Nancy-Université
Université Henri Poincaré

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

Toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

➢ Contact SCD Nancy 1 : theses.sciences@scd.uhp-nancy.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I

ECOLE DOCTORALE SESAMES

THESE

présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

MENTION CHIMIE ET PHYSICO-CHIMIE MOLECULAIRES

par

Liliane MARTINS FERREIRA

Etude des paramètres physico-chimiques impliqués dans les séparations énantiosélectives de xénobiotiques chiraux. Applications en toxicologie clinique et médico-légale

Soutenue publiquement le 18 septembre 2007

Membres du jury

Rapporteurs

Monsieur le Docteur Pascal Kintz, Laboratoire ChemTox de Strasbourg

Monsieur le Docteur Christian Staub, Institut Universitaire de Médecine Légale de Genève

Examinateurs

Monsieur le Professeur Robert Wennig, Laboratoire National de Santé de Luxembourg

Monsieur le Professeur Daniel Canet, Université de Nancy I

Monsieur le Professeur Alain Verstraete, Université de Gent

Monsieur le Professeur Gérald Monard, Université de Nancy I

Vom Himmel fordert er die schönsten Sterne
Und von der Erde jede höchste Lust,
Und alle Näh und alle Ferne
Befriedigt nicht die tiefbewegte Brust“

Faust, *Der Tragödie erster Teil*, Goethe, 1808

Para

Miguel,

minha melhor metade

e

Maria da Piedade e Joaquim,

meus queridos pais

Obrigada por tudo, obrigada por vocês existirem ! Nunca teria ido tão longe se não fossem vocês.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Robert Wennig, chef de la division de Toxicologie du Laboratoire National de Santé du Grand-Duché de Luxembourg, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour avoir dirigé mes recherches. Je lui suis très reconnaissante de la confiance qu'il m'a accordée, ainsi qu'aux moyens qu'il m'a mis à disposition pour la réalisation de ces travaux. Je le remercie aussi pour tous les conseils dont j'ai pu bénéficier et pour m'avoir permis de travailler sur les sujets passionnants de cette thèse. Qu'il soit assuré de ma sincère gratitude.

Je remercie Monsieur le Docteur Michel Yegles, qui m'a guidée et m'a aidée depuis le DEA et pendant ces années de thèse. Ses compétences scientifiques, sa confiance et son soutien m'ont permis de mener à bien cette étude. Il a su me communiquer avec beaucoup d'entrain son savoir-faire et me donner de nombreuses idées. Je voudrais aussi lui exprimer ma très grande reconnaissance pour ses qualités humaines telles sa sympathie, sa simplicité, son humour et sa patience. Je dois beaucoup à sa bonne humeur permanente. Merci aussi d'avoir sauvé le disque dur qui contenait mes résultats de 6 mois de travaux de recherche ! Je n'oublierai pas non plus les longues conversations tranquilles que nous avons eues devant l'électrophorèse capillaire ou le NCI. C'est un vrai plaisir de travailler avec toi Misch!

Je tiens aussi à exprimer mes remerciements à Monsieur le Docteur Guillermo Mulliert Carlín du Laboratoire de Cristallographie et de Modélisation des Matériaux Minéraux et Biologiques de l'Université Henri Poincaré de Nancy, pour m'avoir initiée à la modélisation moléculaire et pour tout l'intérêt qu'il a porté à mon travail. Du premier au dernier jour, il a toujours été présent pour discuter, étudier mes idées, remettre en cause mes expériences et proposer une alternative. Je n'oublierai pas tous les moments de doute où il m'a soutenue et où il a su me redonner confiance en moi (calma y nos amanecemos !)

Je remercie vivement Monsieur le Docteur Pascal Kintz du Laboratoire de développement, d'analyse et d'expertise en Toxicologie (ChemTox) de Strasbourg et Monsieur le Docteur Christian Staub, responsable de l'Unité de Toxicologie de l'Institut Universitaire de Médecine Légale de Genève, qui me font un grand honneur de juger ce travail et d'être les rapporteurs scientifiques de ma thèse.

Je remercie avec le même élan Monsieur le Professeur Daniel Canet, responsable du Laboratoire de Méthodologie en Résonance Magnétique Nucléaire de l'Université Henri Poincaré de Nancy et directeur de l'école doctorale SESAMES, qui me fait l'honneur de participer à ce jury de thèse. C'est grâce à sa détermination, sa force de persuasion et son soutien que j'ai fait cette thèse. Je le remercie particulièrement de m'avoir fait pleurer autant cet après-midi de juillet 2004 et de m'avoir redonné confiance en moi. Je n'oublierai jamais tout l'intérêt qu'il a porté à mon travail.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur le Professeur Alain Verstraete, responsable du Laboratoire de Toxicologie de l'Hôpital Universitaire de Gent et le

Docteur Gérald Monard, Maître de Conférences à l'Université Henri Poincaré de Nancy, pour l'honneur qu'ils me font d'être examinateurs de ce travail.

J'exprime toute ma sympathie à Monsieur le Professeur Bernard Vitoux du Laboratoire de Cristallographie et de Modélisation des Matériaux Minéraux et Biologiques de l'Université Henri Poincaré de Nancy, qui m'a fait découvrir la modélisation moléculaire en DEA et qui m'aidée à réaliser une partie de mon projet de thèse au sein de ce laboratoire. Merci pour la lecture et pour les commentaires relatifs à la préparation de ce manuscrit.

J'exprime toute ma sympathie à Monsieur le Professeur Marc Hébrant du Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement de l'Université Henri Poincaré, pour ses encouragements et ses conseils depuis ces 4 dernières années.

Je remercie aussi particulièrement Agnès Labarthe, technicienne au Laboratoire de Toxicologie, qui, à une époque où elle était très occupée, n'a pas hésité à corriger les fautes de français et les tournures des phrases de ce pavé indigeste.

Je tiens à remercier Claude Schummer, que j'ai surnommé Claudii, avec qui j'ai partagé le bureau pendant cette dernière année. Il a toujours été à mon écoute, notamment lors des préparations des mes conférences orales, il n'a pas hésité à relire mon travail et à y rajouter toutes les virgules. J'espère pouvoir aussi être là pour lui pour sa soutenance (c'est une belle amitié qui a commencé !).

Merci à tous ceux du labo de toxicologie qui, à un moment ou un autre, m'ont prodigué des conseils scientifiques, fourni une aide matérielle et technique, ou tout simplement humaine :

Andrée Ruden, la maman du labo, la seule à avoir eu le privilège de voir mes fesses en l'air au labo lors d'une séance de couture sur mes pantalons, juste après mon petit accident avec une spatule; Dany Ulçün-Weyland, l'artiste cachée du labo, pour son amitié et ses blagues; Estelle Panarotto, Mistinguett, pour les crises de fou rire, sa bonne humeur, son amitié et pour avoir partagé avec moi mes crises de boulimie de chocolat (le chocolat c'est bon pour le moral !); Joelle Stein-Krippes pour ses conseils avisés sur les hommes et son humour; Maria Falco-Schwickerath, la Sicilienne ou encore ma Tata, pour sa gentillesse, sa bonne humeur, ses conseils et son amitié, c'est grâce à Maria que je suis devenue la reine des pizzas (par contre j'attends toujours ma sauce à la tomate fraîche !); Alain Gras, qui par son 1.98 m m'a souvent causé des problèmes de torticolis; Babak Ahani, pour ses friandises sauf pour les graines de café ou les raisins enrobés de chocolat (ils n'étaient pas trop à mon goût, tu as déjà fait mieux!) ; Dr. Brice Appenzeller pour ses conseils; François Meys, mon dealer, qui m'a toujours bien approvisionnée en dérivés amphétaminiques et pour pas cher en plus; Gilbert Asselborn, pour son aide technique, notamment en spectrométrie de masse ; Dr. Marc Schuman, Mister Marki, pour son amitié, sa disponibilité, ses conseils en synthèse chimique, en anglais et ses réponses aux problèmes (Format C !); Patrick Lemmer pour ses conseils au sujet du foot (FC Porto reste quand-même mon équipe favorite!); Dr. Serge Schneider pour ses conseils, son aide technique en spectrométrie de masse notamment et son humour.

Mes derniers mots de remerciement sont adressés aux personnes les plus importantes de ma vie et pour qui j'ai une profonde affection et énormément de respect: mes parents et mon époux.

Maman et papa, vous m'avez toujours encouragée, conseillée et soutenue tout au long de mes études. Je n'oublierai pas toutes ces nuits où vous avez essuyé mes larmes au téléphone (désolé pour les frais de téléphone !). Vous avez toujours su trouver les mots justes pour me réconforter et m'aider à reprendre confiance en moi. Merci du fond du cœur!

Et bien sûr merci à toi, Miguel, de m'avoir permis de vivre ça. Durant toutes ces années, tu as partagé avec moi mes pleures et mes rires. Merci de m'avoir poussée à réfléchir et de m'avoir aidée à trouver des solutions à mes problèmes en me posant des questions bêtes! Merci d'avoir relu cet annuaire téléphonique chinois alors que tu préfères de loin les livres de Mary Higgins Clark. Enfin, je te remercie de me supporter tous les jours, je sais que je suis un tout petit peu impatiente, mais j'espère que j'arrive quand-même à me racheter avec ma bonne cuisine, même si celle-ci n'égale pas celle de ta mère!

Avant propos

Ce travail de thèse a principalement été effectué au Laboratoire National de Santé de Luxembourg, division de Toxicologie, sous la direction de Monsieur le Professeur Robert Wennig.

Les travaux de modélisation moléculaire, décrits dans cette thèse, ont été réalisés au Laboratoire de Cristallographie et de Modélisation des Matériaux Minéraux et Biologiques de l'Université Henri Poincaré de Nancy sous la direction de Monsieur le Docteur Guillermo Mulliert Carlín.

Ces travaux de recherche et la publication de cette thèse ont été financés par le Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche du Grand-Duché de Luxembourg (BFR 04/072) respectivement par le Fonds National de la Recherche du Grand-Duché de Luxembourg.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I. INTRODUCTION 1

1. ETAT DU PHÉNOMÈNE DE LA DROGUE DANS LE MONDE 2
2. GÉNÉRALITÉS SUR QUELQUES STUPÉFIANTS 5
2.1. Les stimulants de type amphétaminique 5
2.1.1. Historique 5
2.1.2. Les échantillons illicites des STA 7
2.1.3. Les propriétés pharmacologiques des STA 8
2.2. La méthadone 11
2.2.1. Origine de la méthadone 11
2.2.2. Généralités sur le traitement à la méthadone 13
2.2.3. Caractéristiques chimiques et pharmacologiques de la méthadone 14
3. DEPISTAGE DES DROGUES DANS LES MATRICES BIOLOGIQUES ALTERNATIVES 16
3.1. Détection de drogues dans les cheveux 16
3.1.1. Structure et mécanisme de croissance des cheveux 16
3.1.2. Mécanisme d'incorporation des drogues dans les cheveux 18
3.1.3. Avantage du dépistage des drogues dans les cheveux 19
3.2. La salive 21
3.2.1. Physiologie de la sécrétion salivaire 21
3.2.2. Mécanisme de transport des xénobiotiques dans la salive 22
3.2.3. Intérêt du dépistage des drogues dans la salive 23
4. SEPARATIONS ENANTIOSELECTIVES DE XENOBIOTIQUES EN TOXICOLOGIE ANALYTIQUE 24
4.1. Séparations énantiosélectives par chromatographie liquide à haute performance 24
4.2. Séparations énantiosélectives par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse 25
4.2.1. Généralités 25
4.2.2. Couplage de la CG à la spectrométrie de masse 25
4.2.3. Dérivation 28
4.2.4. Séparation chirale par CG/SM 29
4.3. Séparations énantiosélectives par électrophorèse capillaire 30
4.3.1. Généralités sur l'électrophorèse capillaire 30
4.3.2. Principe et théorie de l'électrophorèse capillaire 31
4.3.3. Les différentes techniques de séparation en électrophorèse capillaire 34
4.3.4. Séparation d'énantiomères par électrophorèse capillaire 37
4.3.5. Les cyclodextrines 38
4.3.6. Les cyclodextrines en tant que sélecteurs chiraux en électrophorèse capillaire 44
4.4 Applications des séparations énantiosélectives en toxicologie analytique 51
4.4.1. Séparation énantiosélective par CG/SM avec une colonne achirale 52
4.4.2. Dosage des énantiomères des stimulants de type amphétaminique dans les cheveux 53
4.4.3. Séparation énantiosélective par électrophorèse capillaire 55

4.4.4. Dosage énantiosélectif de la MTD et de son métabolite principal l'EDDP dans la salive 58
5. LA MODELISATION MOLECULAIRE 59
5.1. Introduction 59
5.2. Méthodes de calcul en modélisation moléculaire 59
5.3. Le programme AMBER et son champ de force 60
5.4. Les techniques de la modélisation moléculaire 61
5.4.1. Principe de la méthodologie du docking 61
5.4.2. Minimisation de l'énergie 62
5.4.3. Dynamique moléculaire 64
5.5. La modélisation moléculaire comme outil supplémentaire à la mise au point de méthodes de séparation d'énantiomères 64

CHAPITRE II. DOSAGE DES ENANTIOMERES DES STIMULANTS DE TYPE AMPHETAMINIQUE DANS LES CHEVEUX PAR CG/SM-ICN 69

1. OBJECTIFS DE L'ETUDE 70
2. MATERIEL ET METHODES 71
2.1. Réactifs, standards internes, solutions de référence et colonnes d'extraction 71
2.2. Synthèse du (S,R)-HFBOPCl 72
2.3. Préparation des échantillons de cheveux 73
2.3.1. Prélèvement des cheveux 73
2.3.2. Décontamination, hydrolyse et extraction des cheveux 73
2.3.3. Conditions optimales de dérivation chirale des STA par le (S,R)-HFBOPCl 75
2.4. Conditions d'analyse par CG/SM en mode ICN 75
2.5. Dosage des énantiomères des STA 76
2.6. Paramètres de validation de la méthode 77
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION 78
3.1 Synthèse et pureté du (S,R)-HFBOPCl 78
3.2. Mise au point des paramètres expérimentaux de dérivation des STA par le (S,R)-HFBOPCl 78
3.2.1. Influence de la quantité de (S,R)-HFBOPCl 79
3.2.2. Influence du pH du milieu réactionnel 79
3.2.3. Influence du temps de réaction sur le rendement de dérivation 80
3.2.4. Conditions optimales de dérivation des STA 81
3.3 Analyse des spectres de masse et des chromatogrammes des STA obtenus en CG/SM-ICN 81
3.3.1. Spectres de masse des STA-(S,R)-HFBOP 81
3.3.2. Exemple d'un chromatogramme des énantiomères des STA séparés par CG 82
3.3.3. Evaluation de la résolution énantiomérique des STA 84
3.4. Validation de la méthode pour l'analyse de cheveux 84
3.4.1. Mise au point de la méthode d'extraction 84
3.4.2. Droites de calibration et validation de la méthode 86
3.5 Etude de la disposition énantiosélective des STA dans les cheveux d'individus soupçonnés d'avoir consommé des substances illicites 89
3.5.1. Analyse de cheveux non segmentés 89

3.5.2. Analyse segmentaire de la distribution des énantiomères des STA 93
3.5.3. Influence de la décoloration des cheveux sur les rapports énantiomériques des STA 98

CHAPITRE III. MISE AU POINT D'UNE METHODE POUR LE DOSAGE DES ENANTIOMERES DE LA MTD ET DE L'EDDP EXTRAITS DE LA SALIVE 103

1. OBJECTIFS DE L'ETUDE 104
2. MATERIEL ET METHODES 104
2.1 Réactifs, solutions de référence et cyclodextrines 104
2.2 Préparation des solutions électrolytes, des cyclodextrines et des solutions de référence à analyser .. 105
2.2.1. Préparation des électrolytes 105
2.2.2. Préparation des solutions de cyclodextrines 105
2.2.3. Préparation des échantillons à injecter dans l'EC 105
2.3. Préparation des échantillons de salive 106
2.3.1. Collecte et conservation des échantillons de salive 106
2.3.2. Procédure d'extraction de la salive 106
2.4. L'électrophorèse capillaire 106
2.4.1. Instrumentation 106
2.4.2. Conditions optimisées pour les analyses énantiosélectives des échantillons de salive par EC 107
3. RESULTATS ET DISCUSSION 108
3.1. Choix du sélecteur chiral 108
3.1.1. Séparation énantiosélective en présence de la DIMEB 108
3.1.2. Séparation énantiosélective en présence de la HS-β-CD 109
3.1.3. Séparation énantiosélective de la MTD et de l'EDDP par EC en présence de la HS-γ-CD 109
3.2. Influence de certains paramètres expérimentaux sur la séparation chirale de la MTD et de l'EDDP en EC en utilisant la HS-γ-CD 111
3.2.1. Influence du pH de l'électrolyte 111
3.2.2. Influence de la tension appliquée sur les résolutions 112
3.2.3. Influence de la température 113
3.2.4. Influence de la concentration en HS-γ-CD et calcul des constantes apparentes de complexation 113
3.2.5. Paramètres expérimentaux optimisés pour la séparation des énantiomères de la MTD et de l'EDDP par EC 117
3.3. Quantification énantiosélective de la MTD et de l'EDDP dans la salive 117
3.3.1. Choix de la méthode d'extraction 117
3.3.2. Etablissement des droites de calibration et validation de la méthode 119
3.3.3. Etude de cas réels 120

CHAPITRE IV. PREVISION PAR DYNAMIQUE MOLECULAIRE DE LA SELECTION CHIRALE DES CYCLODEXTRINES EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE 124

1. OBJECTIFS DE L'ETUDE 125
2. MATERIEL ET METHODES 126
2.1 Spectroscopie d'absorption dans l'UV 126
2.1.1. Préparation des solutions 126
2.1.2. Conditions opératoires 127

2.1.3. Détermination de la stœchiométrie par la méthode de Job 127
2.2. Modélisation moléculaire *128*
2.2.1. Détermination des charges atomiques avec le programme GAUSSIAN 128
2.2.2. Choix du site de fixation des ligands sur les CDs avec le logiciel DOCK 5.2 134
2.2.3. Paramètres de minimisation et de dynamique moléculaire des systèmes étudiés 134
3. RESULTATS ET DISCUSSION 136
3.1. Etude de la complexation de certains xénobiotiques chiraux avec la DIMEB et la HS-γ-CD par spectroscopie d'absorption dans l'UV *136*
3.2. Positionnement des ligands par rapport aux CDs avec le programme DOCK *137*
3.3. Résultats de la dynamique moléculaire *138*
3.3.1. Evaluation des énergies d'interaction dans le vide avec la DIMEB 138
3.3.2. Evaluation des énergies d'interaction dans le solvant implicite avec la DIMEB 143
3.3.3. Evaluation des énergies d'interaction dans le vide avec la HS-γ-CD 146
3.3.4. Evaluation des énergies d'interaction avec la HS-γ-CD dans le solvant implicite 150
3.4. Comparaison des résultats théoriques avec l'expérience *152*
CHAPITRE V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 154
CHAPITRE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 158
ANNEXES 186
1. Charges atomiques et noms des atomes de la MTD utilisés dans AMBER *187*
2. Charges atomiques et noms des atomes de l'EDDP utilisés dans AMBER *188*
3. Charges atomiques et noms des atomes de la MDA utilisés sous AMBER *189*

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Estimations de l'usage de drogues dans le monde pour la période 2004-2005 2
Figure 2 : Evolution en Europe à long terme (1985-2004) des décès directement liés à la drogue (intoxication aiguë) 4
Figure 3 : Structures chimiques des STA les plus courants 5
Figure 4 : Exemple de comprimés de MDMA vendus sur le marché clandestin 8
Figure 5 : Introduction du traitement de substitution à la méthadone (-) et à la buprénorphine (-) dans les états membres de l'Union européenne. Source : Rapport Annuel 2006 de l'OEDT 12
Figure 6 : Principaux métabolites de la MTD 14
Figure 7 : Schéma simplifié d'un follicule pileux, des glandes associées et du système vasculaire 17
Figure 8 : Coupe latérale d'un cheveu 18
Figure 9 : Exemple d'une acétylation avec Z = N (azote) ou O (oxygène) 28
Figure 10 : Sens de migration des particules en EC 34
Figure 11 : Représentation de la CECM 36
Figure 12 : Electrophorèse capillaire sur gel 36
Figure 13 : Structure des trois cyclodextrines natives 40
Figure 14 : Représentation schématique simplifiée d'une cyclodextrine 40
Figure 15 : Principe de la séparation chirale en EC en présence de CDs 45
Figure 16 : Interaction à trois points entre le ligand et le récepteur selon Ahn (Ahn et al., 2000) 67
Figure 17 : Schéma réactionnel de la synthèse du (S,R)-HFBOPCl 72
Figure 18 : Etude des paramètres expérimentaux de dérivation des énantiomères de la (S)-MDMA et la (R)-MDMA par le (S,R)-HFBOPCl 79
Figure 19 : Spectres de masse SM/ICN mode SCAN de l'AM, l'AM-d_5, la MA, la MA-d_5, la MDA, la MDA-d_5, la MDMA, la MDMA-d_5, la MDEA et la MDEA-d_5 après dérivation par le (S,R)-HFPOPCl 82
Figure 20 : Chromatogramme d'un mélange de STA séparés sous forme de diastéréoisomères après dérivation avec le (S,R)-HFBOPCl 83
Figure 21 : Chromatogramme de l'échantillon de cheveux de l'individu 11 testé positif à la (S)-MA et à la (S)-AM 90
Figure 22 : Cheveux de l'individu 24 testé positif aux énantiomères (R) et (S) de la MA, la MDMA et son métabolite la MDA 92
Figure 23. Distribution des énantiomères (R) et (S) de la MDA, la MDMA et de l'AM après une analyse segmentaire différente de l'échantillon 1 98
Figure 24. Chromatogramme de l'échantillon de cheveux non traité de l'individu 7 102
Figure 25 : Electrophérogramme d'une solution racémique de MTD et EDDP après séparation chirale en présence de DIMEB 1mM 108
Figure 26 : Electrophérogramme des énantiomères de la MTD et de l'EDDP séparés en présence de HS-γ-CD 0,2% (w/v) 110
Figure 27 : Influence du pH sur la résolution des énantiomères de la MTD et de l'EDDP 111

Figure 28 : Influence du voltage sur la résolution des énantiomères de la MTD et de l'EDDP 112
Figure 29 : Influence de la concentration en HS-γ-CD (%, w/v) sur la mobilité des énantiomères de la MTD et de l'EDDP..... 114
Figure 30 : Influence de la concentration en HS-γ-CD sur la résolution des énantiomères de la MTD et de l'EDDP 115
Figure 31 : Détermination des constantes apparentes de complexation K par la méthode graphique inversée en x (équation 29)..... 116
Figure 32 : Electrophérogramme de l'échantillon de salive n°7 testé positif aux énantiomères de la MTD et de l'EDDP 122
Figure 33 : Exemple d'une représentation du fragment composé de 3 unités de glucose du DIMEB et utilisé pour le calcul des charges..... 130
Figure 34 : Noms des atomes des résidus utilisés sous AMBER pour le DIMEB (A) et la HS-γ-CD (B) 131
Figure 35 : Représentation de la structure de l'AM et des noms utilisés..... 133
Figure 36 : Diagramme de Job obtenu dans le cas de la (R)-MTD avec (a) la DIMEB et (b) la HS-γ-CD 136
Figure 37 : Illustrations des structures des complexes (R)-EDDP-DIMEB (A) et (R)-EDDP-HS-γ-CD (B). Les différentes couleurs correspondent à la position finale de la (R)-EDDP à l'intérieur de la CD..... 138
Figure 38 : Structure des complexes (S)-AM-DIMEB et (R)-MTD-DIMEB après la dynamique moléculaire... 139
Figure 39 : Evolution de la position de la (S)-AM à l'intérieur de la cavité de la DIMEB au cours de la dynamique moléculaire..... 139
Figure 40 : Evolution de la (S)-MTD à l'intérieur de la cavité de la HS-γ-CD au cours de la dynamique moléculaire dans le vide 146
Figure 41. Structure des complexes (R)-MDA-DIMEB et (S)-EDDP-DIMEB après la dynamique moléculaire 147

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Comparaison des fenêtres de détection des xénobiotiques dans les différentes matrices biologiques 20
Tableau 2. Principales propriétés physico-chimiques des CDs natives (Szejtli, 1998) 41
Tableau 3. Résumé des méthodes graphiques permettant de déterminer la constante de formation de complexes K par EC (Rundlett et al., 1997) 50
Tableau 4. Valeurs de m/z choisies pour la détection des STA en SM-ICN-SIM 76
Tableau 5. Comparaison des résolutions entre les pics diastéréoisomériques des STA obtenus après dérivation par le (S)-HFBPCl et par le (S,R)-HFBOPCl 84
Tableau 6. LODs des énantiomères d'AM, MA, MDA, MDMA et MDEA extraits de cheveux par les colonnes Clean Screen et Chromabond 85
Tableau 7. Calibration, limites de détection et de quantification 86
Tableau 8. Rendements d'extraction de la méthode Clean Screen pour les cheveux dopés à différentes concentrations de STA (n=5) 87
Tableau 9. Répétabilités et justesses intra- jour (n=10) et inter-jour (n=5) 88
Tableau 10. Concentrations et rapports R/S de cheveux testés positifs (sujets 1-23) à l'AM et la MA après analyse par CG/SM-ICN 89
Tableau 11. Echantillon de cheveux du spécimen 24 testé positif aux énantiomères de la MA, la MDA et la MDMA 91
Tableau 12. Descriptif de l'administration contrôlée de MDMA et d'alcool 93
Tableau 13. Concentrations des énantiomères des STA détectés au cours de l'analyse segmentaire de cheveux de 14 individus 95
Tableau 14. Rapports énantiomériques R/S de la MDA, la MDMA et AM déterminés pendant l'analyse segmentaire 96
Tableau 15. Concentrations et valeurs R/S de l'AM, la MDA et de la MDMA après une analyse segmentaire de 1 et/ou de 2 cm chez l'individu 1 97
Tableau 16. Concentrations et rapports R/S des STA dans les cheveux 100
Tableau 17. Constantes apparentes de complexation K des énantiomères de la MTD et de l'EDDP avec la HS-γ-CD déterminées par EC. 116
Tableau 18. Rendements d'extraction et LODs de la MTD et de l'EDDP après différents modes d'extraction 117
Tableau 19. Paramètres des droites de calibration, limites de détection et de quantification des énantiomères de la MTD et de l'EDDP 119
Tableau 20. Rendements d'extraction de la MTD et de l'EDDP 120
Tableau 21. Répétabilité et justesse de la méthode 120
Tableau 22. Concentration des énantiomères de la MTD et de son métabolite EDDP dans la salive de patients participant à un programme de substitution par la méthadone 121
Tableau 23. Rapports molaires et concentrations totales des espèces dans le cas de l'étude du complexe (R)-MTD-DIMEB 126

Tableau 24. Charges atomiques pour un résidu de la DIMEB *131*
Tableau 25. Charges atomiques pour un résidu de la HS-γ-CD *131*
Tableau 26. Charges atomiques de l'AM utilisées pour AMBER *133*
Tableau 27. Energies d'interaction (kcal/mol) des ligands chiraux avec la DIMEB dans le vide *140*
Tableau 28. Contribution des énergies non-covalentes lors de la complexation avec la DIMEB *141*
Tableau 29. Représentation en pourcentages (> 10%) des liaisons hydrogènes présentes dans le complexe (R)-MTD-DIMEB et (S)-MTD-DIMEB *142*
Tableau 30. Représentation en pourcentages (> 10%) des liaisons hydrogènes présentes dans le complexe (R)-AM-DIMEB et (S)-AM-DIMEB *143*
Tableau 31. Energies d'interaction (kcal/mol) de la (R)-AM- et de la (S)-AM avec la DIMEB dans le solvant implicite *144*
Tableau 32. Energies d'interaction (kcal/mol) de la (R)-MTD- et la (S)-MTD avec la DIMEB dans le solvant implicite *144*
Tableau 33. Energies d'interaction (kcal/mol) de la (R)-EDDP et de la (S)-EDDP-DIMEB dans le solvant implicite *145*
Tableau 34. Energies d'interaction (kcal/mol) des ligands chiraux avec la HS-γ-CD *148*
Tableau 35. Contribution des énergies non-covalentes pour le cas de la HS-γ-CD *148*
Tableau 36. Représentation en pourcentages (>10%) des liaisons H présentes dans le complexe (R)-MTD-HS-γ-CD et (S)-MTD- HS-γ-CD *149*
Tableau 37. Représentation en pourcentages (> 10%) des liaisons H présentes dans le complexe (R)-AM-HS-γ-CD et (S)-AM- HS-γ-CD *149*
Tableau 38. Energies d'interaction (kcal/mol) de la (R)-AM et de la (S)-AM avec la HS-γ-CD dans le solvant implicite *150*
Tableau 39. Energies d'interaction (kcal/mol) de la (R)-EDDP et de la (S)-EDDP avec la HS-γ-CD dans le solvant implicite *150*
Tableau 40. Energies d'interaction (kcal/mol) de la (R)-MTD et de la (S)-MTD avec la HS-γ-CD dans le solvant implicite *151*
Tableau 41. Comparaison des ordres de migration observés en EC en présence de la DIMEB avec les résultats de la modélisation moléculaire *152*
Tableau 42. Comparaison des ordres de migration des énantiomères obtenus en EC en présence de la HS-γ-CD avec les résultats de la modélisation moléculaire *153*

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SYMBOLES

AGP phase de silice greffée par des groupements d'acides α-glycoprotéiques

AM amphétamine

CD cyclodextrine

CE capture d'électrons

CEC électrochromatographie

CED capture d'électrons dissociative

CECM électrophorèse capillaire de type micellaire

CG chromatographie en phase gazeuse

CG/SM-ICN chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse en mode ionisation chimique négative

CLHP chromatographie liquide à haute performance

CM-β-CD carboxy-méthyl-β-cyclodextrine

CV coefficient de variation

de excès diastéréoisomérique

DIMEB heptakis-2,6-di-*O*-méthyl-β-cyclodextrine

DM dynamique moléculaire

DS degré de substitution moyen

EC électrophorèse capillaire

ECG électrophorèse capillaire sur gel

ECZ électrophorèse capillaire de zone

EC/UV électrophorèse capillaire couplée à un détecteur UV

EDDP 2-éthylidène-1,5-diméthyl-3,3-diphénylpyrrolidine

EDMP 2-éthyl-5-méthyl-3,3-diphénylpyrroline

E_{elec} énergie électrostatique

EI ionisation à impact électronique

EOF flux électroosmotique

Ep_{com} énergie potentielle totale du complexe

$\Delta Ep_{interaction}$ énergie potentielle d'interaction

Ep_{ligand} énergie potentielle du ligand

Ep_t énergie potentielle totale

ESI	électrospray
ESP	potentiel électrostatique
E_{vW}	énergie de van der Waals
EZHP	électrophorèse de zone à haute performance
FPI	formation de paires ioniques
HF	théorie Hartree-Fock
HFBA	anhydride d'acide heptafluorobutanoïque
HP-β-CD	hydroxylpropyl-β-cyclodextrine
HS-β-CD	β-cyclodextrine hautement sulfatée
HS-γ-CD	γ-cyclodextrine hautement sulfatée
K	constante de formation de complexes
ICN	ionisation chimique négative
ID	diamètre interne
IEF	isoélectrofocalisation capillaire
IS	étalon interne
ITP	isotachophorèse
l	longueur effective du capillaire
ICN	ionisation chimique négative
LLOQ	limite de quantification (lowest limit of quantification)
LOD	limite de détection
L_{tot}	longueur totale du capillaire
l-TPC	chlorure de *N*-trifluoroacétyl-*l*-prolyle
m/z	rapport masse sur charge
MA	méthamphétamine
MCF	1*R*,2*S*,5*R*-(-)-menthylchloroformiate
MDA	3,4-méthylènedioxyamphétamine
MDEA	3,4-méthylènedioxyéthylamphétamine
MDMA	3,4-méthylènedioxyméthamphétamine
MM-PBSA	Molecular Mechanics_Poisson Boltzmann Surface Area
MTD	méthadone
MTPCl	*R*-(-)-α-méthoxy-α-tri-fluorométhylphényl de propanoyle ou réactif de Mosher
PCI	ionisation chimique positive

PEA	phényléthylamine
RESP	potentiel électrostatique restreint
RMN	résonance magnétique nucléaire
Rs	résolution
R/*S*	rapport énantiomérique *R*/*S*
s	écart-type
S	ligand (substrat)
SNC	système nerveux central
(*S*)-HFBPCl	chlorure de (*S*)-heptafluorobutérylprolyle
(S,*R*)-HFBOPCl	chlorure de (2*S*,4*R*)-4-heptafluorobutoyloxy-*N*-heptafluorobutyryl-prolyle
SIM	détection d'ions sélectionnés (selected ion monitoring)
SM	spectrométrie de masse
STA	stimulants de type amphétaminique
TBCD	2,3-di-*O*-méthyl-6-(*O*-terbutyldiméthyl-silyl)-β-cyclodextrine
TM-β-CD	heptakis-2,3,6-triméthyl-β-cyclodextrine
μ_{ap}	mobilité apparente
μ_{EP}	flux électrophorétique
μ_{EOF}	flux électroosmotique
μ_c	mobilité du ligand sous forme complexée
μ_l	mobilité du ligand sous forme libre
UV	ultra-violet
v_{EP}	vitesse électrophorétique
v_{EOF}	vitesse électroosmotique

Chapitre I. Introduction

1. Etat du phénomène de la drogue dans le monde

A l'échelle mondiale, on estime le nombre global de consommateurs de drogues à quelques 200 millions de personnes (4,9% de la population mondiale, âgée entre 15 et 64 ans) en 2004-2005. Le cannabis reste de loin la drogue la plus répandue (72% des drogues consommées), suivi des stimulants de type amphétaminique comprenant les amphétamines (11%) et l'ecstasy (4%) (Figure 1). Parmi les consommateurs d'opiacés (7% au total), 5% sont des consommateurs d'héroïne. Les données statistiques révèlent aussi que 6% ont consommé de la cocaïne.

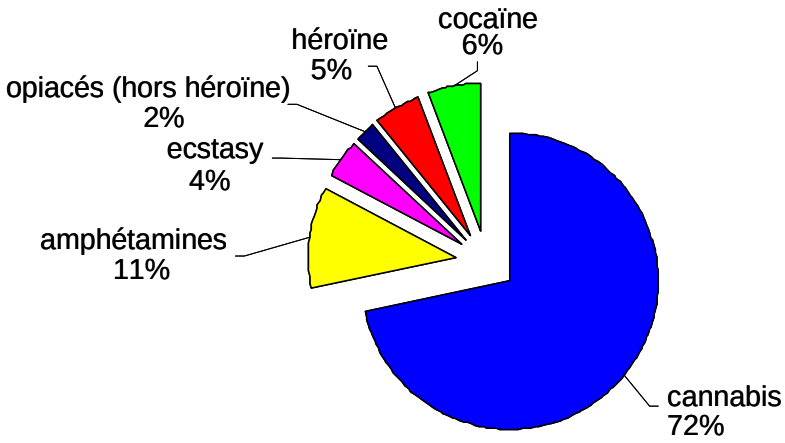


Figure 1 : Estimations de l'usage de drogues dans le monde pour la période 2004-2005
Données statistiques issues du rapport « World Drug Report 2006 » des Nations Unies-Office des drogues et des crimes (UNODC, 2006)

Au cours de la dernière décennie, des augmentations concernant l'abus de drogues ont concerné non seulement le cannabis, mais aussi les stimulants de type amphétaminique, la cocaïne et les opiacés.

Le cannabis demeure la drogue illicite la plus produite et la plus sujette au trafic dans le monde (OEDT, 2006; UNODC, 2006). La production à grande échelle de résine de cannabis est concentrée dans quelques pays tels que le Maroc, le Pakistan ou encore l'Afghanistan. Une grande partie de la résine de cannabis vendue sur le marché noir européen provient du Maroc via la péninsule Ibérique. Les Pays-Bas sont aussi centre de distribution important de cannabis. La consommation de cannabis a nettement augmenté ces dernières années, notamment chez les jeunes.

En Europe, 3 à 44% de jeunes âgés entre 15 et 24 ans déclarent avoir consommé du cannabis au cours de l'année 2004.

Dans l'ensemble, la méthamphétamine, l'amphétamine et l'ecstasy représentent les drogues de synthèse les plus courantes. La production de ces stimulants s'est avérée difficile à quantifier, parce qu'elle se fait en grande partie à partir de produits chimiques courants dans des laboratoires clandestins. Néanmoins, les études montrent que la production mondiale d'amphétamine et d'ecstasy est surtout concentrée en Europe occidentale (Pays-Bas, Belgique) et Europe centrale (Bulgarie, République tchèque), alors que la méthamphétamine est surtout fabriquée en Asie de l'Est et du Sud-Est (Chine, Philippines, Thaïlande), suivie de l'Amérique du Nord et de l'Amérique centrale. L'augmentation de la consommation de ces stimulants, surtout chez les jeunes, est devenue très préoccupante au vu des graves problèmes de santé qui y sont associés. On observe une nette prévalence de la consommation d'ecstasy en Europe (> 40% des consommateurs mondiaux) alors que les pays asiatiques connaissent surtout un usage illégal de méthamphétamine (60 % de la consommation mondiale totale).

La vente de cocaïne représente le commerce illicite le plus intense dans le monde entier, suivi de celui de l'herbe et de la résine de cannabis. La Colombie, de est de loin le premier producteur mondial (54%) de feuilles de coca, suivi du Pérou et de la Bolivie. La vente de cocaïne se fait essentiellement en Amérique du Nord en Europe centrale et en Europe occidentale. Les niveaux de consommation mondiale de cocaïne montrent une stabilisation globale, même si ces dernières années, certaines données (indicateurs de marché, nombre de décès par exemple) évoquent la possibilité d'un usage croissant en Europe.

L'héroïne vendue sur le marché se présente sous deux formes : l'héroïne brune, qui est la plus courante, et l'héroïne blanche (un chlorhydrate) moins courante et généralement plus chère. L'Afghanistan est le premier cultivateur mondial de pavot (89%) suivi du Myanmar et du Laos. En 2005, 0,4% de la population mondiale âgée de 15 à 64 ans, a régulièrement consommé des opiacés. Parmi cette population 0,3% a pris de l'héroïne. Le nombre important de demandes de traitement de dépendance aux opiacés (59 à 65% des demandes mondiales en 2004) a clairement montré que l'héroïne est la drogue qui pose le plus de problèmes.

En ce qui concerne les décès liés à l'abus de drogues, les données disponibles pour l'Union européenne montrent certaines tendances ces vingt dernières années (OEDT, 2006) (Figure 2) : une augmentation importante du nombre de décès a été observée durant les années 80 et au début des années 90. Cette tendance a persisté jusqu'en 2000. Dès lors, bon nombre de pays européens ont observé une diminution générale de décès liés à une surdose, qui serait due à une augmentation de la disponibilité des traitements (exemple traitement par la méthadone) et des initiatives de réduction des risques. Cependant depuis l'année 2004, les pays de l'Union européenne ont observé de nouveau une hausse d'environ 3% pour les décès liés à la drogue.



Figure 2 : Evolution en Europe à long terme (1985-2004) des décès directement liés à la drogue (intoxication aiguë)

Il est important de noter que l'usage des drogues se diversifie constamment. Ainsi, ces dernières années, des problèmes de polytoxicomanie (association de plusieurs substances psycho-actives) y compris un chevauchement considérable de problèmes de drogues et d'alcool se sont multipliés progressivement.

2. Généralités sur quelques stupéfiants

2.1. Les stimulants de type amphétaminique

2.1.1. Historique

Dans beaucoup de pays européens, les drogues de synthèse sont, après le cannabis, les substances illicites les plus consommées. Le terme « drogues de synthèse » (de l'anglais « *designer drugs* ») se réfère à des substances psychotropes synthétisées artificiellement contrairement aux drogues d'origine végétale (cannabis, opium, cocaïne) ou aux drogues semi-synthétiques (héroïne). Parmi les drogues de synthèse les plus répandues, on compte l'amphétamine (AM) et ses dérivés tels que la méthamphétamine (MA), la 3,4-méthylènedioxyamphétamine (MDA), la 3,4-méthylènedioxyéthylamphétamine (MDEA) et la 3,4-méthylènedioxyméthamphétamine (MDMA), plus connue sous le nom d'ecstasy (Figure 3).

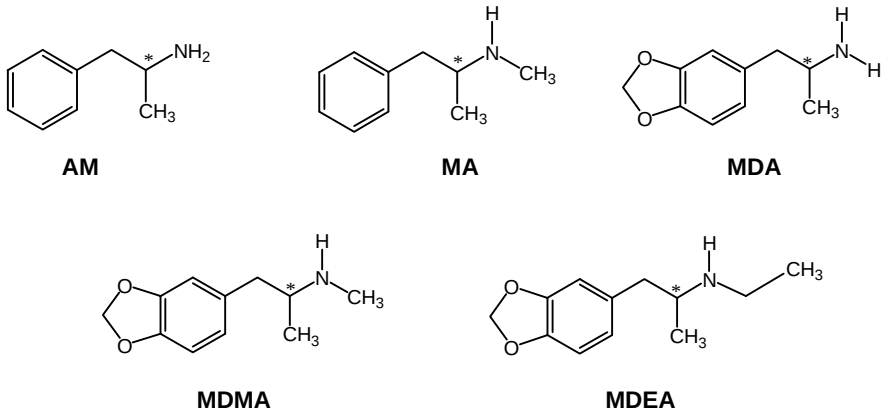


Figure 3 : Structures chimiques des STA les plus courants

Le précurseur des stimulants de type amphétaminique (STA) est l'éphédrine, un alcaloïde extrait de *l'Ephedra vulgaris* ('Ma-Huang'), une plante utilisée depuis de millénaires en Chine (De la Torre *et al.*, 2004). La première synthèse de l'AM a été réalisée en 1887 par le chimiste allemand Edeleano à l'université de Berlin (Edeleano, 1887). C'est seulement dans les années 1920, que cette molécule a été redécouverte. Depuis 1935, l'AM est utilisée dans certains traitements médicaux

notamment pour la décongestion nasale, contre l'obésité, contre la narcolepsie ou encore contre l'hypotension.

La MA a été obtenue pour la première fois au Japon en 1919 par Akira Ogata. Elle présentait les mêmes caractéristiques que l'AM, mais les effets étaient plus forts. L'AM et la MA furent rapidement détournées de leurs usages thérapeutiques et la vente illicite de ces substances s'est rapidement répandue. Leur pouvoir psychostimulant a notamment été utilisé pendant la deuxième guerre mondiale par les soldats (exemple soldats kamikazes japonais) et les ouvriers de l'industrie de l'armement pour combattre la fatigue. Même Adolf Hitler se serait injecté, à partir de 1942, régulièrement de la MA, commercialisée alors à l'époque sous le nom de Pervitin. D'autres abus ont été observés dans les années soixante chez les étudiants en période d'examen pour se passer de sommeil et pour travailler plus vite.

La synthèse du premier dérivé du groupe des méthylènedioxyamphétamines, à savoir la MDA, date de 1910 et résulte des travaux de C. Mannich et W. Jacobsohn (Pentney, 2001). Des propriétés antitussives et anorectiques ont été attribuées à la MDA, mais elle n'apparût jamais dans le commerce.

L'origine de la MDMA apparaît assez controversée dans la littérature. Selon certains auteurs, la MDMA aurait été obtenue en 1891 par l'allemand F. Haber (prix Nobel de Chimie en 1919 pour ses travaux sur la synthèse de l'ammoniac), alors qu'il travaillait sur des dérivés du pipéronal, molécule de base dans la synthèse de la MDMA (Haber, 1891). Cependant ses notes ne contiendraient pas les structures exactes qu'il aurait obtenues ni le nom de MDMA. Selon la société Merck, la première synthèse de la MDMA a été réalisée en 1912 par A. Köllisch, lorsqu'il travaillait sur la synthèse de l'hydrastinine (vasoconstricteur). Un brevet sur la MDMA en tant que coupe-faim fut finalement déposé en 1914 par Merck, mais elle ne fut jamais mise en vente. En revanche, le gouvernement des États-Unis réalisa au cours des années 1960 des expériences sur la MDMA et la MDA dans le cadre du développement de guerres chimiques. La première application thérapeutique de la MDMA date des années 1970 au cours desquelles les psychiatres administraient la MDMA à leurs patients au cours des thérapies psychédéliques afin de favoriser la communication.

La MDEA, quant à elle, n'est apparue que beaucoup plus tard. Alexander T. Shulgin a mentionné pour la première fois la MDEA dans ses publications à la fin des années 1970 (Braun *et al.*, 1980; Shulgin *et al.*, 1991).

Les premiers STA sont apparus dès les années 50 sur le marché illicite. Devant le développement de la toxicomanie aux STA, les graves problèmes de santé, voire même des décès liés à l'abus des STA, et le marché clandestin des STA grandissant, les STA (incluant l'AM, la MA, la MDA et la MDMA) ont été placés dès 1971 par les Nations Unies sur la liste des psychotropes, placés sous contrôle international (convention unique sur les psychotropes de 1971, tableaux I et II) (De la Torre *et al.*, 2004). La MDEA a été rajoutée par de nombreux pays à la liste des stupéfiants dès la fin des années 1980 (Freudenmann *et al.*, 2004).

Par ailleurs, 14 médicaments, qui contiennent de l'AM, de la MA ou bien qui sont métabolisés en l'une de ces deux substances sont actuellement (Kraemer *et al.*, 2002). Cependant leur usage est exclusivement destiné au traitement de problèmes de santé spécifiques, comme par exemple le traitement contre l'excès de poids, la narcolepsie, le traitement de la maladie de Parkinson ou encore l'hyperactivité infantile.

2.1.2. Les échantillons illicites des STA

L'ecstasy (MDMA) fait actuellement partie des drogues les plus couramment consommées dans les sociétés occidentales dans des contextes festifs (discothèques, raves, festivals de musiques,..). Dans les pays asiatiques, surtout en Thaïlande, c'est le Yaba (MA), qui a le plus de succès auprès des consommateurs. Nombreux sont aussi ceux qui ont régulièrement recours aux STA afin d'améliorer leurs performances dans le cadre d'une compétition sportive ou bien dans le cadre de leur travail.

Les STA vendus sur le marché parallèle proviennent de nombreux laboratoires clandestins, qui les fabriquent par transformation de médicaments ou à partir d'autres substances chimiques facilement disponibles dans le commerce. Ils se présentent généralement sous forme de poudre ou de petits comprimés avec des formes, des couleurs et des noms différents (Figure 4). La prise de STA se fait généralement par voie orale, mais les consommateurs peuvent aussi recourir à l'inhalation ou à l'injection par voie intraveineuse (cas de la MA).



Figure 4 : Exemple de comprimés de MDMA vendus sur le marché clandestin

Selon une étude menée par l'Observatoire européen de la drogue et de la toxicomanie sur la teneur des dérivés amphétaminiques saisis au cours de l'année 2004, les analyses ont révélé que la teneur moyenne variait entre 5 et 44% pour l'AM, 43 et 50% pour la MA (OEDT, 2006). Pour les comprimés d'ecstasy, la teneur en MDMA variait considérablement selon les lots, même parmi ceux qui portaient le même logo. De même, les tests réalisés sur les saisies démontrent encore souvent la présence d'un mélange de STA (MDMA et MDA par exemple) et d'autres composés à activité pharmacologique tels que la caféine ou la kétamine (hallucinogène), fréquemment utilisées en tant qu'agent de coupe (Liau *et al.*, 2003; Parrot, 2004). En outre, comme les dérivés amphétaminiques peuvent être obtenus à partir de diverses synthèses chimiques, les comprimés ou les poudres vendues illicitement renferment encore souvent des précurseurs de la synthèse, comme l'éphédrine ou la phénylacétone, qui sont les précurseurs majeurs de la MA (Lurie *et al.*, 2000; Nagai *et al.*, 2000), et le safrole, la 3,4-méthylène-dioxyphényl-2-propanone ou le pipéronal, qui interviennent dans fabrication de la MDMA, de la MDEA et de la MDA (Cheng *et al.*, 2003; Swist *et al.*, 2005).

2.1.3. Les propriétés pharmacologiques des STA

Les STA sont des produits stimulants du système nerveux central (SNC). L'AM et la MA sont plutôt considérées comme des stimulants simples, alors que la MDA, la MDMA et la MDEA ont des effets stimulants et entactogènes. Les STA sont chimiquement proches des catécholamines comme l'adrénaline et la noradrénaline. Après administration, les STA pénètrent facilement dans le SNC par le passage à travers la barrière hémato-encéphalique. Les STA exercent une action pharmacologique singulière, essentiellement centrée sur les synapses des neurones

provocant une libération de l'adrénaline, la noradrénaline et la sérotonine au niveau du SNC et du système nerveux périphérique (De la Torre *et al.*, 2004). L'activité des neurones est complètement altérée à la suite de l'épuisement des stocks de ses neuromédiateurs. Les STA sont neurotoxiques à haute dose et peuvent entraîner des dommages irréversibles (Kalant, 2001; Baselt, 2006), voire même entraîner la mort d'un individu (Dowling *et al.*, 1987; Henry *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 1997). Une dépendance psychique est observée chez les usagers des STA, mais comme les effets désirés diminuent rapidement avec des consommations régulières, un passage à la polytoxicomanie est souvent observé.

La métabolisation des STA se fait principalement par l'intermédiaire des cytochromes P450 (CYP2D6, CYP1A2,…) majoritairement localisés au niveau du foie (Maurer *et al.*, 2004; Pizarro *et al.*, 2004). Certains des métabolites sont eux-mêmes biologiquement actifs et neurotoxiques. Ainsi, la MDA est formée après *N*-déalkylation de la MDMA et de la MDEA, tandis que l'AM apparaît dans le corps après *N*-déméthylation de la MA (Kraemer *et al.*, 2002; Freudenmann *et al.*, 2004). Les autres métabolites, résultant d'autres transformations chimiques comme des réactions de *O*-déméthylénation, n'ont quant à eux pas d'activité pharmacologique.

Les STA présentent des structures semblables à celle de la phényléthylamine. Elles contiennent toutes un carbone asymétrique, ce qui implique que les STA existent sous forme d'énantiomères (*S*) et (*R*).

De ce fait, les énantiomères, de par leur différence de configuration, ont des propriétés pharmacologiques différentes. La (*S*)-AM par exemple, est un stimulant du SNC 3 à 4 fois plus puissant que la (*R*)-AM (Musshoff, 2000; De la Torre *et al.*, 2004). La demi-vie plasmatique de l'AM varie entre 8 et 13 heures et elle est fonction de l'isomère optique. Ainsi la demi-vie de la (*R*)-AM est 39% plus longue que celle de son antipode.

En ce qui concerne la MA, l'énantiomère (*S*) est un stimulant du SNC plus puissant que la (*R*)-MA, ce dernier possédant plutôt une action périphérique plus importante. La (*S*)-MA est métabolisée plus rapidement en (*S*)-AM, ce qui se traduit par une demi-vie plasmatique plus courte (±13 heures) par rapport à celle de son antipode (±19 heures) (Cody *et al.*, 1993).

La MDMA et la MDEA ont des effets sur le SNC identiques, sauf que la MDEA est moins neurotoxique que la MDMA (Spitzer *et al.*, 2001; Freudenmann *et al.*, 2004).

Les énantiomères (*S*) de la MDMA et de la MDEA sont plus neurotoxiques que les formes (*R*). La métabolisation est stéréosélective avec un temps de demi-vie plasmatique plus long pour les formes (*R*) de la MDMA et de la MDEA (Benazzi *et al.*, 1991; Spitzer *et al.*, 2001; Pizarro *et al.*, 2003).

Dans le cas de la MDA, les deux isomères optiques causent des effets neurotoxiques à long terme, la (*R*)-MDA ayant un effet plus hallucinogène et la (*S*)-MDA se comportant plus comme l'AM (Schmidt, 1987; Benazzi *et al.*, 1991).

La MDA, la MDMA et la MDEA sont généralement obtenues sous forme racémique sur le marché illicite (Fallon *et al.*, 1999; Freudenmann *et al.*, 2004). En revanche l'AM et la MA sont vendues sous forme d'un seul énantiomère ou bien sous forme de mélanges racémiques (Lurie *et al.*, 2000; Nagai *et al.*, 2000). En effet, la MA peut être synthétisée sous forme racémique en partant de la phénylacétone ou bien peut être obtenue sous forme de (*S*)-MA en prenant la (*S*)-éphédrine comme précurseur de synthèse.

Parmi les 14 médicaments précurseurs ou à base de MA et/ou d'AM, on trouve la sélégiline, qui est utilisée pour le traitement de la maladie de Parkinson et qui se métabolise en (*R*)-MA puis en (*R*)-AM (Musshoff, 2000; Kraemer *et al.*, 2002). La dextroamphétamine, à base de (*S*)-AM, est souvent utilisée dans les traitements contre les déficits de l'attention (hyperactivité) ou la narcolepsie (Nyström *et al.*, 2005). Le fenproporex, un coupe-faim, est transformé par les cytochromes en (*R*)- et (*S*)-AM (Cody *et al.*, 1999).

La métabolisation des STA conduit à une accumulation stéréosélective de ces derniers dans les tissus biologiques humains. En effet, après consommation de STA racémiques, des études pharmacologiques ont montré un excès énantiomérique de la (*R*)-AM, de la (*R*)-MA, de la (*R*)-MDMA et de la (*R*)-MDEA dans les matrices telles que l'urine (De Boer *et al.*, 1997; Hensley *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000), le sang (Fallon *et al.*, 1999; Spitzer *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2003a), la salive (Peters *et al.*, 2003b; Peters *et al.*, 2007), l'humeur vitrée ou encore les tissus du foie et de la bile (Moore *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 1997).

Cependant, jusqu'à ce jour, aucune donnée ne figure dans la littérature sur la disposition des énantiomères de la MDA dans les matrices biologiques humaines après une consommation de MDA racémique uniquement. La raison en est qu'on ne trouve généralement pas que de la MDA dans les saisies, mais plutôt des mélanges

de MDA et de MDMA. En conséquence, la métabolisation stéréosélective touche à la fois les énantiomères de la MDA issus du mélange initial et ceux provenant de la métabolisation de la MDMA. Certains chercheurs ont observé dans les urines et dans le sang d'individus ayant consommé de la MDMA ou de la MDEA, une prévalence de la (*S*)-MDA pendant les premières 24 h. (Fallon *et al.*, 1999; Hensley *et al.*, 1999). Or, d'après d'autres études pharmacocinétiques, des concentrations équivalentes des énantiomères de la MDA voire même une prédominance de la (*R*)-MDA ont pu être observées dans l'urine et le sang humain, 36 heures après consommation de MDMA (ou MDEA) racémique (Hensley *et al.*, 1999; Buechler *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2003a; Pizarro *et al.*, 2004).

2.2. La méthadone

2.2.1. Origine de la méthadone

La méthadone (MTD) est un opioïde analgésique synthétisé en 1939 par les scientifiques M. Bockmühl et G. Ehrhart au laboratoire de I.G. Farben de Hoechst en Allemagne (Gouldin *et al.*, 2000; Baselt, 2006). La synthèse de la MTD a été mise au point pendant la Deuxième Guerre Mondiale pour pallier la pénurie de la morphine, principalement utilisée pour calmer la douleur des blessés. Dès 1947, la MTD a été commercialisée par la compagnie Eli-Lilly aux Etats-Unis sous le nom de « Dolophine ». Les recherches cliniques ont démontré que la MTD avait des effets semblables à ceux de la morphine, mais que sa durée d'action (effets analgésiques) était plus longue. En 1965, les docteurs Dole et Nyswander ont étudié les mécanismes d'action et l'impact thérapeutique chez les héroïnomanes en leur administrant quotidiennement des doses de MTD. A l'époque, l'héroïnomanie était en pleine expansion aux Etats-Unis, propageant les hépatites virales et augmentant le nombre de cas d'overdose. Très vite, le traitement à la MTD a contribué à la réduction de la consommation d'héroïne, à la limitation de la diffusion des maladies (hépatites, etc) ou encore à la baisse des activités criminelles. Finalement, le traitement du syndrome de sevrage aux opiacés par la MTD s'est rapidement répandu dans le monde entier (Alburges *et al.*, 1996; Baselt, 2006). Le programme de substitution à la MTD a été lancé en Europe par la Suède dès 1967, mais son administration est restée limitée pendant de nombreuses années (OEDT, 2006). Or,

face à l'expansion des problèmes liés à l'héroïne, les pays européens ont finalement reconnus la nécessité et les bénéfices de traitements de substitution par la MTD pour la stabilisation et la santé des usagers d'opiacés.

À la fin des années 1980, la vitesse d'introduction du traitement à la MTD en tant que modalité de traitement s'est accélérée en Europe (Figure 5). Aujourd'hui le programme d'entretien à long terme à la MTD est devenu la principale action de santé publique pour le traitement de l'héroïnomanie.

Cependant, la MTD est une substance contrôlée en vertu de l'annexe I de la convention de 1961 des Nations Unies sur les drogues narcotiques. Les niveaux de consommation sont annuellement contrôlés par l'Organe International de Contrôle des Stupéfiants.

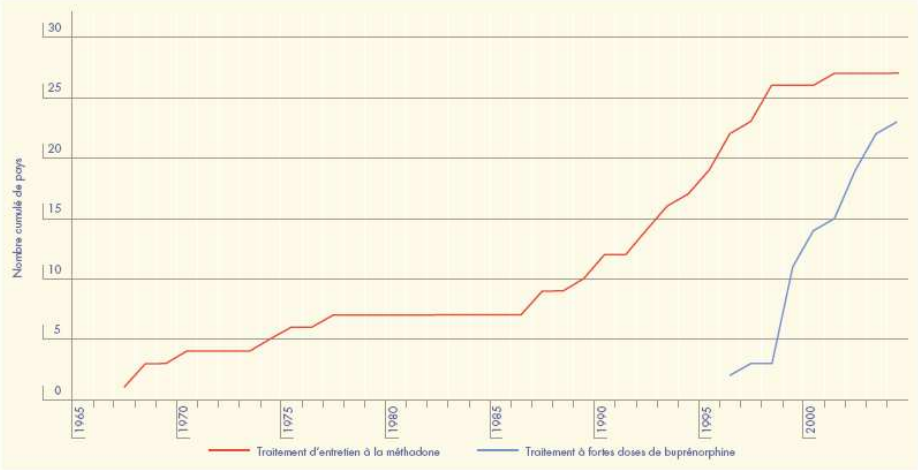


Figure 5 : Introduction du traitement de substitution à la méthadone (-) et à la buprénorphine (-) dans les états membres de l'Union européenne. *Source : Rapport Annuel 2006 de l'OEDT*

Le graphique donne aussi des données sur la buprénorphine, un analgésique et un agoniste partiel des opioïdes, qui a été introduit pour la première fois en 1996 dans le traitement des héroïnomanes en Europe. Etant donné que l'usage de la buprénorphine est contrôlé de manière moins sévère par les conventions des Nations Unies sur les drogues, les médecins ont davantage de latitude pour la prescrire.

2.2.2. Généralités sur le traitement à la méthadone

La MTD est commercialisée sous différents noms tels que Algidon, Dolophin, Mephenon ou encore *l*-Polamidon. La MTD est généralement disponible sous forme de comprimés ou d'une solution glucosidique (60 à 90%) administrée par voie orale. La MTD est un opioïde de synthèse qui se distingue essentiellement de la morphine (opiacé naturel) et de l'héroïne (opiacé semi-synthétique) par son action prolongée (Alburges *et al.*, 1996; Musshoff *et al.*, 2003; Rosas Rodriguez *et al.*, 2003). L'administration contrôlée de MTD permet de stabiliser les drogués en leur évitant les sentiments d'euphorie et les effets de manque liés notamment à l'héroïne (Alburges *et al.*, 1996; Musshoff *et al.*, 2003).

La MTD confère au système nerveux des effets analogues à ceux de la morphine. Son activité maximale se situe entre 2 et 4 heures après ingestion. La demi-vie plasmatique de la MTD est relativement longue et l'effet d'une seule dose chez un patient stabilisé peut durer de 24 à 36 heures en lui permettant de vivre normalement sans symptôme de sevrage ni de somnolence. Contrairement à l'héroïne, la MTD ne présente pas d'effet de pic.

La MTD occupe les récepteurs morphiniques μ et empêche ainsi les autres opiacés de se fixer. La MTD amène à court terme un sentiment de légère euphorie, de l'indifférence et du repli sur soi. Des effets indésirables comme la constipation, la prise de poids, les œdèmes périphériques, la somnolence (surdose), la sudation, la gynécomastie, une diminution de la libido, ou un dysfonctionnement sexuel peuvent également apparaître (Musshoff *et al.*, 2003). La dose de MTD doit être adaptée à chaque individu et un programme graduel de sevrage sur une durée de plusieurs mois ou années associé à un suivi médical, doit aussi être élaboré (Musshoff *et al.*, 2003).

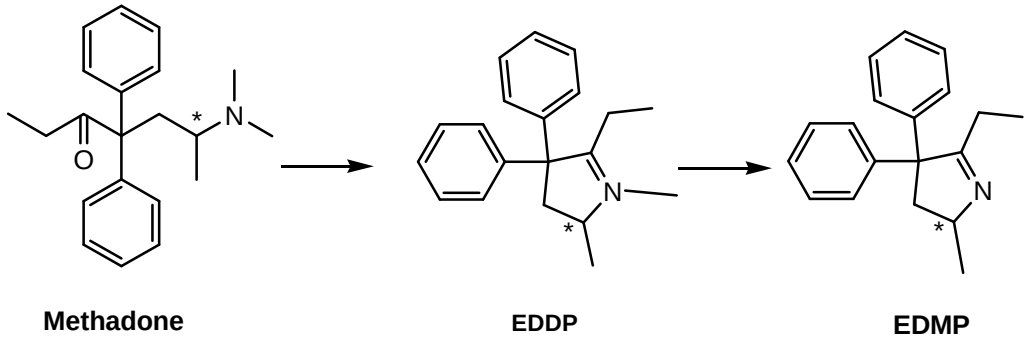
Comme d'autres drogues, la MTD peut également engendrer une dépendance. On devra donc veiller à ne pas remplacer tout simplement une drogue par une autre. Par ailleurs, la consommation simultanée d'autres produits tels que l'alcool, les benzodiazépines ou les opiacés potentialise l'hépatotoxicité de la MTD (Jover *et al.*, 1992). Ces dernières années, plusieurs pays ont constaté l'implication de la MTD dans un nombre important de décès (Segal *et al.*, 1974; Heinemann *et al.*, 2000; Perret *et al.*, 2000; Musshoff *et al.*, 2003; Drummer, 2005a; OEDT, 2006; Lovecchio *et al.*, 2007). Les décès liés à la MTD sont le plus souvent la conséquence d'un

mauvais dosage de la MTD chez un individu, d'une rechute due à une interruption trop prématurée du traitement ou bien d'une consommation non contrôlée de MTD obtenue sur le marché illicite (Segal *et al.*, 1974; Caplehorn *et al.*, 1999; Bell *et al.*, 2000; Heinemann *et al.*, 2000; Wolff, 2002; Musshoff *et al.*, 2003).

2.2.3. Caractéristiques chimiques et pharmacologiques de la méthadone

La MTD (nom IUPAC: 6-diéthylamino-4,4-diphényl-3-heptanone ; pKa 8,3 à 25℃) est une molécule chirale possédant un centre asymétrique (Figure 6). La MTD est généralement administrée sous forme de mélange racémique (Rentsch, 2002; Kelly *et al.*, 2003; Rosas Rodriguez *et al.*, 2003). Cependant, la (*R*)-MTD, est également prescrite sous le nom de *L*-Polamidon dans quelques pays dont l'Allemagne (Hartmann *et al.*, 1991; Moeller *et al.*, 1997).

Après ingestion, 20 à 60% de la MTD est excrétée dans l'urine, dont 33% sous forme non métabolisée (Kelly *et al.*, 2005). La MTD est principalement transformée au niveau hépatique par l'enzyme CYP3A4 du cytochrome P450 où elle subit une *N*-déméthylation oxydative suivie d'une cyclisation spontanée. Le principal métabolite est la 2-éthylidène-1,5-diméthyl-3,3-diphénylpyrrolidine (EDDP 43%; figure 6), qui est lui-même transformé en 2-éthyl-5-méthyl-3,3-diphénylpyrroline (EMDP, 5 à 10%, Figure 6). Ces transformations ne sont pas stéréosélectives (Foster *et al.*, 1999; Prost *et al.*, 2003). L'EDDP (pKa 10,4 à 25℃) et l'EDMP ne possèdent aucune activité pharmacologique (Frost *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 2005). De très petites quantités d'alpha-l-méthadol et d'alpha-1-l-norméthadol, métabolites très actifs, sont également produits au cours de la métabolisation de la MTD.



Methadone **EDDP** **EDMP**

Figure 6 : Principaux métabolites de la MTD

La (*R*)-MTD possède une affinité plus importante pour les récepteurs morphiniques μ et elle est 25 à 50 fois plus active que l'énantiomère (*S*) (Rentsch, 2002; Rosas Rodriguez *et al.*, 2005). Les énantiomères se lient différemment à certaines protéines plasmatiques, avec un taux de complexation pour la (*S*)-MTD au niveau des α_1-glycoprotéines allant de 79 à 87% (Rosas Rodriguez *et al.*, 2003; Lehotay *et al.*, 2005). En plus des différences dans les propriétés pharmacodynamiques, il existe aussi des différences dans leur comportement pharmacocinétique. La (*R)*-MTD présente un temps de demi-vie ($t_{1/2\beta}$ = 37,5 h) plus long que la (*S*)-MTD ($t_{1/2\beta}$ = 28,5 h), ce qui se traduit par une vitesse de métabolisation de la (*R)*-MTD d'environ 1,3 fois inférieure à celle de la (*S*)-MTD.

Par conséquent, des études ont majoritairement observé des concentrations plus élevées pour la (*R)*-MTD dans l'urine (Lanz *et al.*, 1996; Huy-Pham *et al.*, 1997; Kintz *et al.*, 1997a; Kintz *et al.*, 1998; Angelo *et al.*, 1999; Foster *et al.*, 2000), la salive (Ortelli *et al.*, 2000), les cheveux (Kintz *et al.*, 1997b; Kintz *et al.*, 1998) et la sueur (Kintz *et al.*, 1998). La quantité de (*R*)-MTD libre (non complexée) dans le plasma est généralement plus élevée et ceci est dû à la complexation importante de la (*S*)-MTD par les protéines plasmatiques (Boulton *et al.*, 2000; Foster *et al.*, 2004; Rosas Rodriguez *et al.*, 2005). En revanche, les rapports énantiomériques obtenus à partir des concentrations totales des énantiomères de la MTD extraits à partir du sang ou du sérum, montrent plutôt une prédominance de la (*S*)-MTD, avec néanmoins des inversions de rapports *R*/*S* intra- et inter-individuels (Kintz *et al.*, 1997b; Eap *et al.*, 1998; Rudaz *et al.*, 1999a; Chikhi-Chorfi *et al.*, 2001; Whittington *et al.*, 2004; Rosas Rodriguez *et al.*, 2005). Cette inter-variabilité est souvent expliquée par l'affinité plus ou moins importante de la (*S*)-MTD pour les protéines plasmatiques (Kintz *et al.*, 1997b; Boulton *et al.*, 2000). D'autres auteurs suggèrent que la grande variation observée pour la pharmacocinétique de la MTD peut aussi être due à la variabilité dans l'expression de certains isoformes du cytochrome P450. Des études réalisées *in-vivo* ont montré que la formation de l'EDDP faisait aussi intervenir de façon minoritaire les enzymes isoformes CYP2C9, CYP2C19, CYP2B6 et CYP2B6 (Rudaz *et al.*, 1999a; Rentsch, 2002; Prost *et al.*, 2003; Foster *et al.*, 2004; Gerber *et al.*, 2004; Crettol *et al.*, 2005). Contrairement à la CYP3A4, ces enzymes métaboliseraient stéréosélectivement la MTD ; la CYP2D6, la CYP2C9 et la

CYP2C19 transformant préférentiellement la (*R*)-MTD tandis que la CYP2B6 métabolisent stéréosélectivement la (*S*)-MTD en (*S*)-EDDP.

Certains médicaments, comme les antirétroviraux, peuvent aussi interagir avec la métabolisation de la MTD, et entraîner des variations au niveau des rapports énantiomériques de la MTD observés dans le sang et le sérum (Esteban *et al.*, 2004).

3. Dépistage des drogues dans les matrices biologiques alternatives

Le dépistage des drogues chez les individus se fait communément dans le sérum et l'urine. La liste des spécimens utilisés pour le dépistage s'est étendue ces dernières années aux cheveux et à d'autres liquides biologiques tels que la salive et la sueur. L'importance de l'analyse de ces matrices alternatives comme outil de détection de consommation de drogues se concrétise de plus en plus dans les domaines cliniques, du médico-légal et de la médecine du travail (tests avant embauche).

3.1. Détection de drogues dans les cheveux

Depuis quelques décennies, la recherche de xénobiotiques dans les cheveux d'individus soupçonnés d'avoir consommé des substances illicites, s'est considérablement développée (Baumgartner *et al.*, 1989; Moeller *et al.*, 1993; Sachs, 1995; Musshoff *et al.*, 2007).

3.1.1. Structure et mécanisme de croissance des cheveux

Le poil, aussi appelé follicule pileux, est constitué essentiellement d'un agrégat de cellules kératinisées. Les cheveux croissent à partir des follicules pileux pour former une structure cylindrique (Figure 7). Les cheveux renferment environ 65 à 90% de protéines, 1 à 9% de lipides, 0,1 à 5% de pigments (mélanine) et des petites quantités d'eau, de minéraux et des acides gras. La composition exacte varie

considérablement suivant le genre et le mode de nutrition des personnes, l'environnement, le type et la couleur des cheveux.

A la base du follicule se trouve le bulbe pileux, qui est en contact avec la papille dermique. Les nutriments nécessaires à la croissance du cheveu sont apportés par des capillaires dans la papille dermique. Le système vasculaire et les glandes sudoripares forment un environnement complexe autour du cheveu et participent à l'incorporation de diverses substances dans le poil.

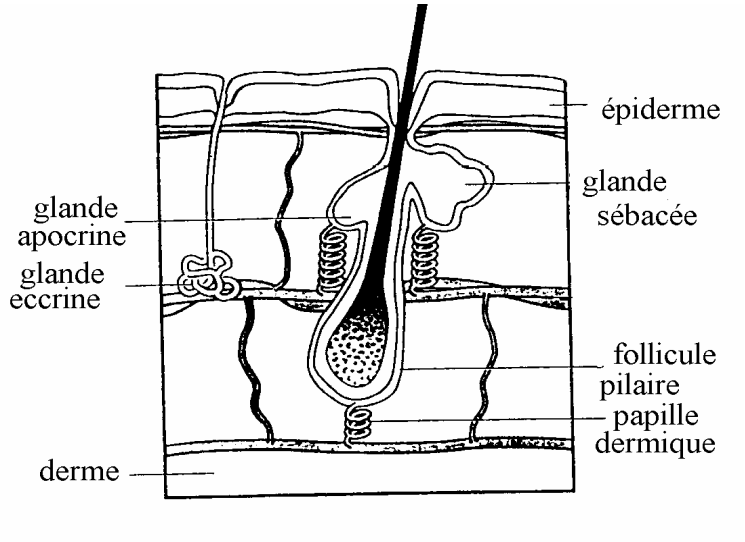


Figure 7 : Schéma simplifié d'un follicule pileux, des glandes associées et du système vasculaire

Le diamètre d'un cheveu humain varie entre 15 et 120 µm en fonction de son type et de l'endroit de prélèvement (Harkey, 1993).

Au moins trois types de cellules constituent les cheveux humains (Figure 8). La cuticule externe, abondamment kératinisée, est formée de cellules qui se recouvrent partiellement et qui protègent les fibres intérieures. Le cortex central est constitué de fibres de cellules kératinisées, qui renferment les pigments. Le principal pigment, la mélanine (du grec melas = noir) est synthétisé à partir de la tyrosine (acide aminé) dans les mélanosomes, situés à la base du cheveu. La mélanine existe sous trois formes (jaune, brun et noir) et leur assemblement en proportions inégales détermine la couleur des cheveux. Un déficit de la production de la mélanine entraîne la formation de poils gris ou blancs. Les cellules de la moelle forment l'axe central du cheveu dont le dessèchement au fur et à mesure de sa croissance fait apparaître

des vacuoles remplies d'air, qui affaiblissent la structure du cheveu. Des pigments sont retrouvés également à l'intérieur de la moelle.

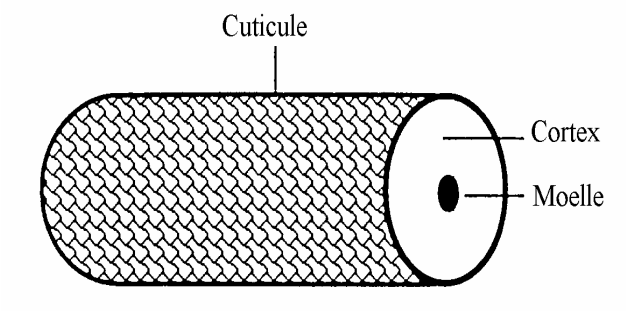


Figure 8 : Coupe latérale d'un cheveu

La croissance moyenne des cheveux varie entre 0,8 et 1,3 cm par mois (Hayashi *et al.*, 1991; Harkey, 1993; Sachs, 1995). Le follicule passe par plusieurs cycles de croissance. Chez les humains, chaque cheveu possède son propre cycle de croissance. La croissance du cheveu humain commence par une phase anagène, une phase active au cours de laquelle le follicule se forme et se développe. La durée de ce cycle est très variable et prend normalement entre 7 à 94 semaines, et peut s'étendre à des années selon la région anatomique (Kintz, 2007). Ce premier cycle est généralement suivi par une phase de repos, la phase catagène au cours de laquelle le follicule s'atrophie un peu. Finalement, le cheveu tombe pendant la phase télogène et un nouveau cycle recommence.

Comme les follicules pileux s'atrophient de plus en plus avec l'âge, le remplacement des cheveux tombés n'est souvent plus effectué, ce qui peut résulter en une calvitie. Ce phénomène est plus marqué chez l'homme que chez la femme.

3.1.2. Mécanisme d'incorporation des drogues dans les cheveux

Plusieurs études ont été menées afin d'élucider le(s) mécanisme(s) d'incorporation des drogues dans les cheveux (Moeller *et al.*, 1993; Nakahara *et al.*, 1995; Nakahara *et al.*, 1996; Gygi *et al.*, 1997; Kikura *et al.*, 1997; Rothe *et al.*, 1997; Uhl, 1997; Wilkins *et al.*, 1998; Stout *et al.*, 1999; Stout *et al.*, 2000; Borges *et al.*, 2001; Kronstrand *et al.*, 2001). Le délai d'apparition d'une substance, défini entre le moment de l'administration orale ou de l'administration parentérale, et son apparition dans les cheveux, est variable.

Trois modes d'incorporation ont été envisagés par les chercheurs : une diffusion interne (active ou passive) du sang vers les cellules en croissance des bulbes pileux, une diffusion externe à partir des sécrétions sudorales ou sébacées et une contamination passive due aux vapeurs ou aux poudres en suspension qui contaminent les cheveux.

Lors de la formation du cheveu, les cellules en croissance et en contact avec le sang piègeraient les substances dans la structure kératinisée. Les cinétiques d'incorporation sont dépendantes des interactions non covalentes (exemple : interactions van der Waals) entre le xénobiotique et la mélanine (Nakahara, 1995; Nakahara *et al.*, 1995; Nakahara *et al.*, 1996; Wilkins *et al.*, 1998; Borges *et al.*, 2001; Kronstrand *et al.*, 2001). Les substances mères sont généralement détectées à des concentrations plus élevées dans les cheveux que leurs métabolites, contrairement à l'urine.

D'autres mécanismes d'incorporation ont également été proposés. Il est bien connu que les drogues sont notamment excrétées par le biais de la sueur (Kintz *et al.*, 1996; Kintz *et al.*, 1998). Ainsi, Henderson a découvert de la cocaïne deutérée dans de nombreux segments de cheveux après une prise unique (Henderson *et al.*, 1996). Il en a conclu que la présence de la cocaïne devait aussi résulter des sécrétions des glandes apocrine et sébacée.

Finalement, la fixation des xénobiotiques dans les cheveux peut aussi s'effectuer par le biais d'une contamination environnementale. Ainsi, les substances fumées telles que le cannabis, le crack ou même l'héroïne peuvent se déposer sur toute la longueur du cheveu. Néanmoins, la contamination par voie passive entraîne une interaction moins forte des drogues avec la matrice, ce qui permet de les éliminer majoritairement par des procédés de décontamination adéquats. Ainsi, des lavages à l'aide de solutions aqueuses et/ou de solvants organiques pendant des temps d'incubation et à des températures différentes permettent d'éliminer largement une décontamination (Baumgartner *et al.*, 1989; Schaffer *et al.*, 2005).

3.1.3. Avantage du dépistage des drogues dans les cheveux

Après incorporation dans les cheveux, une substance y demeure jusqu'à ce que le cheveu tombe. La stabilité des xénobiotiques dans les cheveux semble tout à fait exceptionnelle. Il a ainsi été possible d'identifier de la cocaïne et ses métabolites

dans les cheveux de momies chiliennes et péruviennes vieilles de plus de 3000 ans (Cartmell *et al.*, 1991; Springfield *et al.*, 1993). L'intérêt majeur des analyses de substances dans les cheveux réside dans le fait que cette matrice biologique permet de suivre une consommation chronique de drogues et de médicaments pendant un intervalle de temps très long, qui n'est pas couvert par les analyses habituelles d'urine, de sang ou de salive (Tableau 1). En plus, le prélèvement des cheveux est non invasif et aisé à réaliser.

Les analyses de sang et de salive ne permettent de suivre une consommation que pendant quelques heures, alors que les urines et la sueur présentent des fenêtres de détection de quelques jours.

En revanche, puisque les cheveux poussent en moyenne de 0,8 à 1,3 cm/mois, chaque cm est en moyenne le témoin mensuel de l'exposition aux drogues. L'analyse des cheveux permet alors de dresser un calendrier rétrospectif de la consommation d'un individu. La consommation peut être suivie jusqu'à plusieurs mois, le seul facteur limitant étant la longueur de cheveux disponible. Par ailleurs, l'analyse segmentaire des cheveux est devenue aujourd'hui un outil indispensable pour dresser le profil d'un individu dépendant aux drogues et aux médicaments. Un des inconvénients est que les quantités des substances présentes dans les segments peuvent être assez faibles, notamment après une prise unique. Il est donc important de disposer de techniques d'analyse très spécifiques et très sensibles.

Tableau 1. Comparaison des fenêtres de détection des xénobiotiques dans les différentes matrices biologiques

Echantillon biologique	Durée de détection des drogues	Informations	Remarques
Sérum	3 h à 24 h	Evaluation de la toxicité, dosage des drogues et médicaments	Le sang doit être rapidement prélevé, homogénéisé et refroidi, puis transféré immédiatement au laboratoire
Urine	6 h – 2 j	Dépistage des drogues et des médicaments	Min 20 mL, à conserver à 4°C jusqu'à 1-2 jours, puis au congélateur
Salive	1 h à 24 h	Concentration proche de celle du sérum	Utilisation de salivette
Sueur	1 h à 24 h	Dépistage	Utilisation de patch
Cheveux	> 1 mois (dépendant de la longueur des cheveux)	Consommation chronique	Facilement stockable et transportable

Cependant, les résultats quantitatifs des cheveux doivent être pris avec beaucoup de précaution en tenant compte, par exemple, de valeurs seuils pertinentes pour éviter des faux-positifs.

De même, puisqu'il n'existe pas d'information sur l'incorporation de substances chirales dans les cheveux (exemple : accumulation stéréosélective), la détection d'un seul énantiomère dans le cadre des STA, par exemple, peut donner lieu à plusieurs interprétations. Ainsi la présence de la (*R*)-AM dans un échantillon de cheveux pourra être due à une consommation illicite de (*R*)-AM, le résultat de la métabolisation d'un médicament tel que la sélégiline ou bien l'accumulation stéréosélective d'un énantiomère au détriment de l'autre.

Il est important de noter que des traitements cosmétiques tels que les décolorations, les permanentes ou encore les colorations peuvent aussi diminuer les concentrations des xénobiotiques dans les cheveux et influencer de façon non négligeable les résultats toxicologiques (Yegles *et al.*, 2000; Yegles, 2005).

3.2. La salive

Le transfert des xénobiotiques depuis le compartiment circulant vers la salive est un phénomène décrit depuis plusieurs décennies. De très nombreux composés ont ainsi pu être détectés dans la salive après une administration orale ou parentérale d'alcool, de stupéfiants usuels (opiacés, cocaïne, amphétamine, cannabinoïdes,…) ou de médicaments (benzodiazépines et autres) (Fucci *et al.*, 2003; Walsh *et al.*, 2003; Yonamine *et al.*, 2003; Wylie *et al.*, 2005).

3.2.1. Physiologie de la sécrétion salivaire

La salive dite « mixte » est produite par trois glandes salivaires principales. Les sécrétions majoritaires résultent des glandes sous-maxillaires (71%), des glandes parotides (25%) et des glandes sublinguales (4%) (Kidwell *et al.*, 1998; Aps *et al.*, 2005). Le tissu des glandes salivaires consiste en un système de canaux terminaux entourés de vaisseaux capillaires et incorporés dans le tissu connectif.

La formation de salive primaire a lieu au niveau des extrémités des canaux excréteurs des glandes salivaires par filtration du sang des capillaires. Au fur et à mesure qu'elle parcourt le système des canaux, la salive devient de plus en plus

hypotonique. L'osmolarité salivaire, toujours inférieure à celle du plasma, s'élève avec l'accroissement du débit salivaire, ce qui s'accompagne généralement d'une augmentation du pH, qui tend alors à s'approcher du pH plasmatique ou même à le dépasser. Le pH de la salive au repos (non-stimulée) se situe entre 5,6 et 7 (Kidwell *et al.*, 1998). Le débit salivaire total est de 500 à 1500 mL par jour. La salive mixte est composée en grande partie d'eau (99%). Elle contient également des sels minéraux, des protéines telles que les mucines (lipoprotéines ayant un rôle de lubrification) et des α-amylases.

3.2.2. Mécanisme de transport des xénobiotiques dans la salive

Les canaux salivaires sont séparés du système circulatoire sanguin seulement par une fine couche de cellules épithéliales. Les membranes de ces cellules vont déterminer quelles molécules pourront être transférées vers la salive. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le passage des xénobiotiques dans la salive : les substances peuvent être transportées à travers les membranes biologiques soit par sécrétion (transport actif), soit par diffusion à travers les canaux de la membrane, ou encore par diffusion passive à travers la couche phospholipidique en suivant un gradient de concentration. Les plus petites molécules, comme l'éthanol, passeraient librement à travers les pores des membranes. Cependant, les molécules de masse moléculaire plus élevée telles que les xénobiotiques, sembleraient passer dans la salive par un simple mécanisme de diffusion passive dépendant du pH plasmatique et salivaire, de leur interaction avec les protéines plasmatiques et de leurs propriétés physico-chimiques (pKa, liposolubilité, masse moléculaire et structure spatiale) (Kidwell *et al.*, 1998; Drummer, 2005b). Ainsi les substances lipophiles et faiblement ionisées passeraient aisément la barrière entre le plasma et la salive. Comme la salive est un filtrat du sang, la concentration salivaire devrait être le reflet de la concentration plasmatique de la molécule sous forme libre (Kidwell *et al.*, 1998; Yonamine *et al.*, 2003; Aps *et al.*, 2005). Pour les substances faiblement basiques, la concentration salivaire serait directement liée au pH de la salive. En outre, une contamination orale par des substances fumées, administrées par voie orale ou intra-nasale influencent les rapports des concentrations entre la salive et le plasma (S/P).

Contrairement aux urines, les substances mères des xénobiotiques sont majoritairement détectées lors des dépistages salivaires (Schramm *et al.*, 1992; Kidwell *et al.*, 1998; Yonamine *et al.*, 2003).

3.2.3. Intérêt du dépistage des drogues dans la salive

L'intérêt de la salive en tant qu'alternative aux prélèvements biologiques classiques pour les investigations chez le vivant a été signalé dès la fin des années 1970. Les analyses de salive peuvent aussi donner des informations quantitatives et qualitatives chez un individu suspecté d'avoir consommé des substances illicites. Le plus grand avantage de la salive est son mode de prélèvement pratiquement non invasif et aisé à réaliser. Le prélèvement peut être effectué sans atteinte à une sphère privée, sous contrôle visuel du personnel médical ou des enquêteurs, ce qui réduit les risques de substitution ou d'adultération. Les prélèvements d'échantillon de salive peuvent être aisément réalisés dans le cadre de contrôles routiers, d'investigations policières, d'études épidémiologiques, pour des études cinétiques et pour la surveillance de patients sous traitement à la MTD (Yonamine *et al.*, 2003; Verstraete, 2005; Wylie *et al.*, 2005). En effet, comme les concentrations salivaires de nombreuses substances seraient fortement corrélées aux concentrations plasmatiques, le prélèvement de salive permettrait de connaître en temps réel l'importance de l'imprégnation d'un composé chez un individu, ce qui est très utile notamment pendant les contrôles routiers.

En pratique, un échantillon de salive peut être collecté en crachant dans un récipient, en balayant la cavité orale avec un coton-tige, en stimulant la production salivaire avec des friandises acidulées (cristaux d'acide citrique) ou en mastiquant un matériau inerte tel que le téflon. Cependant, vu que la concentration des drogues dans la salive peut diminuer parallèlement à l'accroissement du flux salivaire, un prélèvement de salive non stimulée peut être conseillé pour des substances faiblement concentrées.

4. Séparations énantiosélectives de xénobiotiques en toxicologie analytique

Un énantiomère est une molécule non superposable à son image dans un miroir. Les énantiomères *R* et *S* ont les mêmes propriétés physico-chimiques, mais ils se différencient par leur action sur la lumière polarisée : l'un des composés la dévie à droite et l'autre à gauche. Ils diffèrent également par leur structure tridimensionnelle et ont généralement des propriétés pharmacologiques et des toxicités différentes.

La résolution des molécules chirales nécessite des méthodes analytiques hautement spécifiques telles que la chromatographie en phase gazeuse, l'électrophorèse capillaire ou encore la chromatographie liquide à haute performance. Ces techniques peuvent être couplées à toutes sortes de détecteurs comme un détecteur d'absorption ultra-violet (UV) ou visible, un spectromètre de masse ou encore un détecteur à fluorescence.

4.1. Séparations énantiosélectives par chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est une technique de séparation utilisant d'une part une phase stationnaire et d'autre part une phase mobile. La phase stationnaire retient sélectivement les solutés en fonction de leur affinité pour cette phase, tandis que la phase mobile permet d'éluer les solutés en fonction de leur solubilité dans cette phase.

Les séparations énantiosélectives en CLHP peuvent être réalisées selon trois modes (Herráez-Hernández *et al.*, 2002; Toyo'oka, 2002) :

- greffage d'un auxiliaire chiral sur les énantiomères et puis séparation des diastéréoisomères sur une phase stationnaire achirale
- résolution des énantiomères sur une phase stationnaire chirale
- ajout d'un sélecteur chiral dans la phase mobile

Tous ces modes de séparation ont été employés en toxicologie analytique notamment pour la résolution des STA (Rizzi *et al.*, 1994; Foster *et al.*, 1998; Herráez-Hernández *et al.*, 1998; Al-Dirbashi *et al.*, 2000; Brunnenberg *et al.*, 2001;

Meyer *et al.*, 2002; Nagai *et al.*, 2002; Buechler *et al.*, 2003), de l'éphédrine, de la pseudo-éphédrine (Herráez-Hernández *et al.*, 1998; Cháfer-Pericás *et al.*, 2006), de la MTD, de l'EDDP (Beck *et al.*, 1991; Rosas Rodriguez *et al.*, 2003; Lehotay *et al.*, 2005), de la cocaïne (Armstrong *et al.*, 1987), ou encore des benzodiazépines telles que le lorazépam, l'oxazépam ou encore le témazépam (Pham-Huy *et al.*, 2002; He *et al.*, 2004) .

4.2. Séparations énantiosélectives par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

4.2.1. Généralités

La chromatographie en phase gazeuse (CG) s'applique aux gaz et aux composés susceptibles d'être vaporisés à une température appropriée sans décomposition. Les composés sont entraînés sur une colonne capillaire à l'aide d'un gaz vecteur tel que l'hélium ou l'hydrogène. La colonne, à l'intérieur de laquelle se trouve une phase stationnaire donnée (à base de silice par exemple), est placée dans un four. Deux types d'interactions peuvent se produire en CG : une interaction de surface, appelée chromatographie d'adsorption et un processus faisant intervenir une pénétration des produits dans la phase, appelé chromatographie de partage.

4.2.2. Couplage de la CG à la spectrométrie de masse

La CG couplée à la spectrométrie de masse (SM) est utilisée en toxicologie analytique et en toxicologie médico-légale pour la détection et le dosage de drogues et de médicaments faiblement concentrés et volatils (Maurer, 2002).

En effet, le détecteur SM réunit deux avantages considérables : la sensibilité et la spécificité. Le fonctionnement général d'un SM est le suivant : les substances à la sortie de la CG pénètrent dans une chambre d'ionisation, où un bombardement d'électrons provoque la rupture de liaisons covalentes de ces molécules. La fragmentation qui en résulte, est plus ou moins caractéristique d'un composé donné et elle est enregistrée sous forme d'un spectre de masse.

La SM présente deux modes d'acquisition distincts: le balayage (SCAN) et la détection d'ions sélectionnés (en anglais « *selected ion monitoring* », en abrégé SIM)

(Hübschmann, 1996). En mode SCAN, des spectres complets entre deux valeurs extrêmes de m/z (masse/charge) sont enregistrés. Le mode SCAN est surtout employé dans le cas de la détermination des caractéristiques spectrales d'une substance inconnue. Le mode SIM a pour but de détecter avec un maximum de sensibilité des substances cibles, dont les caractéristiques spectrales sont connues. Ainsi le fait de détecter une substance donnée au moyen de trois valeurs m/z caractéristiques, permet de faire un énorme gain en sensibilité. Le mode SIM est donc surtout employé lors d'une analyse quantitative.

Outre les modes d'acquisition, un détecteur SM est aussi caractérisé par sa source d'ionisation. Les sources à impact électronique et à ionisation chimique sont principalement utilisées en CG/SM.

4.2.2.a. Impact électronique

La source à impact électronique (EI) a été inventée par Dempster et perfectionnée par Bleakney et par Nier (De Hoffmann *et al.*, 1999). La source est constituée d'un filament chauffé qui émet des électrons. Ceux-ci sont accélérés vers une anode et entrent en collision avec les molécules gazeuses de la source. L'énergie standard d'ionisation est de 70 eV et elle est obtenue par des électrons accélérés par une différence de potentiel de 70V dans la source.

Formation d'ions en EI:

$$M + e^-_{(70eV)} \rightarrow M^{+\bullet} + 2e^-$$

L'EI produit principalement des ions positifs. L'énergie nécessaire pour qu'une molécule capte un électron sans produire des ions négatifs est de l'ordre de 1eV. Les molécules fragmentées sont alors dirigées vers les analyseurs où elles sont séparées d'après leur masse.

4.2.2.b. Ionisation chimique

Au cours du processus d'ionisation chimique, les électrons ionisent de préférence par EI le gaz réactif (CH_4, NH_3, MeOH, …) présent en large excès dans la chambre d'ionisation. Les ions ainsi produits entrent eux-mêmes en collision avec d'autres molécules du gaz réactif, formant ainsi un plasma d'ionisation. Des ions de la

substance à analyser se forment par réactions chimiques avec les ions de ce plasma, donnant lieu à des réactions de transfert de protons, d'abstraction d'hydrure, d'addition, de transfert de charges et beaucoup d'autres encore. Ce type d'ionisation est plus doux que l'ionisation en mode EI. Il s'avère que ce type d'ionisation est très utile lors d'analyses de nouvelles drogues inconnues, car on observe surtout des pics moléculaires (Hübschmann, 1996; De Hoffmann *et al.*, 1999; Maurer, 2002).

En ionisation chimique, deux types d'ions peuvent être obtenus selon de mode d'ionisation: le mode positif (PCI) donne des ions positifs alors qu'en mode négatif (ICN), on récupère d'ions négatifs à nombre pair.

4.2.2.c. Ionisation chimique négative

L'ionisation chimique négative (ICN) utilise une polarité inverse de celle du mode EI (De Hoffmann *et al.*, 1999; Maurer, 2002). L'avantage de la ICN est qu'on obtient dans certains cas une meilleure sensibilité de détection surtout avec des composés renfermant beaucoup d'atomes électronégatifs (Fitzgerald *et al.*, 1993; De Hoffmann *et al.*, 1999; Maurer, 2002) .

La fraction de la pression de l'échantillon étant beaucoup plus faible que celle du gaz réactif (CH_4 dans ce cas), un électron ionise de préférence le méthane d'après le mécanisme ci-dessous :

$$CH_4 + e^- \rightarrow CH_4^+ + 2e^-_{(\text{thermiques})}$$

Ces électrons thermiques ont une énergie plus faible que ceux générés en mode EI (70 eV). Ces derniers vont réagir avec les molécules à analyser par les mécanismes (a)-(c) présentés ci-dessous.

a) Capture d'électrons (CE)

La capture d'un électron est le mécanisme majoritaire en ICN et c'est celui qui donne la meilleure sensibilité. Cette réaction est favorisée par la présence d'un hétéroatome électronégatif dans les molécules M de l'échantillon et elle peut être décrite de la façon suivante :

$$MX + e^-_{(\text{thermique})} \rightarrow MX^{-\bullet}$$

b) Capture d'électrons dissociative (CED)

La capture d'électron dissociative présente un processus similaire à la CE, sauf qu'il y a formation d'un radical neutre et un anion.

$$MX + e^-_{(thermique)} \rightarrow M^{\bullet} + X^-$$

Cette réaction donne des sensibilités plus faibles qu'en CE, et le pic moléculaire est généralement moins intense.

c) Formation de paires ioniques (FPI)

L'échantillon est fragmenté au cours de ce mécanisme réactionnel comme en CED, cependant, l'électron n'est pas capturé par le fragment.

$$MX + e^-_{(thermique)} \rightarrow M^+ + X^- + e^-$$

4.2.3. Dérivation

Pour être correctement analysés en CG/SM, les analytes doivent satisfaire à deux conditions : ils doivent être volatils et thermiquement stables. Afin de compenser ces difficultés, les produits doivent souvent être modifiés chimiquement ; on parle alors de dérivation. Une dérivation est une réaction, qui consiste à greffer des groupements donnés (groupements acétyles ou silylés par exemple) sur les atomes d'oxygène ou d'azote de la substance à analyser.

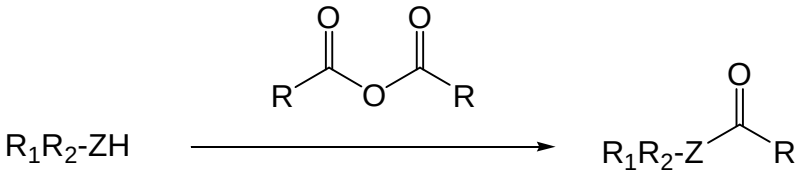


Figure 9 : Exemple d'une acétylation avec Z = N (azote) ou O (oxygène)

En CG/SM, on a souvent recours à ce type de modification chimique, car elle présente de nombreux avantages:

- une augmentation de la volatilité des substances polaires en chromatographie gazeuse (exemple STA,…)

- détection des substances en SM (mode ICN par exemple)
- diminution sur la phase stationnaire des phénomènes d'adsorption des fonctions polaires, tels que les amines, alcools, acides, ce qui conduit à une meilleure symétrie des pics
- séparation des énantiomères sous forme de diastéréisomères (dérivation chirale) et des composés de structure voisine

Les réactifs de dérivation les plus courants sont le *N,O*-bis triméthylsily-trifluoro-acétamide, le *N*-méthyl-*N*-triméthylsilyl-trifluoro-acétamide ou encore des agents fluorés tels que l'anhydride trifluoracétique, l'anhydride pentafluoropropïonique ou l'anhydride heptafluorobutyrique. Les agents de dérivation fluorés sont souvent utilisés pour obtenir des molécules portant un nombre d'atomes halogénés élevé, ce qui permet ainsi des les détecter en SM en mode ICN (Fitzgerald *et al.*, 1993; Maurer, 2002).

4.2.4. Séparation chirale par CG/SM

En CG, les séparations des énantiomères sont généralement obtenues soit en employant des phases stationnaires chirales soit en les séparant après les avoir transformé en diastéréoisomères (propriétés physico-chimiques différentes).

De nos jours, il existe des phases stationnaires chirales qui permettent la séparation d'énantiomères, telles que des phases stationnaires à base d'acides aminés, de dipeptides, de diamides, de complexes métalliques ou de cyclodextrines. Les colonnes chirales de CG sont peu employées en toxicologie analytique, car les colonnes ne sont limitées qu'aux séparations de certaines substances et la durée de vie de ces colonnes est généralement assez courte. Les phases stationnaires les plus rencontrées en toxicologie analytique sont les colonnes à base de cyclodextrines, qui ont été employées pour les séparations énantiosélectives de l'AM, la MA, l'éphédrine et la pseudo-éphédrine (Wan *et al.*, 1993; Jin *et al.*, 1994; Hasegawa *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002; Kraemer *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006). D'autres auteurs ont aussi obtenu des séparations énantiosélectives pour ces mêmes composés en prenant une colonne chirale à base de dipeptides de valine, du nom de Chirasil-Val (Liu *et al.*, 1981; Liu *et al.*, 1982). Récemment, une séparation chirale des dérivés de l'éphédrine a été réalisée par CG à deux dimensions (CG x

CG), une phase stationnaire de β-cyclodextrines étant la première colonne et une phase polaire de polyéthylène glycol étant couplée en deuxième position (Wang *et al.*, 2006).

Le greffage d'un auxiliaire chiral sur les énantiomères, communément appelé dérivation chirale, suivi d'une séparation par CG, est assez répandue en toxicologie analytique. Parmi les auxiliaires chiraux les plus courants, on peut citer le chlorure de *N*-trifluoroacétyl-*l*-prolyle (*l*-TPC), le chlorure de *R*-(-)-α-méthoxy-α-trifluorométhylphényle de propanoyle, connu sous le nom de réactif de Mosher ((*R*)-MTPCL), le 1*R*,2*S*,5*R*-(-)-menthylchloroformiate (MCF) et le chlorure de (*S*)-heptafluorobutyrylprolyle ((*S*)-HFBPCl) (Fallon *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 2002; Pizarro *et al.*, 2003). La dérivation chirale des énantiomères est le procédé le mieux adapté à la toxicologie analytique. En effet, elle permet non seulement de séparer de façon très simple et rapide les énantiomères de composés tels que les STA, mais elle permet en plus d'augmenter la spécificité et surtout la sensibilité de détection des composés au niveau de certains détecteurs (Liu *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2002).

4.3. Séparations énantiosélectives par électrophorèse capillaire

4.3.1. Généralités sur l'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique de séparation relativement ancienne puisque le principe de migration des particules chargées dans un champ électrique fût déjà décrit en 1886 par Kohlrausch. Dans les années 1930, le finlandais Tiselius réalisa des séparations de protéines par EC. Il obtînt le Prix Nobel pour ces travaux en 1947. Or, l'utilisation de l'EC était assez limitée. En effet le principal problème était dû à la convection thermique. Ce dégagement de chaleur (effet Joule) apparaissait lorsque le courant électrique était trop élevé. Les temps de migration variaient alors d'une acquisition à l'autre et la répétabilité des résultats n'était pas garantie. Ces problèmes ont pu être résolus par l'utilisation de tubes avec un diamètre intérieur plus petit et par la fixation de ces tubes dans des cartouches remplies d'un liquide refroidissant.

L'EC moderne a débuté en 1967 avec l'emploi par Hjerten de capillaires dont les diamètres intérieurs (ID) allaient de 1 à 3 mm (Hjerten, 1967). En 1981, Jorgenson et Lukacs (Jorgenson *et al.*, 1981) ont utilisé des tubes en silice de 75 µm ID et ont

démontré le potentiel de ce que l'on appelle l'électrophorèse de zone à haute performance (EZHP). Depuis, le développement technologique de l'EZHP s'est poursuivi dans le sens de la miniaturisation. Parallèlement à la microchromatographie, des techniques hybrides telles que l'EC micellaire sont alors apparues (Terabe *et al.*, 1984).

4.3.2. Principe et théorie de l'électrophorèse capillaire

Le principe de l'électrophorèse capillaire est de séparer, sous l'influence d'un champ électrique E, des molécules chargées, injectées dans un tube capillaire rempli préalablement d'une solution d'électrolyte. Cette solution est un milieu conducteur qui permet le transport de molécules. Ainsi la séparation repose essentiellement sur la mobilité électrophorétique, le coefficient de partage entre les phases, les constantes d'ionisation et la taille des molécules.
La mobilité apparente μ_{ap} des espèces à séparer résulte à la fois :

- de leur mobilité propre μ_{EP}, (flux électrophorétique), dépendant de la charge et de la taille de l'espèce,
- et de la mobilité de l'électrolyte μ_{EOF} (flux électroosmotique), dépendant du pH et de l'électrolyte.

Lors de l'application d'une tension positive en entrée, l'ordre de migration des molécules en électrophorèse capillaire est le suivant : les cations, puis les espèces neutres, puis les anions.

4.3.2.a. Flux électrophorétique

Une molécule chargée mise en solution et soumise à un champ électrique E, se déplace avec une vitesse linéaire appelée vitesse électrophorétique (v_{EP}) qui est donnée par la relation suivante :

$$v_{EP} = \mu_{EP} \cdot E \qquad (1)$$

Avec v_{EP} = vitesse de l'ion (m/s)

μ_{EP} = mobilité électrophorétique (m^2 /V.s)

E = champ électrique (V/m)

Le champ électrique est fonction de la tension appliquée et de la longueur du capillaire. La mobilité électrophorétique (μ_{EP}) est constante pour un analyte ionique donné. Elle est déterminée par l'équilibre entre la force électrique F_E et la force de frottement F_F.

$$F_E = q \cdot E \qquad (2)$$

$$F_F = -6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v_{EP} \qquad (3)$$

Où q est la charge ionique (C), r le rayon de l'ion (m) et η la viscosité de la solution ($N.s/m^2$).

De l'équilibre entre F_E et F_F on tire μ_{EP} :

$$\mu_{EP} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \qquad (4)$$

Pour un cation, le flux s'effectuera dans le sens du champ (vers la cathode pour une tension positive), et pour un anion dans le sens inverse. La vitesse de migration dépend du rapport charge/taille. Un ion de petite taille migrera plus rapidement qu'un ion gros de même charge. Un ion à charge élevée migre plus vite qu'un ion à charge faible de même taille.

4.3.2.b. Flux électroosmotique

Lorsqu'on applique une tension au système, un flux se forme dans le capillaire. Ce flux dépend de la concentration et du pH de l'électrolyte utilisé, on l'appelle flux électroosmotique (EOF). La mobilité du flux est définie par la relation suivante :

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \qquad (5)$$

Où ε est la constante diélectrique, ζ le potentiel zêta (V) et η la viscosité de la solution ($N.s/m^2$)

L'électroosmose est un phénomène particulier à l'électrophorèse qui se traduit par le déplacement relatif d'une couche ionique de liquide sous l'action d'un champ électrique, par rapport à une couche fixe d'ions de charges opposées. La surface intérieure du capillaire, le plus souvent en silice fondue, est recouverte d'une couche de charges négatives à partir d'un pH > 3 et qui sont compensées par des charges positives provenant de l'électrolyte. On est ainsi en présence d'une double couche d'ions qui crée une différence de potentiel proche de la paroi, appelée potentiel zêta ζ. Cette double couche forme un tuyau qui entoure les électrolytes du tampon de migration ainsi que les analytes à séparer. Lors de l'application du champ électrique, les charges positives du tuyau, constituée par la double couche, entraînent par viscosité les ions de l'électrolyte et les substances en direction de la cathode. Le flux qui en résulte a un front plat (contrairement au flux parabolique de la chromatographie) et sa vitesse électroosmotique est donnée par :

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \cdot E \qquad (6)$$

Le flux μ_{EOF} est nul pour un pH inférieur à 3, il croît pour un pH compris entre 3 et 6 et il est constant pour un pH supérieur à 6. On s'arrange en général de façon à ce que la vitesse électroosmotique soit supérieure à la vitesse électrophorétique faisant que toutes les espèces migrent avec l'EOF en direction de la cathode.

Par conséquent, la mobilité apparente d'une substance est donnée par :

$$\mu_{ap} = \mu_{EP} + \mu_{EOF} \qquad (7)$$

Les cations, par addition des vecteurs v_{EP} et v_{EOF}, auront une vitesse apparente supérieure aux espèces neutres, elles-mêmes plus rapides que les anions. Les espèces neutres sont uniquement entraînées par l'EOF et migrent avec une vitesse moyenne vers la cathode (Figure 10). Les cations et anions ayant la même charge sont séparés entre eux par leurs rayons, alors que les espèces neutres ne sont pas séparées.

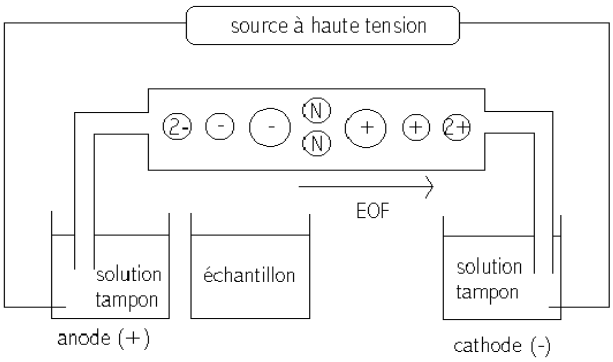


Figure 10 : Sens de migration des particules en EC

L'EOF peut être influencé en modifiant des paramètres expérimentaux tels que la puissance du champ électrique, l'électrolyte (composition, pH, force ionique, viscosité), la température et les caractéristiques de la surface du capillaire.

La mobilité d'une espèce peut être directement mesurée à partir des temps de migration du soluté t et d'un soluté neutre (marqueur de flux EOF) t_{eo} :

$$\mu_{EP=} \mu_{ap} - \mu_{EOF} = \frac{l \cdot L_{tot}}{V \cdot t} - \frac{l \cdot L_{tot}}{V \cdot t_{eo}} \qquad (8)$$

où μ_{ap} est la mobilité apparente de l'analyte, l la longueur effective du capillaire (jusqu'au détecteur ; en cm), L_{tot} la longueur totale du capillaire (en cm) et V le voltage appliqué (kV).

4.3.3. Les différentes techniques de séparation en électrophorèse capillaire

Les différentes techniques rencontrées en EC sont l'électrophorèse capillaire de zone (ECZ), l'électrophorèse capillaire de type micellaire (CECM), l'électrophorèse capillaire sur gel (ECG), l'isotachophorèse (ITP) l'isoélectrofocalisation capillaire (IEF) et l'électrochromatographie (CEC).

4.3.3.a. Electrophorèse capillaire de zone

Il s'agit du mode le plus utilisé en EC, en raison de sa simplicité et de sa versatilité. Les caractéristiques fondamentales de l'ECZ sont l'homogénéité de la solution électrolyte et la constance du champ électrique sur toute la longueur du capillaire. La séparation est basée sur les différences de mobilités électrophorétiques dues à des différences de taille et de charge à un pH donné. Seules les molécules neutres ne peuvent pas être séparées. Les analyses en ECZ peuvent être réalisées en absence ou en présence du phénomène d'EOF, sachant que la présence de l'EOF permet une analyse simultanée des anions et des cations. Son domaine d'application inclut l'analyse de molécules biologiques (acides aminés, peptides), d'ions minéraux (Li) et de petites molécules organiques.

4.3.3.b. Electrophorèse capillaire électrocinétique micellaire

La CECM, aussi appelée chromatographie électrocinétique micellaire, est une combinaison des techniques électrophorétiques et chromatographiques. Elle a été introduite par Terabe et coll*.* en 1984 (Terabe *et al.*, 1984). On distingue une phase aqueuse et une phase pseudo-stationnaire, la phase micellaire (Figure 11). Cette dernière phase est constituée d'électrolytes contenant des surfactants chargés (en général le sulfate de dodécyl sodium ou le taurodéoxycholate de sodium) (Weinberger *et al.*, 1991; Tagliaro *et al.*, 1996; Imazawa *et al.*, 1997; Lurie, 1997). Les surfactants sont ajoutés à une concentration supérieure à leur concentration micellaire critique. Comme la phase micellaire et l'électrolyte ont des vitesses de migration différentes, les solutés neutres peuvent être séparés en fonction de leur coefficient de partage.

La CECM permet également d'aboutir à la séparation de composés chargés ayant des mobilités électrophorétiques voisines (Lurie, 1997). Cependant il faut noter que la séparation de ces solutés ionisés est également fonction de la charge et donc de la composition de l'électrolyte, du pH et de la présence de modificateurs organiques.

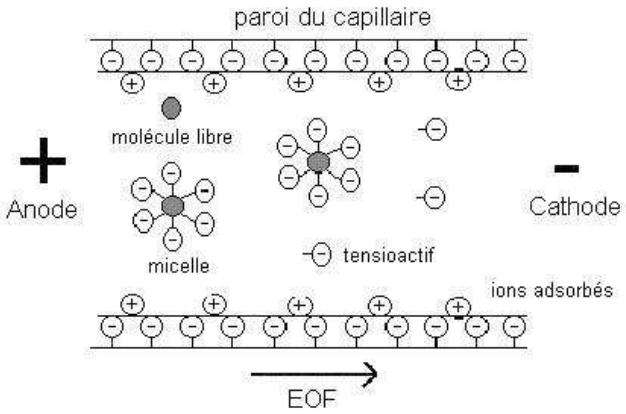


Figure 11 : Représentation de la CECM

4.3.3.c. Electrophorèse capillaire sur gel

L'ECG se fait par des capillaires contenant un gel de polyacrylamide. Celui-ci produit un effet de tamis qui ralentit les grosses molécules et minimise les phénomènes de convection ou de diffusion. La séparation se fait seulement selon la taille des molécules (Figure 12). Ce mode est notamment utilisé pour la séparation de grandes biomolécules comme les peptides le plus souvent dénaturés par le sulfate de dodécyl-sodium et pour la séparation de molécules d'ADN.

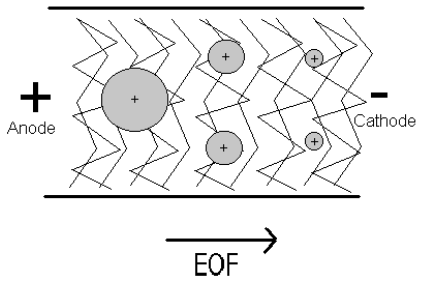


Figure 12 : Electrophorèse capillaire sur gel

4.3.3.d. L'électrochromatographie capillaire

La séparation associe l'électromigration des ions propre à l'électrophorèse, et les effets de partage, phénomène propre à la chromatographie. Il s'agit d'une électrophorèse capillaire dans laquelle le tube contient une phase stationnaire. La phase mobile est en général une solution hydro-organique, la phase stationnaire

étant une silice greffée. Les solutés sont séparés selon leur mobilité électrophorétique et leur coefficient de distribution entre la phase mobile et la phase stationnaire.

4.3.3.e. Electrophorèse à focalisation isoélectrique

L'électrophorèse à focalisation isoélectrique (IEF) consiste à créer un gradient de pH linéaire dans un capillaire à paroi traitée contenant un ampholyte. Ce traitement permet de supprimer l'EOF. Les solutés ionisables s'immobilisent dans la zone où le pH est égal à leur point isoélectrique. Ensuite, sous l'effet d'une pression hydrostatique et en maintenant un champ électrique constant, les espèces ainsi séparées sont dirigées vers le détecteur. L'IEF permet de séparer des peptides et des protéines selon leurs points isoélectriques.

4.3.3.f. Isotachophorèse

Dans cette technique, comme dans la précédente, l'EOF est inexistant et en plus le système tampon est hétérogène. Le capillaire est rempli avec un électrolyte du réservoir initial qui a une mobilité plus élevée que n'importe quelle espèce de l'échantillon. Par contre, l'électrolyte du réservoir final possède une mobilité plus faible que les espèces de l'échantillon. Ceci crée un gradient de mobilité qui permet donc la séparation. Cette méthode s'applique bien à la séparation de petites molécules, de peptides et de protéines.

4.3.4. Séparation d'énantiomères par électrophorèse capillaire

Les énantiomères ayant le même rapport de charge sur masse, une séparation par EC traditionnelle est impossible. Cependant, il existe en EC deux types techniques pour les séparer: une première technique dite indirecte, qui consiste à séparer les énantiomères sous forme de diastéréoisomères après greffage d'un auxiliaire chiral et une deuxième méthode de séparation dite directe employant un support chiral.

La séparation en mode indirect après dérivation chirale des énantiomères n'est pas souvent employée en EC (Fanali *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998).

Le mode de séparation direct nécessite l'injection, dans le capillaire, d'un agent chiral, couramment appelé sélecteur chiral. Cet agent chiral apporte alors un élément de dissymétrie dans l'environnement des énantiomères. L'énantioséparation est finalement basée sur les interactions stéréosélectives des énantiomères avec de tels sélecteurs chiraux.

Parmi les agents chiraux, on retrouve les cyclodextrines (Armstrong *et al.*, 1986; Lurie *et al.*, 1994; Chankvetadze, 1997; Scarcella *et al.*, 1997; De Boer *et al.*, 2000; Fanali, 2000; Fillet *et al.*, 2000; Gübitz *et al.*, 2001; Vescina *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2003), les éthers couronnes (Pena Sanchez *et al.*, 1996), les protéines (Tanaka *et al.*, 1995; Fanali *et al.*, 1997; Fanali *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2000; Sutton *et al.*, 2000), des polysaccharides (D'Hulst *et al.*, 1992; Nishi *et al.*, 1995), les antibiotiques macrocycliques (Amstrong *et al.*, 1994; Fanali *et al.*, 1998; Sutton *et al.*, 2000), les sels biliaires (Terabe *et al.*, 1989) ou les complexes métalliques à ligands chiraux (Gozel *et al.*, 1987).

Au lieu d'une pseudo-phase stationnaire, la séparation des molécules chirales peut se faire dans un capillaire comportant une couche de (mercaptopropyl)-méthyl-silice greffée avec des β-cyclodextrines, mieux connue sous le nom de Chirasil-Dex-silica (Wistuba *et al.*, 1998; Wistuba *et al.*, 2000; Gübitz *et al.*, 2004). De nombreuses autres colonnes ont été employées pour la séparation des nombreux composés tels que les protéines ou des petites molécules (Gübitz *et al.*, 2004).

Parmi toutes les méthodes énumérées, la résolution des énantiomères à l'aide des sélecteurs chiraux des cyclodextrines est de loin la technique la plus employée en EC (Fanali *et al.*, 1998; Salvador *et al.*, 1999; Rudaz *et al.*, 2003; Zukowski *et al.*, 2002; Gübitz *et al.*, 2004).

4.3.5. Les cyclodextrines

4.3.5.a. Bref historique sur les cyclodextrines

La première personne qui a fait référence à une cyclodextrine était M. A. Villiers en 1891, lors de l'expérience de la dégradation de l'amidon par une souche de micro-organismes (l'amylase de Bacillus macerans : cyclodextrinase) (Villiers, 1891). Villiers a alors mis en évidence deux produits (probablement l'α- et la β-cyclodextrine) qu'il a alors appelés « cellulosine », en raison de leurs propriétés

physico-chimiques proches de celle de la cellulose. Les cyclodextrines ont finalement été caractérisées en 1903 par F. Schardinger (Schardinger, 1903) en tant que oligosaccharides cycliques. Par la suite, il les a appelés dextrines dans ses premières publications.

En 1938 Freudenberg et coll. (Freudenberg *et al.*, 1938; Freudenberg *et al.*, 1947) ont montré que les cyclodextrines étaient constituées d'unités de D-glucose liées entre elles par des liaisons α-(1-4)-glucosidiques. De même, il a découvert que les cyclodextrines étaient capables de former des complexes d'inclusion, et il a déterminé la structure de la γ-cyclodextrine (Freudenberg *et al.*, 1948). French et coll. (French *et al.*, 1949) et Cramer et coll. (Cramer *et al.*, 1957) ont finalement travaillé sur la synthèse et la purification de complexes de cyclodextrines. Le premier brevet sur les cyclodextrines a été déposé en 1953 par Freudenberg (Freudenberg *et al.*, 1953). Dès lors, l'étude des cyclodextrines a pris un essor considérable : fabrications industrielles, synthèse de cyclodextrines modifiées, synthèse de complexes d'inclusion, fabrication de colonnes chirales à base de cyclodextrines etc (Szejtli, 1998). Dans les années 1970-1980, les travaux de Szejtli ont apporté une importante contribution à ce domaine.

4.3.5.b. Structure et propriétés des cyclodextrines natives

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques non-réducteurs de l'α-D-(+)-pyranose, obtenues industriellement par dégradation enzymatique de l'amylose (amidon linéaire) à l'aide d'une enzyme, la cyclodextrine glucosyltransférase (CGTase) (Varesio *et al.*, 1995; Szejtli, 1998). Les trois cyclodextrines les plus courantes sont les cyclodextrines naturelles, α-, β- et γ-CD, qui correspondent respectivement à 6,7 et 8 unités de D-(+)-glucopyranose liées en α-1,4 (Figure 13) (Szejtli, 1998; Salvador *et al.*, 1999). Il existe également des CDs plus grandes pouvant renfermer jusqu'à 14 unités glucopyranosiques (Saenger *et al.*, 1998). Par la présence de 5 centres asymétriques par unité glucosidique, les CDs sont des molécules dites hautement chirales.

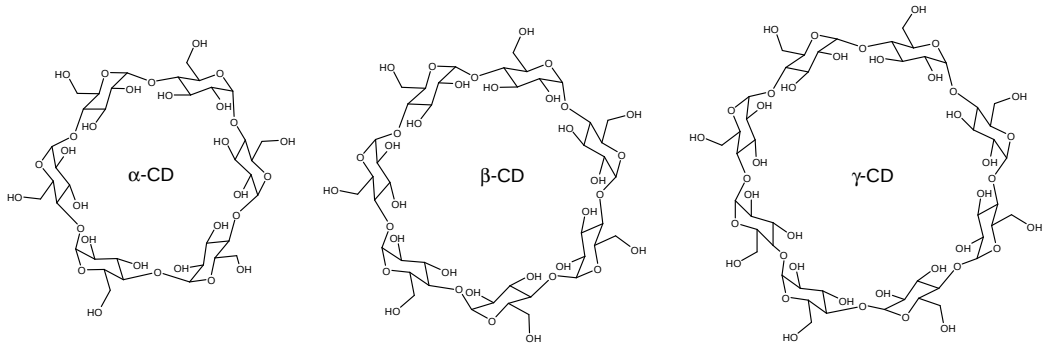


Figure 13 : Structure des trois cyclodextrines natives

Grâce aux structures tridimensionnelles observées par diffraction aux rayons X, on a pu mettre en évidence la forme conique tronquée des CDs avec deux extrémités ouvertes (Figure 14) (Szejtli, 1998; Spanik *et al.*, 2002) . Les hydroxyles primaires (O6) se trouvent sur l'extrémité la plus étroite alors que les hydroxyles secondaires (O2 et O3) sont sur la partie la plus large du cône.

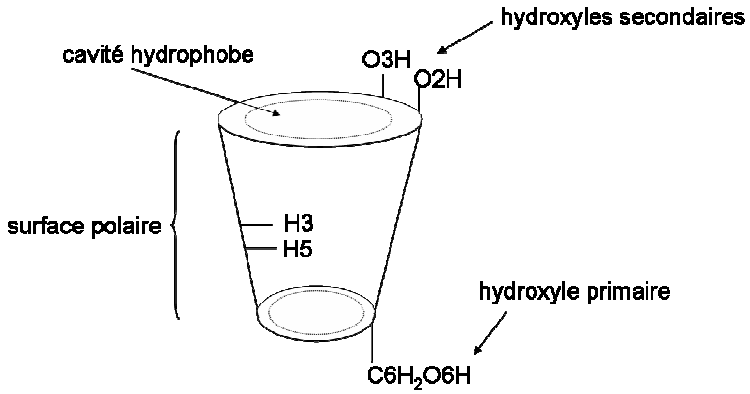


Figure 14 : Représentation schématique simplifiée d'une cyclodextrine

Les oxygènes interglucosidiques (O4) sont situés sur le plan équatorial du cône et dirigés vers l'intérieur de la cavité. Les hydrogènes H1, H2 et H4 sont dirigés vers l'extérieur de la cavité tandis que les hydrogènes H3 et H5 sont orientés vers l'intérieur. Ces derniers sont alors les seuls pouvant interagir avec un substrat inclus dans la cavité. Des liaisons hydrogènes interglucosidiques entre les hydroxyles primaires et secondaires peuvent exister et ainsi conférer une certaine rigidité à la CD. De même, les groupements hydroxyles primaires peuvent tourner légèrement de façon à bloquer l'entrée de la cavité. A cause de leur structure conique tronquée et

de la position particulière des hydroxyles, les CDs sont dites « amphiphiles ». Elles possèdent deux zones de polarité distinctes, une cavité hydrophobique interne et une surface extérieure polaire.

La présence de groupements hydroxyles sur la partie extérieure et les extrémités confèrent un caractère polaire aux CDs et favorisent leur solubilisation dans des milieux très polaires tels que l'eau (Tableau 2). Toutefois il faut noter que la solubilité de la β-CD est relativement faible en raison d'un réseau stable de liaisons hydrogènes entre les fonctions C-O2H et C-O3H, responsables de sa rigidité et empêchant ainsi l'hydratation par les molécules d'eau. L'α-CD et la γ-CD, plus flexibles, présentent deux ou trois unités de glucose inclinées, et par conséquent ne contiennent pas de réseau continu de liaisons H entre les hydroxyles O2 et O3. Ceci entraîne que les groupements -OH sont plus disponibles pour interagir par liaison H avec le solvant (Tableau 2). Pour toutes les CDs, l'intérieur de la cavité est beaucoup moins polaire. Le diamètre intérieur de la cavité varie en fonction du nombre d'unités de glucose entre 5 et 8 Å. Les principales caractéristiques des CDs natives sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2. Principales propriétés physico-chimiques des CDs natives (Szejtli, 1998)

Propriétés	α-CD	β-CD	γ-CD
Unités de glucose	6	7	8
Formule brute (anhydre)	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Masse molaire ($g.mol^{-1}$)	972,8	1135,0	1297,1
Hauteur de la cavité (Å)	7,9±0,1	7,9±0,1	7,9±0,1
Diamètre de la cavité (Å)	4,7-5,3	6,0-6,56	7,5-8,4
Diamètre extérieur (Å)	14,6±0,4	15,4±0,4	17,5±0,4
Volume de la cavité ($Å^3$)	174	262	427
pKa, 25℃	12,332	12,202	12,081
Point de fusion (℃)	278	299	267
Solubilité dans l'eau à 25℃ ($g.L^{-1}$)	145,5	18,5	232,0

C'est ce caractère amphiphile qui donne aux CDs leur capacité à former des

complexes supramoléculaires d'inclusion, dont les propriétés intéressent diverses branches scientifiques et technologiques.

4.3.5.c. Les cyclodextrines modifiées

Parallèlement aux CDs natives, diverses CDs modifiées chimiquement ont fait leur apparition sur le marché. Ces modifications ont été réalisées au niveau de leurs groupements hydroxyles. Elles ont notamment permis de faire varier leurs propriétés physico-chimiques telles que leur stabilité, leur propriétés de solubilisation ou encore leur sélectivité dans l'inclusion (Chankvetadze, 1997; Scarcella *et al.*, 1997; Fanali *et al.*, 1998; Tagliaro *et al.*, 1998; Salvador *et al.*, 1999; De Boer *et al.*, 2000; Vescina *et al.*, 2002; Zukowski *et al.*, 2002).

Les groupements -OH en position 2, 3 ou 6 de chaque unité de glucopyranose possèdent une réactivité suffisamment différente pour induire une sélectivité dans la fixation de différentes fonctions. Parmi les fonctionnalisations chimiques, on trouve le greffage de groupements méthyles, hydroxypropyles, sulfates ou encore amines. Ainsi, par exemple, la (2,6-di-*O*-méthyl)-β-cyclodextrine (DIMEB) est obtenue par méthylation sélective de toutes les fonctions hydroxyles secondaires des atomes O2 et des hydroxyles primaires O6. L'alkylation de la β-CD a ainsi permis d'augmenter considérablement sa solubilité. A côté des CDs neutres, sont aussi apparues des CDs chargées positivement et négativement. La triméthylammonium-β-cyclodextrine est cationique (Szejtli, 1998; De Boer *et al.*, 2000; Mura *et al.*, 2005) tandis que les cyclodextrines sulfatées ou les carboxyméthyl-cyclodextrines sont anioniques (Wren, 1995; Szejtli, 1998; Sabbah *et al.*, 2001; Chen F.-T. A. *et al.*, 2002; Iwata *et al.*, 2002; Zukowski *et al.*, 2002).

Aujourd'hui, on dénombre plus de 100 dérivées différentes de CDs disponibles dans le commerce.

4.3.5.d. Les complexes d'inclusion

Le champ d'utilisation des CDs est très large et leurs principales applications sont liées à leurs propriétés complexantes. Une nouvelle branche de la chimie supramoléculaire, qui s'occupe des structures moléculaires maintenues par des

interactions intermoléculaires, est à l'origine de la notion de composé « hôte-invité » aussi dit « récepteur-ligand ». Dans ce contexte, les CDs ont largement été étudiées.

La principale propriété des CDs est leur capacité à capter une grande variété de molécules dans leur cavité et de former ainsi des composés d'inclusion (Penn *et al.*, 1994; Szejtli, 1998; Fanali, 2000; Chen K.-H. *et al.*, 2002; Iwata *et al.*, 2002; Spanik *et al.*, 2002; Wedig *et al.*, 2002). La formation d'un édifice « hôte-invité » dépend de certains facteurs dont les plus importants sont le facteur stérique, la molécule invitée qui doit pouvoir s'insérer au moins partiellement à l'intérieur de la CD, et le facteur chimique, qui fait que seules les molécules moins polaires que l'eau pourront être complexées. En effet, la cavité légèrement apolaire est occupée par des molécules d'eau, énergétiquement défavorisées (interaction polaire-apolaire). Lors de la formation de complexes d'inclusion, les molécules d'eau peuvent donc être rapidement substituées par des molécules invitées moins polaires. L'inclusion d'une molécule provoque l'expulsion des molécules d'eau. La complexation entraîne une diminution de l'énergie libre du système, et par conséquent, la stabilise. Ainsi les forces motrices de la formation du complexe sont les gains énergétiques liés à la substitution des molécules d'eau par des molécules moins polaires.

Le processus de complexation d'un ligand (S) par une CD est une réaction équilibrée :

$$CD + S \rightleftharpoons CDS$$

Cet équilibre donne accès aux constantes de formation (K) et de dissociation (K_d) d'un complexe permettant de connaître sa stabilité.

Lorsqu'une molécule forme un complexe d'inclusion avec la CD, certaines propriétés physico-chimiques du substrat complexé sont modifiées:

- modification des propriétés spectrales telles que les déplacements chimiques en résonance magnétique nucléaire (RMN) des atomes en raison de l'anisotropie de l'environnement
- diminution de la réactivité du substrat due à sa stabilisation. Les CDs peuvent même se comporter en tant qu'enzyme artificielle accélérant des réactions
- diminution de la volatilité et de la diffusion du substrat
- protection de la molécule hôte contre un certain nombre de réactions excepté celles avec les hydroxyles de la CD

- modification de la mobilité chromatographique de la molécule complexée

Les complexes de stœchiométrie 1 :1 sont les structures les plus fréquemment rencontrées. Il existe cependant des structures de type 1 :2 , 2 :1, 2 :2 et même des complexes plus compliqués (Szejtli, 1998).

4.3.5.e. Les forces impliquées dans les complexes d'inclusion

Il a été démontré que plusieurs forces intermoléculaires intervenaient simultanément lors de la formation d'un complexe, la relativité de chacune des forces dépendant du récepteur et du ligand (Penn *et al.*, 1994; Szejtli, 1998; Fanali, 2000; Chen K.-H. *et al.*, 2002; Iwata *et al.*, 2002; Spanik *et al.*, 2002; Wedig *et al.*, 2002). La stabilisation du complexe formé fait intervenir des liaisons non covalentes, dites faibles à savoir:

- les interactions de van der Waals (2-4 kJ/mol), qui comprennent les interactions des dipôles permanents dues à la polarisabilité des liaisons, appelées forces de Keesom, les interactions entre dipôles permanents dites forces de Debye et les forces de dispersion, couramment appelées forces de London
- les liaisons hydrogènes (10-40 kJ/mol) entre les groupements hydroxyles des CDs et les hétéroatomes de la molécule invitée

4.3.6. Les cyclodextrines en tant que sélecteurs chiraux en électrophorèse capillaire

4.3.6.a. Avantages des cyclodextrines en EC

Grâce à leur capacité complexante, les applications des CDs sont nombreuses, notamment en tant que sélecteurs chiraux en EC. Leur emploi s'est largement développé en EC, car les CDs sont peu coûteuses et stables dans une large zone de pH et elles n'absorbent pas dans la gamme UV généralement utilisée (UV bas vers 200 nm) (Szejtli, 1998; Salvador *et al.*, 1999; Koppenhoefer *et al.*, 2000). L'autre aspect très important des CDs est la très bonne résolution des pics obtenue en EC. A l'opposé, la CHLP, employant des phases stationnaires chirales de CDs, présente un nombre réduit de plateaux théoriques provocant souvent de moins bonnes

résolutions et des élargissements de pics (De Boer *et al.*, 2000; Iwata *et al.*, 2002; Lurie *et al.*, 2004). Par ailleurs, les temps d'analyse sont généralement assez courts en EC et de nombreuses substances peuvent être analysées avec un même capillaire.

4.3.6.b. Mécanisme d'action des cyclodextrines en EC

L'introduction d'une solution contenant des isomères optiques dans un capillaire rempli de CDs conduit à la formation de complexes diastéréoisomériques transitoires ou stables de type « récepteur-ligand » (Penn *et al.*, 1994; Fanali *et al.*, 1998; Wedig *et al.*, 2002). Les énantiomères migrent ainsi avec une mobilité réduite. Si l'affinité d'une CD pour l'un des isomères optiques diffère (constantes de complexation différentes : $K_R \neq K_S$), cet énantiomère interagira alors plus longtemps avec la CD et il sera plus retenu dans le capillaire. La mobilité des solutés sera ainsi sélectivement modifiée ($\mu_R \neq \mu_S$), ce qui entraînera la séparation des énantiomères (Figure 15).

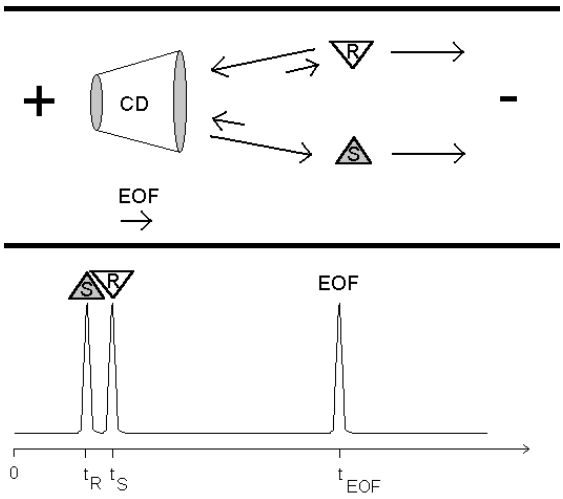


Figure 15 : Principe de la séparation chirale en EC en présence de CDs

La qualité de la séparation des énantiomères est évaluée par la résolution (*Rs*) des pics énantiomériques qui se définit comme suit :

$$Rs = \frac{2\cdot(t_2-t_1)}{\omega_2 + \omega_1} \qquad (9)$$

où t_2 est le temps de migration du pic qui migre le plus loin et t_1 le temps de l'énantiomère le moins retenu (exprimés en sec) et ω les largeurs à la base correspondantes (exprimés en sec).

La résolution chirale en électrophorèse capillaire dépend non seulement des paramètres habituels intervenant dans toute séparation électrophorétique, tels que le pH, l'EOF, la force ionique de l'électrolyte et la température, mais aussi de paramètres plus spécifiques tels que la nature et la concentration du sélecteur utilisé, de l'addition de modificateurs organiques ou de micelles achirales (Fanali, 2000).

4.3.6.c. Constantes de complexation

L'affinité d'un sélecteur chiral type CD vis-à-vis d'un énantiomère et la stabilité d'un complexe diastéréoisomérique peuvent être évaluées en calculant les constantes de formation des complexes. L'EC est une bonne méthode pour déterminer ces constantes de formation.

La formation d'un complexe d'inclusion entre une CD et un ligand S donne accès aux constantes de formation K selon l'expression :

$$K = \frac{[CDS]}{[CD]\cdot[S]} \qquad (10)$$

La mobilité d'un substrat est une combinaison linéaire des mobilités du soluté sous forme libre, μ_l, et sous forme complexée, μ_c.

$$\mu_{EP} = \frac{[S]}{[S]+[CDS]}\cdot\mu_l - \frac{[CDS]}{[S]+[CDS]}\cdot\mu_c \qquad (11)$$

(10) dans (11) donne :

$$\mu_{EP} = \frac{1}{1+ K[CD]}\cdot \mu_l - \frac{K[CD]}{1+K[CD]}\cdot \mu_c \qquad (12)$$

Lors des séparations chirales en présence de CDs, les énantiomères *S* et *R* présentent des constantes de complexation propres K_S et K_R respectivement. Wren et Rowe (Wren *et al.*, 1992b, 1992a; Wren, 1993; Wren *et al.*, 1993; Wren *et al.*,

1994; Wren, 1995) ont développé un modèle théorique qui démontre qu'en EC, la différence de mobilité $\Delta\mu_{EP}$ de deux énantiomères en présence de CD peut se calculer à partir de l'expression suivante :

$$\Delta\mu_{EP} = \frac{[CD](\mu_l-\mu_c)(K_R-K_S)}{1+[CD](K_R+K_S) + K_RK_S[CD]^2} \qquad (13)$$

Dans ce modèle théorique, ils ont posé l'hypothèse, que les complexes de masse et charge similaires, ont la même mobilité électrophorétique μ_c. Ainsi, il est clair que dans l'expression (13) $\Delta\mu_{EP}$ sera nul si :

- $K_R=K_S$
- $\mu_l = \mu_c$
- [CD]=0 ou si [CD] très grand

Il existe donc entre les deux concentrations du sélecteur chiral (entre [CD]=0 et [CD] très grand), une valeur pour laquelle la différence de mobilité effective est maximale, ce qui se traduit par une résolution maximale des énantiomères. Cette concentration s'obtient en résolvant l'équation $\frac{d\Delta\mu_{EP}}{d[CD]} = 0$ à partir de l'équation (13). On trouve comme solution :

$$[CD]_{opt} = \frac{1}{\sqrt{K_RK_S}} \qquad (14)$$

En exprimant K_S en fonction de K_R, $K_S/K_R=n$ (avec n nombre réel, n > 1), la différence de mobilité maximale est alors obtenue pour une concentration optimale de CD:

$$[CD]_{opt} = \frac{(\mu_l-\mu_c)(n-1)}{(\sqrt{n}+1)^2} \qquad (15)$$

Cette équation confirme que la différence de mobilité maximale entre deux énantiomères est d'autant plus grande que le rapport entre K_R et K_S est grand et que la différence entre les mobilités du soluté sous forme libre et sous forme complexée est grande. Or, $(\mu_l-\mu_c)$ est d'autant plus grand que la mobilité du complexe est

contraire à celle de l'analyte. Ceci implique qu'il est préférable que la mobilité du complexe soit opposée à celle de l'analyte, et donc qu'il vaut mieux utiliser un sélecteur chiral portant une charge opposée à celle portée par les énantiomères (Schaeper *et al.*, 2001).

Le modèle développé par Wren et Rowe (Wren *et al.*, 1992b), toujours dans l'hypothèse d'une stœchiométrie 1 :1, permet de calculer à partir de l'équation (11) les constantes apparentes de formation des complexes, ainsi que les mobilités μ_l et $\mu_{c,}$ en reportant la mobilité électrophorétique μ_{EP} en fonction de la concentration du sélecteur chiral, suivi d'un ajustement par régression non linéaire des points expérimentaux.

Les constantes de complexation peuvent être déterminées en EC. Rundlett et Amstrong ont décrit plusieurs méthodes conduisant à la détermination des constantes de formation des complexes par EC (Rundlett *et al.*, 1997, 1996, 2001). L'estimation des ces constantes nécessite une variation de la mobilité électrophorétique sous l'effet de la complexation, et que le soluté ou le sélecteur soit chargé dans les conditions expérimentales données. De même, l'équilibre de la complexation doit être atteint plus rapidement que le temps d'analyse et la quantité de sélecteur chiral doit être supérieure à celle du soluté. Selon Rundlett et Amstrong, l'interaction moléculaire entre un sélecteur chiral et le ligand peut être décrite par la forme hyperbolique de la courbe ayant pour équation :

$$y = \frac{dx}{f + ex} \qquad (16)$$

Où y est la mesure de la réponse expérimentale du système contenant le soluté et le sélecteur, ce qui en EC correspond à $\mu_{EP,}$ x à la concentration en sélecteur sous forme non complexée et d, e et f à des constantes. Le réarrangement de l'équation 16 donne :

$$\frac{1}{y} = \frac{f}{d}\frac{1}{x} + \frac{e}{d} \qquad (17)$$

$$\frac{x}{y} = \frac{e}{d}x + \frac{f}{d} \qquad (18)$$

$$\frac{y}{x} = -\frac{e}{f}y + \frac{d}{f} \qquad (19)$$

Ces équations linéaires et leur courbe correspondante sont dites, respectivement, de forme doublement inversée, inversée en y et inversée en x.

L'équation (11) de modèle de Wren et Rowe (Wren *et al.*, 1992b) ne présente pas la même forme mathématique que l'équation générale (16). Pour ce faire, il est nécessaire de faire un changement de variable où les μ_{EP} et μ_c sont exprimées par rapport à μ_l:

$$(\mu_{EP} - \mu_l) = \frac{(\mu_c-\mu_l)\, K[CD]}{1+[CD]K} \qquad (20)$$

On tire K [CD] de 20 :

$$K\,[CD] = \frac{(\mu_l-\mu_{EP})}{(\mu_{EP}-\mu_c)} \qquad (21)$$

et par analogie avec les équations 17 à 19 on aura :

$$\frac{1}{(\mu_{EP}-\mu_l)} = \frac{1}{(\mu_c-\mu_1)K[CD]} + \frac{1}{(\mu_c-\mu_l)} \qquad (22)$$

$$\frac{[CD]}{(\mu_{EP}-\mu_l)} = \frac{1}{(\mu_c-\mu_l)}[CD] + \frac{1}{(\mu_c-\mu_l)K} \qquad (23)$$

$$\frac{(\mu_{EP}-\mu_l)}{[CD]} = K(\mu_{EP}-\mu_1) + K(\mu_c-\mu_l) \qquad (24)$$

En conclusion, il existe 5 méthodes graphiques principales qui conduisent aux valeurs expérimentales des constantes de complexation K et à la différence $(\mu_c-\mu_l)$. La totalité de ces méthodes sont résumées dans le tableau 3 ci-dessous.

On peut noter que l'équation (26) ne peut être utilisée que si la mobilité de l'espèce complexée μ_c est obtenue expérimentalement, ce qui n'est pas possible. En revanche, les équations 27-29 sont les plus utilisées pour la détermination des constantes de complexation (Heintz *et al.*, 1999; Salvador *et al.*, 1999; Biosca-Martín *et al.*, 2000; Chen K.-H. *et al.*, 2002; Danel *et al.*, 2005; Nhujak *et al.*, 2005; Rundlett *et al.*, 2001). Les valeurs des constantes K obtenues sont du même ordre de grandeur que celles rapportées par d'autres techniques et l'incertitude relative est moins de 10% dans la plupart des cas (Rundlett *et al.*, 1996).

Tableau 3. Résumé des méthodes graphiques permettant de déterminer la constante de formation de complexes K par EC (Rundlett *et al.*, 1997)

Équation N° / Méthode graphique	K	$(\mu_c-\mu_l)$
25 / Courbe hyperbolique	Regression non linéaire	
26/ Rapport des différences de mobilité $\frac{(\mu_l-\mu_{EP})}{(\mu_{EP}-\mu_c)}$ *vs*. [CD]	pente	Déterminé expérimentalement
27 / Doublement inversée $\frac{1}{(\mu_{EP}-\mu_l)}$ *vs*. $\frac{1}{[CD]}$	$\frac{o^*}{pente}$	$\frac{1}{o^*}$
28 / Inversée en y $\frac{[CD]}{(\mu_{EP}-\mu_l)}$ *vs*. [CD]	$\frac{pente}{o^*}$	$\frac{1}{pente}$
29 / Inversée en x $\frac{(\mu_{EP}-\mu_l)}{[CD]}$ *vs*. $(\mu_{EP}-\mu_l)$	− pente	$-\frac{o^*}{pente}$

N.B. o* = ordonnée à l'origine

Des erreurs dans la détermination des valeurs de K peuvent survenir, car la mobilité électrophorétique des isomères peut changer par ajout d'une CD dans le milieu par exemple. Comme l'ajout de CD modifie la viscosité de l'électrolyte, il s'avère indispensable de corriger les mobilités expérimentales par un facteur qui tient compte de ce phénomène. Ce problème peut se résoudre de différentes façons : (i) ajout d'un marqueur de mobilité qui ne se complexe pas aux sélecteurs chiraux (Rundlett *et al.*, 1996), (ii) mesure de la viscosité de l'électrolyte (Penn *et al.*, 1993; Penn *et al.*, 1994; Sabbah *et al.*, 2001; Nhujak *et al.*, 2005), (iii) mesure du courant généré (Salvador *et al.*, 1999), (iv) mesure de la mobilité du flux électroosmotique (Rundlett *et al.*, 1996; Biosca-Martín *et al.*, 2000; Chen F.-T. A. *et al.*, 2002; Rudaz *et al.*, 2003; Busby *et al.*, 2005).

4.4 Applications des séparations énantiosélectives en toxicologie analytique

Le nombre croissant de publications parues sur les séparations énantiosélectives des drogues témoigne du grand intérêt que portent la toxicologie analytique et la toxicologie médico-légale à de telles analyses spécifiques. En effet, de nombreuses substances illicites telles que les STA, la cocaïne ou encore la MTD sont chirales et l'activité pharmacologique dépend de l'énantiomère. La toxicologie analytique et la toxicologie médico-légale ont souvent recours aux analyses stéréospécifiques dans les cas suivants :

- Etude du profil pharmacologique et toxicologique d'un énantiomère chez l'homme. Ainsi, ces études ont notamment permis de démontrer que la (*S*)-AM était 3 à 4 fois plus stimulante que la (*R*)-AM.
- Elucidation de la cause de la mort ou bien traitement de personnes intoxiquées. Une intoxication voire même la mort d'individu peut survenir après une administration non contrôlée de lévométhorphane, un analgésique opiacé. A l'opposé, le dextrométhorphane, prescrit comme antitussif, peut provoquer des malaises chez les métaboliseurs lents (Thormann *et al.*, 1998).
- Dans certains pays, un seul énantiomère est sous contrôle légal. La séparation des énantiomères permet ainsi de faire la distinction entre une consommation illicite et licite. Les Etats-Unis ont inscrit la (*S*)-MA sur la liste des stupéfiants interdits, mais la vente de l'inhalateur nasal Vicks, contenant de la (*R*)-MA, reste autorisée (Baumgartner *et al.*, 1989; Cody *et al.*, 1993).
- Distinction entre un usage licite et une consommation illicite. Certains médicaments contiennent ou se transforment au cours de la métabolisation en composés illicites. C'est le cas de la sélégiline, qui est utilisée pour le traitement de la maladie de Parkinson et qui se métabolise en (*R*)-MA puis en (*R*)-AM (Liu *et al.*, 2002; Iio *et al.*, 2005; Nyström *et al.*, 2005).
- Identification du chemin de synthèse d'échantillons clandestins. La présence de la *l*-cocaïne dans un échantillon est généralement obtenue après extraction des feuilles de coca, tandis qu'un mélange racémique de cocaïne est le résultat d'une synthèse chimique (Lurie *et al.*, 1994) . De même, au Japon, on trouve plutôt de la (*S*)-MA, obtenue à partir de la (1*R*,2*S*)-(-)-éphédrine ou de la (1*R*,2*S*)-(+)-pseudo-éphédrine, alors qu'en Europe la MA racémique est

principalement fabriquée à partir de l'acétylphénone (Fanali *et al.*, 1998; Iwata *et al.*, 2002)

- Contrôle de l'adhérence thérapeutique (compliance) à un traitement de substitution notamment par la MTD. A cause des propriétés pharmacologiques différentes des énantiomères de la MTD, il s'avère nécessaire de contrôler la quantité de la (*R*)-MTD dans les matrices biologiques afin d'optimiser au maximum le traitement pour chaque individu et de prévenir ainsi tout risque d'intoxication (Huy-Pham *et al.*, 1997; Chikhi-Chorfi *et al.*, 1998).

4.4.1. Séparation énantiosélective par CG/SM avec une colonne achirale

En toxicologie analytique, les séparations chirales par CG/SM ont été réalisées surtout pour les STA, pour les médicaments à base de STA comme la sélégiline, ou pour des médicaments qui sont transformés dans le corps en dérivés STA, comme le fenproporex ou encore le famprofazone. La dérivation chirale des énantiomères est la technique la plus communément appliquée pour le cas des STA. En effet, les dérivations chimiques évitent l'emploi de colonnes chirales assez chères et souvent seulement adaptées aux séparations de certains types de molécules. Par ailleurs, les séparations sur des colonnes chirales nécessitent souvent aussi au préalable une dérivation chimique des STA afin d'augmenter leur volatilité et surtout leur sensibilité au niveau de la détection en SM (Liu *et al.*, 2002). Toutes ces raisons font que les séparations énantiosélectives des STA sous forme de diastéréoisomères sur colonne achirale en CG/SM ont largement été employées en toxicologie analytique.

Le chlorure de *N*-trifluoroacétyl-*l*-prolyl (*l*-TPC) est souvent employé en tant que réactif chiral de dérivation des STA (Fitzgerald *et al.*, 1988; Cody *et al.*, 1993; Moore *et al.*, 1996; Van Bocxlaer *et al.*, 1997; Cody *et al.*, 1998, 1999; Hensley *et al.*, 1999; Kupiec *et al.*, 1999; George *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002; Tao *et al.*, 2002; Nyström *et al.*, 2005). D'autres auxiliaires chiraux tels que le réactif de Mosher ((*R*)-MTPCL) (Gal, 1977; Fallon *et al.*, 1999; Pizarro *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2004; Holler *et al.*, 2005; Rasmussen *et al.*, 2006), le 1*R*,2*S*,5*R*-(-)-menthylchloroformiate (MCF) (Hughes *et al.*, 1991) et le chlorure de (*S*)-heptafluorobutyrylprolyle ((*S*)-HFBPCl) (Lim *et al.*, 1986; De Boer *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 2002; Leis *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2003b), ont aussi servi d'agent de dérivation chiral dans les analyses des STA extraits de matrices biologiques telles que le plasma/sérum, l'urine

et la salive. A part le (*S*)-HFBPCl, tous ces réactifs sont commercialisés et leurs avantages et désavantages sont multiples.

Le *l*-TPC est le réactif de dérivation chiral (pureté optique > 99.5%) le plus employé dans le cadre des STA. Les diastéreoisomères, résultant de la réaction avec le *l*-TPC, peuvent être séparés en 30 minutes par CG/SM-EI. Néanmoins, de nombreux auteurs suggèrent un contrôle très régulier de la pureté optique du *l*-TPC. En effet, le *l*-TPC a tendance à se racémiser (Fitzgerald *et al.*, 1988; Hensley *et al.*, 1999).

Le désavantage majeur de l'emploi du MCF est que les résolutions des pics diastéréoisomériques de l'AM et de la MA par CG ne sont pas très bonnes (pas de séparation de ligne de base). Par ailleurs, cette méthode n'a pas encore été testée avec les énantiomères de la MDA, MDMA et MDEA.

Le réactif de Mosher a déjà été employé de manière efficace pour les résolutions chirales des dérivés amphétaminiques en CG/SM-EI. La stabilité stéréochimique du réactif est un de ses avantages. Toutefois la procédure de dérivation est assez longue (45 minutes jusqu'à 2 heures), car elle nécessite deux incubations successives (Pizarro *et al.*, 2003; Rasmussen *et al.*, 2006).

Le (*S)*-HFBPCl quant à lui doit être synthétisé selon une procédure proposée par Lim *et al.* (Lim *et al.*, 1986). Le (*S*)-HPBPCl présente une pureté optique ≥ 99.8%, stable même 10 mois après sa synthèse (De Boer *et al.*, 1997; Peters *et al.*, 2002; Leis *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2003b). Par ailleurs, la procédure de dérivation est simple et rapide (30 minutes). Cette méthode a conduit à des très bonnes séparations des énantiomères des STA.

4.4.2. Dosage des énantiomères des stimulants de type amphétaminique dans les cheveux

Seules quelques méthodes analytiques ont été développées pour la séparation des énantiomères des STA extraits à partir de cheveux humains. Les techniques développées à cet effet sont l'électrophorèse capillaire (EC) couplée à l'UV (Scarcella *et al.*, 1997; Tagliaro *et al.*, 1998) ou la CHPL couplée soit à l'UV, soit à un détecteur à fluorescence (Nagai *et al.*, 1989; Nagai *et al.*, 1988; Al-Dirbashi *et al.*, 1999b; Al-Dirbashi *et al.*, 2000; Phinney *et al.*, 2004). Les méthodes EC mises en

place par Scarcella et coll. (Scarcella *et al.*, 1997) et par Tagliaro et coll. (Tagliaro *et al.*, 1998) permettaient une analyse simultanée de tous les énantiomères des STA les plus courants. Les techniques de la CHLP quant à elles étaient basées sur des colonnes chirales, spécifiques aux isomères de l'AM et de la MA seulement. Certains de ces procédés seulement ont été appliqués à l'étude de cas réels. Les observations faites et les interprétations étaient peu concluantes. En effet, aucun mécanisme d'incorporation ni aucune information spécifique sur la répartition des énantiomères des STA dans les cheveux n'a été proposée. Finalement, toutes ces méthodes présentaient des inconvénients majeurs tels que des temps d'analyses trop longs, des mauvaises résolutions de pics, et surtout un manque de sensibilité.

Tagliaro et coll., qui ont analysé un échantillon unique de cheveux d'un consommateur d'ecstasy par EC, a observé un excès énantiomérique de la (*R*)-MDMA dans cet échantillon (Tagliaro *et al.*, 1998). Nagai et coll. (Nagai *et al.*, 1988) et Al-Dirbashi et coll. (Al-Dirbashi *et al.*, 1999b; Al-Dirbashi *et al.*, 2000) ont appliqué leur méthode CHLP à la quantification énantiosélective de l'AM et de la MA dans les cheveux. Aucun rapport énantiomérique *R*/*S* n'a pu être calculé dans ces études, car seuls les énantiomères (*S*)-AM et (*S*)-MA avaient été détectés. L'interprétation des résultats s'est alors avérée difficile pour plusieurs raisons : soit les individus avaient consommé des amphétamines optiquement pures, soit l'accumulation des énantiomères dans les cheveux était stéréospécifique avec une préférence pour la forme (*S*), ou bien la concentration des isomères (*R*) dans les cheveux était si basse que la méthode n'était pas assez sensible pour les détecter.

Récemment, une séparation des énantiomères des STA a été obtenue sur phase achirale par CG couplée à un SM en mode ICN après dérivation chirale par le (*S*)-HFBPCl (Peters *et al.*, 2002; Leis *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2003b). Le plus gros avantage de la méthode est sa détection par SM en mode ICN, qui s'est avérée être très efficace pour la détection des STA. La très bonne sensibilité de cette méthode s'explique par le fait que les STA, greffés par le (*S*)-HFBPCl, portent 7 atomes de fluor, ce qui a permis d'augmenter le rapport signal/bruit de fond, et de nettement améliorer leur limite de détection. Ce procédé a été appliqué à la détermination des rapports énantiomériques des STA extraits du sang (Peters *et al.*, 2002; Leis *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2003b) ou de la salive (Peters *et al.*, 2003a).

Cette méthode a aussi été employée dans le cadre de travaux préliminaires sur l'incorporation énantiomères des STA dans les cheveux, réalisés au sein du laboratoire (Martins, 2004; Martins *et al.*, 2005). Les limites de détection avaient été abaissées d'un facteur moyen de 20 par rapport aux techniques déjà publiées. L'analyse de cheveux contenant potentiellement des STA a permis de calculer pour la première fois des rapports *R*/*S* de l'AM et de la MA dans les cheveux. Une prédominance de la (*S*)-MA et de la (*S*)-AM avait été observée sans donner d'interprétation. En effet, l'AM et la MA sont disponibles sous forme pure et sous forme de mélanges racémiques. Or, comme on n'avait aucune indication sur la nature du mélange d'amphétamines administré, la prépondérance des énantiomères (*S*) dans les cheveux n'a pas pu être expliquée. Aucun échantillon n'a été testé positif aux énantiomères de la MDEA, de la MDA ou de la MDMA. Cette méthode présentait également des désavantages. Les pics diastéréoisomériques n'étaient pas très symétriques, et certains pics, notamment ceux de la MDA, présentaient un phénomène d'élargissement (« *tailling* » en anglais). En outre, les limites de détection des énantiomères de la MDMA et de la MDEA étaient beaucoup moins bonnes par rapport à celles de l'AM ou de la MA. Ceci pourrait poser un problème, notamment lors de dosages de très faibles quantités.

Par ailleurs, il est bien connu que les traitements chimiques tels que les shampoings décolorants, les permanentes ou encore les radiations UV diminuent les concentrations des drogues dans les cheveux (Cirimele *et al.*, 1995; Pötsch *et al.*, 1996; Skopp *et al.*, 1997; Yegles *et al.*, 2000). Seule une étude a porté sur l'influence de tels traitements chimiques sur les concentrations totales de la MA et de l'AM dans les cheveux (Takayama *et al.*, 1999). Or, elle n'a pas évalué l'impact de tels traitements sur la disposition des énantiomères des STA incorporés dans les cheveux.

4.4.3. Séparation énantiosélective par électrophorèse capillaire

L'EC est devenue une méthode de séparation présentant beaucoup d'atouts en toxicologie clinique et médico-légale. L'emploi des CDs en tant que sélecteurs chiraux est très répandu dans l'analyse chirale de nombreuses substances illicites comme l'éphédrine, la pseudo-éphédrine, la cocaïne ou encore le racéméthorphane (Lurie *et al.*, 1994; Thormann *et al.*, 1998; Zaugg *et al.*, 2000; Thormann *et al.*, 2001;

Lurie *et al.*, 2004). Un grand intérêt a notamment été porté aux déterminations stéréosélectives des STA, de la MTD et de son métabolite l'EDDP.

Dans le cas des STA extraits de matrices biologiques ou de poudres illicites, certaines études ont démontré que les CDs à 7 unités de glucopyranose, de type β-CD, semblaient être les meilleurs sélecteurs chiraux pour la séparation des énantiomères (Varesio *et al.*, 1995; Scarcella *et al.*, 1997; Sadeghipour *et al.*, 1998; Tagliaro *et al.*, 1998; Heo *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2002; Vescina *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003; Liau *et al.*, 2003; Tábi *et al.*, 2003; Nhujak *et al.*, 2005). Ce choix se justifierait par le fait que la cavité de la α-CD serait trop étroite et celle de la γ-CD trop large pour accueillir ces molécules. L'ajout de telles β-CD neutres ou chargées dans le milieu a permis d'obtenir de très bonnes résolutions de pics pour les énantiomères des STA. Parmi les CDs les plus utilisées, on trouve la β-CD native (Scarcella *et al.*, 1997; Heo *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003), la β-cyclodextrine hautement sulfatée (HS-β-CD) (Liau *et al.*, 2003), la carboxy-méthyl-β-cyclodextrine (CM-β-CD) (Heo *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000), la 2-hydroxypropyl- β-cyclodextrine (HP-β-CD) (Varesio *et al.*, 1995; Scarcella *et al.*, 1997; Sadeghipour *et al.*, 1998; Ramseier *et al.*, 1999; Heo *et al.*, 2000; Cherkaoui *et al.*, 2001; Di Pietra *et al.*, 2001; Vescina *et al.*, 2002; Szöko *et al.*, 2004), la heptakis-2,6-di-*O*-méthyl- β-cyclodextrine (DIMEB) (Vescina *et al.*, 2002; Tábi *et al.*, 2003; Nhujak *et al.*, 2005), la heptakis-2,3,6-tri-*O*-méthyl-β-CD et la heptakis-3-*O*-acétyl-2,6-di-O-méthyl-β-CD (Vescina *et al.*, 2002).

Par ailleurs, les γ-cyclodextrines hautement sulfatées (HS-γ-CD), qui ont une cavité plus grande, ont également conduit à la séparation énantiosélective des STA les plus courants (Iwata *et al.*, 2002; Iwata *et al.*, 2003; Rudaz *et al.*, 2005). D'autres auteurs ont combiné deux types de CDs pour obtenir des séparations énantiosélectives plus nettes pour l'AM ou pour la MA (Lurie *et al.*, 1994; Chinaka *et al.*, 2000). La plupart des ces méthodes ont été appliquées avec succès à la quantification énantiosélective des STA provenant de saisies ou bien à des analyses de spécimens biologiques humains tels que l'urine, les cheveux ou encore le sérum.

Quelques articles ont aussi proposé des procédés pour la séparation énantiosélective de la MTD et de son métabolite principal, l'EDDP par EC. Les CDs ont principalement joué le rôle de sélecteurs chiraux. Frost et coll., Kelly et coll. et Berens et coll. ont testé en EC/UV de nombreuses CDs telles que la α-CD, β-CD et

la γ-CD naturelles ou encore des CDs modifiées ou chargées telles que la DIMEB, la méthyl-β-cyclodextrine, la HP-β-CD, la heptakis-(3-*O*-acétyl-2,6-di-*O*-méthyl)-β-cyclodextrine, la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-méthyl)-β-cyclodextrine ou la CM-β-CD (Frost *et al.*, 1997; Berens *et al.*, 2002; Kelly *et al.*, 2003). La plupart de ces CDs ont conduit à la séparation chirale totale de la MTD, alors que les pics des énantiomères de l'EDDP n'étaient jamais ou seulement partiellement résolus. Les meilleures résolutions des pics de la MTD et de l'EDDP ont été observées en employant la DIMEB, bien que la séparation des pics des énantiomères de l'EDDP ne fût pas totale et que le temps d'analyse fût assez long (± 20 minutes). Cette dernière méthode a finalement été appliquée à la quantification des énantiomères de l'EDDP et de la MTD extraits de l'urine, du sérum et même, dans un cas, de cheveux.

Beaucoup d'autres auteurs ont préféré optimiser une méthode en EC/UV à l'aide de la HP-β-CD (Lanz *et al.*, 1996; Ramseier *et al.*, 1999). De nouveau, une séparation énantiosélective totale a pu être observée seulement pour les pics de la MTD. Cette méthode a surtout été employée au dosage des énantiomères de la MTD et de l'EDDP dans les urines.

Wind et coll. ont étudié la séparation énantiosélective de la MTD par la CM- β-CD, un CD chargé négativement (Wind *et al.*, 2000). Leur idée était de jouer sur les interactions électrostatiques entre la CD anionique et la MTD chargée positivement pour séparer les isomères optiques de cette dernière. Les valeurs de Rs calculées étaient largement supérieures à 2.

Une très bonne séparation simultanée des pics des énantiomères de la MTD et de l'EDDP par EC/UV en présence de HS-β-CD a pu être obtenue par Esteban et coll. (Esteban *et al.*, 2004). Le procédé a surtout été appliqué au dosage de la MTD et de l'EDDP extraits de sérums de personnes séropositives suivant un traitement de trithérapie contre le VIH et participant aussi parallèlement à un programme de substitution par la MTD.

Le couplage d'un nouveau mode de détection à l'EC, la SM a apporté beaucoup d'améliorations au niveau de la détection. Le couplage de la SM est obtenu en utilisant une source électrospray (électrovaporisation, ESI-SM). Or, à l'inverse de la plupart des analytes, les CDs ne sont pas volatiles. Afin d'éviter de polluer l'électrospray et la source SM, les analyses chirales doivent être réalisées en mode normal (détection à la cathode) en présence de CDs anioniques. Ainsi, en absence

d'EOF, les CDs anioniques migrent alors vers l'anode, à savoir dans le sens opposé au détecteur SM. La CM-β-CD, la sulfato-butyl-éther-β-cyclodextrine, la HS-γ-CD ont ainsi été testées avec succès en EC-ESI/SM dans les séparations énantiosélectives des STA ou encore de la MTD (Cherkaoui *et al.*, 2001; Rudaz *et al.*, 2001; Iwata *et al.*, 2003; Rudaz *et al.*, 2003; Rudaz *et al.*, 2005).

4.4.4. Dosage énantiosélectif de la MTD et de son métabolite principal l'EDDP dans la salive

La surveillance de patients par le dosage des énantiomères de la MTD est très importante. En effet, à cause des différentes propriétés pharmacologiques des isomères optiques et, surtout à cause des grandes différences interindividuelles au niveau de la métabolisation de la MTD, il est utile de doser les énantiomères de la MTD chez les patients pour mieux pouvoir dresser leur profil thérapeutique et pour éviter des cas d'intoxications. De tels dosages permettent de vérifier si les individus adhèrent bien au traitement, s'ils suivent les prescriptions données et s'ils ne consomment pas de la MTD d'origine clandestine (Wolff *et al.*, 1991; Dos Santos Lucas *et al.*, 2000; Ortelli *et al.*, 2000).

Seules deux méthodes ont été mises au point à ce jour pour le dosage des énantiomères de la MTD et/ou de l'EDDP extraits de salive (Ortelli *et al.*, 2000; Rosas Rodriguez *et al.*, 2003). Les deux ont utilisé la CLHP avec une phase de silice greffée par des groupements d'acides α_1-glycoprotéiques (AGP) pour les séparations énantiosélectives des molécules, la détection se faisant par SM/ESI. Or, le procédé mis au point par Rosas et coll. est le seul à permettre le dosage simultané des énantiomères de la MTD et de l'EDDP. La séparation des pics énantiomériques était presque jusqu'à la ligne de base pour les deux composés. Les valeurs des limites de détection étaient correctes, avec des valeurs situées autour de 5 ng/mL. Cependant, des pertes de résolution et de sensibilité ont pu être observées après un certain nombre d'injections. En effet, la colonne AGP a tendance à se détériorer assez vite avec le nombre d'analyses, limitant ainsi sa durée d'utilisation (Kristensen *et al.*, 1994; Rudaz *et al.*, 1999b; Boulton *et al.*, 2000).

5. La modélisation moléculaire

5.1. Introduction

Le terme « modélisation moléculaire » est utilisé pour décrire l'étude théorique de molécules et de systèmes moléculaires. La modélisation a pour but de prévoir la structure et la réactivité de molécules ou de systèmes moléculaires tout en manipulant des structures en trois dimensions.

Depuis longtemps, la modélisation moléculaire occupe une place primordiale dans la recherche scientifique, notamment en chimie. Au début, elle n'était réservée qu'à des chercheurs très expérimentés, qui utilisaient des programmes informatiques très complexes, difficiles à maîtriser. En plus, à cause de la faible puissance des ordinateurs, la modélisation moléculaire ne se résumait principalement qu'à l'étude de petites molécules, et les temps de calculs étaient extrêmement longs. Toutefois, grâce au développement d'ordinateurs de plus en plus puissants, l'emploi de la modélisation moléculaire dans l'étude de nouveaux composés chimiques et biochimiques est aujourd'hui très répandu en recherche. D'ailleurs, le prix Nobel de Chimie de 1998 fût attribué à John A. Pople et Walter Kohn pour leurs travaux dans les domaines de la chimie informatique et de la modélisation moléculaire (chimie quantique).

5.2. Méthodes de calcul en modélisation moléculaire

Les méthodes de calculs théoriques utilisées en modélisation moléculaire pour la simulation de systèmes moléculaires peuvent être rangées en trois catégories : les méthodes quantiques (*ab initio*), les méthodes semi-empiriques et les méthodes empiriques (mécanique moléculaire, dynamique moléculaire).

La mécanique quantique a pour objectif principal de déterminer l'énergie et la distribution électronique au sein d'une structure donnée. Les méthodes quantiques sont basées sur la résolution mathématique de l'équation de Schrödinger. L'équation peut être résolue sans approximation (*ab initio*) ou en introduisant des approximations (semi-empirique). Les calculs des ces deux méthodes sont généralement très longs et onéreux. De plus, elles sont plutôt réservées à l'étude de petites molécules

La mécanique moléculaire, appelée parfois « calcul de champ de force », est une méthode de calcul qui permet, d'obtenir des résultats de géométries et d'énergies moléculaires en se basant sur la mécanique classique. Les calculs sont généralement plus rapides et s'appliquent aussi à des systèmes moléculaires très grands. La mécanique moléculaire est basée sur l'approximation de Born-Oppenheimer, selon laquelle les électrons sont plus rapides que les noyaux, ces derniers étant considérés comme des masses fixes. Ainsi, en mécanique moléculaire, on considère donc une structure moléculaire comme étant composée de billes (noyaux ou atomes) et de ressorts de différentes forces (liaisons), associés à une série de fonctions de potentiel. La somme de ces fonctions est exprimée sous la forme d'un champ de force moléculaire.

$$E_{total} = E_{lié} + E_{non\text{-}lié} \qquad (30)$$

où $E_{lié} = E_{liaison} + E_{angle} + E_{torsion}$

$E_{non\text{-}lié} = E_{van\ der\ Waals} + E_{électrostatique}$

Aujourd'hui il existe plusieurs champs de forces (modèles mathématiques) qui représentent aussi bien que possible les variations de l'énergie potentielle totale avec la géométrie moléculaire. Chaque champ de force contient un ensemble de type d'atomes, de paramètres et d'équations qui lui est propre. A ce jour, il n'existe pas encore de modèle unique permettant de simuler tous les aspects du comportement moléculaire. Les champs de force les plus répandus sont AMBER (Weiner *et al.*, 1981), MM3 (Allinger *et al.*, 1989), CHARMM (Brooks *et al.*, 1983) et CVFF (Dauber-Osguthorpe *et al.*, 1988), développés par des universitaires. Il existe également des logiciels commerciaux assez répandus tels que Insight (Accelrys) ou encore Sybyl (Tripos).

5.3. Le programme AMBER et son champ de force

AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) est un logiciel de mécanique moléculaire développé par Peter Albert Kollman et coll. pour étudier les protéines, les acides aminées et bien d'autres petites molécules (Weiner *et al.*, 1981;

Wipff *et al.*, 1982). L'équation du champ utilisée par AMBER v8 (Case *et al.*, 2004), qui définit l'énergie totale d'une molécule, est la suivante :

$$E_{tot} = \sum_{\text{paires liées}} K_r (r - r_{éq})^2 \quad (31)$$

$$+ \sum_{\text{angles de liaisons}} K_\theta (\theta - \theta_{éq})^2 \quad (32)$$

$$+ \sum_{\text{angles dièdres}} 1/2\ Vn\ (1 + \cos[nf - g]) \quad (33)$$

$$+ \sum_{i<j} A_{ij}/r_{ij}^{12} - B_{ij}/r_{ij}^{6} \quad (34)$$

$$+ \sum_{i<j} q_i\, q_j/\varepsilon\, r_{ij} \quad (35)$$

Avec (31) : énergie des longueurs de liaisons
(32) : énergie des angles
(33) : énergie des angles dièdres
(34) : énergie d'interaction de type van der Waals
(35) : énergie d'interaction de type électrostatique

5.4. Les techniques de la modélisation moléculaire

Le docking, la minimisation d'énergie et la dynamique moléculaire sont des techniques couramment employées en modélisation moléculaire pour l'évaluation de la structure et de la stabilité d'un système donné.

5.4.1. Principe de la méthodologie du docking

La technique du docking utilisée en modélisation moléculaire permet de prévoir la structure d'un complexe intermoléculaire formé entre deux molécules ou plus. Le docking est souvent utilisé pour prévoir les différents modes de fixation des inhibiteurs de protéines. Divers algorithmes de docking ont été développés afin de prévoir et de visualiser les sites de fixation d'un ligand par rapport à un récepteur.

Le problème du docking peut être résolu en adaptant de façon « manuelle » un ligand sur un récepteur. Cette approche manuelle s'avère très efficace dans le cas où le site de fixation d'une molécule analogue sur un récepteur est déjà connu dans la littérature. Cette méthode présente néanmoins des limitations, car les expériences cristallographiques aux rayons X ont révélé que des ligands très semblables peuvent adopter des sites de fixation tout à fait différents.

Divers algorithmes automatisés ont finalement été développés pour aborder le problème du docking, et parmi les algorithmes les plus courants on trouve FlexX (Rarey *et al.*, 1996), GOLD (Jones *et al.*, 1997) et DOCK (Ewing *et al.*, 2001).

L'algorithme de DOCK, par exemple, réalise le docking des molécules rigides à l'aide d'un algorithme géométrique adapté pour superposer le ligand sur une image négative du site de fixation au niveau d'un récepteur (Ewing *et al.*, 2001). Le programme crée tout d'abord une « image négative » du site actif de fixation à partir de la surface accessible du récepteur. Cette image négative se compose d'un ensemble de sphères de rayons variables qui se recouvrent entre elles, mais dont chacune ne touche la surface du récepteur qu'à deux points seulement. Le programme construit ensuite une grille d'énergie pour le récepteur. Chaque point de cette grille renferme les paramètres de van der Waals et les charges partielles pour cet espace donné. Les atomes du ligand sont alors raccordés aux centres des sphères et la molécule est finalement positionnée dans le site de fixation du récepteur tout en l'ajustant par rapport à ces centres des sphères. Les orientations favorables des ligands dans les sites de fixation d'un récepteur peuvent être générées par DOCK en combinant différents ensembles d'atomes du ligand avec différents ensembles de centres de sphères. Chaque orientation de la molécule dans le site est vérifiée afin de s'assurer qu'il n'existe aucune interaction stérique inacceptable entre le ligand et le récepteur. Une fois le positionnement vérifié, le programme calcule les énergies d'interaction correspondant aux modes de fixation possibles et donne un classement décroissant des orientations énergétiquement favorables.

5.4.2. Minimisation de l'énergie

Une minimisation en mécanique moléculaire implique une recherche de la conformation minimale d'énergie potentielle totale Ep_t d'une molécule. La

minimisation est un processus itératif dans lequel les coordonnées des atomes sont constamment ajustées afin d'amener la molécule à une énergie minimale. A partir d'une géométrie, on recherche le jeu de coordonnées cartésiennes qui réduit à son minimum la somme de toutes les contributions énergétiques dues aux déformations des coordonnées internes et aux interactions entre atomes non liés. Il existe différents algorithmes de minimisation, mais toutes ces méthodes ont un point commun : on commence à un endroit donné de l'hypersurface de l'énergie potentielle et on descend de façon itérative le long de l'hypersurface vers le minimum le plus proche sans savoir si ce minimum est local ou absolu. Les procédures pour atteindre ce but sont de deux types : la méthode de la plus grande pente (steepest descent) et la méthode du gradient conjugué utilisent uniquement la pente de la surface de la courbe (dérivée première), alors que la méthode Newton-Raphson utilise à la fois cette pente et la courbure de la surface (dérivée première et seconde).

La différence entre la méthode « steepest descent » et la méthode du gradient conjugué est que la première technique calcule la dérivée première et suit la direction imposée par les forces interatomiques, alors que le gradient conjugué nécessite aussi le calcul de la dérivée première, mais tient en plus compte des étapes précédentes afin de déterminer plus finement la direction et le pas. Mais comme l'algorithme du gradient conjugué est beaucoup moins efficace pour des structures présentant de nombreux mauvais contacts, une combinaison des deux techniques steepest descent et gradient conjugué est souvent nécessaire. La méthode de Newton-Raphson quant à elle demande un calcul de la matrice complète des dérivés secondes, ce qui fait que cette procédure est beaucoup plus longue, qu'elle nécessite beaucoup d'espace de mémoire et qu'elle s'applique plutôt aux petits systèmes.

Le problème des minima locaux est l'inconvénient majeur de la minimisation. Le processus de minimisation peut se trouver dans un minimum local et ne pas s'approcher du minimum absolu. Pour explorer l'hypersurface énergétique, il faut souvent faire appel à la dynamique moléculaire, une autre technique couramment employée en modélisation moléculaire.

5.4.3. Dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire (DM) est une technique qui consiste à étudier la trajectoire d'une molécule en appliquant les équations de mouvement de Newton utilisées en mécanique classique. Chaque atome est considéré comme une masse ponctuelle dont le mouvement est déterminé par l'ensemble des forces exercées sur lui par les autres atomes en fonction du temps. Les forces exercées sont considérées comme constantes. La molécule est donc perçue comme une entité dynamique dont les atomes modifient leurs positions spatiales au cours du temps. Au temps T, chaque atome i, de coordonnées x_i, y_i, z_i et de masse m_i subira une accélération a_i telle que :

$$F_i = m_i a_i = m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \qquad (36)$$

avec F_i = force agissant sur l'atome i (N)

a_i = accélération de l'atome (m/s^2)

r_i = coordonnées cartésiennes de l'atome

t = temps (s)

Des intégrations successives de cette équation en fonction du temps conduisent à une trajectoire de l'atome en fonction du temps sous la forme d'une série de positions et de vitesses dans l'espace. Ainsi la DM représente une évolution temporelle des mouvements moléculaires et, contrairement à la minimisation, permet d'étudier les propriétés dépendantes du temps comme la diffusion ou encore le repliement moléculaire. Un autre avantage de la DM est qu'elle ne se limite pas aux mouvements autour des minima, mais elle permet en plus aux molécules de franchir des maxima d'énergie et d'explorer d'autres conformations stables.

5.5. La modélisation moléculaire comme outil supplémentaire à la mise au point de méthodes de séparation d'énantiomères

L'emploi de la chimie informatique dans le domaine des CDs s'est révélé être un outil complémentaire pour les scientifiques dans la compréhension des mécanismes de reconnaissance des CDs. Les recherches sur les CDs assistées par ordinateur

ont permis, par exemple, de visualiser en 3D les complexes « hôte-invité », ou encore d'évaluer les forces mises en jeu lors de la formation de complexes. Par ailleurs, face à la gamme diversifiée de CDs disponibles, le choix du sélecteur chiral approprié pour des séparations énantiosélectives par chromatographie ou par EC, implique souvent un criblage systématique des CDs natives et chimiquement modifiées. La mise au point d'une telle méthode est ainsi assez laborieuse. Par ailleurs, l'attribution des pics énantiomériques peut s'avérer difficile voire même impossible quand l'un des énantiomères au moins n'est pas disponible. Certains scientifiques ont constaté que la modélisation moléculaire permettait d'évaluer l'énergie des complexes formés entre une CD et deux énantiomères et pourrait par la même occasion donner des bonnes indications sur la stabilité de ces complexes. Ils ont alors proposé la modélisation moléculaire comme outil supplémentaire pour la recherche d'un sélecteur chiral approprié et la prédiction de l'ordre d'élution des énantiomères lors de séparations chromatographiques ou électrophorétiques (Copper *et al.*, 1994a; Srinivasan *et al.*, 1998; Schaeper *et al.*, 2001).

L'équipe d'Armstrong s'est basée sur des représentations tridimensionnelles pour pouvoir interpréter la séparation énantiosélective du propranolol et l'absence de résolution des énantiomères de la warfarine en chromatographie sur une colonne de silice greffée par de la β-CD (Armstrong *et al.*, 1986). Ils ont ainsi démontré que les isomères optiques du propranolol formaient une liaison hydrogène stabilisante avec les fonctions hydroxyles de la CD. Ces expériences ont été confirmées plus tard grâce au calcul des énergies d'interaction des complexes entourés de molécules d'eau (Kim *et al.*, 2003). En revanche, l'absence de résolution énantiomérique de la warfarine s'expliquerait selon Armstrong par le fait qu'il n'existerait pas d'interaction énantiodiscriminante significative entre les énantiomères et la β-CD.

D'autres scientifiques ont également cherché à interpréter les séparations chirales obtenues en chromatographie sur des colonnes greffées par des CDs à l'aide de la modélisation moléculaire, Kobor et coll. ont comparé les résolutions chirales du limonène et du 1-phényléthanol par chromatographie phase gazeuse sur des colonnes chirales de heptakis-2,3,6-triméthyl-β-CD (TM-β-CD) et de heptakis (2,3-di-O-méthyl-6-(O-tert-butyldiméthylsilyl))- β-CD (TBCD) avec les résultats obtenus par la modélisation moléculaire (Kobor *et al.*, 1993). Ils ont utilisé la méthodologie de Monte Carlo. Les énergies de liaisons moyennes calculées des

complexes diastéreoisomériques corrélaient bien avec les ordres d'élution. Leurs résultats étaient cependant peu concluants, car les valeurs des énergies de liaison dépendaient fortement de la conformation de la CD considérée (Lipkowitz, 1998, 2001).

Lipkowitz et coll. ont réalisé une étude expérimentale et théorique détaillée sur la discrimination stéréosélective de la β-CD vis-à-vis des isomères du mandélate de méthyle (Lipkowitz *et al.*, 1996). Les résultats obtenus en chromatographie liquide furent confrontés avec ceux de la modélisation moléculaire, réalisée avec le champ de forces CHARMM. La dynamique moléculaire a permis de prédire correctement l'ordre d'élution des énantiomères.

Dans la même année, Durham a calculé les différences d'énergie de formation de complexes diastéréoisomériques de la β-CD complexant les énantiomères de la bromphéniramine, l'éphédrine, la pseudo-éphédrine, l'acide mandélique, l'ibuprofène, l'hexobarbital et la méthylphénobarbital (Durham, 1996). Les résultats, obtenus grâce au logiciel de CHEMMOD stp-Molecular graphics system, ont permis de prédire l'ordre d'élution de ces énantiomères en CHLP sur une phase stationnaire de β-CD.

Plus tard, Lipkowitz et coll. (Lipkowitz *et al.*, 1997b; Lipkowitz *et al.*, 1997a) se sont intéressés à la reconnaissance chirale de la TM-β-CD. Les ligands chiraux mis en jeu étaient le limonène, le pinène, le 3-hydroxy-1-butène, le 1-fluorophénylléthane et des homologues du 3-acétyl-1-alkène. Les simulations de DM ont été effectuées à l'aide du logiciel AMBER. Les petites différences d'énergie d'interaction calculées suffiraient pour expliquer l'ordre d'élution des énantiomères en chromatographie gazeuse.

Le champ de force CVFF a été utilisé pour évaluer, dans le vide, l'énantiosélectivité de la 2,3-di-*O*-méthyl-6-(*O*-terbutyldiméthyl-silyl)-β-cyclodextrine (TBCD) vis-à-vis des dérivés aromatiques de la dihydrofuranone (Beier *et al.*, 1998) . Les sites de fixation des ligands sur la CD ont été déterminés à l'aide de la technique du docking.

Ahn et coll . (Ahn *et al.*, 2000) ont testé la validité d'un modèle d'interaction entre le ligand et son récepteur nommé « interaction à trois points » pour décrire l'énantiosélectivité d'une phase stationnaire chirale de β-CD vis-à-vis des acides aminés protonés (Figure 16). Les complexes ont été construits et simulés à l'aide du logiciel Insight II. Les résultats de la DM ont montré que le modèle d'interaction à

trois points permettait de bien décrire ce qui se passait en phase gazeuse. L'énantiodiscrimination de la CD utilisée en chromatographie gazeuse serait optimale lorsqu'il existerait deux points d'attraction et un point de répulsion entre le ligand et le récepteur. La sélectivité diminuerait lorsqu'il y aurait seulement 1 ou même 3 interactions attractives dans le complexe (Ahn *et al.*, 2000).

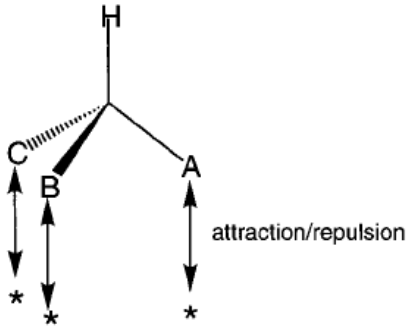


Figure 16 : Interaction à trois points entre le ligand et le récepteur selon Ahn (Ahn *et al.*, 2000)

Grigorean et coll. (Grigorean *et al.*, 2001) se sont également basés sur le modèle d'interaction à trois points pour expliquer le phénomène d'énantiodifférentiation de la colonne de TM-β-CD utilisée en chromatographie gazeuse. Les ligands chiraux modélisés dans le vide avec Insight II étaient la dopamine, l'amphétamine, l'éphédrine et la pénicillamine. Là aussi, les calculs théoriques ont rejoint les observations expérimentales.

A côté de ces nombreuses études qui portent exclusivement sur le comportement de molécules chirales en phase gazeuse vis-à-vis de CDs immobilisées sur une phase stationnaire, la modélisation moléculaire a également été utilisée pour confirmer l'ordre de migration de certains énantiomères en EC séparés en présence de CDs.

Ainsi, Copper et coll. (Copper *et al.*, 1994b; Copper *et al.*, 1994a; Copper *et al.*, 1995) ont utilisé la modélisation moléculaire pour interpréter les séparations chirales d'acides aminés, de composés binaphtyle ou encore de la benzopyrène, obtenues en EC en présence de CDs natives et modifiées. Ils se sont basés sur les résultats de la minimisation obtenus grâce au champ de force SYBYL pour confirmer l'ordre de migration des énantiomères en EC.

Une autre étude a combiné la modélisation moléculaire, la RMN et les expériences de diffraction aux rayons X afin d'expliquer l'ordre de migration des énantiomères de la kétamine en EC en présence de la α-, la β- et la γ-CD (Chankvetadze *et al.*, 2002). Des simulations de minimisation d'énergie ont été réalisées dans le vide et dans l'eau avec le logiciel Hyperchem afin de trouver la structure du complexe présentant l'énergie potentielle la plus basse. Les énergies calculées dans le vide ne corrélaient que partiellement avec les temps de migration des énantiomères de la kétamine. En revanche, les calculs effectués en milieu aqueux étaient en accord avec les expériences. Cependant, le désavantage de cette méthodologie était les temps de calcul trop long.

La stabilité des complexes formés entre les énantiomères de la mélantonine (hormone du sommeil) et la DIMEB, a été comparée avec l'ordre de migration de ces isomères résolus en EC (Liu *et al.*, 1997). Les énergies totales des complexes diastéréoisomériques ont été évaluées en les plaçant dans un environnement aqueux et en minimisant le tout à l'aide du logiciel AMBER. Les calculs ont donné une affinité de la DIMEB plus prononcée pour l'isomère (*S*), ce qui était en accord avec les observations faites en EC.

Srinivasan et coll. (Srinivasan *et al.*, 1998) ont réussi à attribuer les pics des énantiomères du sécobarbital résolus par EC en présence de HP-γ-CD, à la suite d'un simple calcul de minimisation de l'énergie des complexes diastéréoisomériques, placés dans le vide.

La discrimination énantiosélective de la β-CD vis-à-vis des énantiomères de la *N*-acétyl-phénylalanine en milieu aqueux a été évaluée par DM avec le champ de force CHARMM (Choi *et al.*, 2004). Les enthalpies libres de formation des complexes ont été calculées en se basant sur la mécanique moléculaire et la distribution de Boltzmann (traitement mécanique statistique).

Récemment, Zhang et coll. (Zhang *et al.*, 2007) ont utilisé la technique du docking moléculaire pour étudier les mécanismes de séparation énantiosélectifs de l'adrénaline et de ses dérivés par EC. La β-CD et la TM-β-CD ont été prises en tant que sélecteurs chiraux. Les valeurs des énergies d'interaction reflétaient bien les résultats obtenus expérimentalement.

Chapitre II. Dosage des énantiomères des stimulants de type amphétaminique dans les cheveux par CG/SM-ICN

1. Objectifs de l'étude

Les STA sont des molécules chirales, dont les énantiomères présentent des propriétés pharmacologiques différentes. Par ailleurs, certains médicaments sont des précurseurs ou bien contiennent de l'AM et/ou de la MA. Par conséquent l'interprétation toxicologique correcte des résultats nécessite une connaissance plus approfondie du mode d'incorporation de ces molécules dans les cheveux. Or, aucune étude n'a donné des informations précises sur l'incorporation voire même sur la disposition énantiosélective des STA dans les cheveux.

Seule une étude préliminaire, réalisée au sein du laboratoire, avait permis de calculer pour la première fois les rapports énantiomériques de l'AM et de la MA, extraites de cheveux de 11 individus soupçonnés d'avoir consommé des STA (Martins *et al.*, 2005). Aucun énantiomère de la MDA, la MDMA et de la MDEA n'avait été détecté. Cependant, cette méthode, qui a été réalisée avec le (*S*)-HFBPCl en tant qu'agent de dérivation, présentait des désavantages tels que des phénomènes d'élargissements de pics et des limites de détection moins bonnes surtout pour les énantiomères de la MDMA et de la MDEA.

L'objectif de la présente étude était alors d'améliorer la séparation et surtout la détection des énantiomères sous forme de diastéréoisomères en CG/SM-ICN. Pour cela, on a greffé au préalable sur les énantiomères un auxiliaire chiral du nom de chlorure de (2*S*,4*R*)-4-heptafluorobutoyloxy-*N*-heptafluorobutyryl-prolyle [(*S*,*R*)-HFBOPCl]. Cette molécule n'avait jamais été testée auparavant en tant qu'agent de dérivation chiral. Sa structure chimique est très proche de celle du (*S*)-HFBPCl. Ce choix s'est justifié par des observations faites au cours d'expériences de modifications de phases stationnaires utilisées en CLHP. En effet, Davanko et coll. avaient montré que les résolutions chromatographiques de pics énantiomériques pouvaient être nettement améliorées en remplaçant la colonne chirale de dodécylproline par une phase stationnaire greffée avec des dérivés de la dodécylhyroxyproline, une molécule à plusieurs centres asymétriques (Davanko *et al.*, 1983). De même, la fixation du (*S*,*R*)-HFBOPCl à deux centres asymétriques sur un énantiomère devrait permettre d'augmenter les différences relatives des propriétés physico-chimiques (polarité, caractère lipophile, propriété d'adsorption,…) et les résolutions chromatographiques de deux diastéréoisomères (Toyo'oka, 2002; Srinivas, 2004). Par ailleurs, les terminaisons heptafluorobutyliques fixées sur les

deux hétéroatomes (O et N) des centres chiraux devraient donner une certaine stabilité structurale et une rigidité conformationnelle à l'ensemble. La présence d'un nombre élevé d'atomes de fluor (14 atomes en tout) devrait en plus augmenter la volatilité et surtout la sensibilité de détection des STA en SM-ICN (Lim *et al.*, 1986; Fitzgerald *et al.*, 1993; Maurer, 2002; Srinivas, 2004).

Or, comme le (*S*,*R*)-HFBOPCl n'était pas disponible commercialement, le premier objectif de cette étude était d'obtenir le produit par une synthèse chimique. Dans un deuxième temps, le greffage de l'auxiliaire chiral sur les énantiomères des STA les plus courants (AM, MA, MDA, MDMA et MDEA) a été étudié en optimisant les conditions de dérivation. Un des derniers objectifs de cette étude était l'application de la méthode optimisée et validée à des échantillons de cheveux d'individus, soupçonnés d'avoir consommé des STA. Par ailleurs, des analyses segmentaires ont été réalisées sur des spécimens de cheveux dont la consommation en STA était bien documentée. Le but de ces expériences était de mieux comprendre les résultats obtenus et d'étudier la stabilité des énantiomères le long d'une mèche. Finalement, les conséquences des traitements cosmétiques tels que la décoloration sur cheveux ont été évalués afin d'étudier la stabilité des énantiomères des STA incorporés dans les cheveux traités.

2. Matériel et Méthodes

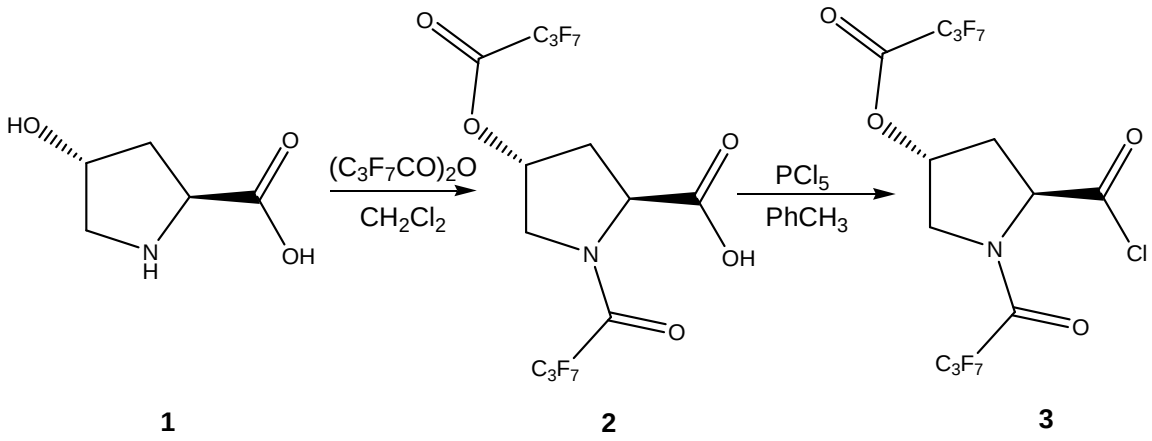
2.1. Réactifs, standards internes, solutions de référence et colonnes d'extraction

La trans-4-hydroxy-*L*-proline, le dichlorométhane anhydre (CH_2Cl_2, 99,8%), le toluène anhydre ($PhCH_3$), le diéthyléther anhydre (Et_2O), le pentachlorure de phosphore (PCl_5, 95%), la (*R*)-(+)-1-phényléthylamine ((*R*)-PEA *R*:*S* ≥ 99,5:0,5), la *S*-(-)-1-phényléthylamine ((*S*)-PEA, *S*:*R* ≥ 99,5:0,5) et le cyclohexane (99,5%) proviennent de Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique). L'anhydride d'acide heptafluorobutanoïque (HFBA) provient de Macherey-Nagel (Düren, Allemagne). Le carbonate de sodium (Na_2CO_3, 99,5%) et l'hydrogénocarbonate de sodium ($NaHCO_3$, 95,5%) proviennent de Merck (Overijse, Belgique). Les substances racémiques deutérées (AM-d_5, MA-d_5, MDA-d_5, MDMA-d_5, MDEA-d_5), utilisées

comme étalons internes, les solutions racémiques de référence, ainsi que la (*S*)-AM (S : R ≥ 99:1%) ont été obtenues chez Radian (Austin, Texas). Les colonnes d'extraction CLEAN SCREEN® ZSDAU020 proviennent d'United Chemical Technologies (Bristol, EUA), tandis que les colonnes Chromabond® ont été fabriquées par Macherey-Nagel (Hoerdt, France). Les cheveux ont été pulvérisés avec un broyeur à billes provenant de Retsch (Haan, Allemagne).

Toutes les synthèses ont été effectuées sous atmosphère inerte d'azote sec (N_2).

2.2. Synthèse du (*S*,*R*)-HFBOPCl



1 **2** **3**

Figure 17 : Schéma réactionnel de la synthèse du (*S*,*R*)-HFBOPCl

Un ballon de 50 mL contenant 250 mg (1,9 mmol) de trans-4-hydroxy-*L*-proline (Figure 17 ; **1**), fermé avec un bouchon en téflon, est placé sous atmosphère inerte d'azote dans un bain de glace à 0℃. Après l'ajout de 5 mL de CH_2Cl_2 anhydre et 1,9 mL (7,8 mmol) de HFBA, le mélange est maintenu à 0°C pendant 10 min. L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) avec un mélange de CH_2Cl_2/méthanol (9:1 v/v) pour éluant. Après avoir maintenu le milieu réactionnel à température ambiante pendant 1 heure, on ajoute 1 mL d'Et_2O anhydre et on laisse réagir pendant 2 heures à la même température. Finalement, la solution contenant le produit **2** est évaporée sous vide afin d'éliminer le CH_2Cl_2 et l'excès de HFBA. La (*R*,*S*)-4-heptafluorobutoyloxy-*N*-heptafluorobutyryl-proline (**2**) est à nouveau maintenue sous atmosphère de N_2 avant d'y ajouter 5 mL de $PhCH_3$

anhydre. Le mélange, maintenu sous N_2, est placé ensuite dans un bain de glace à 0℃. Le chlorure d'acide **3** est obtenu par ajout de 395 mg (1,9 mmol) de PCl_5 (Mori *et al.*, 1986; Uozumi *et al.*, 2001a; Uozumi *et al.*, 2001b). Après 10 minutes, le milieu réactionnel est placé à température ambiante pendant 90 minutes. Ensuite, le $PhCH_3$ est évaporé sous vide, le liquide jaune obtenu est dilué dans 1 mL de CH_2Cl_2 et le mélange est évaporé sous vide. Cette dernière opération est répétée une fois. Le résultat est un liquide légèrement visqueux, qui est dilué dans 9 mL de CH_2Cl_2, afin d'obtenir une concentration théorique du (*S*,*R*)-HFBOPCl (**3**) finale de 0,2 mol/L.

La pureté optique du réactif est déterminée par CG/MS-ICN en dérivant une solution de 20 $\mu g.mL^{-1}$ de (*R*)-PEA respectivement de (*S*)-PEA par le (*S*,*R*)-HFBOPCl selon la procédure décrite ci-dessous. Les diastéréoisomères sont finalement séparés par CG/MS-ICN pour permettre le calcul de l'excès diastéréoisomérique.

2.3. Préparation des échantillons de cheveux

2.3.1. Prélèvement des cheveux

Le prélèvement de cheveux se fait au niveau du vertex postérieur. Une mèche de cheveux de l'épaisseur d'un crayon est solidement fixée à l'aide d'une cordelette à 1 cm de la base du crâne. L'échantillon est prélevé le plus près possible du cuir chevelu à l'aide d'une paire de ciseaux. Le fil permet d'indiquer l'extrémité de la racine. Les cheveux sont conservés à température ambiante dans un tube sec, dans une enveloppe ou bien entre deux feuilles d'aluminium.

2.3.2. Décontamination, hydrolyse et extraction des cheveux

2.3.2.a. Décontamination et hydrolyse des cheveux

Dans une première mesure, les cheveux prélevés sont décontaminés (salissures, produits de beauté) par un lavage dans 100 mL l'eau distillée pendant 1 min, suivi d'un lavage dans 100 mL d'acétone pendant 1 min (deux fois). Les cheveux sont ensuite coupés en segments de 2 ou 3 cm et pulvérisés dans un broyeur à billes. 10 mg de cheveux sont dilués dans 2 mL d'une solution de NaOH 1M et les solutions de référence et/ou les standards internes y sont ajoutés. Le mélange est mis à incuber à

100℃ pendant 30 min. Après refroidissement et selo n le type d'extraction effectué, le pH de la solution doit être ajusté. Le mélange est finalement centrifugé pendant 5 min à 5000 tours/min et le surnageant est extrait sur phase solide.

2.3.2.b. Extraction des cheveux sur phase solide

- **Colonnes CLEAN SCREEN ZSDAU020**

Les colonnes CLEAN SCREEN ZSDAU020 sont dites « mixtes ». Elles sont constituées d'une phase stationnaire de silice greffée par des groupements benzyles et des chaînes hydrocarbonées C_8 sulfonées échangeuses de cations ($R\text{-}SO_3^-\ Na^+$). L'extraction se fait à pH 6, ce qui implique que la solution de cheveux hydrolysés soit ajustée à pH 6 à l'aide d'une solution HCl 2M.

Le conditionnement de la colonne se fait par le passage successif sous vide (5 mm Hg) de 3 mL de méthanol, 3 mL de H_2O et 1 mL de tampon phosphate NaH_2PO_4 0,1 M pH 6. L'échantillon est lentement extrait sans vide sur la colonne conditionnée. Après le passage de l'échantillon, la colonne est rincée successivement par 3 mL de H_2O, 1 mL d'acide acétique 1M et 3 mL de MeOH. Les dernières gouttes présentes sur les parois de la colonne sont enlevées à l'aide d'un mouchoir en papier et la colonne est séchée sous vide pendant 10 minutes. Pour l'élution, le vide est cassé et 3 mL d'une solution de CH_2Cl_2/2-propanol/NH_3 (80:20:2 en volume) fraîchement préparée est éluée à travers la colonne. 20 µL d'une solution de HCl à 1% dans du MeOH (v/v) sont ajoutés à l'échantillon afin d'obtenir les STA sous forme d'ammoniums quaternaires et d'empêcher ainsi leur évaporation. Le solvant est ensuite évaporé à sec sous N_2 à une température de 37℃.

- **Colonnes Chromabond®**

La phase stationnaire est une couche de silice modifiée par des groupements d'octadécyle (C_{18} ec). Le conditionnement de la colonne nécessite de faire passer successivement sous vide (5 mm Hg) 3 mL de méthanol (2 fois) et 3 mL d'eau. L'extraction est effectuée en laissant passer lentement les échantillons sans vide sur la phase stationnaire conditionnée. Ensuite, la colonne est rincée successivement par 3 mL de H_2O, 3 mL d'une solution aqueuse à 5% de $NaHCO_3$ pH 8 et 3 mL de MeOH. Les dernières gouttes présentes sur les parois de la colonne sont enlevées à l'aide d'un mouchoir en papier. Finalement on fait passer lentement 70 µL d'acétone

(CH_3COCH_3) sur la colonne avant de la sécher sous vide pendant 10 minutes. L'élution des substances se fait à l'aide de 2 mL d'une solution de CH_3COCH_3/CH_2Cl_2 (3/1, v/v). 20 µL d'une solution de HCl à 1% dans le MeOH sont ajoutés à l'échantillon élué. Le solvant est ensuite évaporé à sec sous N_2 à 37°C.

2.3.3. Conditions optimales de dérivation chirale des STA par le (S,R)-HFBOPCl

Les conditions optimales de dérivation ont été déterminées après avoir étudié l'influence de multiples paramètres expérimentaux tels que la quantité de réactif chiral, le pH du milieu et le temps de réaction.

Le résidu sec est tout d'abord repris dans 0,2 mL de tampon carbonate pH 9,5 (70 g/L de Na_2CO_3 – 30 g/L de $NaHCO_3$; 50 mL de ce mélange est dilué dans 950 mL de H_2O). La racémisation des STA se fait par ajout de 20 µL de (*S*,*R*)-HFBOPCl (0,2 mol/L) et suivi d'une agitation de 15 minutes. Ensuite, les diastéréoisomères sont extraits à l'aide de 0,1 mL de cyclohexane pendant 1 minute. La solution est finalement centrifugée pendant 4 minutes à 10 500 *g*. 60 µL de surnageant sont prélevés et analysés.

2.4. Conditions d'analyse par CG/SM en mode ICN

Un spectromètre de masse quadripolaire Hewlett Packard (HP 5973), couplé à une colonne capillaire HP-5MS (crosslinked 5% Ph Me Siloxane) de 30 m x 0,25 mm, recouvert d'un film de 0,25 µm, est utilisé. Le mode d'ionisation employé est le mode ICN avec le méthane comme gaz réactif (flux de 40%). Le gaz vecteur est l'hélium avec un flux de 1 mL/min. 3 µL sont injectés dans le CG/SM. La température de l'injecteur est de 260°C. Le gradient de température au niveau de la CG est le suivant : la colonne est maintenue à 150°C pendant 2 minutes avant d'être chauffée de 20°C/min jusqu'à 220°C, puis elle passe à 260°C à raison de 5°C/min et dans une ultime étape, jusqu'à 305°C en chauffant de 30°C/min. Les spectres de masse sont enregistrés en mode SCAN afin de sélectionner les ions caractéristiques pour chaque substance (Tableau 4). Les fragments m/z spécifiques de chaque substance sont finalement utilisés en mode d'enregistrement SIM afin de simplifier les chromatogrammes et d'augmenter la sensibilité. Toutes les données sont

enregistrées avec l'ordinateur grâce au programme Chemstation Version B.01.00 de Hewlett-Packard.

Tableau 4. Valeurs de m/z choisies pour la détection des STA en SM-ICN-SIM

Fenêtre de détection (min)	Substance	Ions caractéristiques (m/z)
6,5 - 7,0	PEA	606, 626, 586
7,5 - 8,1	AM-d_5	625*, 645, 456
	AM	620*, 640, 451
8,1 - 8,8	MA-d_5	639*, 659, 619
	MA	634*, 654, 614
10,5 - 11,1	MDA-d_5	669*, 649, 689
	MDA	664*, 644, 684
11,1 - 12,2	MDMA-d_5	683*, 703, 663
	MDMA	678*, 698, 658
	MDEA-d_5	697*, 717, 677
	MDEA	692*, 712, 672

* Ions employés pour la quantification

2.5. Dosage des énantiomères des STA

La quantification des énantiomères des STA extraits des cheveux se fait à l'aide d'une droite de calibration. Les gammes-étalons sont construites en dopant, avant l'hydrolyse, 10 mg de cheveux par différentes concentrations de STA racémiques allant de 0 à 60 ng/mg de cheveux. La concentration des étalons internes d_5 (IS) est de 5 ng/mg. Les droites de calibration sont finalement établies par régression linéaire d'après l'équation :

$$\frac{\text{concentration du pic à doser}}{\text{concentration du standard interne}} = a \cdot \frac{\text{aire du pic à doser}}{\text{aire du standard interne}} + b \quad (37)$$

Où a est la pente de la droite et b est l'ordonnée à l'origine.

2.6. Paramètres de validation de la méthode

La validation d'une méthode comporte les étapes suivantes (Girod *et al.*, 2000; Musshoff *et al.*, 2004):

- détermination de la limite de détection (LOD ; hauteur du signal 3 fois supérieure à la hauteur du bruit de fond) et de la limite de quantification (LLOQ, « *lowest limit of quantification »* en anglais); hauteur du signal 10 fois supérieure à la hauteur du bruit de fond).

- Détermination des rendements d'extraction : le rendement d'extraction est calculé en réalisant deux extractions. La première extraction consiste à extraire les substances à doser ainsi que les IS ajoutés au milieu. La deuxième manipulation consiste à extraire seulement le milieu biologique contenant les standards internes, les substances à doser étant rajoutées après l'extraction. Le calcul des rendements d'extraction se fait en prenant le rapport des concentrations des deux manipulations.

- Exactitude :

- répétabilité intra-jour (10 extraits analysés chacun une fois en une journée) et inter-jour (5 extraits analysés une fois 5 jours de suite). Les résultats de répétabilité sont exprimés par le biais du coefficient de variation (CV):

$$CV = (\text{Écart-type}/\text{Moyenne})*100$$

On estime que les mesures sont répétables si le coefficient de variation est inférieur à 15%.

- justesse des mesures : la variation des mesures intra-jour et inter-jour par rapport à une valeur cible, exprimée en pourcentages.

3. Résultats et discussion

3.1 Synthèse et pureté du (*S*,*R*)-HFBOPCl

La synthèse du (*S*,*R*)-HFBOPCl était partiellement basée sur les procédés décrits par Mori et coll. (Mori *et al.*, 1986) et Uozumi Y. et coll. (Uozumi *et al.*, 2001a; Uozumi *et al.*, 2001b). Ces auteurs avaient utilisé des dérivés trifluoroacétylés de la 4-hydroxy-*L*-proline comme intermédiaires réactionnels dans la fabrication d'antibiotiques. Dans notre cas, les chaînes trifluoroacétylées ont été remplacées par des groupements de heptafluorobutanoate grâce à l'acylation par le HFBA.

La pureté optique de l'auxiliaire chiral a été évaluée en dérivant 10 µL d'une solution à 10 mg/L de (*R*)-phényléthylamine (PEA) et de (*S*)-PEA avec le (*S*,*R*)-HFBOPCl. Dans chaque cas, l'aire du pic correspondant au diastéréoisomère minoritaire ne représentait que 0,1% de la surface totale des pics (pic principal + pic du diastéréoisomère minoritaire). Les excès diastéréoisomériques (*de*) des couples (*S,R*)-HFBOPCl-(*R*)-PEA et/ou (*S*,*R*)-HFBOPCl-(*S*)-PEA étaient > 99,8% . Le (*S,R*)-HFBOPCl présentait une pureté optique tout à fait correcte et aucune racémisation n'a pu être observée lors de la dérivation des énantiomères. Finalement, le (*S,R*)-HFBOPCl restait stable pendant au moins 6 mois (*de* > 99,7%) à condition de le conserver à -20°C sous atmosphère inerte dans du CH_2Cl_2 sec.

3.2. Mise au point des paramètres expérimentaux de dérivation des STA par le (*S,R*)-HFBOPCl

Aucune donnée sur l'emploi de (*S*,*R*)-HFBOPCl en tant qu'auxiliaire chiral ne figurait dans la littérature. Ainsi, les conditions optimales de dérivation chirale des STA par le (*S*,*R*)-HFBOPCl ont été mises au point en étudiant l'influence des paramètres expérimentaux tels que le temps de dérivation, la quantité de (*S*,*R*)-HFBOPCl ou encore le pH du milieu. La concentration du mélange racémique des STA testée au cours de cette étude était de 40 ng/µL. Le diazépam (50 ng/µL), qui est détecté en SM/ICN sans dérivation, a joué le rôle d'étalon externe. Chaque expérience a été répétée 5 fois. Les résultats de cette étude sont résumés sur la figure 18 ci-dessous pour le cas de la MDMA.

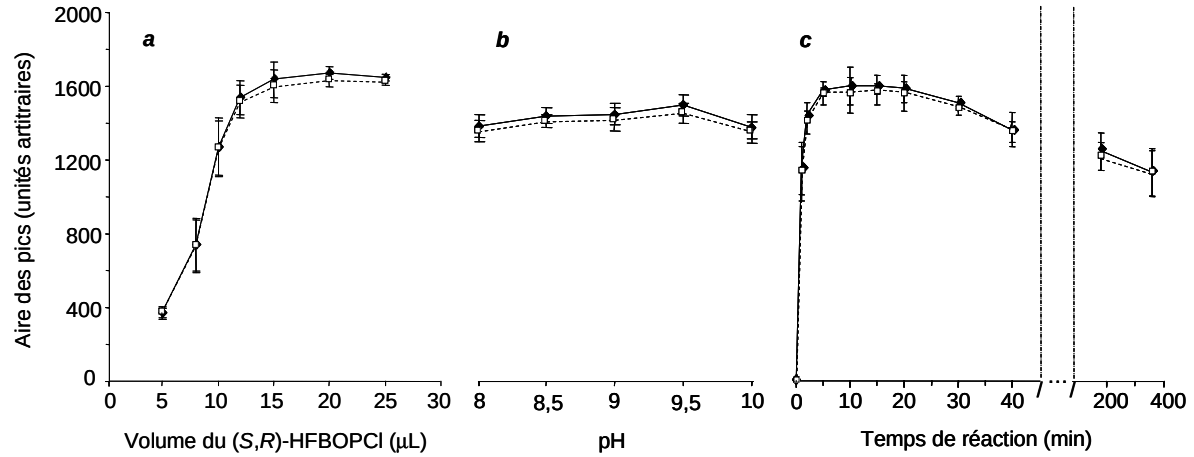


Figure 18 : Etude des paramètres expérimentaux de dérivation des énantiomères de la (*S*)-MDMA et la (*R*)-MDMA par le (*S*,*R*)-HFBOPCl

*(**a**) Influence de la quantité de (S,R)-HFBOPCl 0,2 M (temps de réaction 5 min, pH 9,5); (**b**) Influence du pH du milieu (20 µL de (S,R)-HFBOPCl 0,2 M pendant 5 min) ; (**c**) Evolution du temps de réaction sur la quantité d'énantiomères de la MDMA dérivés (20 µL de (S,R)-HFBOPCl 0,2 M, pH 9,5). (S)-MDMA (--□--) ; (R)-MDMA (—◆—).*

3.2.1. Influence de la quantité de (S,R)-HFBOPCl

L'influence de la quantité de réactif sur la réactivité avec les énantiomères des STA a été évaluée en ajoutant différents volumes (5 à 25 µL) d'une solution de 0,2 M de (*S*,*R*)-HFBOPCl. La dérivation fût stoppée systématiquement au bout de 5 minutes par l'ajout de 100 µL de cyclohexane suivi d'une extraction liquide-liquide des dérivés en phase organique. Les résultats obtenus après analyse par CG/SM-ICN sont représentés sur la figure 18 (*a*) pour le cas des énantiomères de la MDMA. La figure montre que la réaction d'acylation des énantiomères de la MDMA atteint un plateau maximal après l'ajout de 20 µL de (*S*,*R*)-HFBOPCl 0,2 M et qu'elle tend à se stabiliser par la suite. Pour les énantiomères de l'AM, la MA, la MDA et de la MDEA, les résultats étaient tout à fait identiques.

3.2.2. Influence du pH du milieu réactionnel

Etant donné que la dérivation des STA par des dérivés de chlorure d'acides tels que le (*S*,*R*)-HFBOPCl s'effectue généralement dans 0,2 mL de solution de carbonate (Lim *et al.*, 1986; Peters *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2005), il était important de vérifier s'il pouvait y avoir des différences importantes au niveau des rendements

de réaction dans une gamme de pH allant de 8 à 10 (Figure 18, *b*). Comme attendu, aucune différence significative n'a pu être mesurée à différents pH. Néanmoins, à pH 9,5, les signaux étaient légèrement plus élevés, quelque soit la substance étudiée.

3.2.3. Influence du temps de réaction sur le rendement de dérivation

Le temps de réaction nécessaire pour fonctionnaliser le maximum de STA par le (*S*,*R*)-HFBOPCl a également été évalué. La réaction était stoppée à des intervalles de temps différents allant de 2 à 360 minutes par l'ajout de cyclohexane. La figue 18 (*c*) montre l'évolution des aires des pics des diastéréoisomères de la MDMA à différents intervalles de temps. On peut voir que le maximum de MDMA est transformé au bout de 10 minutes à peine. De façon générale, les courbes évoluaient de façon identique, et la réaction atteignait son maximum au bout de 15 minutes, quelque soit l'énantiomère des STA étudié. Ceci montre que les énantiomères (*R*) et (*S*) présentent un comportement cinétique identique et qu'il n'y a pas de discrimination stéréosélective apparente du (*S*,*R*)-HFBOPCl vis-à-vis des STA.

Au-delà de 20 minutes de temps de réaction, le signal mesuré en SM-ICN tendait à diminuer. Lim et coll. avaient également observé un phénomène identique lors de leurs travaux portant sur la dérivation des énantiomères du méthylphenidate par le (*S*)-HFBPCl (Lim *et al.*, 1986). Ils ont conclu que les diastéréoisomères une fois formés n'étaient pas très stables en milieu aqueux et qu'ils avaient tendance à s'hydrolyser lentement au bout d'un certain temps. Vu la similitude structurale du méthylphenidate avec les STA, et les conditions réactionnelles de dérivation identiques à celles de Lim et coll., on en a déduit qu'il était préférable d'arrêter la réaction au bout de 15 minutes afin d'éviter au maximum leur hydrolyse et la perte de signal.

Constatant que les diastéréoisomères des STA présentaient des problèmes de stabilité en milieu basique, il était important de contrôler la stabilité de ces composés dans le cyclohexane, solvant d'extraction et d'analyse en CG/SM-ICN. Ainsi, l'évaluation de la dégradation des diastéréoisomères des STA-(*S*,*R*)-HFBOP dans le cyclohexane a montré que ces dérivés étaient assez stables pendant au moins 72 heures (la plus longue période de temps examinée), même à trois températures différentes (-20℃, 4℃ et 20℃). Au bout de 72 heu res, les quantités des STA (exprimée en %) encore détectées sous forme de dérivés du (*S*,*R*)-HFBOPCl

variaient entre 40 et 69%, si le stockage se faisait à 20°C, entre 48 et 70% pour un stockage à 4°C et de 54 à 75% après stockage à -20° C. En conséquence, une ré-analyse des STA peut être effectuée par CG/SM-ICN avec peu de perte de signal, sous condition que les extraits d'échantillon soient conservés dans du cyclohexane à -20°C.

3.2.4. Conditions optimales de dérivation des STA

En se basant sur les résultats ci-dessus, les paramètres expérimentaux retenus pour la dérivation des STA par le (*S*,*R*)-HFBOPCl ont été les suivants : 20 µL de (*S*,*R*)-HFBOPCl à 0,2 M dans 0,2 mL d'une solution de carbonate à pH 9,5 et un temps de réaction de 15 minutes.

3.3 Analyse des spectres de masse et des chromatogrammes des STA obtenus en CG/SM-ICN

3.3.1. Spectres de masse des STA-(S,R)-HFBOP

Les spectres de masse des dérivés STA-(*S*,*R*)-HFBOP et des étalons internes STA-d_5-(*S*,*R*)-HFBOP obtenus en mode SCAN en SM-ICN sont représentés dans la figure 19 ci-dessous. L'ion moléculaire de chaque substance étudiée est facilement identifiable. Les autres ions détectés résultent de la perte séquentielle de groupements HF $[m/z-20]^-$. Les trois ions les plus abondants et caractéristiques de chaque composé, un ion cible (pour la quantification) et deux ions qualificatifs, ont été retenus pour la suite des analyses par SM/ICN en mode SIM (Tableau 4, chapitre II, paragraphe 2.4).

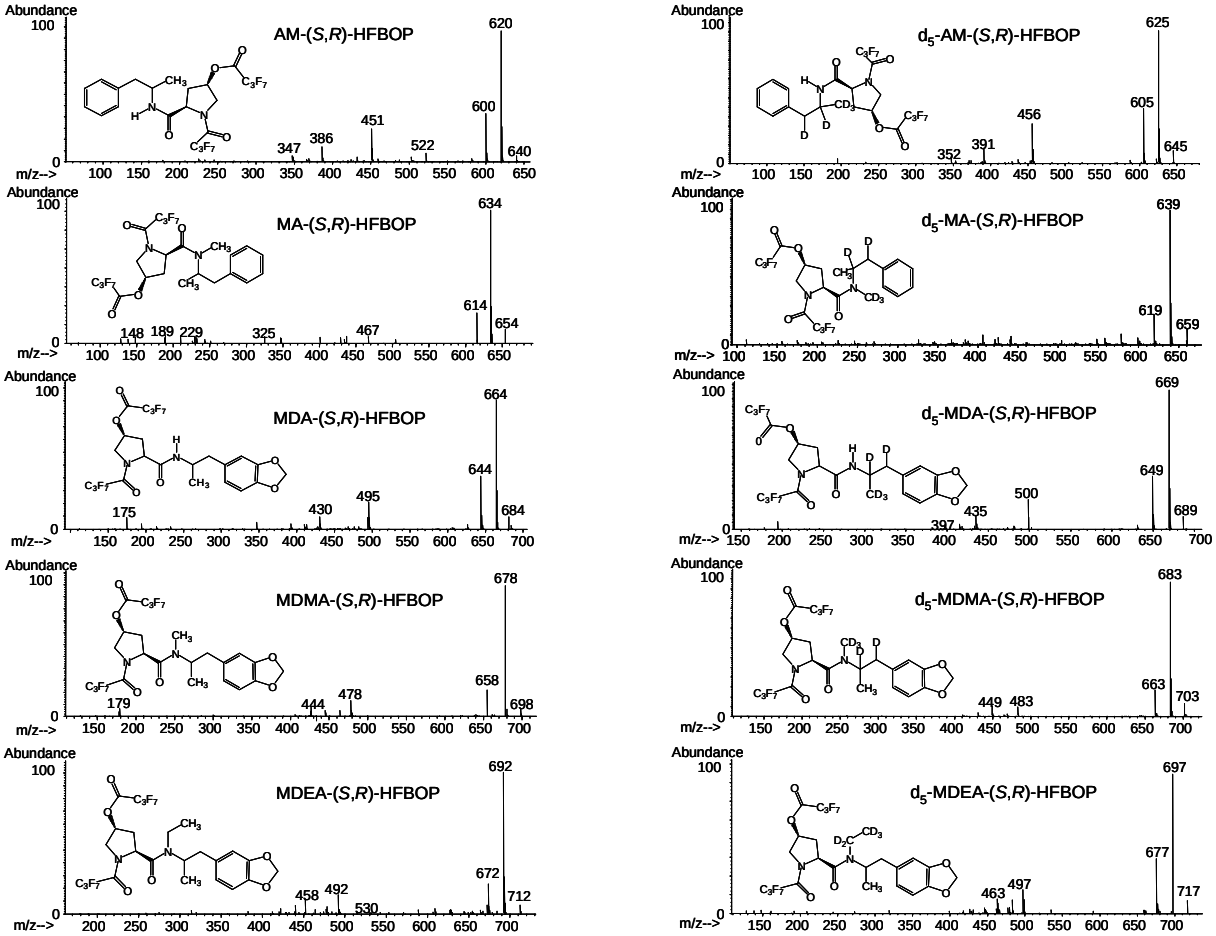


Figure 19 : Spectres de masse SM/ICN mode SCAN de l'AM, l'AM-d_5, la MA, la MA-d_5, la MDA, la MDA-d_5, la MDMA, la MDMA-d_5, la MDEA et la MDEA-d_5 après dérivation par le (*S*,*R*)-HFPOPCl

3.3.2. Exemple d'un chromatogramme des énantiomères des STA séparés par CG

L'analyse par CG/SM-ICN d'un mélange racémique de STA dérivés par le (*S*,*R*)-HFBOPCl a permis d'obtenir le chromatogramme de la figure 20.

L'ordre d'élution croissant des composés est: AM (± 7,7 min) < MA (± 8,2 min) < MDA (± 10,6 min) < MDMA (± 11,1 min) < MDEA (± 11,3 min).

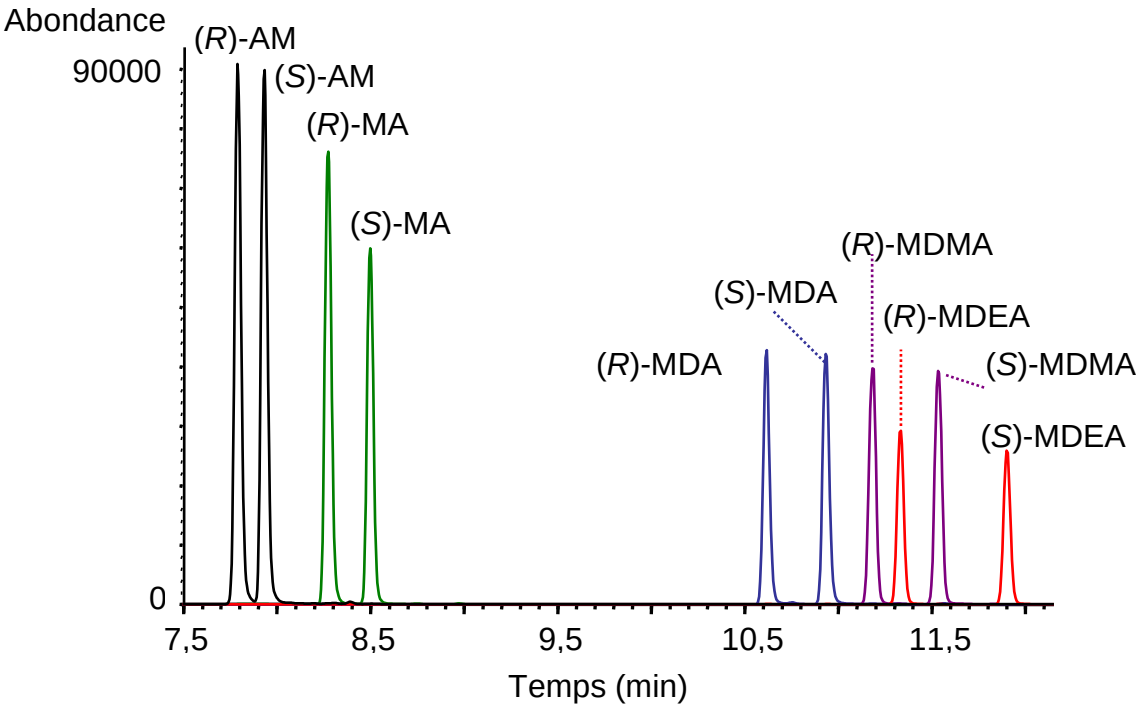


Figure 20 : Chromatogramme d'un mélange de STA séparés sous forme de diastéréoisomères après dérivation avec le (*S*,*R*)-HFBOPCl

Tous les pics des diastéréoisomères des STA sont séparés nettement en 12 minutes à peine, ce qui représente un gain de 5 minutes par rapport à une autre méthode utilisant le (*S*)-HFBPCl (Martins *et al.*, 2005). Par rapport à ce dernier procédé, les pics des diastéréoisomères sont bien symétriques et ne présentent ni élargissement, ni chevauchement.

L'analyse de solutions de (*S*)-AM ou de (*S*)-MA a montré que les diastéréoisomères (*S*)-AM-(*S*,*R*)-HFBOP et (*S*)-MA-(*S*,R)-HFBOP étaient élués après ceux de (*R*)-(*S*,*R*)-HFBOP. Pour les autres composés, des expériences de dérivation chirale ont montré, que les énantiomères (*R*) de l'AM et de ses analogues, greffés par des auxiliaires chiraux de type (*S*)-(-)-heptafluoroacétylprolyle ou encore de type (*R*)-(-)-méthoxy-(trifluorométhyl)phénylacétyle, migraient plus vite que leurs diastéréoisomères (*S*) (Westley *et al.*, 1968; Gal, 1977; Fallon *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 2003b; Paul *et al.*, 2004). En absence d'autres standards purs d'énantiomères de STA et en accord avec les données précédentes, nous avons considéré par la suite que le premier diastéréoisomère à être élué, était le (*R*)-(*S*,*R*)-HFBOP, que ce soit dans le cas de la MDA, de la MDEA ou de la MDMA.

3.3.3. Evaluation de la résolution énantiomérique des STA

La qualité de la séparation des énantiomères a été évaluée en calculant la Rs des pics (Scarcella *et al.*, 1997). Les Rs ont été calculées grâce à l'équation 9 (chapitre I, paragraphe 4.3.6.b) et les valeurs ont finalement été comparées à celles obtenues après dérivation chirale par le (*S*)-HFBPCl (Martins *et al.*, 2005). Les résultats sont résumés dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5. Comparaison des résolutions entre les pics diastéréoisomériques des STA obtenus après dérivation par le (*S*)-HFBPCl et par le (*S*,*R*)-HFBOPCl

Substance	Résolution (Rs)	
	(*S*)-HFBPCl	(*R,S*)-HFBOPCl
AM	1,50	1,70
MA	1,07	1,99
MDA	2,50	2,83
MDMA	1,56	2,79
MDEA	2,03	4,64

Le tableau 5 nous montre que la séparation énantiosélective de l'AM et de la MDA n'est que légèrement améliorée en utilisant le (*S*,*R*)-HFBOPCl en tant qu'agent de dérivation. En revanche, les résolutions chromatographiques des pics énantiomériques de la MA, la MDA et la MDMA ont été améliorées en moyenne d'un facteur 2 en passant d'un réactif chiral à l'autre. Ainsi, la présence de 3 centres asymétriques dans nos substances dérivées a permis d'augmenter de façon significative les différences de leurs comportements chromatographiques et d'améliorer les séparations des STA sous forme de diastéréoisomères.

3.4. Validation de la méthode pour l'analyse de cheveux

3.4.1. Mise au point de la méthode d'extraction

Les cheveux étant une matrice biologique assez sale, l'extraction sur phase solide est généralement conseillée pour éliminer le plus d'interférences possible et récupérer un maximum de xénobiotiques. Deux phases stationnaires de nature

différente, Clean Screen et Chromabond, ont été testées dans le cadre de cette étude.

La phase stationnaire de Chromabond est une colonne à base de silice modifiée par des groupements d'octadécyle. L'extraction se fait alors à pH basique. Les colonnes Clean Screen sont dites « mixtes » à cause de leurs groupements benzyles et de leurs chaînes hydrocarbonées C_8 sulfonées ($R\text{-}SO_3^-\ Na^+$) échangeuses de cations. L'extraction est réalisée à pH acide, ce qui nécessite d'acidifier les solutions de cheveux hydrolysés. L'efficacité des colonnes a été évaluée en comparant les rendements d'extraction et les LODs des STA. A cet effet, quatre échantillons, dopés par une solution racémique de STA à 0,1 ng/mg et une concentration des IS de 0,25 ng/mg, ont été extraits sur chaque colonne.

Les LODs calculées sont résumées dans le tableau 6 ci-dessous.

Tableau 6. LODs des énantiomères d'AM, MA, MDA, MDMA et MDEA extraits de cheveux par les colonnes Clean Screen et Chromabond

Substance	LOD (pg/mg)	
	Clean Screen	Chromabond
(*R*)-AM	0,8	5,7
(*S*)-AM	0,7	4,0
(*R*)-MA	2,1	ND[a]
(*S*)-MA	1,5	ND
(*R*)-MDA	1,6	35,1
(*S*)-MDA	1,3	28,2
(*R*)-MDMA	1,7	ND
(*S*)-MDMA	1,5	ND
(*R*)-MDEA	2,7	ND
(*S*)-MDEA	2,3	ND

[a]ND: non détecté

Alors que l'extraction sur la colonne mixte de Clean Screen a permis de récupérer tous les STA, l'extraction par Chromabond a donné des chromatogrammes dans lesquels, seuls les pics des énantiomères de l'AM et de la MDA étaient visibles (Tableau 8). D'autre part, les résidus secs obtenus après extraction par les colonnes Chromabond présentaient un aspect plus sale. L'interférence de la matrice cheveux a bien été mise en évidence au niveau des chromatogrammes, par la présence notamment de nombreux gros pics parasites et d'un bruit de fond beaucoup plus

important. Les chromatogrammes des extraits de cheveux par les colonnes Clean Screen étaient quant à eux relativement propres sans pics parasites majeurs. Les expériences ont bien démontré que l'extraction sur colonne mixte Clean Screen permettait d'éliminer au maximum les interférences de matrices.

Les colonnes Clean Screen ont donc été retenues pour faire la validation de la méthode.

3.4.2. Droites de calibration et validation de la méthode

Les paramètres des droites de calibration, ainsi que les résultats de la validation sont résumés dans les tableaux 7 à 9.

- Les droites de calibration ont été établies pour chaque énantiomère extrait des cheveux dopés à différentes concentrations (0 à 60 ng/mg) de mélanges racémiques d'AM, de MA, de MDA, de MDMA et de MDEA. La concentration des IS (mélange des 10 énantiomères des STA deutérés (d_5) était de 5 ng/mg cheveux. D'après le tableau 7, les domaines de linéarité s'étendent de 0,002 à 60 ng/mg. Les coefficients de détermination (r^2) des droites de calibration sont tous > 0,995.

Tableau 7. Calibration, limites de détection et de quantification

Substance	Linéarité (ng/mg)	Regression linéaire		Coefficient de détermination (r^2)	LOD (pg/mg)	LLOQ (pg/mg)
		a*	b**			
(*R*)-AM	0,003 - 60	0,985 ± 0,012	3,498 ± 2,235	0,998	0,8	2,7
(*S*)-AM	0,002 - 60	0,979 ± 0,010	2,396 ± 2,180	0,997	0,7	2,4
(*R*)-MA	0,007 - 60	0,967 ± 0,013	3,955 ± 2,644	0,996	2,1	6,9
(*S*)-MA	0,005 - 60	0,969 ± 0,014	5,885 ± 2,916	0,996	1,5	5,0
(*R*)-MDA	0,005 - 60	1,017 ± 0,013	−1,408 ± 2,789	0,998	1,6	5,3
(*S*)-MDA	0,004 - 60	1,011 ± 0,010	−1,600 ± 2,164	0,999	1,3	4,3
(*R*)-MDMA	0,006 - 60	1,001 ± 0,015	1,899 ± 1,249	0,998	1,7	5,6
(*S*)-MDMA	0,005 - 60	0,995 ± 0,009	1,838 ± 1,787	0,998	1,5	5,1
(*R*)-MDEA	0,009 - 60	0,984 ± 0,012	3,203 ± 2,497	0,997	2,7	8,9
(*S*)-MDEA	0,008 - 60	0,995 ± 0,013	2,607 ± 2,057	0,997	2,3	7,7

* pente de la droite

** ordonnée à l'origine

- Les LODs et les LLOQs se situent entre 0,7 et 2,7 pg/mg respectivement entre 2,4 et 8,9 pg/mg. Les énantiomères (*R*) et (*S*) de la MDEA

présentent les moins bonnes valeurs tandis que les meilleures LODs ou LLOQs sont attribuées à l'AM avec une valeur moyenne de 0,8 pg/mg respectivement de 2,6 pg/mg. Comparé à d'autres méthodes chromatographiques de type CHPL ou encore EC (Nagai *et al.*, 1988; Nagai *et al.*, 1989; Scarcella *et al.*, 1997; Tagliaro *et al.*, 1998; Al-Dirbashi *et al.*, 1999b; Al-Dirbashi *et al.*, 2000; Phinney *et al.*, 2004; Nishida *et al.*, 2006), la sensibilité de la détection des énantiomères des STA extraits des cheveux est améliorée en moyenne d'un facteur moyen 30. Par rapport à notre ancien procédé utilisant le (S)-HFBPCl (Martins *et al.*, 2005), les LODs des énantiomères de l'AM, de la MDA et de la MA sont diminuées en moyenne d'un facteur 3 tandis que les LODs de la MDMA et de la MDEA sont améliorées d'un facteur 10. Ainsi, la dérivation par un auxiliaire chiral portant en tout 14 atomes de fluor a nettement permis d'augmenter la sensibilité à la détection des énantiomères des STA en SM/ICN.

Tableau 8. Rendements d'extraction de la méthode Clean Screen pour les cheveux dopés à différentes concentrations de STA (n=5)

Concentration (ng/mg)		AM		MA		MDA		MDMA		MDEA	
		R	*S*	*R*	*S*	*R*	*S*	*R*	*S*	*R*	*S*
0,5	m* (%)	97,1	96,3	93,8	90,0	97,3	96,2	94,2	93,4	96,0	92,7
	s**	4,3	5,7	4,1	4,2	5,9	5,1	4,2	4,7	3,6	4,7
10	m (%)	94,8	94,8	91,2	91,0	96,3	97,9	91,1	91,7	92,5	93,6
	s	2,6	2,8	4,9	2,7	3,0	3,4	2,6	3,0	3,2	2,9
50	m (%)	97,7	96,8	90,0	92,6	98,1	96,6	94,5	94,1	96,8	94,9
	s	3,7	2,9	3,1	3,9	5,9	4,6	5,4	5,2	7,1	6,5

* m: moyenne; ** s: écart-type

- Les rendements d'extraction ont été calculés en analysant 3 séries d'échantillons de cheveux (n=5) dopés avec des concentrations en STA et en IS identiques (0,5 ; 10 et 50 ng/mg). Les rendements d'extractions sont tous supérieurs à 90%.

- Les répétabilités et les valeurs de justesse intra- et inter-jour ont été déterminés pour des concentrations en STA de 0,25 ng/mg et de 5 ng/mg. (tableau 9). Pour la répétabilité, les mesures ont été considérées comme répétables si le

coefficient de variation était inférieur à 15%, ce qui est le cas pour tous les composés étudiés en intra-jour et inter-jour. Concernant la justesse des mesures, les écarts de la valeur d'une concentration calculée par rapport à sa valeur cible n'excèdent pas 9,5% (cas de (*S*)-MDA) en intra-jour et 8,1% (cas de (*S*)-AM) en inter-jour.

Ainsi, vu que la méthode développée était très sensible et répétable, elle a été employée pour la suite des expériences.

Tableau 9. Répétabilités et justesses intra- jour (n=10) et inter-jour (n=5)

Substance	Concentration	Intra-Jour (n=10)		Inter-Jour (n=5)	
	(ng/mg)	Répétabilité (CV*, %)	Justesse (%)	Répétabilité (CV*, %)	Justesse (%)
(*R*)-AM	0,25	5,0	3,0	7,2	4,4
	5	3,4	2,2	3,0	8,1
(*S*)-AM	0,25	2,7	8,6	7,5	7,1
	5	2,8	4,8	2,8	5,8
(*R*)-MA	0,25	5,4	0,4	6,7	4,2
	5	5,8	7,5	4,1	6,3
(*S*)-MA	0,25	3,6	1,7	8,7	4,3
	5	3,1	2,6	2,9	2,3
(*R*)-MDA	0,25	7,3	3,5	7,5	3,7
	5	3,0	9,0	3,1	7,3
(*S*)-MDA	0,25	2,9	9,5	5,7	5,1
	5	2,8	9,3	2,9	6,9
(*R*)-MDMA	0,25	3,0	1,5	4,4	3,4
	5	2,8	6,8	2,9	5,7
(*S*)-MDMA	0,25	3,6	1,4	5,6	3,8
	5	3,2	6,7	3,2	4,5
(*R*)-MDEA	0,25	3,1	3,8	6,1	2,9
	5	3,1	2,6	3,0	2,7
(*S*)-MDEA	0,25	4,4	0,5	6,5	2,7
	5	3,0	5,4	3,0	2,5

* CV: coefficient de variation

3.5 Etude de la disposition énantiosélective des STA dans les cheveux d'individus soupçonnés d'avoir consommé des substances illicites

3.5.1. Analyse de cheveux non segmentés

La méthode validée a tout d'abord été appliquée au dépistage de 24 échantillons de cheveux provenant du National Institute of Scientific Investigation de Séoul (Corée). Les résultats sont repris par les tableaux 10 et 11.

Tableau 10. Concentrations et rapports *R*/*S* de cheveux testés positifs (sujets 1-23) à l'AM et la MA après analyse par CG/SM-ICN

Sujet	(*R*)-AM (ng/mg)	(*S*)-AM (ng/mg)	*R* vs. *S*	(*R*)-MA (ng/mg)	(*S*)-MA (ng/mg)	*R* vs. *S*
1	ND[a]	0,2	/	ND	3,8	/
2	1,0	7,5	0,13	10,8	43,6	0,25
3	0,2	2,0	0,07	1,5	12,3	0,12
4	0,2	0,9	0,21	0,4	21,9	0,02
5	ND	0,1	/	ND	3,1	/
6	0,1	1,9	0,03	0,2	21,6	0,01
7	0,2	1,4	0,16	0,3	28,0	0,01
8	0,1	1,2	0,06	1,0	14,5	0,07
9	0,2	1,3	0,15	1,4	27,3	0,05
10	1,0	3,2	0,30	9,7	23,6	0,41
11	ND	1,5	/	0,6	20,4	0,03
12	ND	0,8	/	0,6	9,0	0,07
13	0,2	0,3	0,79	1,6	2,0	0,82
14	0,4	1,0	0,40	4,3	18,0	0,24
15	ND	1,4	/	ND	26,1	/
16	1,2	1,3	0,92	43,2	20,5	2,11
17	0,1	0,4	0,23	0,1	6,5	0,11
18	0,2	0,2	0,95	0,2	2,4	0,07
19	ND	2,8	/	1,7	44,5	0,04
20	0,1	0,7	0,14	0,8	13,9	0,05
21	ND	2,4	/	ND	31,8	/
22	0,2	1,3	0,17	0,2	40,1	0,01
23	0,4	1,8	0,20	0,3	39,5	0,01

[a] Non détectable

Les 24 échantillons contenaient de l'AM et/ou de la MA, alors que les énantiomères de la MDMA et de la MDA n'ont été détectés que dans un seul cas. Aucun échantillon de cette série n'a été testé positif à la MDEA. En fait, il est bien

connu que dans les pays asiatiques, la consommation de MA et/ou AM est beaucoup plus populaire que celle de la MDMA, de la MDEA ou encore de la MDA (UNODC, 2006).

Les concentrations de la MA sont largement supérieures à celles de l'AM (rapports des concentrations métabolite/substance mère AM/MA < 0,16), ce qui suggère plutôt une consommation majoritaire de MA. La présence de l'AM proviendrait majoritairement de la métabolisation de la MA (Nakahara, 1995; Al-Dirbashi *et al.*, 1999b; Al-Dirbashi *et al.*, 1999a; Miki *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2006). La détermination des rapports énantiomériques montre une distribution des énantiomères assez variable, que l'on peut répartir en trois groupes.

19 échantillons de cheveux sur 24 contiennent les deux énantiomères de l'AM et de la MA et les concentrations des isomères (*S*) sont plus élevées que celles de leurs antipodes. Les valeurs des rapports énantiomériques *R*/*S* sont situées entre 0,01 et 0,82 pour la MA, et entre 0,03 et 0,95 pour l'AM.

Un deuxième groupe de 4 sujets a uniquement été testé positif aux énantiomères les plus actifs, la (*S*)-AM et la (*S*)-MA (Figure 21). Or, sachant que les deux énantiomères de l'AM et/ou de la MA avaient déjà été détectés dans notre étude précédente (Martins *et al.*, 2005), la présence d'un seul isomère optique dans les cheveux indique clairement que ces individus semblent avoir principalement consommé de la (*S*)-MA pure.

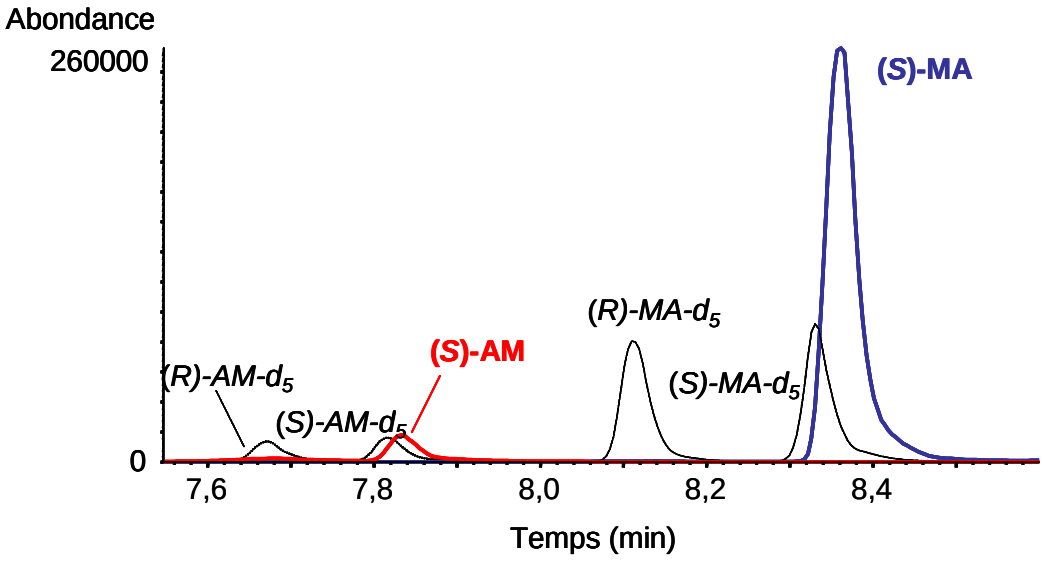


Figure 21 : Chromatogramme de l'échantillon de cheveux de l'individu 11 testé positif à la (*S*)-MA et à la (*S*)-AM

Finalement, une prédominance de la forme la moins active de la MA à savoir, la (*R*)-MA a été observée dans un échantillon (individu 16) et le rapport *R*/*S* était alors de 2,11. Les concentrations des énantiomères du métabolite AM étaient équivalentes, ce qui s'est traduit par un rapport *R*/*S* proche de 1.

Tableau 11. Echantillon de cheveux du spécimen 24 testé positif aux énantiomères de la MA, la MDA et la MDMA

Substance détectée	Concentration (ng/mg)	*R/S*
(*R*)-MA	0,1	0,25
(*S*)-MA	0,4	
(*R*)-MDA	0,1	0,50
(*S*)-MDA	0,2	
(*R*)-MDMA	5,2	2,00
(*S*)-MDMA	2,6	

Par contre, le dépistage des cheveux de l'individu 24 révèle la présence des énantiomères de la MA, de la MDMA et de la MDA. Les concentrations et les valeurs *R*/*S* sont résumées dans le tableau 11 et le chromatogramme correspondant est reproduit dans la figure 22. Les valeurs *R*/*S* de la MDMA sont > 1, ce qui démontre bien une prédominance de la forme (*R*)-MDMA dans les cheveux. La concentration de la MDA étant largement inférieure à celle de la MDMA, l'origine de la MDA serait plutôt le résultat de la métabolisation de la MDMA que celui d'une consommation de MDA (Röhrich *et al.*, 1997; Rothe *et al.*, 1997). Pour la MDA et la MA, les rapports *R*/*S* sont < 1.

Ces résultats semblent confirmer un résultat précédent de Tagliaro et coll., qui ont également observé, par EC/UV, une prédominance de la (*R*)-MDMA dans les cheveux d'un consommateur d'ecstasy (Tagliaro *et al.*, 1998). Cependant, ils n'avaient ni quantifié, ni calculé de rapport énantiomérique de la MDMA ou de MDA. Sachant que la MDMA est généralement vendue sous forme racémique, et étant donné que les rapports *R*/*S* de la MDMA et de la MDA montrent la même prédominance que ceux déterminés dans les urines, la salive ou encore le sérum (De Boer *et al.*, 1997; Lanz *et al.*, 1997; Fallon *et al.*, 1999; Brunnenberg *et al.*, 2001; Pizarro *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2003a; Pizarro *et al.*, 2003; Pizarro *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2007), nous pouvons supposer que le mode d'incorporation de la

MDMA dans les cheveux n'est pas énantiosélectif. Ainsi, la disposition énantiosélective de la MDMA serait plutôt le résultat de la métabolisation hépatique stéréosélective et/ou de l'élimination rénale plus rapide de la (*S*)-MDMA.

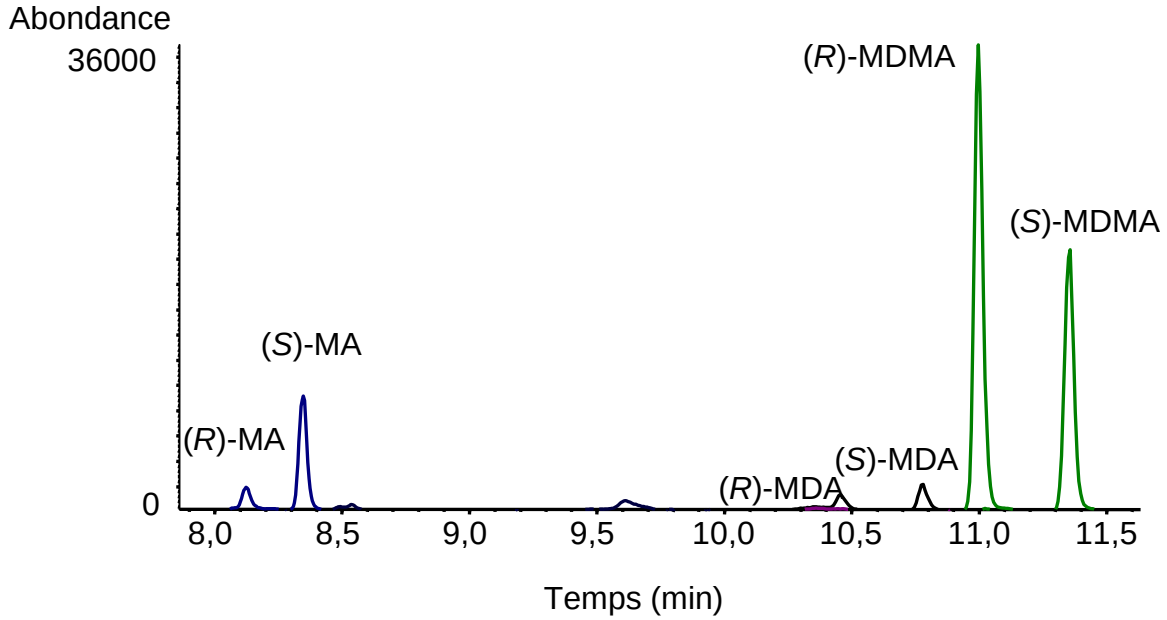


Figure 22 : Cheveux de l'individu 24 testé positif aux énantiomères (*R*) et (*S*) de la MA, la MDMA et son métabolite la MDA

Vu les similitudes structurales avec la MDMA on peut supposer que le mode d'incorporation des énantiomères de la MA et de la AM dans les cheveux est identique. Cependant, même si la plupart des échantillons présentaient des concentrations plus élevées pour l'énantiomère (*S*), l'interprétation de ces résultats demeure compliquée. En effet, une consommation concomitante de MA et/ou d'AM sous forme de mélange racémique et/ou optiquement pur ne peut être exclue. Ainsi, il n'existe pas moins que 14 médicaments qui contiennent ou qui sont les précurseurs soit d'un ou des deux énantiomères de la MA ou de l'AM.

En conséquence, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour analyser les rapports énantiomériques des STA dans les cheveux d'individus, dont la pureté optique des produits consommés est parfaitement connue.

3.5.2. Analyse segmentaire de la distribution des énantiomères des STA

Le but de cette étude était d'évaluer la distribution énantiomérique des STA le long d'une mèche de cheveux et de vérifier leur stabilité afin d'en apprendre plus sur leur mode d'incorporation. Les analyses segmentaires ont été réalisées sur 14 échantillons de cheveux provenant de consommateurs réguliers d'ecstasy ayant reçu une administration orale et contrôlée de MDMA. En effet, ces individus ont participé à une étude volontaire à Maastricht, dont le but était d'évaluer les effets de la MDMA et de l'alcool, seuls ou en association, sur le comportement et les capacités de réaction des personnes (Ramaekers *et al.*, 2006). Les doses administrées contenaient 0 (placebo), 75 ou 100 mg de MDMA racémique avec ou sans alcool (Tableau 12).

Tableau 12. Descriptif de l'administration contrôlée de MDMA et d'alcool

Periode*	Groupe 1 (n=2)**	Groupe 2 (n=3)	Groupe 3 (n=2)	Groupe 4 (n=4)	Groupe 5 (n=1)	Groupe 6 (n=2)
	Administration					
1	a	b	c	e	f	d
2	e	f	d	a	c	b
3	c	d	f	b	a	e
4	d	c	b	f	e	a
5	f	e	a	d	b	c
6***	b	a	e	c	d	f

Abréviations : a=placebo, b=75 mg MDMA, c=100 mg MDMA, d=alcool, e=75 mg MDMA + alcool, f=100 mg MDMA + alcool

* Ecart moyen entre deux administrations était une semaine

** Nombre de volontaires par groupe

*** Moment où les cheveux ont été prélevés

Les participants étaient soumis à des dépistages d'urines avant chaque administration de drogue. L'étude portait sur plus ou moins 7 semaines. Il est important de noter qu'aucun rapport détaillé sur la consommation de STA ou d'autres stupéfiants avant cette période de tests n'avait été établit pour aucun des participants.

Les cheveux ont été prélevés lors de la dernière journée de l'étude contrôlée. Dans le cadre de notre étude, les 14 échantillons de cheveux ont été coupés en segments de 2 cm de longueur. Ainsi, comme la croissance moyenne des cheveux

est de 0,8 à 1,3 cm/mois, le segment proximal (côté racine) de 2 cm, qui correspond à 10 semaines, couvrirait la période principale de l'étude et contiendrait en plus 3 semaines de consommation "non contrôlée" de STA. En plus, comme l'échantillon n°1 contenait assez de matériel, une segmentation supplémentaire différente a été effectuée : le morceau de la mèche de cheveux proximal de 5 cm de longueur a été segmenté par 1 cm, tandis que le reste de la mèche (de 5 à 11 cm) a été segmenté par 2 cm. Au total, 45 segments de cheveux ont été analysés par CG/SM-ICN. Les concentrations des énantiomères des STA détectés et les rapports énantiomériques correspondants sont résumés dans les tableaux 13 à 15.

En ne considérant que les segments 0-2 cm, tous ces échantillons contiennent les deux énantiomères de la MDMA. Les concentrations de la (*R*)-MDMA s'étendent de 0,14 à 10,12 ng/mg tandis que celles de la (*S*)-MDMA se situent entre 0,06 et 9,97 ng/mg. Aucune corrélation n'a pu être établie entre les doses de MDMA administrées et la quantité de MDMA détectée dans les segments proximaux. Une des explications pourrait être que le segment proximal de 2 cm prélevé ne couvre pas toute la période de l'étude et que les concentrations de MDMA mesurées, seraient le résultat « d'une consommation non déclarée» de MDMA avant cette étude. En outre, bien que des dépistages d'urine aient été exécutés avant et le jour de l'administration de MDMA, une consommation non déclarée de MDMA entre les différentes sessions d'administration ne peut pas être exclue.

En regardant tous les segments analysés, 39 des 45 segments ont été testés positifs aux énantiomères de la MDMA et les concentrations totales varient de 0,2 à 20,1 ng/mg. Dans chacun de ces segments, la (*R*)-MDMA est prédominante par rapport à la (*S*)-MDMA et les valeurs des rapports énantiomériques oscillent entre 1,02 et 2,75. Les isomères optiques de la MDA ont également été détectés au cours de l'analyse segmentaire. Leurs concentrations sont largement inférieures à celles de la MDMA non-métabolisée (rapports métabolite/substance mère MDA/MDMA <0,09), ce qui signifie que la MDA proviendrait plutôt de la métabolisation de la MDMA que d'une consommation de MDA proprement dite (Röhrich *et al.*, 1997; Rothe *et al.*, 1997; Cooper *et al.*, 2000). Les valeurs *R*/*S* se situaient entre 0,60 et 1,60, mais la plupart des segments contenaient des concentrations équivalentes de (*R*) et (*S*)-MDA (médiane = 1).

Tableau 13. Concentrations des énantiomères des STA détectés au cours de l'analyse segmentaire de cheveux de 14 individus

Sujet	STA	0 - 2 cm		2 - 4 cm		4 - 6 cm		6 - 8 cm		8 - 10 cm		10 - 12 cm	
	(ng/mg)	*R*	*S*	*R*	*S*	*R*	*S*	*R*	*S*	*R*	*S*	*R*	*S*
1	MDMA	0,88	0,51	1,23	0,77	1,07	0,64	0,73	0,42	0,44	0,26	0,30	0,18
	MDA	0,04	0,05	0,06	0,07	0,06	0,06	0,04	0,04	0,02	0,03	0,02	0,02
	AM	0,25	0,17	0,36	0,26	0,37	0,28	0,26	0,19	0,20	0,15	0,15	0,11
2	MDMA	0,23	0,09	0,22	0,08	na		na		na		na	
3	MDMA	0,22	0,09	na*		na		na		na		na	
4	MDMA	10,12	9,97	8,88	8,58	6,67	6,46	5,07	4,77	na		na	
	MDA	0,06	0,10	0,07	0,10	0,07	0,10	0,07	0,10	na		na	
	AM	0,19	0,17	0,26	0,22	0,31	0,28	0,34	0,32	na		na	
5	MDMA	0,76	0,41	0,18	0,10	na		na		na		na	
	MDA	0,03	0,03	nd**	nd	na		na		na		na	
6	MDMA	0,49	0,25	0,18	0,11	na		na		na		na	
	MDA	0,02	0,03	nd	nd	na		na		na		na	
7	MDMA	0,94	0,41	1,03	0,55	1,21	0,77	1,34	0,85	na		na	
	MDA	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,06	0,04	na		na	
	AM	nd	nd	nd	nd	0,06	0,06	0,09	0,09	na		na	
8	MDMA	0,14	0,06	1,13	0,49	na		na		na		na	
	MDA	nd	nd	0,05	0,06	na		na		na		na	
9	MDMA	2,60	1,01	2,92	1,16	na		na		na		na	
	MDA	0,13	0,09	0,16	0,10	na		na		na		na	
	AM	3,67	2,76	2,92	2,26	na		na		na		na	
10	MDMA	0,51	0,22	0,17	0,08	0,14	0,06	0,11	0,06	0,10	0,04	na	
	MDA	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	nd	nd	nd	nd	na	
11	MDMA	1,24	0,87	0,40	0,21	0,36	0,17	0,35	0,17	0,25	0,14	0,16	0,08
	MDA	0,03	0,05	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	nd	nd	nd	nd
12	MDMA	0,51	0,22	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	na	
13	MDMA	0,17	0,07	nd	nd	na		na		na		na	
14	MDMA	0,54	0,22	nd	nd	na		na		na		na	

* na = segment non disponible

** nd = non détecté

Tableau 14. Rapports énantiomériques *R*/*S* de la MDA, la MDMA et AM déterminés pendant l'analyse segmentaire

Individu	STA	Rapports *R/S* dans les segments de cheveux					
		0 - 2 cm	2 - 4 cm	4 - 6 cm	6 - 8 cm	8 - 10 cm	10 - 12 cm
1	MDMA	1,73	1,60	1,67	1,74	1,70	1,67
	MDA	0,80	0,86	1,00	1,00	0,67	1,00
	AM	1,47	1,39	1,32	1,37	1,33	1,36
2	MDMA	2,56	2,75	na*	na	na	na
3	MDMA	2,44	na	na	na	na	na
4	MDMA	1,02	1,04	1,03	1,06	na	na
	MDA	0,60	0,70	0,70	0,70	na	na
	AM	1,12	1,18	1,11	1,06	na	na
5	MDMA	1,85	1,80	na	na	na	na
	MDA	1,00	nd**	na	na	na	na
6	MDMA	1,92	1,64	na	na	na	na
	MDA	0,67	nd	na	na	na	na
7	MDMA	2,29	1,85	1,57	1,58	na	na
	MDA	1,00	1,00	1,25	1,50	na	na
	AM	nd	nd	1,00	1,00	na	na
8	MDMA	2,33	2,31	na	na	na	na
	MDA	nd	0,83	na	na	na	na
9	MDMA	2,60	2,52	na	na	na	na
	MDA	1,44	1,60	na	na	na	na
	AM	1,33	1,29	na	na	na	na
10	MDMA	2,32	2,13	2,33	1,83	2,50	na
	MDA	1,00	1,00	1,00	nd	nd	na
11	MDMA	1,43	1,91	2,12	2,06	1,76	2,00
	MDA	0,60	1,00	1,00	1,00	nd	nd
12	MDMA	2,32	nd	nd	nd	nd	na
13	MDMA	2,43	nd	na	na	na	na
14	MDMA	2,46	nd	na	na	na	na

* na = segment non disponible

** nd = non détecté

L'AM a également été détectée dans les segments proximaux et/ou dans les segments distaux de 4 individus. Les rapports énantiomériques *R*/*S* de l'AM varient entre 1,00 et 1,47, ce qui montre une prédominance générale de la (*R*)-AM. Bien que les contrôles d'urine réalisés sur les 14 individus avant l'administration de la MDMA

étaient négatifs aux STA, la présence de l'AM dans le segment proximal de cheveux de quelques volontaires pourrait néanmoins être le résultat d'une consommation non déclarée d'AM entre les sessions d'administration et/ou avant l'étude.

Cette étude a enfin permis d'obtenir des informations sur la distribution énantiomérique de la MDMA, de la MDA et de l'AM dans les segments de cheveux humains. La prédominance de la forme (*R*)-MDMA est en accord avec les résultats observés lors de l'analyse d'un seul échantillon de cheveux au cours de notre étude précédente (Martins *et al.*, 2006) et de celle de Tagliaro et coll. (Tagliaro *et al.*, 1998). Par ailleurs, la disposition stéréosélective de la MDMA dans les cheveux est en accord avec celle observée dans l'urine, le plasma ou la salive (Moore *et al.*, 1996; De Boer *et al.*, 1997; Lanz *et al.*, 1997; Hensley *et al.*, 1999; Fallon *et al.*, 1999; Brunnenberg *et al.*, 2001; Pizarro *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2003b; Pizarro *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2003a; Pizarro *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2005). Les différences interindividuelles observées pour les distributions énantiomériques des isomères de la MDA ont également déjà été observées pour d'autres matrices (Hensley *et al.*, 1999; Fallon *et al.*, 1999; Buechler *et al.*, 2003; Pizarro *et al.*, 2004).

Nyström et coll. avaient observé, lors d'une étude contrôlée de AM racémique, une prépondérance de la (*R*)-AM chez un patient (Nyström *et al.*, 2005). Ainsi, la prédominance de la (*R*)-AM dans les segments de nos patients pourrait aussi résulter d'une ingestion d'AM racémique.

Tableau 15. Concentrations et valeurs *R*/*S* de l'AM, la MDA et de la MDMA après une analyse segmentaire de 1 et/ou de 2 cm chez l'individu 1

Segment (cm)	(*R*)-MDMA (ng/mg)	(*S*)-MDMA (ng/mg)	*R/S*	(*R*)-MDA (ng/mg)	(*S*)-MDA (ng/mg)	*R/S*	(*R*)-AM (ng/mg)	(*S*)-AM (ng/mg)	*R/S*
0 - 1	0,64	0,38	1,68	0,03	0,04	0,75	0,25	0,17	1,47
1 - 2	1,11	0,64	1,73	0,05	0,06	0,83	0,24	0,16	1,50
2 - 3	1,27	0,78	1,63	0,06	0,07	0,86	0,33	0,24	1,37
3 - 4	1,19	0,75	1,59	0,06	0,07	0,86	0,39	0,29	1,34
4 - 5	1,07	0,64	1,67	0,06	0,06	1,00	0,37	0,28	1,32
5 - 7	0,75	0,45	1,67	0,04	0,04	1,00	0,29	0,22	1,32
7 - 9	0,50	0,29	1,72	0,02	0,03	0,67	0,20	0,16	1,25
9 - 11	0,35	0,21	1,67	0,01	0,01	1,00	0,21	0,16	1,31

On peut aussi constater que les valeurs des rapports énantiomériques de l'AM, de la MDMA et de la MDA demeurent relativement constantes sur toute la longueur des cheveux d'un même individu. Même quand les cheveux ont été segmentés par 1 cm (Tableau 15, Figure 23), les rapports *R*/*S* des STA révélaient une tendance claire et nette de la racine jusqu'à la pointe des cheveux.

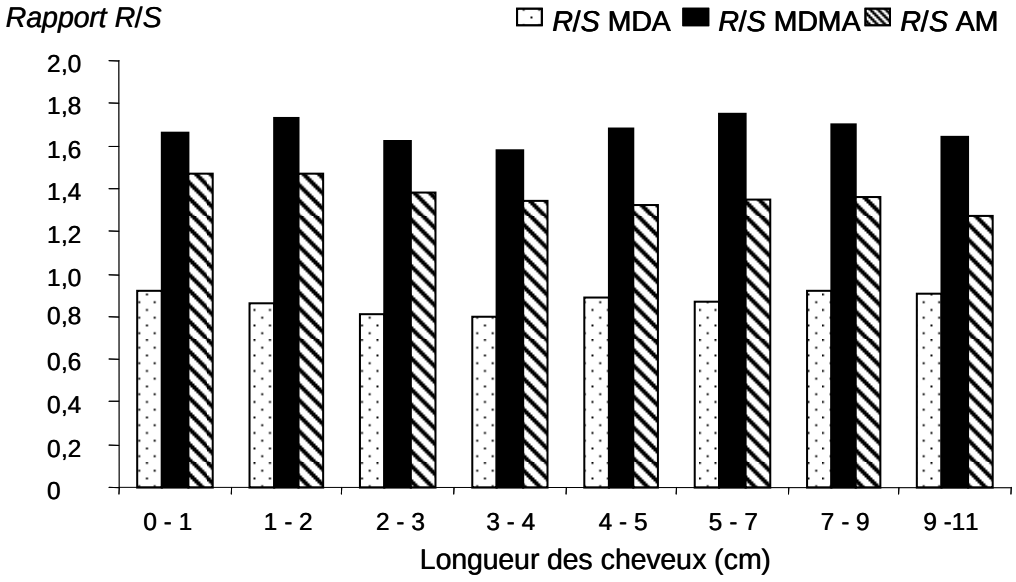


Figure 23. Distribution des énantiomères (*R*) et (*S*) de la MDA, la MDMA et de l'AM après une analyse segmentaire différente de l'échantillon 1

Ces données démontrent bien qu'après incorporation, les énantiomères des STA présentent une bonne stabilité et les rapports *R*/*S* demeurent relativement constants le long des mèches de cheveux.

En conclusion, les résultats de cette étude renforcent l'hypothèse selon laquelle le mécanisme d'incorporation des STA dans les cheveux ne serait pas énantiosélectif, impliquant qu'aucune inversion du rapport de *R*/*S* ne se produirait pendant la séquestration dans la kératine.

3.5.3. Influence de la décoloration des cheveux sur les rapports énantiomériques des STA

L'objectif de ces expériences était d'évaluer pour la première fois l'impact d'un traitement chimique tel que la décoloration sur la disposition énantiomérique des

STA dans les cheveux. Des échantillons de cheveux (n=14), testés positifs à diverses STA lors d'analyses au laboratoire de Forensisch Toxikologisches Centrum GmbH à Munich, ont été traités pendant 40 minutes *in vitro* à l'aide d'une crème décolorante commerciale (Poly Blonde, Schwarzkopf).

Les résultats des analyses des cheveux naturels et décolorés sont représentés dans le tableau 16.

Les énantiomères des 5 STA les plus courants ont été détectés au cours de cette étude. Trois échantillons de cheveux ont même été testés positifs à un seul énantiomère, à savoir la (*S*)-AM et/ou la (*S*)-MA.

Les résultats du tableau 16 montrent que les concentrations de tous les énantiomères des STA décelés sont plus basses dans les cheveux décolorés que dans les cheveux naturels d'origine. Les pourcentages des énantiomères éliminés par ce traitement varient selon la substance. Les valeurs des médianes de ces pourcentages étaient respectivement 24,5 et 25,5% pour la (*R*)- et la (*S*)-MDMA, 20 et 21% pour les isomères (*R*)- et (*S*)-MDA, 34 et 29,5% pour la (*R*)- et la (*S*)-AM, 38 et 39% pour la (*R*)- et la (*S*)-MA et 24,5 et 25% pour la (*R*)- et la (*S*)-MDEA. Les énantiomères de l'AM et de la MA étaient généralement plus dégradés que leurs dérivés chimiques analogues.

La décoloration des cheveux diminue bien la concentration des drogues et de leurs énantiomères dans les cheveux. L'incubation d'un mélange racémique de STA dans une solution de peroxyde d'hydrogène (30%) pendant 30 minutes à 39℃ a montré, après extraction et analyse par CG/SM-ICN, une dégradation moyenne de 45% de l'abondance des énantiomères des STA par rapport à une solution non traitée. Ainsi, la diminution des concentrations des STA dans les cheveux résulterait plutôt d'une dégradation par le peroxyde, majoritairement présent dans les produits de décoloration, que d'une lixiviation (Yegles *et al.*, 2000; Yegles, 2005). Ceci est en accord avec les expériences de Tanaka et coll. qui ont identifié des dérivés hydroxyles de la MA, après l'avoir incubée dans du peroxyde d'hydrogène (Tanaka *et al.*, 2001).

Tableau 16. Concentrations et rapports *R*/*S* des STA dans les cheveux

Sujet	Couleur	STA	Cheveux non décolorés			Cheveux décolorés			Dégradation (%)	
		(ng/mg)	*R*	*S*	*R/S*	*R*	*S*	*R/S*	*R*	*S*
1	brun	MDMA	8,74	4,50	1,94	6,52	3,32	1,96	25	26
		MDA	0,63	0,58	1,09	0,53	0,47	1,13	16	19
2	brun	AM	16,58	13,70	1,21	9,52	8,28	1,15	42	40
		MA	0,13	0,16	0,81	0,07	0,09	0,78	46	44
		MDMA	0,05	0,04	1,25	0,04	0,03	1,33	20	25
3	brun	AM	9,85	10,92	0,90	5,49	6,25	0,88	44	43
		MA	0,19	0,22	0,86	0,16	0,19	0,84	16	14
		MDA	0,15	0,14	1,07	0,12	0,11	1,09	20	21
		MDMA	3,37	2,95	1,14	3,04	2,55	1,19	10	14
		MDEA	0,19	0,17	1,12	0,16	0,14	1,14	16	18
4	brun	AM	0,08	0,07	1,14	0,03	0,03	1,00	62	62
		MDA	0,09	0,06	1,50	0,07	0,04	1,75	22	33
		MDMA	1,42	0,68	2,09	0,59	0,30	1,97	58	56
		MDEA	0,15	0,09	1,67	0,11	0,06	1,83	27	33
5	brun	MDMA	0,07	0,05	1,40	0,05	0,04	1,25	29	20
6	brun	AM	16,69	14,19	1,18	13,91	12,55	1,11	17	12
		MA	0,13	0,17	0,76	0,08	0,10	0,80	38	41
7	brun	AM	0,75	0,73	1,04	0,36	0,34	1,06	52	53
		MDA	1,31	1,34	0,98	0,98	1,00	0,98	25	25
		MDMA	13,17	9,99	1,32	9,97	7,08	1,41	24	29
		MDEA	2,75	2,03	1,35	2,07	1,45	1,43	25	29
8	brun	AM	0,45	0,44	1,02	0,43	0,42	1,02	4	5
		MDMA	1,23	1,02	1,21	0,97	0,89	1,10	22	18
9	brun foncé	MDA	0,05	0,04	1,25	0,04	0,03	1,33	20	25
		MDMA	0,72	0,38	1,89	0,44	0,23	1,91	39	39
10	noir	AM	0,93	0,81	1,24	0,64	0,56	1,20	26	27
11	brun	AM	0,12	0,11	1,09	0,09	0,08	1,13	25	27
		MDA	0,11	0,10	1,10	0,09	0,08	1,13	18	20
		MDMA	2,40	1,96	1,22	1,62	1,36	1,23	32	31
		MDEA	0,17	0,14	1,21	0,13	0,11	1,18	24	21
12	brun foncé	AM	nd	0,28	nc	nd	0,19	nc	nc	32
		MDA	0,38	0,28	1,36	0,30	0,22	1,36	21	21
		MDMA	7,17	4,09	1,75	5,42	3,08	1,75	24	25
13	brun foncé	AM	nd	3,70	nc	nd	2,94	nc	nc	20
		MA	nd	11,29	nc	nd	10,08	nc	nc	10
14	brun	AM	nd	1,54	nc	nd	0,96	nc	nc	39
		MA	nd	5,57	nc	nd	3,86	nc	nc	30

nd = non détecté
nc = non calculé

Les rapports énantiomériques des STA ,déterminés avant et après décoloration des cheveux, sont significativement les mêmes (test de Student ; P > 0,05). Ces

expériences ont permis de mettre en évidence pour la première fois que la décoloration ne dégrade pas stéréosélectivement les STA. Ainsi, au vu de ces résultats, aucune précaution spéciale ne doit être prise en compte lors de l'interprétation d'une analyse énantiosélective de cheveux décolorés à part celle de la diminution de la concentration.

Cependant, des différences interindividuelles sont apparues au niveau de la dégradation d'une même substance, alors que la pigmentation de la plupart des cheveux était assez semblable (brun à brun-foncé). Ainsi, par exemple, les concentrations des énantiomères de la MDMA ont diminué entre 10 et 58%. Ces données pourraient être dues aux constitutions différentes des cheveux, qui feraient que le produit de décoloration pénètre plus ou moins bien dans la matrice. De même, les STA incorporés dans un même échantillon ne présentaient pas les mêmes pourcentages de dégradation. Ainsi, par exemple, les cheveux de l'individu 3 présente après décoloration, une diminution de la concentration allant de 10% ((*R*)-MDMA) à 44% ((*R*)-AM). La forte réactivité des énantiomères de l'AM vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène comparée à celle de la MDMA pourrait expliquer les variations observées.

Cette étude a aussi permis de quantifier, pour la première fois, les isomères optiques de la MDEA dans les cheveux (Figure 24). La (*R*)-MDEA est toujours prédominante par rapport à la (*S*)-MDEA et les rapports *R*/*S* se situent entre 1,12 et 1,67. La prédominance de la (*R*)-MDEA avait aussi été mise en évidence dans d'autres matrices biologiques telles que le sang/sérum, la salive ou encore l'urine (Brunnenberg *et al.*, 2001; Spitzer *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2003b; Peters *et al.*, 2003a; Paul *et al.*, 2004). Comme la MDMA, la MDEA est aussi généralement synthétisée sous forme racémique et les rapports *R*/*S* de la MDEA seraient donc la conséquence de la métabolisation stéréosélective hépatique et/ou de l'élimination rénale plus rapide de la (*S*)-MDEA. Les données de notre étude montrent encore une fois que le mode d'incorporation des STA dans les cheveux n'est pas énantiosélectif.

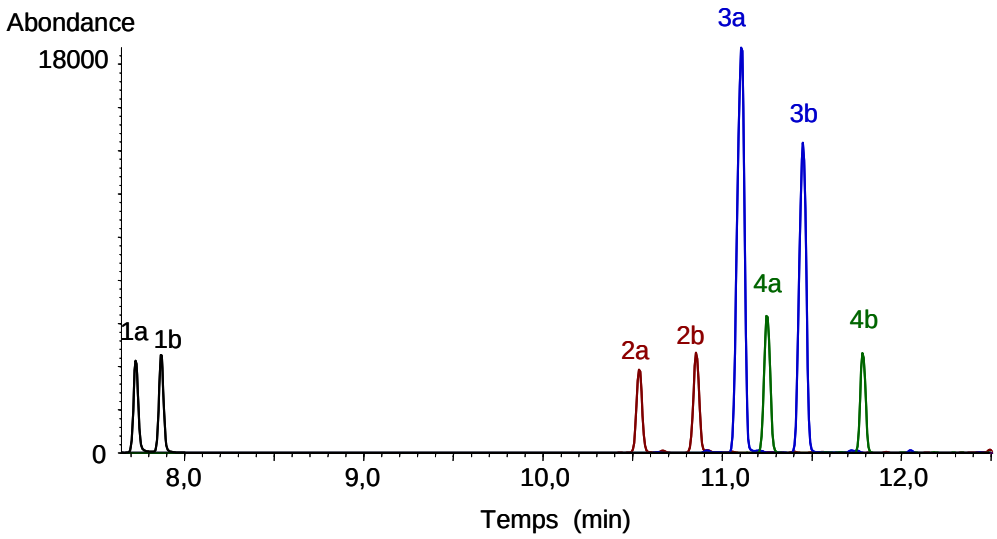


Figure 24. Chromatogramme de l'échantillon de cheveux non traité de l'individu 7

Pics: (1a) (R)-AM, (1b) (S)-AM; (2a) (R)-MDA, (2b) (S)-MDA; (3a) (R)-MDMA, (3b) (S)-MDMA; (4a) (R)-MDEA, (4b) (S)-MDEA

Chapitre III. Mise au point d'une méthode pour le dosage des énantiomères de la MTD et de l'EDDP extraits de la salive

1. Objectifs de l'étude

Cette étude avait pour objectif de développer une méthode permettant d'obtenir la séparation énantiosélective de la MTD et de l'EDDP, extraits de la salive, par EC. Une première étape du développement de la méthode était tout d'abord de choisir le meilleur sélecteur chiral parmi les nombreuses CDs disponibles. Une fois le sélecteur chiral fixé, l'influence de certains paramètres expérimentaux (pH de l'électrolyte, concentration en CD, …) a été étudiée. Le procédé optimisé a été utilisé pour les séparations énantiosélectives de la MTD et de l'EDDP extraits de la salive. Finalement, la méthode validée a été appliquée à l'analyse des échantillons de salive provenant de patients suivant un traitement de substitution par la MTD au Luxembourg.

2. Matériel et méthodes

2.1 Réactifs, solutions de référence et cyclodextrines

Les solutions racémiques de MTD et EDDP (1 mg/mL) proviennent de Cerilliant (Paloma, USA). La DIMEB a été fabriquée par CYCLOLAB (Budapest, Hongrie), alors que les HS-α-CD, HS-β-CD et HS-γ-CD (20% w/v) proviennent de Beckmann Coulter (Fullerton, CA, USA). L'acide orthophosphorique 85 % (H_3PO_4) et les pastilles de soude (NaOH) proviennent de Merck (Overijse, Belgique), le méthanol (CLHP-grade, MeOH) et H_2O (CLHP-grade) de Labscan (Dublin, Irlande). Les filtres Minisart avec des pores de 0,2 µm de diamètre proviennent de Sartorius AG (Goettingen, Allemagne) et les salivettes utilisées pour le prélèvement de la salive proviennent de Sarstedt (Nümbrecht, Allemagne). Le cyclohexane (99,5%), l'ammoniac (NH_3, 25%), la (*R*)-(+)-1-phényléthylamine ((*R*)-PEA *R*:*S* ≥ 99,5:0,5) sont de Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique). La (*R*)-MTD a été fournie par le Laboratoire National de la Santé de Luxembourg, division du Contrôle des Médicaments.

2.2 Préparation des solutions électrolytes, des cyclodextrines et des solutions de référence à analyser

2.2.1. Préparation des électrolytes

A. Solution 50 mM de phosphate

On dilue 3,37 mL de H_3PO_4 85% dans 800 mL d'eau et le pH est ajusté à 4,5 avec du NaOH 1 mol/L. La solution est transvasée dans une fiole de 1L et le niveau est ajusté avec H_2O. L'électrolyte est finalement filtré à travers le filtre Minisart 0,2 µm de diamètre.

B. Solution 100 mM de phosphate

On dilue 6,74 mL de H_3PO_4 85% dans 800 mL de H_2O et le pH est ajusté à pH 2,5 avec NaOH 1 mol/L. La solution, transvasée dans une fiole de 1L, est finalement ajustée avec de l'eau. L'électrolyte est finalement filtré à travers le filtre Minisart 0,2 µm de diamètre.

2.2.2. Préparation des solutions de cyclodextrines

A. DIMEB 1mM

La DIMEB (1,325 mg, M_w = 1382 g/mol) est diluée dans 1 mL d'électrolyte de phosphate 100 mM, pH 2,5.

B. Solution HS-β-CD et HS-γ-CD 0,2% (w/v)

10 µL de HS-β-CD ou HS-γ-CD 20% (w/v) sont dilués dans 990 µL de l'électrolyte phosphate 50 mM.

2.2.3. Préparation des échantillons à injecter dans l'EC

10 µL d'une solution racémique de MTD et EDDP à 20 µg/mL sont ajoutés à 5 µL de H_2O et à 5 µL d'oxyde de mésityle (isopropylidène acétone) 5 mM, utilisé comme marqueur de l'EOF.

2.3. Préparation des échantillons de salive

2.3.1. Collecte et conservation des échantillons de salive

La salive est collectée sur des patients qui participent au programme de substitution à la MTD et qui ont signé préalablement un consentement éclairé. Par ailleurs, cette étude a reçu l'accord du comité national d'éthique de recherche du Luxembourg. La salive est prélevée à l'aide de deux types de « salivettes » neutres et acidulées. En pratique, il s'agit de mastiquer un rouleau de coton pendant 2 minutes puis de le replacer dans la salivette tout en la fermant avec le bouchon. La récupération de la salive à partir du coton se fait en centrifugeant pendant 10 minutes (5000 tr/min) la salivette. La salive extraite est récupérée dans un récipient en verre et conservée à -20 °C jusqu'à l'analyse.

Cette étude a été réalisée en notant la dose de MTD prescrite afin de pouvoir comparer la quantité administrée avec la concentration salivaire. Les doses quotidiennes de MTD racémique, déclarées par les patients, allaient de 3 à 140 mg et étaient administrées soit sous forme liquide soit sous forme solide.

2.3.2. Procédure d'extraction de la salive

200 µL de salive sont prélevés dans un tube à essai en verre. Après l'addition de l'IS, 10 µL d'une solution de (*R*)-PEA 10 ng/mL, le mélange est basifié en ajoutant 200 µL d'une solution de NH_3 à 25%. Les analytes sont finalement extraits par agitation pendant 2 minutes avec 3 mL de cyclohexane. Après l'extraction liquide-liquide, les tubes sont centrifugés pendant 5 min à 5000 tr/min. 2,5 mL de surnageant sont prélevés et évaporés à sec sous N_2 à 37 °C. Le résidu sec est repris dans un mélange H_2O/MeOH (50:50 v/v) pour être finalement analysé par EC/UV.

2.4. L'électrophorèse capillaire

2.4.1. Instrumentation

L'appareil EC utilisé est un BECKMAN P/ACE^{TM} MDQ équipé d'un détecteur UV P/ACE Diode Array (PDA). L'injection s'effectue soit par pression (injection

hydrodynamique), soit en appliquant une tension électrique (mode électrocinétique). La tension maximale délivrée est de 30 kV et le courant maximal de 300 A. Les données sont traitées par le logiciel 32 Karat^{TM} Software V4.0. Les capillaires utilisés proviennent de BECKMAN. Ils sont placés dans une cartouche BECKMAN thermostatée à 20℃ par un liquide organique de ref roidissement, afin de limiter au maximum l'effet Joule. Les échantillons sont maintenus à 15℃ dans le chariot.

Selon les CDs employées, différentes longueurs de capillaires sont utilisées. Pour la séparation avec le DIMEB, on utilise un capillaire de longueur totale (L_{tot}) de 67 cm et de 50 µm de diamètre interne (ID). Dans le cas des séparations avec la HS-β-CD, un capillaire de L_{tot}=40 cm et ID=50 µm est employé, tandis que pour les séparations chirales avec les HS-γ-CD, on a utilisé des capillaires de L_{tot}=60 cm /ID=50 µm et de L_{tot}=40 cm /ID=50 µm respectivement.

La détection se fait du côté de la cathode à 200 nm. Comme l'électrolyse modifie le pH de l'électrolyte au bout d'un certain temps et par conséquent aussi les temps de rétention des substances, l'électrolyte de séparation est remplacé en moyenne toutes les 4 manipulations, (Rudaz *et al.*, 2005).

2.4.2. Conditions optimisées pour les analyses énantiosélectives des échantillons de salive par EC

Le conditionnement du capillaire comporte les étapes suivantes : rinçage à l'eau pendant 0,5 minutes, conditionnement avec 50 mM d'électrolyte NaH_2PO_4 à pH 4,5 pendant 0,5 minutes, et injection pendant 0,5 minutes d'une solution d'électrolyte 50 mM de NaH_2PO_4 pH 4,5 contenant 0,2% de HS-γ-CD (w/v). L'échantillon est introduit de façon électrocinétique en appliquant une tension de 10 kV pendant 8 secondes. La séparation se fait finalement à 20℃ avec l'élec trolyte de phosphate 50 mM à pH 4,5, en appliquant entre les deux bornes une tension de 20 kV pendant 6 minutes. A la fin de chaque analyse, le capillaire est rincé pendant 2 minutes avec du NaOH 0,1 M.

3. Résultats et discussion

3.1. Choix du sélecteur chiral

La DIMEB et la HS-β-CD ont souvent été employées en EC pour la séparation énantiosélective de la MTD et de l'EDDP. Ainsi, nous avons voulu tester ces sélecteurs chiraux en premier en se basant sur les procédés mis en place (Frost *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 2003; Esteban *et al.*, 2004). Cependant, on n'a pas réussi à reproduire exactement les mêmes résolutions de pics. Ainsi, des ajustements de paramètres tels que la tension, le pH ou encore la concentration de l'électrolyte ont été nécessaires.

3.1.1. Séparation énantiosélective en présence de la DIMEB

En présence de DIMEB 1mM, les pics des énantiomères de la MTD sont pratiquement séparés jusqu'à la ligne de base, alors que la résolution des pics énantiomériques de l'EDDP n'est que partielle (Figure 25). L'analyse des spectres UV a montré que les énantiomères de l'EDDP migrent plus vite que ceux de la MTD.

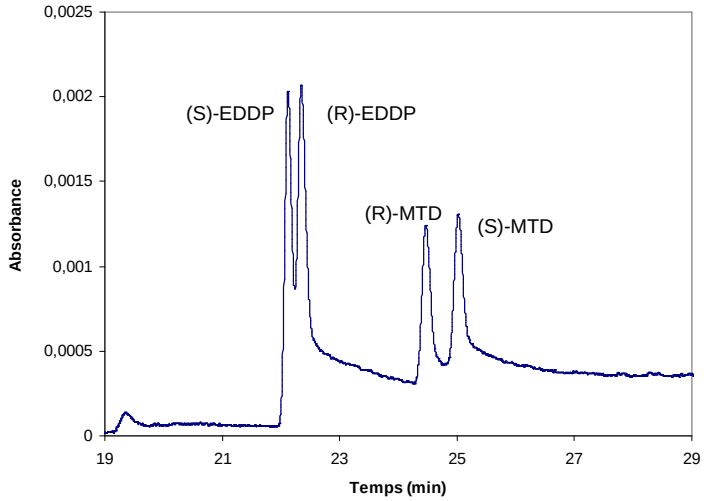


Figure 25 : Electrophérogramme d'une solution racémique de MTD et EDDP après séparation chirale en présence de DIMEB 1mM

Conditions expérimentales: L_{tot}=67 cm, 50 µm ID ; électrolyte: phosphate 100 mM pH 2,5 ; V=14 kV, T=15℃.

L'ajout d'une concentration plus élevée de (*R*)-MTD a montré que la (*R*)-MTD migrait plus vite. Cela signifie que la (*S*)-MTD présente une affinité plus forte pour la DIMEB. Pour son métabolite, aucun énantiomère seul de l'EDDP n'était disponible ni au laboratoire, ni dans le commerce. Cependant, la littérature indique que la (*S*)-EDDP élue avant la (*R*)-EDDP en présence de DIMEB comme sélecteur chiral (Prost *et al.*, 2003; Trkulja *et al.*, 2004).

3.1.2. Séparation énantiosélective en présence de la HS-β-CD

Esteban et coll. avaient obtenu des séparations de ligne de base pour les pics énantiomériques de l'EDDP et de la MTD en présence de HS-β-CD 0,2% (w/v) (Esteban *et al.*, 2004). La reproduction de ces expériences a donné des résolutions de pics très bonnes pour les énantiomères de la MTD (Rs > 3). En revanche, les pics de l'EDDP semblaient difficilement identifiables au départ. L'augmentation de la concentration en EDDP a finalement démontré que les énantiomères de l'EDDP n'étaient pas séparés. La modification de certains paramètres tels que la concentration de CD, le pH ou la concentration de l'électrolyte ne conduisaient toujours pas à la séparation énantiosélective de l'EDDP.

En résumé, l'utilisation des conditions expérimentales selon Esteban et coll. a donné des résultats très satisfaisants pour la MTD. En revanche, aucune séparation chirale n'a pu être observée pour l'EDDP. Par ailleurs, les électrophérogrammes présentaient en plus de nombreux pics d'interférence.

3.1.3. Séparation énantiosélective de la MTD et de l'EDDP par EC en présence de la HS-γ-CD

La HS-γ-CD, qui est l'analogue de la HS-β-CD avec une unité de glucose en plus, avait déjà été utilisée auparavant dans le cadre de la séparation chirale de la MTD par EC/SM-ESI (Rudaz *et al.*, 2003). Cependant, elle n'avait jamais été testée sur les énantiomères de l'EDDP.

L'emploi de la HS-γ-CD comme sélecteur chiral dans le cadre de cette étude a donné l'électrophérogramme ci-dessous (Figure 26).

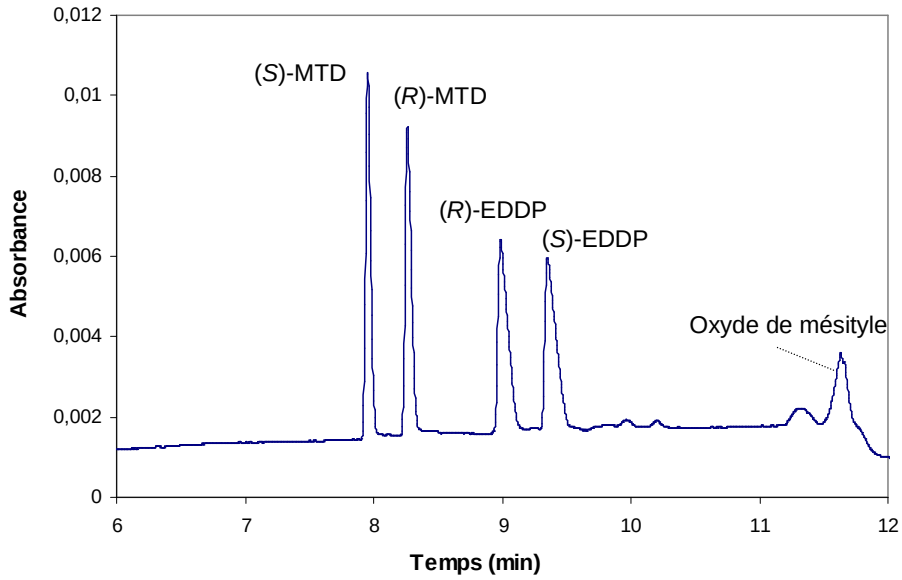


Figure 26 : Electrophérogramme des énantiomères de la MTD et de l'EDDP séparés en présence de HS-γ-CD 0,2% (w/v)

Conditions expérimentales: L_{tot}=60 cm, 50 µm ID ; électrolyte: phosphate 50 mM pH 5, V=20 kV, T=25°C, oxyde de mésityle 5 mM (marqueur du flux)

Les pics des énantiomères de la MTD et de l'EDDP sont séparés jusqu'à la ligne de base en moins de 10 minutes. D'après la figure 26, l'interaction des énantiomères de l'EDDP avec la HS-γ-CD est plus longue, c'est-à-dire que les complexes EDDP-HS-γ-CD sont plus stables que ceux complexés avec la MTD. En outre, l'ajout de (*R*)-MTD montre que celle-ci migre moins vite comparée à la (*S*)-MTD et qu'elle a donc une affinité plus importante pour la HS-γ-CD. En revanche, il n'existe dans le commerce que des solutions racémiques de l'EDDP. Cependant, il a été mis en évidence en CG/SM que la MTD se transforme en EDDP à haute température (Galloway *et al.*, 1999). En conséquence, une solution aqueuse (100 ng/mL) de (*R*)-MTD a été placée à 150°C pendant 6 heures, et le résidu, repris dans H_2O/MeOH (50 :50), a été injecté en EC (Rosas Rodriguez *et al.*, 2003). L'analyse de ce mélange a finalement permis d'établir l'ordre de migration : la (*R*)-EDDP migre plus vite que la (*S*)-EDDP. Par ailleurs, les électrophérogrammes ne présentaient pas de pics d'interférence majeurs.

Ainsi, la HS-γ-CD 0,2% semble être le sélecteur chiral le mieux adapté à nos expériences.

3.2. Influence de certains paramètres expérimentaux sur la séparation chirale de la MTD et de l'EDDP en EC en utilisant la HS-γ-CD

Les premières expériences préliminaires ont montré que la HS-γ-CD était le sélecteur approprié dans le cadre de notre étude. Cependant, avant toute validation et application de la méthode, il est important d'étudier et d'optimiser différents paramètres principaux affectant les résolutions tels que le pH de l'électrolyte, le voltage, la température ou encore la concentration en HS-γ-CD.

3.2.1. Influence du pH de l'électrolyte

Le pKa à 25°C de la MTD étant autour de 8,5, ses énantiomères sont majoritairement sous forme protonée en milieu faiblement acide voire très acide. En ce qui concerne l'EDDP (pKa de 9,2 à 25°C), il porte toujours une charge positive sur son azote quaternaire.

En augmentant le pH de 4 à 6, les résolutions des pics de la MTD et de l'EDDP diminuent au fur et à mesure avec l'augmentation du pH (Figure 27). Parallèlement, les temps de migration des composés diminuaient en augmentant le pH.

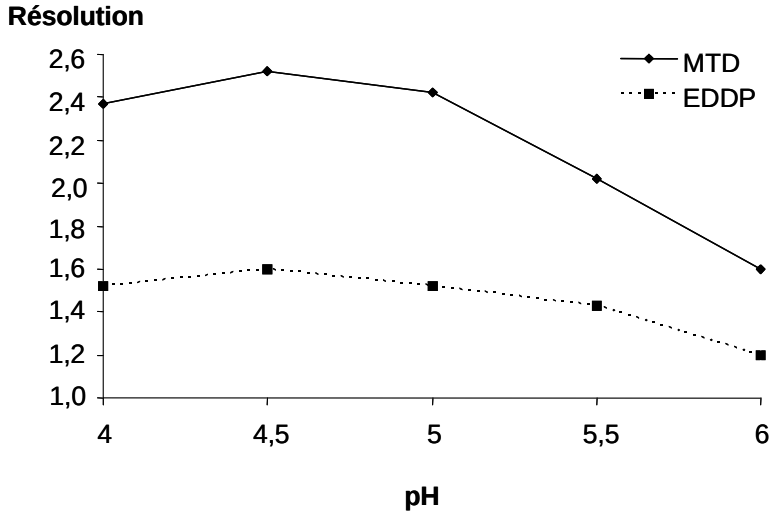


Figure 27 : Influence du pH sur la résolution des énantiomères de la MTD et de l'EDDP

Conditions : L_{tot}=60 cm, 50 µm ID ; électrolyte: phosphate 50 mM; HS-γ-CD 0,2% ; V=20 kV; T=25°C; détection à 200 nm.

En effet, plus le pH est élevé, plus l'EOF est important et plus les énantiomères migrent plus vite vers le détecteur. Ainsi, le temps d'interaction avec les CDs diminue et par la suite aussi la résolution. Le maximum de résolution est observé à pH 4,5 avec des valeurs Rs (Rs=2,5) plus élevées pour la MTD que pour l'EDDP (Rs=1,6). En effet, bien que les énantiomères de l'EDDP interagissent plus longtemps avec les CDs (temps de migration plus long), les valeurs des résolutions se trouvent diminuées à cause de l'apparition du phénomène d'élargissement de pic de l'EDDP (« *tailing* » en anglais). A pH 4, où l'EOF est faible, la séparation a duré 20 minutes. Les énantiomères ont migré plus lentement vers la cathode à faible EOF, mais la séparation était meilleure, car ils étaient plus retenus par les CDs anioniques. Plus les temps de séparation entre les différents énantiomères augmentaient, plus les pics s'élargissaient et plus les résolutions diminuaient.

Un pH de 4,5 a finalement été retenu pour la suite des manipulations.

3.2.2. Influence de la tension appliquée sur les résolutions

L'influence de la tension appliquée sur la séparation des pics des énantiomères a été évaluée pour une gamme allant de 15 à 30 kV (Figure 28).

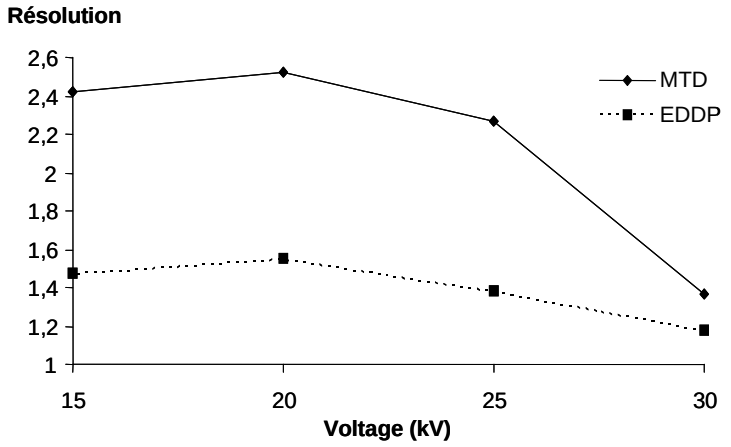


Figure 28 : Influence du voltage sur la résolution des énantiomères de la MTD et de l'EDDP

Conditions : L_{tot}=60 cm, 50 µm ID ; électrolyte: phosphate 50 mM pH 4,5; HS-γ-CD 0,2% ; T=25°C; détection à 200 nm.

Une tension supérieure à 20 kV a diminué la résolution des pics, surtout dans le cas des pics des énantiomères de la MTD. Une tension trop élevée réduit le temps de rétention des énantiomères dans le capillaire et par conséquent restreint le temps d'interaction avec les HS-γ-CD. Les meilleures résolutions sont observées pour un voltage de 20 kV.

3.2.3. Influence de la température

La variation de la température entre 15 et 20℃ n' a pas apporté de changements significatifs au niveau des résolutions. Néanmoins, à 15℃, les temps d'analyse étaient de 15 minutes contre 10 minutes pour 20℃. Cependant, à partir de 25℃ et jusqu'à 35℃, l'élévation de la température du capillaire a entraîné une dégradation des séparations énantiosélectives. En général, l'augmentation de la température diminue la viscosité de l'électrolyte et les migrations des substances sont accélérées. Ce phénomène peut réduire le temps de contact des CDs avec les énantiomères ainsi que l'écart au niveau de leur mobilité, et par conséquent aussi leur résolution (Scarcella *et al.*, 1997). Finalement, la température du capillaire était maintenue à 20℃ pour la suite des expériences.

3.2.4. Influence de la concentration en HS-γ-CD et calcul des constantes apparentes de complexation

La figure 29 montre la variation de la mobilité électrophorétique des énantiomères de la MTD et de l'EDDP en fonction de la concentration en HS-γ-CD variant de 0,1 et 0,8% (w/v). La mobilité des énantiomères de la MTD et de l'EDDP diminue avec l'augmentation de la concentration en CDs, en passant des valeurs positives à des valeurs négatives pour l'EDDP. Ces résultats montrent bien que, plus la concentration en CDs augmente, plus les énantiomères de la MTD et de l'EDDP interagissent avec les CDs, et plus les temps de migration sont longs.

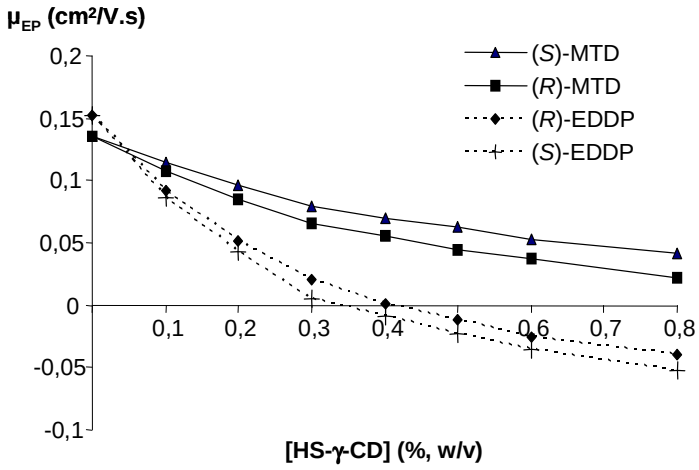


Figure 29 : Influence de la concentration en HS-γ-CD (%, w/v) sur la mobilité des énantiomères de la MTD et de l'EDDP

Conditions : L_{tot}=60 cm, 50 µm ID ; électrolyte: phosphate 50 mM pH 4,5 ; V=20 kV; T=20°C; détection à 200 nm.

L'influence de la concentration en HS-γ-CD sur la résolution des pics est représentée par la figure 30 ci-dessous. Plus la concentration en sélecteur chiral est élevée, plus la séparation est bonne. Cependant, pour toute concentration en HS-γ-CD > 0,3%, le pic de l'EOF se place entre la MTD et l'EDDP. L'augmentation de la concentration en CDs provoque un accroissement de la viscosité du milieu et par conséquent un abaissement de l'EOF. A 0,6% de HS-γ-CD, le pic de l'EOF a interféré avec le pic de la (*R*)-MTD en diminuant sa résolution. L'ordre de migration restait toujours le même.

Il est important de signaler que, parallèlement à l'augmentation de la résolution, le phénomène d'élargissement des pics a de nouveau augmenté pour toute concentration en CD > 0,4%. Les pics étaient assez dissymétriques et les temps d'analyses considérablement plus longs. Les plus beaux pics symétriques séparés à la ligne de base ont été observés pour une concentration en HS-γ-CD de 0,2% avec un temps de séparation de 11 minutes.

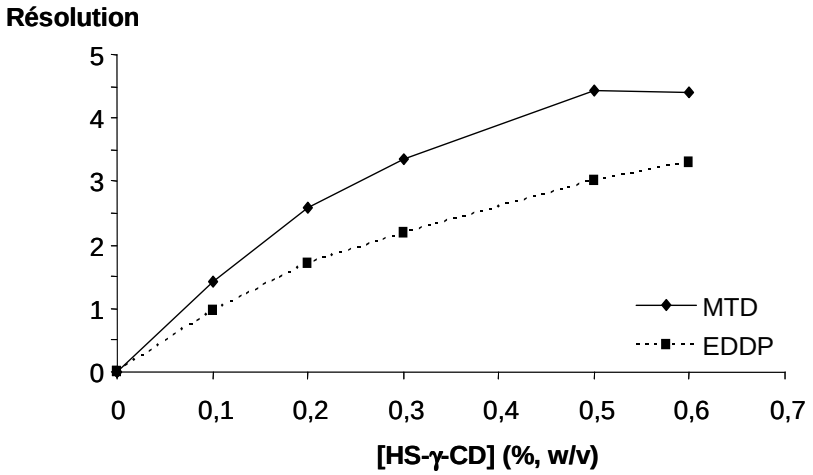


Figure 30 : Influence de la concentration en HS-γ-CD sur la résolution des énantiomères de la MTD et de l'EDDP

Conditions : L_{tot}=60 cm, 50 µm ID ; électrolyte: phosphate 50 mM pH 4,5; V=20 kV; T=20°C; détection à 200 nm.

L'étude des variations des concentrations en HS-γ-CD a permis d'évaluer les mobilités des différents énantiomères et d'estimer aussi la constante apparente de complexation de chaque énantiomère. Les constantes de complexation peuvent être déterminées graphiquement en utilisant l'une des équations énoncées auparavant (équations 26-29 ; chapitre I, section 4.3.6.c). Toutes ces méthodes sont tout à fait équivalentes, mais le graphique construit à partir de l'équation 29 permet de lire très rapidement la constante à partir de la pente. La droite obtenue dans le cas des énantiomères de l'EDDP est représentée dans la figure 31.

Les coefficients de détermination r^2 des droites obtenues par régression linéaire des points expérimentaux de $\frac{(\mu_{EP}-\mu_l)}{[CD]}$ *vs*. $(\mu_{EP}-\mu_l)$ sont tous supérieurs à 0,97. Les constantes apparentes ont été déterminées à partir de la lecture de la pente des droites (Tableau 17).

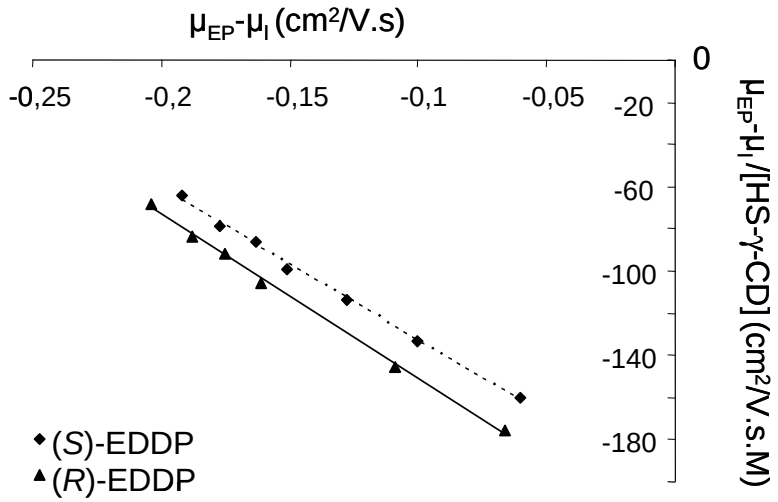


Figure 31 : Détermination des constantes apparentes de complexation K par la méthode graphique inversée en x (équation 29)

Conditions : L_{tot}=60 cm, 50 µm ID ; électrolyte: phosphate 50 mM pH 4,5; V=20 kV; T=20°C; détection à 200 nm.

Les énantiomères qui migrent le plus vite, à savoir ceux de la MTD, présentent les constantes apparentes de complexation les plus petites. Les valeurs confirment bien que la complexation de la HS-γ-CD est plus forte avec les deux énantiomères de l'EDDP qu'avec ceux de la MTD.

Tableau 17. Constantes apparentes de complexation K des énantiomères de la MTD et de l'EDDP avec la HS-γ-CD déterminées par EC.

Enantiomère	Constantes apparentes de complexation K (M^{-1}) à 20°C avec HS- γ-CD (n*=5)
(*S*)-MTD	405 ± 33
(*R*)-MTD	469 ± 37
(*R*)-EDDP	761 ± 37
(*S*)-EDDP	810 ± 29

*n = nombre d'expériences répétées

3.2.5. Paramètres expérimentaux optimisés pour la séparation des énantiomères de la MTD et de l'EDDP par EC

Finalement, en présence de 0,2% de HS-γ-CD dans un capillaire rempli d'un électrolyte de phosphate 50 mM pH 4,5 et thermostaté à 20°C, les énantiomères de la MTD et de l'EDDP sont proprement séparés en EC jusqu'à la ligne de base, et les pics sont relativement symétriques.

3.3. Quantification énantiosélective de la MTD et de l'EDDP dans la salive

3.3.1. Choix de la méthode d'extraction

La mise au point d'une méthode implique tout d'abord le choix d'un mode d'extraction. Deux procédés différents ont été testés : une extraction sur phase solide par les colonnes Clean Screen et une extraction liquide-liquide. Le mode de fonctionnement des colonnes Clean Screen a déjà été décrit précédemment (chapitre II). Le principe de l'extraction liquide est le suivant : la salive est d'abord alcalinisée et ensuite les substances sont extraites en phase organique par du cyclohexane. L'extraction repose sur le coefficient de partage des analytes entre la phase aqueuse et la phase organique. L'efficacité des deux méthodes a été évaluée en comparant les rendements d'extraction, les LODs et aussi les interférences au niveau des électrophérogrammes (Tableau 18).

Tableau 18. Rendements d'extraction et LODs de la MTD et de l'EDDP après différents modes d'extraction

Substance	Rendement d'extraction (%) *		LOD (ng/mL)	
	Clean Screen	Liquide-liquide	Clean Screen	Liquide-liquide
(*S*)-MTD	84,1	92,9	41,1	2,4
(*R*)-MTD	73,3	92,1	41,9	2,4
(*R*)-EDDP	70,0	81,0	26,3	2,3
(*S*)-EDDP	72,4	84,7	29,5	2,3

* déterminé à 250 ng/mL

Les électrophérogrammes obtenus dans les conditions optimisées précédemment présentaient, pour les deux types d'extraction, des pics assez élargis surtout dans le

cas de l'EDDP. Ainsi, la présence de la matrice dans le milieu a interféré avec les CDs et a provoqué une diminution de la résolution des pics. Cependant, le problème a été résolu assez rapidement en réalisant la séparation énantiosélective dans un capillaire plus court de L_{tot} = 40 cm. Le raccourcissement du capillaire a permis d'estomper dans notre cas le phénomène d'élargissement des pics. Les résolutions des pics étaient toujours de ligne de base (Rs > 1,5) et le temps d'analyse était en plus raccourci de 5 minutes.

L'extraction liquide-liquide présentait de nombreux avantages comparés à ceux de l'extraction sur phase solide, tels que les rendements d'extraction, mais surtout les LODs. En effet, en injectant les échantillons en mode électrocinétique, un mode qui permet d'injecter sélectivement les produits par l'application d'une tension, les LODs étaient améliorées d'un facteur 20 pour la MTD et d'un facteur 10 pour l'EDDP. Par ailleurs, les électrophérogrammes obtenus après une simple extraction liquide-liquide ne présentaient pas de pic d'interférence majeur.

Les personnes qui suivent un traitement de substitution à la méthadone consomment souvent encore d'autres substances telles que les benzodiazépines (diazépam, oxazépam, etc) ou encore de la cocaïne, de l'héroïne ou du cannabis. Il était ainsi important de vérifier qu'aucun des pics de ces xénobiotiques n'interagisse avec les pics de nos substances et de celui de la (*R*)-PEA, utilisée comme IS. Pour cela, la salive a été dopée avec de nombreux xénobiotiques, et les composés ont été extraits selon les deux procédés mentionnés ci-dessus. L'analyse des électrophérogrammes et des spectres UV a montré que l'extraction avec les colonnes Clean Screen permettait de récupérer une partie importante des xénobiotiques. Par ailleurs, la cocaïne interférait avec le pic de la (*R*)-MTD. L'extraction liquide-liquide était plus sélective pour la MTD et l'EDDP. En plus, aucune interférence majeure des xénobiotiques testés n'a été observée ni avec les énantiomères de la MTD et de l'EDDP ni avec l'IS. Finalement, le procédé d'extraction liquide-liquide a été retenu pour la suite des expériences.

3.3.2. Etablissement des droites de calibration et validation de la méthode

Les paramètres des droites de calibration ainsi que les résultats de la validation sont résumés dans les tableaux 19 à 21. La concentration dans la salive de l'IS, ici la (*R*)-REA, était de 500 ng/mL.

- Les droites de calibration sont linéaires sur toute la gamme allant de 8,1 à 625 ng/mL pour les énantiomères de la MTD et de 7,6 à 500 ng/mL pour ceux de l'EDDP. Les coefficients de détermination des droites sont tous > 0,99.

Tableau 19. Paramètres des droites de calibration, limites de détection et de quantification des énantiomères de la MTD et de l'EDDP

Substance	Linéarité (ng/mL)	Regression linéaire a*	b**	Coefficient de détermination	LOD (ng/mL)	LLOQ (ng/mL)
(*S*)-MTD	8,1 - 625	0,0093 ±0,0007	−0,2430 ±0,2476	0,991	2,4	8,1
(*R*)-MTD	8,1 - 625	0,0096 ±0,0007	−0,2310 ±0,2506	0,992	2,4	8,1
(*R*)-EDDP	7,6 - 500	0,0057 ±0,0003	−0,0475 ±0,0624	0,995	2,3	7,6
(*S*)-EDDP	7,6 - 500	0,0060 ±0,0004	−0,0123 ±0,0760	0,994	2,3	7,6

* pente de la droite
** ordonnée à l'origine

- Les LODs se situent entre 2,3 et 2,4 ng/mL pour les énantiomères d'EDDP et de ceux de la MTD. Les valeurs des LLOQs sont 7,6 respectivement 8,1 ng/mL.

- Les rendements d'extraction déterminés à trois concentrations différentes (40, 125 et 250 ng/mL) sont tous supérieurs à 77,4%. Les rendements les plus faibles sont attribués aux énantiomères de l'EDDP. Cependant, les rendements restent acceptables.

- Pour la répétabilité, on a estimé que les mesures seraient répétables si le coefficient de variation était inférieur à 15%, ce qui est le cas pour tous les énantiomères étudiés en intra- et inter-jour. De plus, au niveau de la justesse des mesures, les écarts de la valeur d'une concentration calculée par rapport à sa valeur cible n'excèdent pas 9,5% [(S)-EDDP] en intra-jour et 8,9% [(*S*)-MTD] en inter-jour.

Tableau 20. Rendements d'extraction de la MTD et de l'EDDP

Concentration (ng/mL)		MTD		EDDP	
		S	*R*	*R*	*S*
250	m* (%)	92,9	92,1	81,0	84,7
	s**	9,9	10,1	8,5	6,8
125	m (%)	81,1	80,8	89,9	90,8
	s*	7,6	9,9	9,4	5,8
40	m (%)	89,9	90,7	77,4	81,7
	s*	10,5	9,8	1,9	0,8

*m: moyenne; **s: écart-type

Tableau 21. Répétabilité et justesse de la méthode

Substance	Concentration (ng/mL)	Intra-Jour (n=10)		Inter-Jour (n=5)	
		Répétabilité (CV*, %)	Justesse (%)	Répétabilité (CV*, %)	Justesse (%)
(*S*)-MTD	50	5,4	8,6	7,3	8,9
	250	9,5	0,2	8,9	3,2
(*R*)-MTD	50	4,9	6,8	6,8	8,8
	250	9,3	1,4	9,0	4,1
(*R*)-EDDP	50	6,1	1,9	8,4	8,4
	250	10,0	5,1	8,1	5,0
(*S*)-EDDP	50	6,8	7,5	7,1	8,6
	250	7,6	9,5	8,8	7,5

* CV: coefficient de variation

3.3.3. Etude de cas réels

La méthode validée a finalement été appliquée à l'analyse de 60 échantillons de salive provenant d'individus participant au programme de substitution à la MTD au Luxembourg. Chaque patient a préalablement signé un consentement éclairé.

Tableau 22. Concentration des énantiomères de la MTD et de son métabolite EDDP dans la salive de patients participant à un programme de substitution par la méthadone

No	pH salive	dose (mg)	(*S*)-MTD (ng/mL)	(*R*)-MTD (ng/mL)	*R/S*	(*R*)-EDDP (ng/mL)	(*S*)-EDDP (ng/mL)	*R/S*
1	2,5	30	69,2	120,7	1,74	nd**	nd	
2	3,5	ni*	77,1	120,7	1,57	nd	nd	
3	2,5	25	27,8	33,2	1,19	nd	nd	
4	7,0	ni	39,6	58,4	1,48	nd	nd	
5	9,0	ni	33,7	40,9	1,21	nd	nd	
6	6,5	30	55,4	87,6	1,58	nd	nd	
7	6,5	ni	116,6	184,9	1,59	13,3	19,1	0,70
8	8,0	55	159,9	365,8	2,29	nd	nd	
9	6,5	20	37,6	54,6	1,45	nd	nd	
10	4,0	30	195,0	194,6	1,00	nd	nd	
11	3,5	30	39,6	76,0	1,92	nd	nd	
12	4,5	3	47,6	53,7	1,13	nd	nd	
13	4,5	15	65,2	83,7	1,28	nd	nd	
14	3,0	80	146,0	373,6	2,56	nd	nd	
15	4,0	55	274,3	430,0	1,57	nd	nd	
16	3,5	25	31,6	44,8	1,42	nd	nd	
17	6,5	20	29,7	48,7	1,64	nd	nd	
18	8,0	ni	65,2	120,7	1,85	nd	nd	
19	4,0	80	49,5	126,5	2,56	nd	nd	
20	8,0	15	232,9	247,1	1,06	nd	nd	
21	3,5	30	71,2	112,9	1,59	nd	nd	
22	3,0	30	97,1	180,4	1,86	nd	nd	
23	7,0	80	163,4	167,0	1,02	nd	nd	
24	3,5	65	493,3	496,1	1,01	13,6	17,5	0,78
25	3,0	60	47,5	93,5	1,96	nd	nd	
26	8,0	ni	51,4	60,4	1,18	nd	nd	
27	3,0	80	79,0	146,0	1,85	nd	nd	
28	3,5	30	157,9	326,9	2,07	nd	nd	
29	6,0	25	38,0	41,2	1,08	nd	nd	
30	6,5	60	116,5	175,2	1,50	nd	nd	
31	3,5	ni	71,2	97,4	1,37	nd	nd	
32	4,0	ni	93,0	173,5	1,87	nd	nd	
33	4,5	ni	163,0	263,1	1,61	nd	nd	
34	8,0	15	50,0	57,7	1,15	nd	nd	
35	3,0	30	80,2	200,1	2,49	nd	nd	
36	9,0	20	33,4	34,5	1,03	nd	nd	
37	9,0	15	61,9	67,2	1,08	nd	nd	
38	3,0	30	139,4	254,9	1,83	nd	nd	
39	8,0	80	111,4	213,0	1,91	15,9	22,4	0,71
40	3,0	ni	619,5	622,5	1,00	13,9	18,6	0,75
41	8,0	15	236,4	250,8	1,06	nd	nd	
42	7,0	60	45,2	66,2	1,46	nd	nd	
43	7,0	30	18,6	28,4	1,53	nd	nd	
44	8,0	ni	321,6	338,6	1,05	14,4	19,6	0,74
45	5,0	ni	31,4	75,9	2,42	nd	nd	
46	2,5	ni	169,8	317,2	1,87	13,6	18,5	0,74
47	6,0	30	356,9	505,7	1,42	17,7	22,4	0,79
48	9,5	15	41,0	46,9	1,14	nd	nd	
49	3,0	75	89,2	279,1	3,13	nd	nd	
50	2,5	20	60,5	79,8	1,32	nd	nd	
51	8,0	ni	37,4	37,3	1,00	nd	nd	
52	6,0	30	89,1	129,4	1,45	9,0	10,9	0,83
53	4,5	ni	61,9	72,6	1,17	nd	nd	
54	6,0	ni	125,5	249,3	1,99	nd	nd	
55	8,0	ni	60,5	63,2	1,04	nd	nd	
56	7,0	15	103,8	134,9	1,30	10,8	11,6	0,93
57	3,0	20	45,2	63,3	1,40	nd	nd	
58	9,0	ni	47,6	55,2	1,16	nd	nd	
59	3,0	140	227,0	464,4	2,05	16,1	17,2	0,94
60	3,5	65	132,3	247,1	1,87	nd	nd	

*ni=non indiqué
**nd=non détecté

Les 60 échantillons de salive récoltés ont tous été testés positifs aux deux énantiomères de la MTD (Tableau 22). La figure 32 donne l'exemple d'un électrophérogramme obtenu après extraction de la salive de l'échantillon 7.

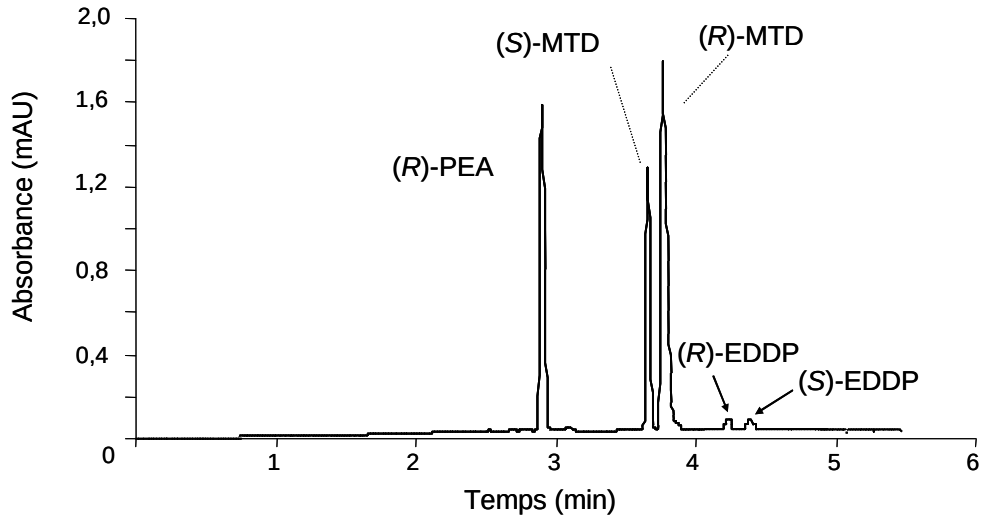


Figure 32 : Electrophérogramme de l'échantillon de salive n°7 testé positif aux énantiomères de la MTD et de l'EDDP

Les concentrations de la (*S*)-MTD s'étendent de 18,6 à 619,5 ng/mL tandis que celles de la (*R*)-MTD se situent entre 28,4 et 622,5 ng/mL. Les rapports énantiomériques *R*/*S* de la MTD s'étalent de 1,00 à 3,13, avec une moyenne de 1,55 ± 0,47 (moyenne ± écart-type). Ainsi, la prépondérance de la (*R*)-MTD dans la salive serait le résultat principal de la fraction de MTD libre dans le sang (Ortelli *et al.*, 2000; Rosas Rodriguez *et al.*, 2003). En effet, la (*S*)- MTD se complexe préférentiellement aux protéines plasmatiques, ce qui entraîne un rapport *R*/*S* de la MTD libre dans le sang > 1 (Boulton *et al.*, 2000; Ortelli *et al.*, 2000; Lehotay *et al.*, 2005; Rosas Rodriguez *et al.*, 2005). Ortelli et coll. avait déjà mis en évidence la corrélation entre les rapports *R*/*S* dans le sérum avec ceux dans la salive.

Une corrélation significative (test de Spearman) a pu être observée pour la première fois entre les doses administrées et la concentration salivaire totale de la MTD déterminée dans la salive (r= 0,55, P= 0,0001). De même, cette corrélation significative (test de Spearman) existait aussi entre les doses et les concentrations des énantiomères : (*R*)-MTD (r=0,59, P< 0,0001) et (*S*)-MTD (r=0,44, P=0,004).

Le métabolite principal, l'EDDP, a été détecté dans 10 échantillons et les concentrations étaient largement inférieures à celles de la MTD, confirmant ainsi des études précédentes (Chikhi-Chorfi *et al.*, 1998; Bermejo *et al.*, 2000; Dos Santos Lucas *et al.*, 2000). Les concentrations des énantiomères s'étendent de 10,8 à 22,4 ng/mL, avec des concentrations plus élevées pour la (*S*)-EDDP. Contrairement à l'étude de Rosas et coll., qui n'ont testé que 5 échantillons (Rosas Rodriguez *et al.*, 2003), notre étude a permis de mettre en évidence une disposition énantiosélective bien définie pour l'EDDP. L'enrichissement en (*S*)-EDDP dans la salive pourrait être lié à la prédominance de la (*S*)-EDDP non liée aux protéines dans le sang (Esteban *et al.*, 2004; Whittington *et al.*, 2004; Lehotay *et al.*, 2005; Rosas Rodriguez *et al.*, 2005).

Ainsi, les expériences ont montré que la détermination des rapports *R*/*S* dans la salive par EC présentait de nombreux avantages. En effet, la méthode développée est rapide, sensible, peu coûteuse et facile à mettre en œuvre. En outre, la préparation des échantillons est peu laborieuse et les analyses sont obtenues en un temps très court (6 minutes). Par ailleurs, la disposition des énantiomères de la MTD et de l'EDDP reflète bien les rapports *R*/*S* dans le sang, mais contrairement à cette matrice, la collecte de la salive est tout à fait non-invasive.

Chapitre IV. Prévision par dynamique moléculaire de la sélection chirale des cyclodextrines en électrophorèse capillaire

1. Objectifs de l'étude

Le but de cette étude était de développer et d'évaluer une méthode de modélisation moléculaire permettant de prévoir l'ordre de migration d'énantiomères en EC en présence de CDs comme sélecteurs chiraux. La toxicologie analytique est souvent confrontée aux problèmes de caractérisation de xénobiotiques chiraux, de leur(s) métabolite(s), et surtout de stupéfiants d'un nouveau genre présents dans les matrices biologiques. Or, la caractérisation correcte des pics requiert l'utilisation de solutions d'énantiomères, ce qui est parfois difficile: soit la molécule donnée n'est commercialement accessible que sous forme racémique, soit sa synthèse et sa purification sont longues et difficiles. Finalement, l'EC est rarement couplée à un polarimètre, seul moyen technique qui permettrait au moins de caractériser un énantiomère par son pouvoir rotatoire.

Ainsi, l'idée était de mettre au point une méthode simple et rapide permettant de prévoir correctement l'ordre de migration d'énantiomères en EC grâce à l'informatique. Contrairement à quelques études publiées, qui ont généralement construit des modèles en milieu aqueux et qui n'ont fait subir à leur système qu'un simple calcul de minimisation d'énergie pour évaluer la sélectivité chirale d'une CD, notre but était de calculer les énergies d'interaction des complexes situés dans le vide et soumis à la DM. Tandis que la minimisation moléculaire permet aux structures d'atteindre seulement un minimum local, la méthodologie de la DM ne se limite pas aux mouvements autour des minima, mais elle permet en plus aux molécules de franchir des maxima d'énergie, d'explorer d'autres conformations stables et de s'approcher le plus possible des structures réelles. Les expériences ont été réalisées dans un premier temps dans le vide, car la prise en compte des molécules d'eau pour imiter au mieux les complexes dans le capillaire rempli d'électrolyte rend les calculs assez longs et laborieux. La DIMEB et la HS-γ-CD ont été pris comme molécules hôtes (récepteur), alors que les énantiomères de la MTD, de l'EDDP, de l'AM et de la MDA ont joué le rôle de ligand. Auparavant, la stœchiométrie des complexes a été déterminée expérimentalement par spectroscopie d'absorption dans l'UV en construisant le diagramme de Job.

Le site de fixation le plus favorable d'un ligand sur son récepteur a été déterminé grâce à la méthodologie du docking. Les énergies potentielles d'interaction calculées

après la DM ont finalement été comparées aux temps de migration observés expérimentalement et/ou décrits dans la littérature.

2. Matériel et méthodes

2.1 Spectroscopie d'absorption dans l'UV

2.1.1. Préparation des solutions

Les solutions sont réalisées avec H_2O pureté CHLP. Différents mélanges de (*R*)-MTD et de DIMEB, respectivement de (*R*)-MTD et HS-γ-CD, sont réalisés comme décrit dans le tableau 23. La concentration initiale des espèces est maintenue constante, alors que le rapport molaire X varie de 0 à 1 et ceci en mélangeant de façon appropriée les solutions mères de DIMEB (1 mM) et de (*R*)-MTD (1 mM) ou de (*R*)-MTD (1mM) et HS-γ-CD (1 mM). Les mêmes mélanges sont préparés pour l'étude de la complexation entre la (*S*)-AM (1mM) avec la DIMEB et la HS-γ-CD.

Tableau 23. Rapports molaires et concentrations totales des espèces dans le cas de l'étude du complexe (*R*)-MTD-DIMEB

$X = \frac{[MTD]_t}{[MTD]_t+[CD]_t}$	$[R\text{-MTD}]_t$ (mM)	Volume (*R*)-MTD (µL)	$[DIMEB]_t$ (mM)	Volume DIMEB (µL)
0	0	0	1	1000
0,1	0,1	100	0,9	900
0,2	0,2	200	0,8	800
0,3	0,3	300	0,7	700
0,4	0,4	400	0,6	600
0,5	0,5	500	0,5	500
0,6	0,6	600	0,4	600
0,7	0,7	700	0,3	700
0,8	0,8	800	0,2	200
0,9	0,9	900	0,1	100
1	1	1000	0	0

Les tableaux sont analogues pour les mélanges (*R*)-MTD/HS-γ-CD, (*S*)-AM/DIMEB et (*S*)-AM/ HS-γ-CD.

2.1.2. Conditions opératoires

Le spectrophotomètre utilisé pour les expériences est un Ultrospec 2100Pro d'Amersham Pharmaciabiotech. Les mesures sont réalisées dans des cuves en quartz de largeur de 1 cm. Les spectres de la DIMEB, de la HS-γ-CD, de la (*S*)-AM et de la (*R*)-MTD sont enregistrés en balayant de 190 à 400 nm afin de choisir la zone de travail et les mesures finales ont toutes été enregistrées à 220 nm. Les blancs sont réalisés en faisant une mesure eau-eau. Lorsque de la CD est présente dans la cuve de mesure, la même quantité de CD est ajoutée dans la cuve de référence afin de soustraire l'absorbance de la CD.

2.1.3. Détermination de la stœchiométrie par la méthode de Job

Le nombre de ligands au sein d'un complexe peut être déterminé par la méthode des variations continues dite méthode de Job (Job, 1928), dont l'équation générale peut s'écrire :

$$X = \frac{1}{1+n} \qquad (38)$$

La réaction de formation d'un complexe d'inclusion entre une CD et un ligand quelconque S s'écrit:

$$CD + nS \rightleftharpoons [CDS_n] \qquad (39)$$

La stœchiométrie du complexe, à savoir la valeur du facteur n (nombre de ligands), est déduite en traçant la courbe $\Delta Abs \cdot [S]$ en fonction du rapport molaire X. ΔAbs est la différence d'absorbance du ligand mesuré en présence et en absence de CD.

2.2. Modélisation moléculaire

2.2.1. Détermination des charges atomiques avec le programme GAUSSIAN

2.2.1.a. Fonctionnement du programme

Les charges utilisées par AMBER sont calculées à partir du potentiel électrostatique restreint (RESP, Restrained ElectroStatic Potential) (Bayly *et al.*, 1993; Cornell *et al.*, 1993). Le potentiel électrostatique RESP de AMBER fixe, sur les surfaces moléculaires, le potentiel électrostatique (ESP) obtenu à partir des méthodes quantiques en utilisant un modèle de charges atomiques centrées. Cette méthode permet de considérer plusieurs conformations pour une molécule donnée. Par conséquence, ces charges RESP dépendent de l'ensemble des conformations d'une molécule et permettent une meilleure estimation.

Le potentiel ESP est déterminé en utilisant un programme de mécanique quantique, Gaussian 98 (Frisch *et al.*, 1998). Le calcul des charges atomiques des structures étudiées dans ce travail est basé sur la méthode décrite par Peter A. Kollman et coll. et d'autres encore (Cornell *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2000). Dans un premier temps, la molécule est optimisée avec la base STO-3G à un niveau de théorie Hartree-Fock (HF) du programme Gaussian 98. Une fois l'optimisation terminée, le champ éléctrostatique est calculé avec la base 6-31G* en ajoutant les mots cléfs de la méthode Merz-Kollman (Besler *et al.*, 1990) « Pop=mk iop(6/33)=2 ».

Une fois le potentiel ESP calculé, on peut procéder à la détermination des charges atomiques RESP. Une fois le fichier initial de Gaussian transformé en fichier compréhensible pour RESP, le programme RESP prépare le fichier des charges atomiques pour AMBER en évaluant toutes les charges atomiques et en affinant toutes les charges des atomes externes.

Vu qu'AMBER calcule l'énergie électrostatique d'une structure moléculaire grâce aux interactions de charges atomiques, il en résulte que le calcul des charges pourrait influencer de façon importante les résultats de simulations.

2.2.1.b. Construction des molécules 3D et calcul des charges atomiques

2.2.1.b.1. Les cyclodextrines

La structure cristallographique de la DIMEB obtenue par diffraction aux rayons X est récupérée de la Cambridge Structural Database (code BEFJOL, Figure 33). La DIMEB comporte 7 unités glucosidiques fonctionnalisées au niveau des hydroxyles des carbones C2 et C6, les hydroxyles en position C3 restant libres. Le degré de substitution moyen (DS) est de 14, ce qui signifie que tous les oxygènes en C6 et C2 portent des groupements méthyles, alors que les hydroxyles en position C3 ne sont pas touchés en raison de leur faible réactivité (Salvador *et al.*, 1999).

En ce qui concerne la HS-γ-CD, aucune donnée cristallographique n'a pu être trouvée ni dans la littérature ni dans aucune banque de données. Par conséquent, la HS-γ-CD est construite de façon manuelle avec le programme Gaussian 98 en se basant sur la structure cristallographique de la γ-cyclodextrine (γ-CD) récupérée elle aussi de la Cambridge Structural Database (code CYDXPL). Les substitutions de la γ-CD peuvent se réaliser au niveau des carbones C2, C3 et C6. Or, d'après les expériences effectuées sur la HS-γ-CD (Chen *et al.*, 2001), la formation des sulfates-esters se fait exclusivement, au niveau carbones C6 et C2, les groupements hydroxyles des C3 n'étant pas touchés par cette fonctionnalisation. En effet, la substitution de l'alcool primaire est plus facile et, selon Chen et coll., elle entraîne une réactivité presque totale des C6. Cependant, à cause de la faible acidité des OH en position C3, la fixation des sulfates sur les hydroxyles secondaires se fait plutôt au niveau des C2. Le degré de substitution moyen des HS-γ-CD est de 13 à repartir entre 16 positions possibles (positions C6 et C2). Les possibilités d'agencement sont par conséquent nombreuses (560 possibilités). Ainsi, en absence d'informations sur sa structure cristallisée, nous considérons pour notre étude une structure fonctionnalisée au niveau de toutes les positions C6 et C2.

Le calcul des charges pour chacune de ces CDs est effectué en ne considérant qu'un fragment de trois unités glycosidiques (unités 1,2 et 7) de chaque CD (Figure 33). Un groupement méthyle est ajouté à chaque extrémité. Cette méthode est conseillée, car elle permet de prendre en compte correctement les charges atomiques partielles des glucoses interglucosidiques. Ainsi seule l'unité du glucose central du fragment est prise en compte pour le calcul des charges.

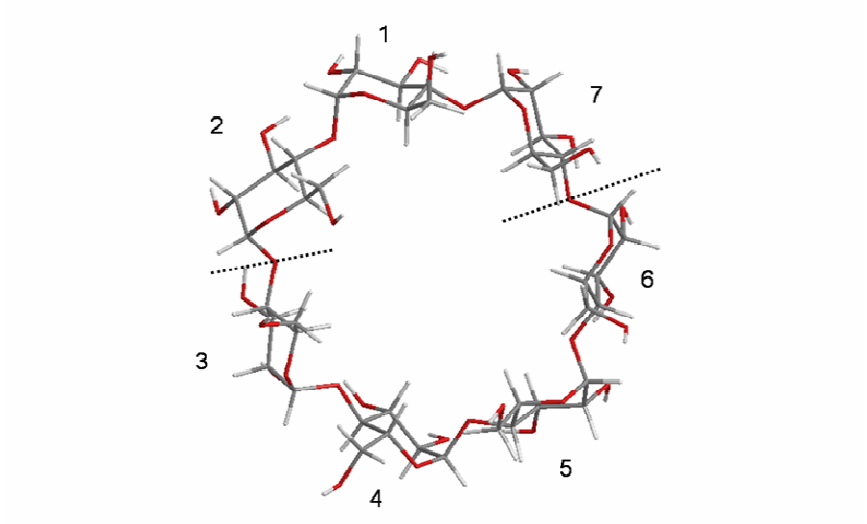


Figure 33 : Exemple d'une représentation du fragment composé de 3 unités de glucose du DIMEB et utilisé pour le calcul des charges

Le calcul des charges se fait sur un ordinateur PC avec un processeur Intel Pentium II 400 MHz avec 128 Mo de mémoire sous Windows 2000. Les potentiels électrostatiques moléculaires ESP sont calculés avec la base 6-31G* à un niveau HF en y ajoutant les mots clefs suivants : Pop=mk iop(6/33=2). Finalement, les charges atomiques des CDs étudiées sont obtenues à partir du potentiel électrostatique ESP de chaque résidu en utilisant le programme ANTECHAMBER de AMBER.

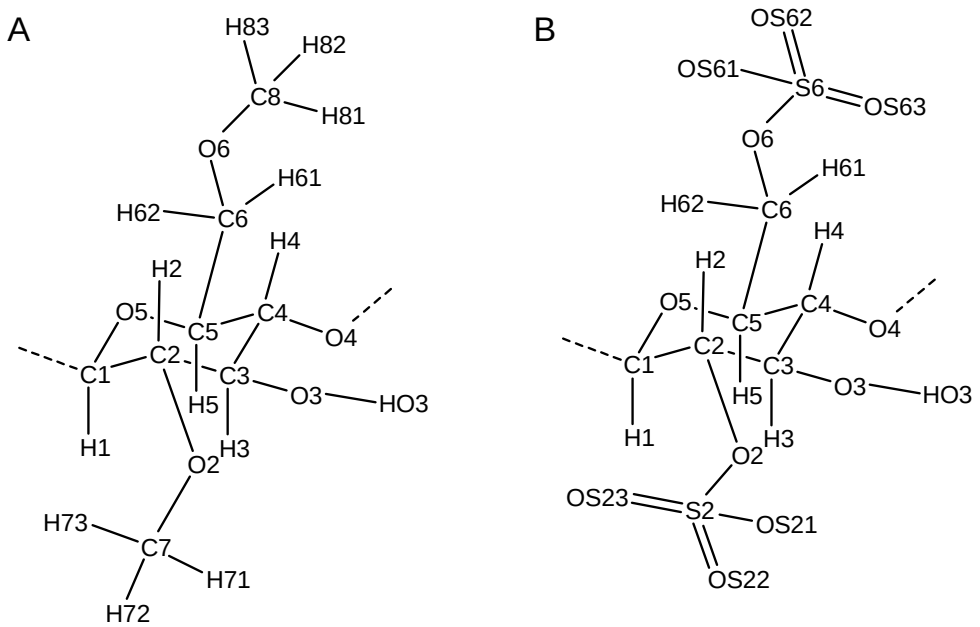


Figure 34 : Noms des atomes des résidus utilisés sous AMBER pour le DIMEB (A) et la HS-γ-CD (B)

Les valeurs des charges atomiques pour un résidu de DIMEB et de HS-γ-CD sont représentées dans les tableaux 24 et 25. Les noms des atomes utilisés pour les unités glyclosidiques de la DIMEB et de la HS-γ-CD sont représentés sur la figure 34:

Le calcul des charges donne les valeurs suivantes :

Tableau 24. Charges atomiques pour un résidu de la DIMEB

Atomes	Charges atomiques
C1	0,0311
C2	0,0523
C3	0,0311
C4	0,0193
C5	0,0462
C6	0,0376
C7	0,0334
C8	0,0334
O2	-0,3085
O3	-0,6205
O4	-0,3072
O5	-0,3880
O6	-0,3741

H1	0,1961
H2	0,1641
H3	0,1595
H4	0,1403
H5	0,1554
HO3	0,3925
H61	0,0779
H62	0,0779
H71	0,0601
H72	0,0601
H73	0,0601
H81	0,0603
H82	0,0603
H83	0,0603

Tableau 25. Charges atomiques pour un résidu de la HS-γ-CD

Atomes	Charges atomiques
C1	-0,0213
C2	-0,0340
C3	0,3602
C4	0,0330
C5	-0,0610
C6	0,2706
O2	-0,3689
O3	-0,7136
O4	-0,2941
O5	-0,2120
O6	-0,4158
H1	0,2340
H2	0,1280

H3	0,0506
H4	0,1467
H5	0,0506
HO3	0,4560
H61	0,0666
H62	0,0666
S2	0,9424
OS21	-0,6169
OS23	-0,6169
OS23	-0,6169
S6	0,9601
OS61	-0,6011
OS62	-0,6011
OS63	-0,6011

2.2.1.b.2. Les ligands

Les ligands chiraux utilisés dans le cadre de cette étude sont les énantiomères de la MTD, de l'EDDP, de l'AM et de la MDA. Nous avons essayé d'analyser la nature des interactions qui pouvaient être à l'origine des séparations chirales par EC en présence de ces CD particulières. De ce fait il était important que la charge totale de nos ligands corresponde à la forme majoritaire des espèces présentes dans les conditions expérimentales utilisées. Or, comme tous les ligands énumérés ci-dessus ont des pKa (à 25°C) compris entre 8,2 et 10 et que les conditions de séparation par EC se font dans un pH allant de 2,5 à 4,5, nous allons considérer par la suite des ligands sous forme protonée au niveau de leur atome d'azote avec une charge totale de +1.

Bien que les ligands existent chacun sous deux formes *R* et *S*, pour la suite des simulations, les deux énantiomères devront tout de même avoir les mêmes charges partielles puisque le champ de force dans AMBER ne fait aucune différence entre deux énantiomères. Cependant, afin d'améliorer la précision du calcul des charges atomiques pour chacun des ligands, il est important de faire le calcul à partir de plusieurs conformations différentes pour un même ligand. Seul le calcul des charges atomiques d'AM sera détaillé dans ce paragraphe, sachant que pour les autres ligands le calcul est effectué de manière analogue.

La molécule de l'AM est initialement construite à l'aide du programme Insight II sur un ordinateur Silicon Graphics O2 avec un processeur MIPS R5000 avec 160 Mo de mémoire sous Irix 6.3. Puis une recherche systématique d'angles de torsion est effectuée par ce même logiciel. Les 10 conformations avec la plus petite énergie sont gardées pour la suite des calculs. Ces 10 premières conformations sont soumises aux calculs des charges atomiques avec le programme Gaussian 98. Chaque structure est d'abord optimisée avec la base STO-3G en ajoutant les mots clés Opt Pop=None Geom(NoDistance,NoAngle). Ensuite, le potentiel électrostatique moléculaire est calculé au niveau HF/6-31G* avec les mots clés Pop=mk iop(6/33)=2 et les charges atomiques ponctuelles de l'AM finalement obtenues en utilisant le programme RESP d'AMBER. Les charges retenues pour l'AM sont reportées dans le tableau 26 (noms des atomes de l'AM reportés dans la Figure 35) :

Tableau 26. Charges atomiques de l'AM utilisées pour AMBER

Atomes	Charges atomiques
C1	-0,1726
C2	-0,1626
C3	-0,0904
C4	-0,1626
C5	-0,1726
C6	0,0685
C7	-0,1977
C8	0,2631
C9	-0,2258
N1	-0,3926
H1	0,1397
H2	0,1740
H3	0,1593
H4	0,1740
H5	0,1397
H6	0,1072
H7	0,1072
H8	0,0594
H9	0,0887
H10	0,0887
H11	0,0887
H12	0,3062
H13	0,3062
H14	0,3062

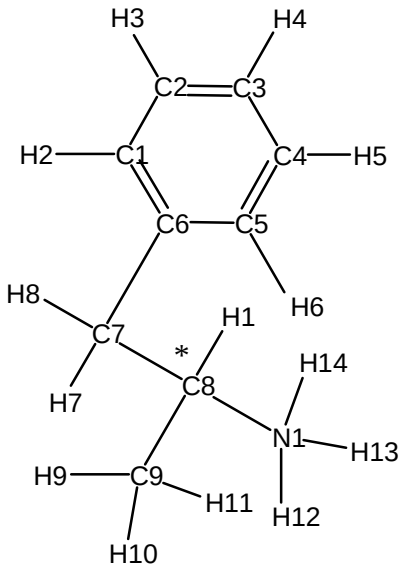


Figure 35 : Représentation de la structure de l'AM et des noms utilisés

La même méthodologie est appliquée aux autres ligands et les charges atomiques correspondantes sont répertoriées en annexe.

2.2.2. Choix du site de fixation des ligands sur les CDs avec le logiciel DOCK 5.2

Les points de départ de ces calculs sont les fichiers de format *mol2* des récepteurs et des ligands. Ces fichiers *mol2* contiennent à la fois les coordonnées cartésiennes des atomes et leur charge atomique correspondante. L'orientation du ligand dans un site du récepteur est réalisée en une série d'étapes grâce à différents programmes de DOCK 5.2. Tout d'abord, le programme *sphgen* identifie les emplacements d'intérêt du récepteur et produit des centres de sphères qui remplissent ces points d'intérêt (réalisation d'une image négative du récepteur). Ensuite, le programme *grid* identifie ces sphères et produit des grilles de marquage qui représentent les points possibles d'interaction du récepteur avec le ligand. Finalement, le programme *dock* est lancé et il oriente le ligand par rapport aux centres de sphères et à la grille de marquage au niveau du récepteur. Une fois le positionnement vérifié, le programme *dock* calcule les énergies d'interaction correspondant aux modes de fixation possibles. Les 10 emplacements de chaque forme chirale (*R* et *S*) du ligand dans la CD présentant l'énergie la plus basse sont retenus.

Finalement, pour chaque énantiomère étudié de l'AM, de la MDA, de l'EDDP, et de la MTD, l'orientation présentant l'énergie d'interaction la plus basse est choisie pour la suite de la modélisation moléculaire du complexe ligand-récepteur.

2.2.3. Paramètres de minimisation et de dynamique moléculaire des systèmes étudiés

La modélisation moléculaire des ligands seuls, des CD et des complexes CD – ligand chiral est réalisée avec le logiciel AMBER v8 sur un ordinateur PC avec un processeur Intel Pentium IV 1.8 GHz avec 1.5 Go de mémoire sous RedHat Linux 9.0.

Le processus de simulation moléculaire pour chacun des systèmes étudiés (énantiomères de MTD, AM, EDDP et MDA, CD et complexe récepteur – ligand), se fait à l'aide du programme *SANDER* d'AMBER. La simulation en soi est divisée en plusieurs étapes.

La première étape consiste à minimiser le système en utilisant deux algorithmes différents, le « steepest descent » et le gradient conjugué. L'algorithme « steepest descent » permet de supprimer tous les mauvais contacts et le gradient conjugué fait converger le système plus rapidement vers un minimum local. Dans chaque cas, les algorithmes sont appliqués au système pendant un nombre de pas équivalent à savoir 250 pas pour chacun jusqu'à un critère de convergence de 10^{-4} kcal/mol.Å. La constante diélectrique est égale à 1, la simulation étant réalisée dans le vide. La valeur du « *cutoff* » (distance limite où les interactions sont prises en compte) de toutes les simulations est de 20 Å pour les interactions non covalentes (forces van der Waals et interactions électrostatiques)

Ensuite la DM débute par le chauffage du système par petits pas successifs, ce qui permet des sauts d'énergie de faible amplitude. La température initiale est de 0 K et le système est chauffé lentement pendant 20 ps (time step 1 fs) jusqu'à atteindre une température de 300 K. On termine la simulation de la DM en équilibrant le système dans le vide à température constante suivant la méthode d'équilibration de Langevin. Pour cela, les températures initiale et finale du système sont maintenues à 300 K pendant un temps de simulation de 10000 ps avec un pas de 1 fs. L'enregistrement des données se fait toutes les ps et donne au total 10000 structures. Aucune contrainte n'est introduite pendant les simulations avec le champ de force AMBER. Il est important de noter que la contribution énergétique des liaisons H n'est pas prise en compte par AMBER dans le calcul de l'énergie totale. Les liaisons H sont déterminées ultérieurement à l'aide du programme *ptraj* d'AMBER en utilisant les fichiers de sortie de la DM.

Pour les modélisations dans le solvant implicite, le solvant est représenté par un champ diélectrique continu, les paramètres de minimisation d'énergie et de DM restant tout à fait les mêmes. Le solvant agit comme une perturbation continue sur le comportement de la phase gazeuse du système. Les énergies d'interaction sont alors déterminées en utilisant l'approche MM-PBSA (Molecular Mechanics_Poisson Boltzmann Surface Area) dans AMBER.

3. Résultats et discussion

3.1. Etude de la complexation de certains xénobiotiques chiraux avec la DIMEB et la HS-γ-CD par spectroscopie d'absorption dans l'UV

Parmi les 4 molécules chirales (AM, MTD, MDA, EDDP), dont nous avons voulu étudier la complexation avec deux CDs, seule la (*R*)-MTD et la (*S*)-AM étaient disponibles sous forme de solutions optiquement pures. Ainsi la détermination de la stœchiométrie par la méthode de Job n'a uniquement pu se faire pour ces deux énantiomères. Le diagramme de Job de la (*R*)-MTD étudiée en présence de la DIMEB ou bien de la HS-γ-CD est représenté à titre d'exemple dans la figure 36.

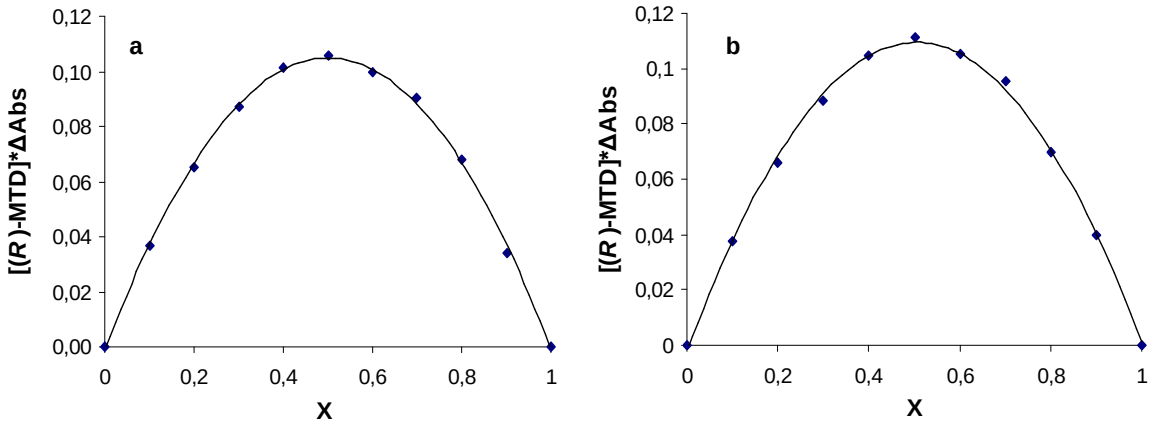


Figure 36 : Diagramme de Job obtenu dans le cas de la (*R*)-MTD avec (a) la DIMEB et (b) la HS-γ-CD

Le tracé de ΔAbs·[S] en fonction de la fraction molaire X montre un maximum pour X = 0,5 à la fois pour l'étude de la (*R*)-MTD avec la DIMEB (a) et avec la HS-γ-CD (b). Il se forme un complexe (*R*)-MTD:DIMEB et (*R*)-MTD:HS-γ-CD selon un rapport 1:1. Les diagrammes de Job obtenus avec les mélanges (*S*)-AM et DIMEB, (*S*)-AM et HS-γ-CD ne sont pas représentés, car les résultats étaient identiques. Les complexes (*S*)-AM:DIMEB et (S)-AM:HS-γ-CD étaient aussi de stœchiométrie 1:1. Par analogie, il a été admis par la suite que les antipodes de ces deux substances, la

(*R*)-AM et la (*S*)-MTD, forment également des complexes de stœchiométrie 1:1 avec la DIMEB et la HS-γ-CD.

Dans le cas de l'EDDP et de la MDA, aucun énantiomère n'était disponible sous forme optiquement pure. Par conséquent, la détermination de la stœchiométrie par la méthode de Job n'a pas pu se faire. Néanmoins, nous avons supposé par la suite que des complexes formés entre les isomères optiques de la MDA et de l'EDDP avec la DIMEB ou la HS-γ-CD étaient de nature 1:1.

3.2. Positionnement des ligands par rapport aux CDs avec le programme DOCK

La méthodologie du docking permet de déterminer la position énergétiquement la plus favorable d'un ligand au niveau d'un récepteur donné, ici la CD. Tous les énantiomères étudiés se sont complexés à l'intérieur de la DIMEB ou de la HS-γ-CD. L'analyse des 10 orientations énergétiquement les plus stables des deux énantiomères de la MTD, EDDP, AM et de la MDA correspondaient toujours à des structures où la molécule se trouvait majoritairement à l'intérieur de la cavité des deux CDs. Toutefois, des complexations avec la partie extérieure de la CD ont pu être observées entre les formes (*R*)- et (*S*)-MDA et la HS-γ-CD. Néanmoins, ces sites de fixation n'étaient pas les plus favorables du point de vue énergétique.

De même, lorsque le ligand était placé dans une position très éloignée par rapport à la CD, les énantiomères ont toujours fini par se complexer à l'intérieur de la CD. De plus, leurs positions finales étaient pratiquement identiques quel que soit leur point de départ. Cette dernière affirmation peut été visualisée sur la figure 37.

Les figures représentent les structures 3D obtenues après le docking de la (*R*)-EDDP, placée initialement à trois endroits différents dans l'espace par rapport à la DIMEB et à la HS-γ-CD. Quelque soit le point de départ du docking, la (*R*)-EDDP finit toujours par s'insérer à l'intérieur de la CD (couleurs rouge, bleu et orange) en orientant le groupement azote du côté des hydroxyles primaires O6.

Finalement, en absence de données cristallographiques ou de données RMN, la méthodologie du docking constitue un moyen efficace pour trouver un site de fixation d'un ligand énergétiquement favorable sur un récepteur.

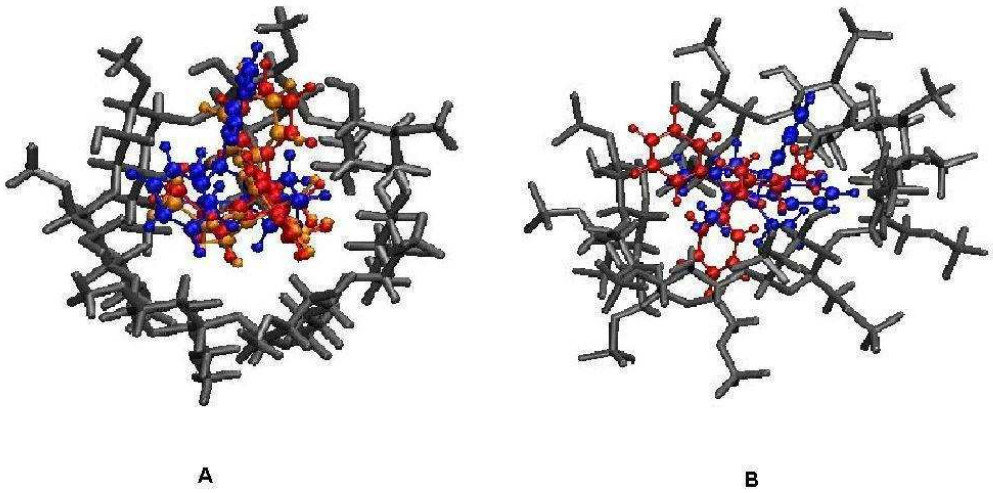


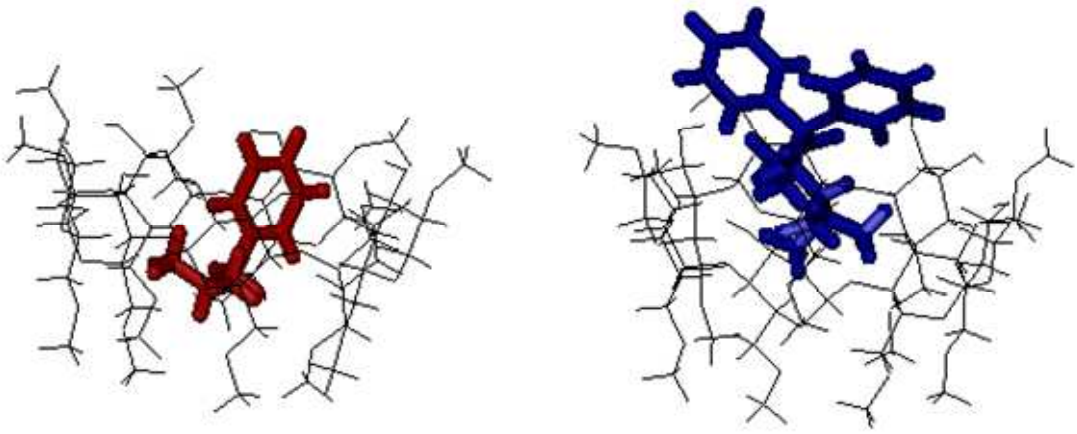
Figure 37 : Illustrations des structures des complexes (*R*)-EDDP-DIMEB (A) et (*R*)-EDDP-HS-γ-CD (B). Les différentes couleurs correspondent à la position finale de la (*R*)-EDDP à l'intérieur de la CD

3.3. Résultats de la dynamique moléculaire

3.3.1. Evaluation des énergies d'interaction dans le vide avec la DIMEB

Les énantiomères de l'AM, de l'EDDP, de la MTD et de la MDA sont restés parfaitement complexés à l'intérieur de la cavité de la DIMEB au cours des simulations. L'analyse des structures 3D a montré que les énantiomères de la MDA, respectivement de l'AM, étaient totalement insérés, avec leur cycle benzénique orienté du côté de la grande ouverture de la CD et leur atome d'azote vers les hydroxyles O6. Les énantiomères de la MTD et de l'EDDP présentaient une disposition semblable, le groupement azote étant aussi dirigé vers l'extrémité étroite du cône. Cependant, il n'y avait pas d'inclusion totale, les deux groupements phényles de la MTD et de l'EDDP étant situés en partie à l'extérieur de la grande ouverture du cône (Figure 38).

Tous les ligands chiraux sont restés parfaitement complexés tout au long de la DM dans la partie la moins polaire de la CD. La figure 39 montre un exemple de l'évolution de la position de la (*S*)-AM par rapport à trois différents plans de la CD.



(*S*)-AM-DIMEB (*R*)-MTD-DIMEB

Figure 38 : Structure des complexes (*S*)-AM-DIMEB et (*R*)-MTD-DIMEB après la dynamique moléculaire

Au cours de la DM, la position de la (*S*)-AM se stabilise à l'intérieur de la cavité de la DIMEB. Des observations identiques ont été faites pour la (*R*)-AM et pour les autres énantiomères. Ces résultats ont permis de vérifier que les systèmes étaient bien équilibrés. Parallèlement, la DIMEB a maintenu sa forme conique tout au long de la simulation.

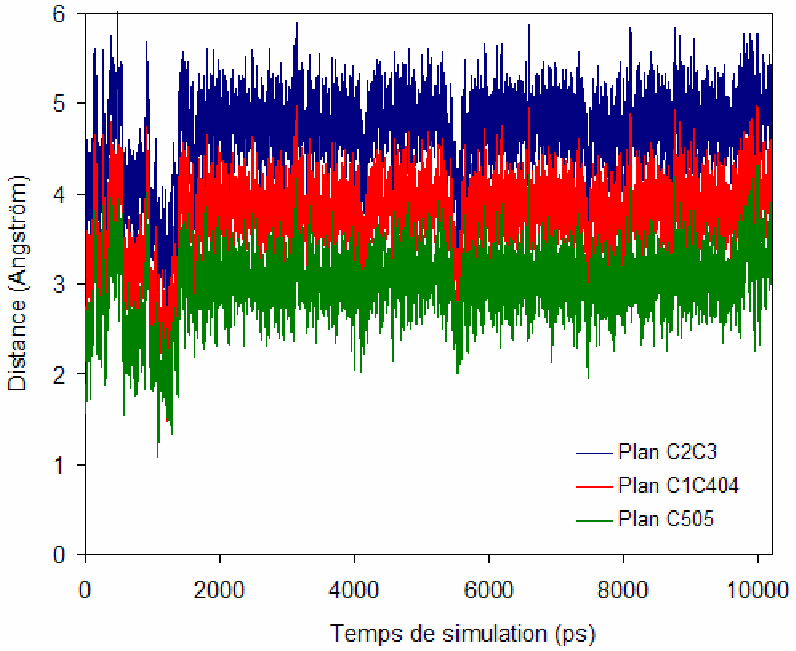


Figure 39 : Evolution de la position de la (*S*)-AM à l'intérieur de la cavité de la DIMEB au cours de la dynamique moléculaire

La détermination des énergies d'interaction des différents complexes a permis d'évaluer leur stabilité. L'énergie potentielle d'interaction $\Delta Ep_{interaction}$ est égale à l'énergie potentielle totale du complexe (Ep_{com}) moins la somme des énergies potentielles du ligand (Ep_{ligand}) et du récepteur (Ep_{DIMEB}). Il est important de noter que les énergies indiquées dans le tableau ne correspondent pas tout à fait aux énergies libres, car les entropies correspondantes ne sont pas calculées explicitement dans le vide.

Tableau 27. Energies d'interaction (kcal/mol) des ligands chiraux avec la DIMEB dans le vide

Nom Ligand	Enantiomère	Contributions des différentes energies (kcal/mol)					
		Ep_{com}	E_{vWcom}	$E_{électrostatcom}$	Ep_{ligand}	Ep_{DIMEB}	$\Delta Ep_{interaction}$
MTD	(*R*)-MTD	355,42	-76,45	-186,82	119,33	290,91	-54,82
	(*S*)-MTD	360,08	-76,51	-191,23	124,24	290,91	-55,07
EDDP	(*R*)-EDDP	351,81	-74,71	-124,17	109,07	290,91	-48,17
	(*S*)-EDDP	352,48	-75,64	-126,95	109,16	290,91	-47,59
AM	(*R*)-AM	255,59	-62,93	-94,78	21,83	290,91	-57,15
	(*S*)-AM	257,71	-60,09	-114,65	26,06	290,91	-59,26
MDA	(*R*)-MDA	277,10	-64,40	-112,84	49,68	290,91	-63,48
	(*S*)-MDA	280,01	-68,27	-103,53	50,05	290,91	-60,95

$\Delta Ep_{interaction} = Ep_{com} - (Ep_{ligand} + Ep_{DIMEB})$

La formation de complexes avec la DIMEB est un processus favorable vu les valeurs négatives des énergies potentielles. Le calcul des énergies d'interaction révèle que la (*S*)-MTD, la (*R*)-EDDP, la (*S*)-AM et la (*R*)-MDA forment les complexes plus stables avec la DIMEB par rapport aux autres énantiomères.

L'évaluation des forces responsables de la complexation et de l'énantiodifférentiation de la DIMEB vis-à-vis des énantiomères passe par la détermination des énergies intermoléculaires non-covalentes de van der Waals (ΔE_{vW}) et des énergies électrostatiques (ΔE_{elec}) entre le ligand et la CD (Tableau 28).

Tableau 28. Contribution des énergies non-covalentes lors de la complexation avec la DIMEB

Nom Ligand	Enantiomère	Energie d'interaction non-covalentes (kcal/mol)			
		ΔEvW	$\Delta\Delta vW_{(R-S)}$	ΔE_{elec}	$\Delta\Delta E_{elec(R-S)}$
MTD	(*R*)-MTD	-32,89	0,93	-21,41	-2,09
	(*S*)-MTD	-33,82		-19,32	
EDDP	(*R*)-EDDP	-29,65	0,94	-14,15	2,80
	(*S*)-EDDP	-30,59		-16,95	
AM	(*R*)-AM	-18,86	-2,83	-32,11	8,70
	(*S*)-AM	-16,03		-40,81	
MDA	(*R*)-MDA	-19,67	3,88	-40,60	-9,27
	(*S*)-MDA	-23,56		-31,33	

$\Delta E_{vW} = (E_{vWcom} - (E_{vWligand} + E_{vWDIMEB})$

$\Delta E_{elec} = (E_{eleccom} - (E_{elecligand} + E_{elecDIMEB})$

L'analyse des valeurs obtenues montre que les forces responsables de la complexation (E_{vW} et $E_{élec}$) n'étaient pas les mêmes pour chaque ligand. En effet, la formation des complexes de la MTD et de son métabolite EDDP était surtout gouvernée par les forces de van der Waals. Pour les énantiomères de l'AM et de la MDA, les forces motrices de la complexation avec la DIMEB provenaient des forces électrostatiques (valeurs les plus négatives). En outre, la stéréosélectivité était principalement gouvernée par les interactions électrostatiques. Ainsi, les plus grands écarts $\Delta\Delta E_{elec(R-S)}$ étaient respectivement de 8,70 et de 9,27 kcal/mol pour l'AM et la MDA.

L'étude des liaisons hydrogènes entre le ligand et le récepteur permet d'en savoir d'avantage sur les stabilités des complexes. Les liaisons H ont pu être évaluées à l'aide du programme *ptraj*. Le tableau 29 résume les résultats des liaisons hydrogène dans les complexes de la (*R*)-MTD-DIMEB et de la (*S*)-MTD-DIMEB. Le *cutoff* (valeur seuil) de la distance entre deux atomes lourds était de 4 Å et le cutoff de l'angle O-H…O était de 120°. Il est important de rappeler que les interactions interglucosidiques sont les interactions établies entre les unités glucosidiques d'une même CD alors que les interactions intermoléculaires correspondent aux interactions entre le ligand et le récepteur.

Tableau 29. Représentation en pourcentages (> 10%) des liaisons hydrogènes présentes dans le complexe (*R*)-MTD-DIMEB et (*S*)-MTD-DIMEB

Ligand	Donneur H	Accepteur H	% occupée	type de liaisons H
(*S*)-MTD	(DIM*1 O2)	(DIM7 HO3)..(DIM7 O3)	99,66	interglucosidique
	(DIM4 O2)	(DIM3 HO3)..(DIM3 O3)	99,16	interglucosidique
	(DIM7 O2)	(DIM6 HO3)..(DIM6 O3)	98,79	interglucosidique
	(DIM5 O2)	(DIM4 HO3)..(DIM4 O3)	98,75	interglucosidique
	(DIM2 O2)	(DIM1 HO3)..(DIM1 O3)	98,58	interglucosidique
	(DIM3 O2)	(DIM2 HO3)..(DIM2 O3)	98,16	interglucosidique
	(DIM6 O2)	(DIM5 HO3)..(DIM5 O3)	97,98	interglucosidique
	(DIM6 O6)	(*S* MTD H7)..(*S* MTD N1)	61,07	intermoléculaire
	(DIM7 O6)	(*S* MTD H7)..(*S* MTD N1)	26,42	intermoléculaire
(*R*)-MTD	(DIM1 O2)	(DIM7 HO3)..(DIM7 O3)	99,73	interglucosidique
	(DIM7 O2)	(DIM6 HO3)..(DIM6 O3)	99,69	interglucosidique
	(DIM5 O2)	(DIM4 HO3)..(DIM4 O3)	99,60	interglucosidique
	(DIM4 O2)	(DIM3 HO3)..(DIM3 O3)	99,16	interglucosidique
	(DIM3 O2)	(DIM2 HO3)..(DIM2 O3)	99,13	interglucosidique
	(DIM6 O2)	(DIM5 HO3)..(DIM5 O3)	98,62	interglucosidique
	(DIM2 O2)	(DIM1 HO3)..(DIM1 O3)	97,41	interglucosidique
	(*R* MTD O1)	(*R* MTD H28)..(*R* MTD N1)	99,31	intramoléculaire

*DIM=DIMEB

Le complexe (*S*)-MTD-DIMEB présente deux liaisons H intermoléculaires (26,42 et 61,07%) qui s'établissent pendant la simulation entre le H7 porté par l'azote de la MTD et l'O6 de l'hydroxyle primaire de la DIMEB. Ceci montre bien que la partie azotée de la (*S*)-MTD était orientée du côté de la petite ouverture de la DIMEB et qu'en plus elle a pu former une liaison H stabilisante. Il n'existait que des liaisons H interglucosidiques dans le complexe DIMEB-(*R*)-MTD. En effet, l'absence de liaisons H intermoléculaires pourrait s'expliquer par la présence tout au long de la simulation d'une liaison H intramoléculaire dans la (*R*)-MTD complexée. Ainsi, la structure de la MTD favoriserait cette liaison H et empêcherait la MTD d'interagir avec la DIMEB.

En conclusion, dans le cas de la (*S*)-MTD, les liaisons H semblent contribuer, parallèlement aux autres forces non-covalentes, à la stabilité du complexe (*S*)-MTD-DIMEB. Les résultats sont en accord avec les calculs précédents, qui reflètent une énergie d'interaction plus favorable avec la (*S*)-MTD qu'avec la (*R*)-MTD.

Tableau 30. Représentation en pourcentages (> 10%) des liaisons hydrogènes présentes dans le complexe (*R*)-AM-DIMEB et (*S*)-AM-DIMEB

Ligand	Donneur H	Accepteur H	% occupée	type de liaisons H
(*R*)-AM	(DIM7 O2)	(DIM6 HO3)..(DIM6 O3)	98,61	interglucosidique
	(DIM2 O2)	(DIM1 HO3)..(DIM1 O3)	97,42	interglucosidique
	(DIM6 O2)	(DIM5 HO3)..(DIM5 O3)	97,08	interglucosidique
	(DIM3 O2)	(DIM2 HO3)..(DIM2 O3)	96,93	interglucosidique
	(DIM1 O2)	(DIM7 HO3)..(DIM7 O3)	96,73	interglucosidique
	(DIM5 O2)	(DIM4 HO3)..(DIM4 O3)	93,32	interglucosidique
	(DIM4 O2)	(DIM3 HO3)..(DIM3 O3)	86,00	interglucosidique
	(DIM3 O6)	(*R* AM H13)..(*R* AM N1)	58,48	intermoléculaire
	(DIM5 O6)	(*R* AM H12)..(*R* AM N1)	53,03	intermoléculaire
	(DIM4 O6)	(*R* AM H14)..(*R* AM N1)	20,79	intermoléculaire
	(DIM3 O6)	(*R* AM H14)..(*R* AM N1)	16,02	intermoléculaire
	(DIM4 O6)	(*R* AM H12)..(*R* AM N1)	11,42	intermoléculaire
	(DIM3 O6)	(*R* AM H12)..(*R* AM N1)	10,93	intermoléculaire
	(DIM7 O6)	(*R* AM H12)..(*R* AM N1)	10,04	intermoléculaire
(*S*)-AM	(DIM2 O2)	(DIM1 HO3)..(DIM1 O3)	98,83	interglucosidique
	(DIM5 O2)	(DIM4 HO3)..(DIM4 O3)	98,80	interglucosidique
	(DIM1 O2)	(DIM7 HO3)..(DIM7 O3)	98,75	interglucosidique
	(DIM3 O2)	(DIM2 HO3)..(DIM2 O3)	97,32	interglucosidique
	(DIM4 O2)	(DIM3 HO3)..(DIM3 O3)	96,30	interglucosidique
	(DIM6 O2)	(DIM5 HO3)..(DIM5 O3)	95,13	interglucosidique
	(DIM7 O2)	(DIM6 HO3)..(DIM6 O3)	94,58	interglucosidique
	(DIM7 O6)	(*S* AM H13)..(*S* AM N1)	28,59	intermoléculaire
	(DIM6 O6)	(*S* AM H12)..(*S* AM N1)	27,58	intermoléculaire
	(DIM6 O6)	(*S* AM H13)..(*S* AM N1)	26,54	intermoléculaire
	(DIM7 O6)	(*S* AM H14)..(*S* AM N1)	26,00	intermoléculaire
	(DIM6 O6)	(*S* AM H14)..(*S* AM N1)	25,60	intermoléculaire
	(DIM7 O6)	(*S* AM H12)..(*S* AM N1)	24,40	intermoléculaire

Les énantiomères de l'EDDP n'ont pas formé de liaison H avec la DIMEB car ils n'ont ni de groupement donneur ni de groupement accepteur de liaison H. En revanche, les deux isomères optiques de l'AM et de la MDA ont établi des liaisons H stabilisantes avec la CD entre les H (3x) portés par l'atome N1 et les O6 primaires de la DIMEB (Tableau 30, cas de l'AM).

3.3.2. Evaluation des énergies d'interaction dans le solvant implicite avec la DIMEB

Afin de mieux étudier les complexes qui se forment en EC, c'est-à-dire en milieu aqueux, des simulations ont aussi été réalisées en appliquant un modèle de solvatation implicite pour les systèmes. Le solvant, représenté par un champ

diélectrique continu, agit comme une perturbation continue sur le comportement de la phase gazeuse. Les simulations d'un tel système sont plus courtes face aux simulations dans un modèle de solvatation explicite (20 à 30 fois plus long). Les ligands étudiés dans ce cas étaient la MTD, l'EDDP et l'AM. Les contributions énergétiques ont été évaluées avec la méthode MM-PBSA (Molecular Mechanics_Poisson Boltzmann Surface Area), technique qui permet de calculer l'énergie libre d'interaction des molécules en solution (Tableaux 31-33).

Tableau 31. Energies d'interaction (kcal/mol) de la (*R*)-AM- et de la (*S*)-AM avec la DIMEB dans le solvant implicite

Contribution	(*R*)-AM	(*S*)-AM	$\Delta\Delta E_{R-S}$
ΔE_{elec}	-37,06	-38,79	1,73
ΔE_{vW}	-20,80	-20,09	-0,71
ΔE_{gas}	-57,86	-58,88	1,02
$\Delta E_{nonpolar}$	-3,12	-3,31	0,19
ΔE_{PB}	39,97	38,63	1,34
$\Delta E_{solvation}$	36,84	35,32	1,52
$\Delta E_{PB+elec}$	2,90	-0,16	3,06
$\Delta E_{(total,PB)}$	-21,02	-23,56	2,54

énergies: électrostatique(ΔE_{elec}); van der Waals (ΔE_{vW}); gas ($\Delta E_{gas}=\Delta E_{vW}+\Delta E_{elec}$); solvatation non polaire ($\Delta E_{nonpolar}$); solvatation polaire (ΔE_{PB}); solvatation ($\Delta E_{solvatation}=\Delta E_{nonpolar}+\Delta E_{PB}$); contribution électrostatique totale ($\Delta E_{PB+elec}$); énergie d'interaction ($\Delta E_{(total,PB)}$))

Tableau 32. Energies d'interaction (kcal/mol) de la (*R*)-MTD- et la (*S*)-MTD avec la DIMEB dans le solvant implicite

Contribution	(*R*)-MTD	(*S*)-MTD	$\Delta\Delta E_{R-S}$
ΔE_{elec}	-19,98	-21,17	1,19
ΔE_{vW}	-22,14	-33,83	11,69
ΔE_{gas}	-42,12	-55,00	12,88
$\Delta E_{nonpolar}$	-3,55	-4,58	1,03
ΔE_{PB}	27,97	36,62	-8,65
$\Delta E_{solvation}$	24,42	32,05	-7,63
$\Delta E_{PB+elec}$	7,98	15,45	-7,43
$\Delta E_{(total,PB)}$	-17,70	-22,96	5,26

Tableau 33. Energies d'interaction (kcal/mol) de la (*R*)-EDDP et de la (*S*)-EDDP-DIMEB dans le solvant implicite

Contribution	(*R*)-EDDP	(*S*)-EDDP	$\Delta\Delta E_{R-S}$
ΔE_{elec}	-21,48	-21,13	-0,35
ΔE_{vW}	-23,31	-20,13	-3,18
ΔE_{gas}	-44,79	-41,26	-3,53
$\Delta E_{nonpolar}$	-3,58	-3,33	-0,25
ΔE_{PB}	27,68	26,53	1,15
$\Delta E_{solvation}$	24,10	23,20	0,90
$\Delta E_{PB+elec}$	6,21	5,40	0,81
$\Delta E_{(total,PB)}$	-20,69	-18,06	-2,63

Les différences entre les énergies d'interaction montrent bien qu'il existe une discrimination chirale de la DIMEB vis-à-vis des énantiomères étudiés. Les complexes faisant intervenir la (*R*)-EDDP, la (*S*)-MTD et la (*S*)-AM sont plus stables que ceux formés entre leurs antipodes et la DIMEB. Les différences énantiosélectives entre les énergies d'interactions $\Delta\Delta E_{R-S}$ varient en valeur absolue entre 2,54 et 5,26 kcal/mol et elles sont plus élevées que celles évaluées dans le vide (différences entre 0,25 et 2,53 kcal/mol). De même, les calculs effectués dans le solvant implicite donnent la même stéréosélectivité de la DIMEB que dans le vide.

Les interactions de van der Waals (ΔE_{vW}) et les énergies de solvatation non polaires étaient les forces les plus significatives qui ont contribué à la formation d'un complexe. Les interactions coulombiennes (ΔE_{elec}) plutôt favorables au départ (valeurs négatives) ont été contrecarrées par les valeurs positives des énergies de solvatation polaire, aussi appelées énergies de Poisson-Boltzman (ΔE_{PB}). Au final, les énergies électrostatiques totales ($\Delta E_{PB+elec}$) étaient défavorables pour la formation des complexes diastéréoisomériques. Par ailleurs, les interactions, intervenant dans le mécanisme de reconnaissance chirale n'étaient pas les mêmes selon le type de complexe. Ainsi, la discrimination chirale de l'AM et de la MDA est plutôt gouvernée par les interactions électrostatiques totales ($\Delta\Delta E_{PB+elec\ R-S}$ =3,06 kcal/mol). Pour la MTD et l'EDDP, les écarts les plus grands peuvent être observés au niveau des énergies de van der Waals (11,69 et -3,18 kcal/mol). Les forces de dispersion de

London ont joué un rôle important dans le processus d'énantiodiscrimination vis-à-vis des énantiomères de la MTD, et de l'EDDP.

L'établissement des liaisons H interglucosidiques, intermoléculaires et intramoléculaire a donné un résultat semblable à celui fait dans le vide. La (*S*)-MTD la (*S*)-AM et la (*R*)-AM ont toujours établi des liaisons H avec la DIMEB. En outre, une liaison H intramoléculaire persistait toujours au niveau de la (*R*)-MTD.

3.3.3. Evaluation des énergies d'interaction dans le vide avec la HS-γ-CD

Les énantiomères de la MTD, l'EDDP, la MDA et l'AM sont parfaitement restés complexés dans la cavité de la CD au cours des simulations. La figure 40 montre que la position de la (*S*)-MTD reste quasiment inchangée tout le long de la DM.

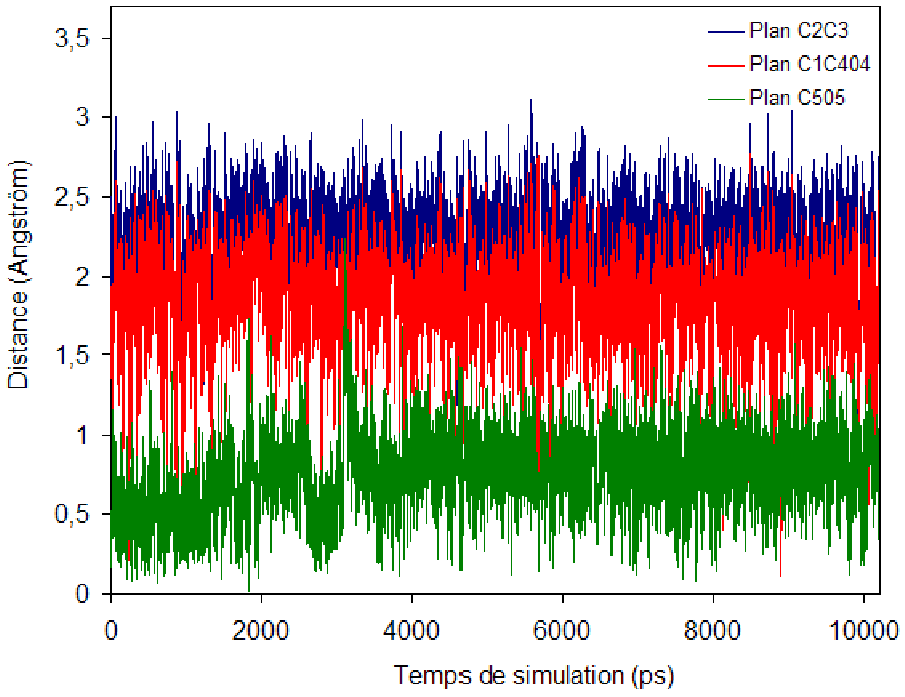
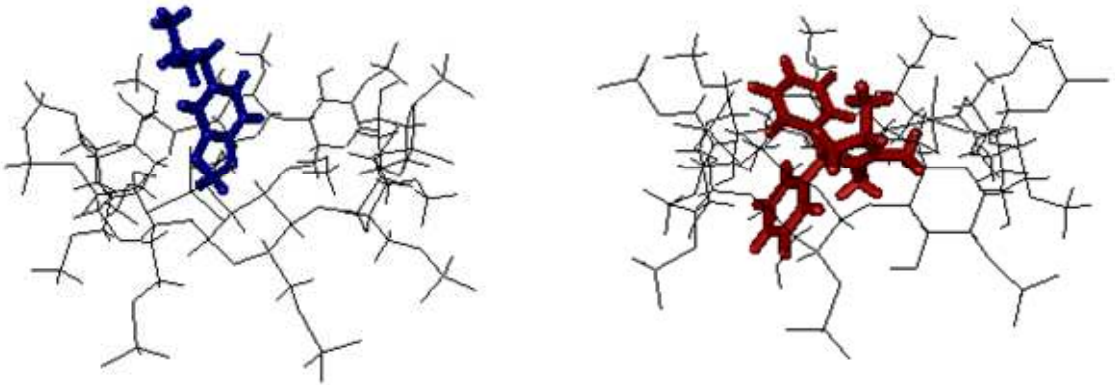


Figure 40 : Evolution de la (*S*)-MTD à l'intérieur de la cavité de la HS-γ-CD au cours de la dynamique moléculaire dans le vide

L'analyse plus détaillée des structures 3D des complexes diastéréoisomériques a révélé que l'atome d'azote des molécules était orienté préférentiellement vers la grande ouverture de la CD, côté des hydroxyles secondaires O2 et O3. Dans le cas des énantiomères de l'AM et de la MDA (figue 41), le groupement phényle était

totalement encastré dans la partie moins polaire de la CD. Pour la MTD et l'EDDP, porteurs de deux fonctions phényles, un groupement phényle était généralement dirigé vers la petite ceinture de la CD alors que l'autre était positionné perpendiculairement au premier vers le côté de la grande ouverture dans le même sens que sa fonction azote (Figure 41).



(*R*)-MDA (*S*)-EDDP

Figure 41. Structure des complexes (*R*)-MDA-DIMEB et (*S*)-EDDP-DIMEB après la dynamique moléculaire

Les résultats du calcul des énergies potentielles d'interaction sont répertoriés dans le tableau 34.

Les signes négatifs de l'énergie potentielle indiquent que l'inclusion des énantiomères de la MTD, de la MDA, de l'EDDP et de l'AM dans la HS-γ-CD est un processus favorable. La HS-γ-CD forme des complexes très stables avec la (*S*)-MTD, la (*S*)-EDDP, la (*S*)-AM et la (*R*)-MDA. Les différences les plus importantes sont observées au niveau de l'EDDP ($\Delta Ep_{interaction\ R\text{-}S}$= 71 kcal/mol) et l'AM ($\Delta Ep_{interaction\ R\text{-}S}$= 32 kcal/mol).

Tableau 34. Energies d'interaction (kcal/mol) des ligands chiraux avec la HS-γ-CD

Nom Ligand	Enantiomère	Contributions des différentes energies (kcal/mol)					
		Ep_{com}	E_{vWcom}	$E_{éleccom}$	Ep_{ligand}	$Ep_{HS\text{-}\gamma\text{-}CD}$	$\Delta Ep_{interaction}$
MTD	(*R*)-MTD	2293,02	-78,96	1319,61	119,33	2573,98	-400,29
	(*S*)-MTD	2296,95	-74,34	1304,21	124,24	2573,98	-401,27
EDDP	(*R*)-EDDP	2283,54	-76,58	1334,89	109,07	2573,98	-399,51
	(*S*)-EDDP	2212,37	-69,18	1295,65	109,16	2573,98	-470,51
AM	(*R*)-AM	2144,47	-61,44	1334,99	21,83	2573,98	-451,31
	(*S*)-AM	2116,75	-55,07	1287,08	26,05	2573,98	-483,28
MDA	(*R*)-MDA	2187,03	-65,10	1361,49	49,68	2573,98	-436,63
	(*S*)-MDA	2206,02	-67,74	1393,51	50,05	2573,98	-418,01

$\Delta Ep_{interaction} = Ep_{com} - (Ep_{ligand} + Ep_{HS\text{-}\gamma\text{-}CD})$

La formation des complexes est surtout gouvernée par les forces coulombiennes (Tableau 35; valeurs les plus négatives), ce qui n'est pas étonnant vu le nombre de fonctions SO_3^- (DS=16) dans la CD et le fait que les ligands sont chargés (+1). Les interactions électrostatiques ont aussi joué un facteur essentiel dans le processus de reconnaissance chirale (différences les plus grandes au niveau de $\Delta\Delta E_{elec}$).

Tableau 35. Contribution des énergies non-covalentes pour le cas de la HS-γ-CD

Nom Ligand	Enantiomère	Energie d'interaction non-covalentes (kcal/mol)			
		ΔE_{vW}	$\Delta\Delta_{vW(R\text{-}S)}$	ΔE_{elec}	$\Delta\Delta E_{elec(R\text{-}S)}$
MTD	(*R*)-MTD	-35,30	-3,75	-326,19	8,90
	(*S*)-MTD	-31,55		-335,09	
EDDP	(*R*)-EDDP	-31,42	-7,40	-366,31	39,25
	(*S*)-EDDP	-24,02		-405,56	
AM	(*R*)-AM	-17,28	-6,37	-413,56	36,73
	(*S*)-AM	-10,91		-450,29	
MDA	(*R*)-MDA	-20,27	2,65	-377,49	31,99
	(*S*)-MDA	-22,92		-345,50	

$\Delta E_{vW} = (E_{vWcom} - (E_{vWligand} + E_{vWHS\text{-}\gamma\text{-}CD})$

$\Delta E_{elec} = (E_{eleccom} - (E_{elecligand} + E_{elecHS\text{-}\gamma\text{-}CD})$

Le pourcentage de liaisons H établi dans le cas de la MTD et de l'AM est illustré au niveau des tableaux 36 et 37.

Tableau 36. Représentation en pourcentages (>10%) des liaisons H présentes dans le complexe (*R*)-MTD-HS-γ-CD et (*S*)-MTD- HS-γ-CD

Ligand	Donneur H	Accepteur H	% occupée	type de liaisons H
(*S*)-MTD	(GSU3 O3)	(*S* MTD H7)..(*S* MTD N1)	82,19	intermoléculaire
	(GSU3 O2)	(*S* MTD H7)..(*S* MTD N1)	52,07	intermoléculaire
(*R*)-MTD	(*R* MTD O1)	(*R* MTD H7)..(*R* MTD N1)	88,73	intramoléculaire
	(GSU5 O2)	(*R* MTD H7)..(*R* MTD N1)	84,74	interglucosidique

*GSU=HS-γ-CD

Contrairement à la DIMEB, la HS-γ-CD n'a pas formé de liaisons H interglucosidiques stables au cours des simulations. Les groupements SO_3^- et les HO3 étaient trop éloignés les uns des autres (> 4 Å). Par contre la (*S*)-MTD, la (*S*)-AM, la (*R*)-AM, la (*S*)-MDA et la (*R*)-MDA ont eu la possibilité d'établir des liaisons H stabilisantes avec la HS-γ-CD. Une liaison H intramoléculaire se maintenait encore au niveau de la (*R*)-MTD complexée.

Tableau 37. Représentation en pourcentages (> 10%) des liaisons H présentes dans le complexe (*R*)-AM-HS-γ-CD et (*S*)-AM- HS-γ-CD

Ligand	Donneur H	Accepteur H	% occupée	type de liaisons H
(*R*)-AM	(GSU5 O3)	(*R* AM H13)..(*R* AM N1)	56,72	intermoléculaire
	(GSU7 O2)	(*R* AM H14)..(*R* AM N1)	53,51	intermoléculaire
	(GSU1 O2)	(GSU8 HO3)..(GSU8 O3)	44,16	interglucosidique
	(GSU7 OS1)	(*R* AM H12)..(*R* AM N1)	34,73	intermoléculaire
	(GSU7 O2)	(*R* AM H13)..(*R* AM N1)	23,52	intermoléculaire
	(GSU5 O3)	(*R* AM H12)..(*R* AM N1)	22,60	intermoléculaire
	(GSU5 O3)	(*R* AM H14)..(*R* AM N1)	19,66	intermoléculaire
	(GSU7 O2)	(*R* AM H14)..(*R* AM N1)	15,88	intermoléculaire
	(GSU7 OS1)	(*R* AM H12)..(*R* AM N1)	15,64	intermoléculaire
	(GSU7 O2)	(*R* AM H13)..(*R* AM N1)	12,71	intermoléculaire
(*S*)-AM	(GSU5 O3)	(*S* AM H14)..(*S* AM N1)	33,71	intermoléculaire
	(GSU5 O3)	(*S* AM H12)..(*S* AM N1)	33,52	intermoléculaire
	(GSU7 OS3)	(*S* AM H13)..(*S* AM N1)	32,83	intermoléculaire
	(GSU5 O3)	(*S* AM H13)..(*S* AM N1)	25,14	intermoléculaire
	(GSU7 OS3)	(*S* AM H14)..(*S* AM N1)	19,35	intermoléculaire
	(GSU7 OS2)	(*S* AM H12)..(*S* AM N1)	16,69	intermoléculaire
	(GSU7 O2)	(*S* AM H12)..(*S* AM N1)	15,68	intermoléculaire
	(GSU7 O2)	(*S* AM H13)..(*S* AM N1)	14,01	intermoléculaire
	(GSU7 O2)	(*S* AM H12)..(*S* AM N1)	12,44	intermoléculaire
	(GSU2 O2)	(GSU1 HO3)..(GSU1 O3)	11,66	interglucosidique

3.3.4. Evaluation des énergies d'interaction avec la HS-γ-CD dans le solvant implicite

Le modèle de solvatation implicite a été appliqué aux complexes renfermant les énantiomères de la MTD, l'EDDP ou l'AM. Les contributions énergétiques calculées avec MM-PBSA sont résumées dans les tableaux 38 à 40 ci-dessous.

Tableau 38. Energies d'interaction (kcal/mol) de la (*R*)-AM et de la (*S*)-AM avec la HS-γ-CD dans le solvant implicite

Contribution	(*R*)-AM	(*S*)-AM	$\Delta\Delta E_{R-S}$
ΔE_{elec}	-604,31	-622,91	18,60
ΔE_{vW}	-20,56	-21,15	0,59
ΔE_{gas}	-624,86	-644,06	19,20
$\Delta E_{nonpolar}$	-3,40	-3,48	0,08
ΔE_{PB}	598,27	613,68	-15,41
$\Delta E_{solvation}$	594,87	610,20	-15,33
$\Delta E_{PB+elec}$	-6,03	-9,23	3,20
$\Delta E_{(total,PB)}$	-29,99	-33,86	3,87

énergies: électrostatique(ΔE_{elec}); van der Waals (ΔE_{vW}); gas ($\Delta E_{gas}=\Delta E_{vW}+\Delta E_{elec}$); solvatation non polaire ($\Delta E_{nonpolar}$); solvatation polaire (ΔE_{PB}); solvatation ($\Delta E_{solvatation}=\Delta E_{nonpolar}+\Delta E_{PB}$); contribution électrostatique totale ($\Delta E_{PB+elec}$); énergie d'interaction ($\Delta E_{(total,PB)}$))

Tableau 39. Energies d'interaction (kcal/mol) de la (*R*)-EDDP et de la (*S*)-EDDP avec la HS-γ-CD dans le solvant implicite

Contribution	(*R*)-EDDP	(*S*)-EDDP	$\Delta\Delta E_{R-S}$
ΔE_{elec}	-543,72	-545,60	1,88
ΔE_{vW}	-29,76	-30,24	0,48
ΔE_{gas}	-573,48	-575,84	2,36
$\Delta E_{nonpolar}$	-4,48	-4,47	0,01
ΔE_{PB}	549,39	551,42	2,03
$\Delta E_{solvation}$	544,90	546,95	2,05
$\Delta E_{PB+elec}$	5,67	5,82	-0,15
$\Delta E_{(total,PB)}$	-28,58	-28,88	0,30

Tableau 40. Energies d'interaction (kcal/mol) de la (*R*)-MTD et de la (*S*)-MTD avec la HS-γ-CD dans le solvant implicite

Contribution	(*R*)-MTD	(*S*)-MTD	$\Delta\Delta E_{R-S}$
ΔE_{elec}	-551,76	-544,93	-6,83
ΔE_{vW}	-36,68	-30,44	-6,24
ΔE_{gas}	-588,44	-575,37	-13,04
$\Delta E_{nonpolar}$	-5,08	-4,67	-0,41
ΔE_{PB}	562,13	552,33	9,80
$\Delta E_{solvation}$	557,06	547,65	9,41
$\Delta E_{PB+elec}$	10,37	7,40	2,97
$\Delta E_{(total,PB)}$	-31,38	-27,72	-3,66

Les complexes impliquant la (*S*)-EDDP, la (*R*)-MTD et la (*S*)-AM étaient plus stables comparés avec ceux formés avec leurs antipodes. Les comparaisons des énergies d'interaction dans la solvatation implicite avec celles dans le vide présentent les mêmes stabilités, sauf le cas de la MTD, où les résultats sont inversés. Tandis que la (*S*)-MTD-HS-γ-CD présente une énergie l'interaction la plus favorable plus stable dans le vide, c'est l'interaction entre la (*R*)-MTD et la HS-γ-CD qui est favorisée dans le modèle de solvatation implicite.

Les interactions de van der Waals (ΔE_{vW}) et les énergies de solvatation non polaires ont principalement contribué à la formation d'un complexe. Les interactions, intervenant dans le mécanisme de reconnaissance chirale, ne sont pas les mêmes selon le type de complexe. Ainsi, la discrimination chirale vis-à-vis de l'AM est plutôt gouvernée par les interactions électrostatiques totales ($\Delta\Delta E_{PB+elec\ R-S}$ =3,20 kcal/mol), tandis que les forces de van der Waals (6,24 kcal/mol) sont majoritairement intervenues dans la discrimination chirale vis-à-vis de la MTD. En revanche, peu de différences peuvent être observées au niveau des énergies $\Delta\Delta E_{PB+elec\ R-S}$, ΔE_{vW} et $\Delta E_{nonpolar}$ dans le cas des complexes diastéréoisomériques avec l'EDDP, et le(s) facteur(s) intervenant dans l'énantiodiscrimination ne sont pas évidents.

Finalement, les pourcentages de liaisons H intermoléculaires étaient très identiques à ceux déterminés dans le vide, avec des pourcentages plus ou moins grands selon l'énantiomère.

3.4. Comparaison des résultats théoriques avec l'expérience

Les modèles dans le vide et dans le solvant implicite ont été développés afin de déterminer si l'une des méthodologies pouvait être utilisée pour la détermination de l'ordre de migration des molécules chirales en EC. Les résultats théoriques de la MDA n'ont pas été comparés avec ceux de la littérature, car l'ordre d'élution des pics des énantiomères de la MDA en présence de DIMEB et de HS-γ-CD ne sont toujours pas connus à ce jour en raison de l'indisponibilité de références optiquement pures.

Les tableaux 41 et 42 ci-dessous permettent de comparer les ordres prédis par la modélisation pour la MTD, l'EDDP et l'AM avec les résultats obtenus en EC. Les énergies potentielles de signe négatif montrent que la complexation des énantiomères étudiés par le DIMEB ou la HS-γ-CD est un processus favorable. Les deux récepteurs peuvent donc à priori être employés en tant que sélecteurs chiraux en EC.

Tableau 41. Comparaison des ordres de migration observés en EC en présence de la DIMEB avec les résultats de la modélisation moléculaire

Ligand	Modèle dans le vide	Modèle de solvatation implicite	Ordre en EC
MTD	*R* avant *S*	*R* avant *S*	*R* avant *S*
EDDP	*S* avant R	*S* avant R	*S* avant *R*
AM	*R* avant *S*	*R* avant *S*	*R* avant *S*

Dans le cas de la DIMEB, les simulations effectuées dans les deux milieux (vide et solvatation implicite) étaient en parfaite concordance avec les résultats expérimentaux de la MTD, de l'EDDP et de l'AM (Prost *et al.*, 2003; Tábi *et al.*, 2003; Martins, 2004; Trkulja *et al.*, 2004; Nhujak *et al.*, 2005). La méthodologie développée dans le vide permet de prédire, après un temps de simulation assez court (2 heures), l'ordre de migration de molécules chirales en EC en présence de la DIMEB. D'autre part, les énergies d'interactions sont aussi en accord avec l'ordre de migration des molécules en EC avec l'EDDP sortant avant MTD et AM migrant plus vite que la MDA.

Tableau 42. Comparaison des ordres de migration des énantiomères obtenus en EC en présence de la HS-γ-CD avec les résultats de la modélisation moléculaire

Ligand	Modèle dans le vide	Modèle de solvatation implicite	Ordre en EC
MTD	*R* avant *S*	*S* avant R	*S* avant *R*
EDDP	*R* avant *S*	*R* avant *S*	*R* avant *S*
AM	*R* avant *S*	*R* avant *S*	*R* avant *S*

Les DM effectuées avec la HS-γ-CD comme récepteur permettent également de prédire correctement l'ordre de migration dans deux systèmes sur trois avec le modèle dans le vide et dans trois sur trois en utilisant le modèle théorique de solvatation implicite (Iwata *et al.*, 2002). En effet, les complexes de la MTD ne présentaient pas la même stabilité selon le modèle utilisé. Dans le vide, les stabilités calculées sont à l'opposé des temps de migration observés pour les énantiomères de la MTD alors que les simulations réalisées dans le modèle de solvatation implicite sont en parfaite concordance avec l'expérience.

Il est important de rappeler que le développement du modèle théorique de la HS-γ-CD a été réalisé en faisant l'hypothèse que toutes les positions C2 et C6 étaient sulfatées. En effet, la littérature rapporte un DS moyen de 13 pour la HS-γ-CD. Or, il est actuellement impossible de connaître la substitution exacte des hydroxyles de la CD. La modélisation de toutes les substitutions possibles serait beaucoup plus longue. Des études de la reconnaissance chirale devraient être réalisées, dans la mesure du possible, avec des structures très proches de la réalité, afin de mieux identifier les mécanismes impliqués dans la formation de ces complexes.

Chapitre V. Conclusions et perspectives

La première partie de ce travail de thèse consistait à mettre au point un protocole analytique pour le dosage énantiosélectif des STA extraits de cheveux. L'emploi d'un nouveau réactif de dérivation chiral original, le chlorure de (2*S*,4*R*)-4-heptafluorobutoyloxy-*N*-heptafluorobutyryl-prolyle, synthétisé au laboratoire, a nettement amélioré la séparation et surtout la détection des énantiomères sous forme de diastéréoisomères en CG/SM-ICN. La méthode validée a permis de doser les énantiomères des STA dans des échantillons de cheveux provenant d'individus soupçonnés d'avoir consommé des STA. Les échantillons positifs à l'AM et à la MA présentaient des concentrations très élevées de la (*S*)-AM et de la (*S*)-MA dans les cheveux. Cette étude a notamment permis de décrire la disposition des énantiomères de la MDEA, de la MDA et de la MDMA dans les cheveux et/ou dans les segments de cheveux. La prédominance de la (*R*)-MDMA et la (*R*)-MDEA dans les cheveux était en accord avec les résultats observés dans d'autres matrices biologiques telles que l'urine, la salive ou encore le sérum. Ainsi, l'accumulation des STA dans les cheveux ne serait pas énantiosélective, mais serait la conséquence de la métabolisation stéréosélective hépatique et/ou de l'élimination rénale plus rapide des énantiomères (*S*). L'analyse segmentaire des cheveux a montré que les isomères optiques de l'AM, de la MDA ou de la MDMA présentaient une stabilité identique après incorporation dans les cheveux. Les rapports *R*/*S* de ces composés étaient relativement constants le long des mèches de cheveux. Finalement, la décoloration chimique des cheveux a entraîné une diminution de la concentration, mais n'a pas modifié les rapports *R*/*S* des STA contenus dans les cheveux.

Les résultats de la MDA sont difficiles à interpréter vu que la présence de MDA dans les cheveux peut résulter de la métabolisation de la MDMA et/ou de la MDEA, ou de la consommation concomitante de MDA. A ce jour, il n'existe pas de données sur la répartition des énantiomères de la MDA dans les matrices biologiques humaines après consommation de MDA seulement. Il serait donc intéressant d'appliquer la méthode développée à l'analyse d'échantillons humains (cheveux et autres) provenant de sujets ayant consommé uniquement de la MDA. En outre, il serait aussi intéressant d'analyser des cheveux dont la consommation et la pureté chimique des STA seraient parfaitement documentées. L'étude permettrait ainsi d'appréhender s'il existe une corrélation entre les doses administrées et les concentrations énantiomériques des STA dans les cheveux. Il serait aussi

intéressant d'évaluer le temps d'apparition des énantiomères des STA dans les poils de barbe. Par ailleurs, il serait aussi utile de comparer les *R*/*S* des STA dans les cheveux avec des poils tels que les poils pubiens, les poils du torse, des jambes ou ceux des aisselles.

Dans une deuxième partie de ce travail, une méthode basée sur l'EC couplée à l'UV a été mise en place pour étudier la disposition des énantiomères de la MTD et de son métabolite principal l'EDDP dans la salive. Une séparation à la ligne de base a été observée pour les énantiomères de la MTD et de l'EDDP en utilisant la HS-γ-CD comme sélecteur chiral. Le procédé développé et validé a finalement été appliqué à l'analyse énantiosélective de la MTD et de l'EDDP dans la salive de personnes ayant participé à un traitement de substitution à la MTD. Les résultats obtenus à partir de 60 échantillons ont montré une prépondérance de la (*R*)-MTD dans la salive, ce qui refléterait principalement la fraction de MTD libre dans le sang. Les échantillons testés positifs aux énantiomères de l'EDDP ont montré une disposition énantiosélective bien définie pour l'EDDP, avec des concentrations plus élevées pour la (*S*)-EDDP. Finalement, les expériences ont bien mis en évidence que la disposition des énantiomères de la MTD et de l'EDDP reflétait les rapports *R*/*S* mesurés dans le sang. Or, contrairement à ce liquide biologique, la collecte de la salive est tout à fait non-invasive, ce qui fait que son prélèvement et son analyse par EC ne présente que des avantages pour les analyses de routine en toxicologie analytique.

Dans la partie finale de ce travail une approche théorique, la modélisation moléculaire, a été utilisée pour prévoir correctement l'ordre de migration d'énantiomères séparés par EC en présence de CDs. Les complexes formés entre les énantiomères de l'AM, de la MTD et de l'EDDP avec la DIMEB ou la HS-γ-CD ont été modélisés dans le vide et dans un modèle de solvatation implicite grâce au champ de force AMBER. A partir de données structurales et grâce à la méthodologie développée, il s'est avéré tout à fait possible de prédire, en temps de calcul assez court, l'énergie potentielle d'interaction entre une cyclodextrine et un énantiomère, et son ordre de migration en EC. Cette méthode pourrait s'avérer utile dans le cas d'études de nouvelles molécules de synthèse apparues sur le marché de la drogue

et dont on n’a pas encore isolé les énantiomères. La modélisation moléculaire pourrait bien être utilisée pour étudier l’affinité de nouvelles drogues synthétiques pour les divers cytochromes humains afin d’étudier ainsi leurs voies de métabolisation potentielles.

Chapitre VI. Références bibliographiques

Ahn S., Ramirez J., Grigorean G. & Lebrilla C. B., Chiral recognition in gas-phase cyclodextrin: amino acid complexes - is the three point interaction still valid in the gas phase? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.,* **12**: 278-287 (2000).

Al-Dirbashi O. Y., Kuroda N., Inuduka S., Menichini F. & Nakashima K., HPLC with fluorescence detection of methamphetamine and amphetamine in segmentally analyzed human hair. *Analyst,* **124**: 493-497 (1999a).

Al-Dirbashi O. Y., Kuroda N., Wada M., Takahashi M. & Nakashima K., Quantification of methamphetamine, amphetamine and enantiomers by semi-micro column HPLC with fluorescence detection; applications on abusers' single hair analyses. *Biomed. Chromatogr.,* **14**: 293-2000 (2000).

Al-Dirbashi O. Y., Wada M., Kuroda N., Inuduka S. & Nakashima K., Enantiomer-specific high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of methamphetamines in abusers' hair and urine. *Biomed. Chromatogr.,* **13**: 543-547 (1999b).

Alburges M. E., Huang W., Foltz R. L. & Moody D. E., Determination of methadone and its N-demethylation metabolites in biological specimens by GC-PICI-MS. *J. Anal. Toxicol.,* **20**: 362-368 (1996).

Allinger N. L., Yuh Y. H. & Lii J.-H., Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.,* **111**: 8551-8566 (1989).

Amstrong D., Rundlett K. L. & Reid III G. L., Use of macrocyclic antibiotic, rifamycin B, and indirect detection for the resolution of racemic amino alcohols by CE. *Anal. Chem.,* **66**: 1690-1695 (1994).

Angelo H. R., Beck N. & Kristensen K., Enantioselective high-performance liquid chromatographic method for the determination of methadone and its main metabolite in urine using AGP and a C_8 column coupled serially. *J. Chromatogr. B,* **724**: 35-40 (1999).

Aps J. K. M. & Matens L. C., Review: the physiology of saliva and transfert of drugs into saliva. *Forensic Sci. Int.,* **150**: 119-131 (2005).

Armstrong D., Ward T. J., Armstrong R. D. & Beesley T. E., Separation of drug isomers by formation of β-cyclodextrin inclusion complexes. *Science,* **232**: 1132-1135 (1986).

Armstrong D. W., Han S. M. & Han Y. I., Separation of optical isomers of scopolamine, cocaine, homatropine and atropine. *Anal. Biochem.,* **167**: 261-264 (1987).

Baselt R. C. *Disposition of toxic drugs and chemicals in man* (seventh ed.). Foster City, California: Biomedical Publications (2006)

Baumgartner W. A., Hill V. A. & Blahd W. H., Hair analysis for drugs of abuse. *J. Forensic Sci.,* **34**: 1433-1453 (1989).

Bayly C. I., Cieplak P., Cornell W. D. & Kollman P. A., A well-behaved electrostatic based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.,* **97**: 10269-10280 (1993).

Beck O., Boreus L. O., Lafolie P. & Jacobsson G., Chiral analysis of methadone in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.,* **570**: 198-202 (1991).

Beier T. & Höltje H.-D., Modified cyclodextrins as chiral selectors: molecular modelling investigations on the enantioselective binding properties of heptakis-(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-tert.-butyldimethylsilyl)-β-cyclodextrin. *J. Chromatogr. B,* **708**: 1-20 (1998).

Bell J. & Zador D., A risk-benefit analysis of methadone maintenance treatment. *Drug Safety,* **22**: 179-190 (2000).

Benazzi F. & Mazzoli M., Psychiatric illness associated with "ecstasy". *Lancet,* **338**: 1520 (1991).

Berens G., Yegles M. & Wennig R., Study of the enantiomeric ratio of methadone and EDDP in hair, urine and serum by capillary electrophoresis. *Ann. Toxicol. Anal.,* **XIV**: 321 (2002).

Bermejo A. M., Lucas A. C. S. & Taberno M. J., Saliva/plasma ratio of methadone and EDDP. *J. Anal. Toxicol.,* **24**: 70-72 (2000).

Besler B. H., Merz K. M. & Kollman P. A., Atomic charges derived from semiempirical methods. *J. Comput. Chem.,* **11**: 431-439 (1990).

Biosca-Martín Y., Ruiz-García C. & Marina M. L., Fast enantiomeric separation of uniconazole and diniconazole by electrokinetic chromatography using an anionic cyclodextrin: application to the determination of analyte-selector apparent binding constants for enantiomers. *Electrophoresis,* **21**: 3240-3248 (2000).

Borges C. R., Wilkins D. G. & Rollins D. E., Amphetamine and N-acetylamphetamine incorporation into hair: an investigation of potential role of drug basicity in hair color bias. *J. Anal. Toxicol.,* **25**: 221-227 (2001).

Boulton D. W. & Devane C. L., Development and application of a chiral high performance liquid chromatography assay for pharmacokinetic studies of methadone. *Chirality,* **12**: 681-687 (2000).

Braun U., Shulgin A. T. & Braun G., Central active N-substitued analogs of 3,4-methylenedioxyphenylisopropylamine (3,4-methylenendioxyamphetamine). *J. Pharm. Sci.,* **69**: 192-195 (1980).

Brooks B. R., Bruccoleri R. E., Olafson B. D., States D. J., Swaminathan S. & Karplus M., CHARMM: a program for macromolecular energy minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.,* **4**: 187-217 (1983).

Brunnenberg M. & Kovar K.-A., Stereospecific analysis of ecstasy-like N-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine and its metabolites in humans. *J. Chromatogr. B,* **751**: 9-18 (2001).

Buechler J., Schwab M., Mikus G., Fischer B., Hermle l., Marx C., Grön G., Spitzer M. & Kovar K.-A., Enantioselective quantitation of the ecstasy compound (*R*)- and (*S*)-N-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine and its major metabolites in human plasma and urine. *J. Chromatogr. B,* **793**: 207-222 (2003).

Busby M. B. & Vigh G., Synthesis of a single-isomer sulfated β-cyclodextrin carrying nonindentical substituents at all of the C2, C3, and the C6 positions and its use for the electrophoretic separation of enantiomers in acidic aqueous and methanolic background electrolytes, Part 2: Heptakis(2-*O*-methyl-6-*O*-sulfo)cyclomaltoheptaose. *Electrophoresis,* **26**: 3849-3860 (2005).

Caplehorn J. R. M. & Drummer O. H., Mortality associated with New South Wales methadone programs in 1994: lives lost and saved. *MJA,* **170**: 104-109 (1999).

Cartmell L. W., Aufderhide A. & Weems C., Cocaine metabolites in pre-Columbian mummy hair. *J. Okla. State Med. Assoc.,* **84**: 11-12 (1991).

Case D. A., Darden T. A., Cheatham IIII T. E., Simmerling C. L., Wang J., Duke R. E., Luo R., Merz K. M., Wang B., Pearlman D. A., Crowley M., Brozell S., Tsui V., Gohlke H., Mongan J., Hornak V., Cui G., Beroza P., Schafmeister C., Caldwell J. W., Ross W. S. & Kollman P. A. *AMBER 8*. San Francisco: University of California (2004)

Cháfer-Pericás C., Campíns-Falcó P. & Hernández-Herráez R., Application of solid-phase microextraction combined with derivatization to the enantiomeric determination of amphetamines. *J. Pharm. Biomed. Anal.,* **40**: 1209-1217 (2006).

Chankvetadze B., Separation selectivity in chiral capillary electrophoresis with charged selectors. *J. Chromatogr. A,* **792**: 269-295 (1997).

Chankvetadze B., Burjanadze N., Breitkreuz J., Bergander K., Bergenthal D., Kataeva O., Fröhlich R., Luftmann H. & Blaschke G., Mechanistic study on the opposite migration order of the enantiomers of the ketamine with α- and β-cyclodextrin in capillary electrophoresis. *J. Sep. Sci.,* **25**: 1155-1166 (2002).

Chen F.-T. A. & Evangelista R. A., Highly sulfated cyclodextrins: the solution for chiral analysis. *American Laboratory,* 30-37 (2002).

Chen F.-T. A., Shen G. & Evangelista R. A., Characterization of highly sulfated cyclodextrins. *J. Chromatogr. A,* **924**: 523-532 (2001).

Chen K.-H., Lin C.-E., Liao W.-S., Lin W.-Y. & Hsiao Y.-Y., Separation and migration behavior of structurally related phenothiazines in cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A,* **979**: 399-408 (2002).

Cheng W.-C., Lee W.-M., Chan M.-F., Tsui P. & Dao K.-L., Enantiomeric separation of methamphetamine and related analogs by capillary zone electrophoresis: intelligence in routine methamphetamine seizures. *J. Forensic Sci.,* **47**: 1248-1252 (2002).

Cheng W.-C., Poon N.-L. & Chan M.-F., Chemical profiling of 3,4-methylenedioxymethamphetamine tablets seized in Hong Kong. *J. Forensic Sci.,* **48**: 1249-1259 (2003).

Cherkaoui S., Rudaz S., Varesio E. & Veuthey J.-L., On-line capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry for the stereoselective analysis of drugs and metabolites. *Electrophoresis,* **22**: 3308-3315 (2001).

Chikhi-Chorfi N., Galons H., Pham-Huy C., Thevenin M., Warnet J.-M. & Claude J.-R., Selective antibodies to methadone enantiomers: synthesis of (*R*)- and (*R,S*) methadone conjugates and determination by an immunoenzymatic method in human serum. *Chirality,* **13**: 187-192 (2001).

Chikhi-Chorfi N., Pham-Huy C., Galons H., Manuel N., Lowenstein W., Warnet J.-M. & Claude J.-R., Rapid determination of methadone and its major metabolite in biological fluids by gas-liquid chromatography with thermionic detection for maintenance treatment of opiate addicts. *J. Chromatogr. B,* **718**: 278-284 (1998).

Chinaka S., Tanaka S., Takayama N., Komai K., Ohshima T. & Ueda K., Simultaneous chiral analysis of methamphetamine and related compounds by capillary electrophoresis *J. Chromatogr. B,* **749**: 111-118 (2000).

Choi Y. & Jung S., Molecular dynamics (MD) simulations for the prediction of chiral discrimination of *N*-acetylpheylalanine enantiomers by cyclomaltoheptaose-β-cyclodextrin (β-CD) based on the MM-PBSA (molecular mechanics-Poisson-Boltzmann surface area) approach. *Carbohydr. Res.,* **339**: 1961-1966 (2004).

Cirimele V., Kintz P. & Mangin P., Drug concentrations in human hair after bleachnig *J. Anal. Toxicol.,* **19**: 331-332 (1995).

Cody J. T. & Schwarzhoff R., Interpretation of methamphetamine and amphetamine enantiomer data. *J. Anal. Toxicol.,* **17**: 321326 (1993).

Cody J. T. & Valtier S., Detection of amphetamine and methamphetamine following administration of benzphetamine. *J. Anal. Toxicol.,* **22**: 299-309 (1998).

Cody J. T. & Valtier S., Amphetamine and fenproporex levels following multidose administration of fenpropex. *J. Anal. Toxicol.,* **23**: 187-194 (1999).

Cooper G. A., Allen D. L., Scoot K. S., Oliver J. S., Ditton J. & Smith I. D., Hair analysis: self-reported use of "speed" and "ecstasy" compared with laboratory findings. *J. Forensic Sci.,* **45**: 400-406 (2000).

Copper C. L., Davis J. B., Cole R. O. & Sepaniak M. J., Separations of derivatized amino acids enantiomers by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis: mechanistic and molecular studies. *Electrophoresis,* **15**: 785-792 (1994a).

Copper C. L., Davis J. B. & Sepaniak M. J., Mechanisms of enantiomeric resolution in cyclodextrin-modified capillary electrophoretic separations of binaphthyl compounds. *Chirality,* **7**: 401-408 (1995).

Copper C. L. & Sepaniak M. J., Cyclodextrin-modified micellar electrokinetic capillary chromatography separations of benzopyrene isomers: correlation with computationally host-guest energies. *Anal. Chem.,* **66**: 147-154 (1994b).

Cornell W. D., Cieplak P., Bayly C. I., Gould I. R., Merz K. M., Ferguson D. M., Spellmeyer D. C., Fox T., Caldwell J. W. & Kollman P. A., A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.,* **117**: 5179-5197 (1995).

Cornell W. D., Cieplak P., Bayly C. I. & Kollman P. A., Application of RESP charges to calculate conformational energies, hydrogen bond energies, and free energies of solvation. *J. Am. Chem. Soc.,* **115**: 9620-9631 (1993).

Cramer F. & Henglein F. M., Über Einschlußverbindungen, XI. Gesetzmässigkeiten bei der Bildung von Addukten der Cyclodextrine. *Chem. Ber.,* **90**: 2561-2571 (1957).

Crettol S., Deglon J. J., Besson J., Croquette-Krokkar M., Gothuey I., Hammig R., Monnat M., Huttemann H., Baumann P. & Eap C., Methadone enantiomer plasma levels, CYP2B6, CYP2C19, and CYP2C9 genotypes, and response to treatment. *Clin. Pharmacol. Ther.,* **78**: 593-604 (2005).

D'Hulst A. & Verbeke N., Chiral separation by capillary electrophoresis with oligosaccharides. *J. Chromatogr.,* **608**: 275-287 (1992).

Danel C., Lipka E., Bonte J.-P., Goossens J.-F., Vaccher C. & Foulon C., Enantioseparation of chiral N-imidazole derivatives by electrokinetic chromatography using highly sulfated cyclodetrins: mechanism of enantioselective recognition. *Electrophoresis,* **26**: 3824-3832 (2005).

Dauber-Osguthorpe P., Roberts V. A., Osguthorpe D. J., Wolff J., Genest M. & Hagler A. T., Structure and energetics of ligand binding to proteins: E. coli dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. *Proteins,* **4**: 31-47 (1988).

Davanko V. A. & Kurganov A., The role of achiral sorbent matrix in chiral recognition of aminoacid enantiomers in ligand-exchange chromatography. *Chromatographia,* (1983).

De Boer D., Tan L. P., Gorter P., van de Wal R. M. A., Kettenes-van den Bosch J. J., de Bruijn E. A. & Maes R. A. A., Gas chromatographic/mass spectrometric assay for

profiling the enantiomers of 3,4-methylenedioxyamphetamine and its chiral metabolites using positive chemical ionization ion trap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.,* **32**: 1236-1246 (1997).

De Boer T., De Zeeuw R. A., De Jong G. & Ensing K., Recent innovations in the use of charged cyclodextrins in capillary electrophoresis for chiral separations in pharmaceutical analysis. *Electrophoresis,* **21**: 3220-3239 (2000).

De Hoffmann E., Charette J. & Stroobant V. *Spectrométrie de masse* (Vol. 2). Paris: DUNOD (1999)

De la Torre R., Farré M., Navarro M., Pacifici R., Zuccaro P. & Pichini S., Clinical pharmacokinetics of amphetamine and related substances: monitoring in conventional and non-conventional matrices. *Clin. Pharmacokinet.,* **3**: 157-185 (2004).

Di Pietra A. M., Gotti R., del Borrello E., Pomponio R. & Cavrini V., Analysis of amphetamine and congeners in illicit samples by liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Anal. Toxicol.,* **25**: 99-105 (2001).

Dos Santos Lucas A. C., Bermejo A., Fernandéz P. & Tabernero M. J., Solid-phase microextraction in the determination of methadone in human saliva by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.,* **24**: 93-96 (2000).

Dowling G. P., McDonough E. T. & Bost R. O., 'Eve' and 'Ecstasy'. A report of five deaths associated with the use of MDEA and MDMA. *JAMA,* **257**: 1615-1617 (1987).

Drummer O. H., Recent trends in narcotic deaths. *Ther. Drug. Monit.,* **27**: 738-740 (2005a).

Drummer O. H., Review: Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. *J. Forensic Sci.,* **150**: 133-142 (2005b).

Durham D. G., Application of force field calculations to the prediction of chirally discriminating chromatographic behaviour for β-CDs. *Chirality,* **8**: 58-66 (1996).

Eap C. B., Bertschy G., Baumann P., Finkbeiner T., Gastpar M. & Scherbaum N., High interindividual variability of methadone enantiomer blood levels to dose ratios. *Arch. Gen. Psychiatry,* **55**: 89-90 (1998).

Edeleano L., Über einige Derivate der Phenylmethacrylsäure und der Phenyliso-buttersäure. *Chem. Ges.,* **20**: 612-622 (1887).

Esteban J., Pellín de la Cruz M., Gimeno C., Barril J., Mora E., Giménez J. & Vilanova E., Detection of clinical interactions betwen methadone and anti-retroviral compounds using an enantioselective capillary electrophoresis for methadone analysis. *Toxicol. Lett.,* (2004).

Evans C. E. & Stalcup A. M., Comprehensive strategy for chiral separations using sulfated cyclodextrins in capillary electrophoresis. *Chirality,* **15**: 709-723 (2003).

Ewing T. J. A., Makino S., Skillman A. G. & Kuntz I. D., DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *J. Compt. Aided Mol. Des.,* **15**: 411-428 (2001).

Fallon J. K., Kicman A. T., Henry J. A., Milligan P. J., Cowan D. A. & Hutt A. J., Stereospecific analysis and enantiomeric disposition of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in humans. *Clin. Chem.,* **45**: 1058-1069 (1999).

Fanali S., Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors. *J. Chromatogr. A,* **875**: 89-122 (2000).

Fanali S., Aturki Z. & Desiderio C., New strategies for chiral analysis of drugs by capillary electrophoresis. *Forensic Sci. Int.,* **92**: 137-155 (1998).

Fanali S., Desiderio C. & Aturki Z., Enantiomeric resolution study by capillary electrophoresis. Selection of the appropriate chiral selector. *J. Chromatogr. A,* **772**: 185-194 (1997).

Fillet M., Hiubert P. & Crommen J., Enantiomeric separations of drugs using mixtures of charged and neutral cyclodextrins. *J. Chromatogr. A,* **875**: 123-134 (2000).

Fitzgerald R. L., Ramos J. M., Bogema S. C. & Poklis A., Resolution of methamphetamine stereoisomers in urine drug testing: urinary excretion of *R*-(-)-methamphetamine following use of nasal inhalers. *J. Anal. Toxicol.,* **12**: 255-259 (1988).

Fitzgerald R. L., Rexin D. A. & Herold D. A., Benzodiazepine analysis by negative chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.,* **17**: 342-347 (1993).

Foster B. S., Gilbert D. D., Hutchaleelaha A. & Mayersohn M., Enantiomeric determination of amphetamine and methamphetamine in urine by pre-column derivatization with Marfey's reagent and HPLC. *J. Anal. Toxicol.,* **22**: 265-269 (1998).

Foster D. J. R., Somogyi A. A. & Bochner F., Stereoselective quantification of methadone and its major oxidative metabolite, 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine, in human urine using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B,* **744**: 165-176 (2000).

Foster D. J. R., Somogyi A. A. & Bochner F., Methadone N-demethylation in human liver microsomes: lack of stereoselectivity and involvement of CYP3A4. *Br. J. Clin. Pharmacol.,* **47**: 403-412 (1999).

Foster D. J. R., Somogyi A. A., White J. M. & Bochner F., Population pharmocokinetics of (*R*)-, (*S*)- and rac-methadone in methadone maintenance patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.,* **57**: 742-755 (2004).

French D., Levine M. L., Pazur J. H. & Norberg E., Studies on the Schardinger dextrins. The preparation and solubility characteristics of alpha-, beta- and gamma-dextrins. *J. Am. Chem. Soc.,* **71**: 353-356 (1949).

Freudenberg K. & Cramer F., Die Konstitution der Schardinger-Dextrine α, β und γ. *Z. Naturforsch.,* **3b**: 464 (1948).

Freudenberg K., Cramer F. & Plieninger H., *German Patent,* 895769 (1953).

Freudenberg K. & Meyer-Delieus M., Über die Schardinger-Dextrine aus Stärke. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.,* **71**: 1596-1600 (1938).

Freudenberg K., Plankenhorn E. & Knauber H., Über Schardingers Dextrine aus Stärke. *Justus Liebigs Ann. Chem.,* **558**: 1-10 (1947).

Freudenmann R. W. & Spitzer M., The neuropsychopharmacology and toxicology of 3,4-methylene-N-ethyl-amphetamine (MDEA). *CNS Drug Reviews,* **10**: 89-116 (2004).

Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Zakrzewski V. G., Montgomery J. A., Stratman R. E., Burant J. C., Dapprich S., Millam J. M., Daniels A. D., Kudin K. N., Strain M. C., Farkas O., Tomasi J., Barone V., Ciossi M., Cammi R., Mennuci B., Pomelli C., Adamo C., Clifford S., Ochterski J., Petersson G. A., Ayala P. Y., Cui Q., Morokuma K., Malick D. K., Rabuck A. D., Raghavachari K., Foresman J. B., Cioslowski J., Ortiz J. V., Stefanov B. B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Gomperts R., Martin R. L., Fox D. J., Keith T., Al-Laham M. A*., et al. Gaussian 98 (Revision A.1)*. Pittsburgh PA: Gaussian (1998)

Frost K., Köhler H. & Blaschke G., Enantioselective determination of methadone and its main metabolite 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP) in serum, urine, and hair by capillary electrophoresis. *Electrophoresis,* **18**: 1026-1034 (1997).

Fucci N., De Giovanni N. & Chiarotti M., Simultaneous detection of some drugs of abuse in saliva samples by SPME technique. *Forensic Sci. Int.,* **134**: 40-45 (2003).

Gal J., Stereochemistry of metabolism of amphetamines: use of (-)-α-(trifluoromethyl)phenylacetyl chloride for GLC resolution of chiral amines. *J. Pharm. Sci.,* **66**: 169-172 (1977).

Galloway F. R. & Bellet N. F., Methadone conversion to EDDP during GC-MS. Analysis of urine samples. *J. Anal. Toxicol.,* **23**: 615-619 (1999).

George S. & Braithwaite R. A., Using amphetamine isomer ratios to determine the compliance of amphetamine abusers prescribed dexedrine. *J. Anal. Toxicol.,* **24**: 223-227 (2000).

Gerber J. G., Rhodes R. J. & Gal J., Stereoselective metabolism of methadone. N-demethylation by cytochrome P4502B6 and 2C19. *Chirality,* **16**: 36-44 (2004).

Girod C. & Staub C., Analysis of drugs of abuse in hair by automated solid-phase extraction, GC/EI/MS and GC ion trap /CI/MS. *Forensic Sci. Int.,* **107**: 261-271 (2000).

Gouldin W. M., Kennedy D. T. & Small R. E., Methadone: history and recommendations for use in analgesia. *APS,* **10**: (2000).

Gozel P., Gassmann E., Michelsen H. & Zare R. N., Electrokinetic resolution of amino acid enantiomers with copper(II)-aspartame support electrolyte. *Anal. Chem.,* **59**: 44-49 (1987).

Grigorean G. & Lebrilla C. B., Enantiomeric analysis of pharmaceutical compounds by ion/molecule reactions. *Anal. Chem.,* 1684-1691 (2001).

Gübitz G. & Schmid M. G., Chiral separation by chromatographic and electromigration techniques. A review. *Biopharm. Drug Dispos:,* **22**: 291-336 (2001).

Gübitz G. & Schmid M. G., Recent advances in chiral separation principles in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Electrophoresis,* 3981-3996 (2004).

Gygi S. P., Wilkins D. G. & Rollins D. E., A comparison of phenobarbital and codeine incorporation into pigmented and nonpigmented rat hair. *J. Pharm. Sci.,* **86**: 209-214 (1997).

Haber F. (1891). *Ueber einige Derivate des Piperonals. Dissertation.* Friedrich-Wilhelms-Univeristät, Berlin.

Han E., Park Y., Yang W., Lee J., Lee S., Kim E., Lim M. & Chung H., The study of metabolite-to-parent drug ratios of methamphetamine and methylenedioxyamphetamine in hair. *Forensic Sci. Int.,* **161**: 124-129 (2006).

Harkey M. R., Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci. Int.,* **63**: 9-18 (1993).

Hartmann L., Jahn K., Bender H. G., Halberstadt E. & Beck L., Drug abuse, pregnancy and HIV infection. *Gynäkologe.,* **24**: 339-344 (1991).

Hasegawa M., Matsubara K., Fukushima S., Maseda C., Uezono T. & Kimura K., Stereoselective analyses of selegiline metabolites: possible urinary markers for selegiline therapy. *Forensic Sci. Int.,* **101**: 95-106 (1999).

Hayashi S., Miayamoto I. & Takeda K., Measurement of human hair growth by optical microscopy and image analysis. *Br. J. Dermatol.,* **125**: 123-129 (1991).

He H., Liu Y.-C., Sun C., Wang X. & Pham-Huy C., Effect of temperature on enantiomer separation of oxazepam and lorazepam by high performance liquid chromatography on a beta-cyclodextrin derivatized bonded chiral stationary phase. *J. Chromatogr. Sci,* **42**: 62-66 (2004).

Heinemann A., Iwersen-Bergamnn S., Stein S., Schmoldt A. & Püschel K., Methadone-related fatalities in Hamburg 1990-1999: implications for quality standards in maintenance treatment? *Forensic Sci. Int.,* **113**: 449-455 (2000).

Heintz J., Hernandez M. & Gomez F. A., Use the partial-filling technique in affinity capillary electrophoresis for determining binding constants of ligands to receptors. *J. Chromatogr. A,* **840**: 261-268 (1999).

Henderson G. L., Harkey M. R., Zhou C., Jones R. T. & Jacob P., Incorporation of isotopically labeled cocaine and metabolites into human hair. *J. Anal. Toxicol.,* **20**: 1-20 (1996).

Henry J. A., Jeffreys K. J. & Dawling S., Toxicity and deaths from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Lancet,* **340**: 384-387 (1992).

Hensley D. & Cody J. T., Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, methylenedioxyamphetamine (MDA), methylenedioxymethamphetamine (MDMA), and methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) enantiomers by GC-MS. *J. Anal. Toxicol.,* **23**: 518-523 (1999).

Heo Y. J., Whang Y. S., In M. K. & Lee K.-J., Determination of enantiomeric amphetamines as metabolites of illicit amphetamines and selegiline in urine by capillary electrophoresis using modified beta-cyclodextrin. *J. Chromatogr. B,* **741**: 221-230 (2000).

Herráez-Hernández R., Campíns-Falcó P. & Tortajada-Genaro L. A., Chiral determination of amphetamine and related compounds using chloroformates for derivatization and high-performance liquid chromatography. *Analyst,* **123**: 2131-2137 (1998).

Herráez-Hernández R., Campíns-Falcó P. & Verdú-Andrés J., Strategies for the enantiomeric determination of amphetamine and related compounds by liquid chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods,* **54**: 147-167 (2002).

Hjerten S., Free zone electrophoresis. *Chromatogr. Rev.,* **9**: 122-219 (1967).

Holler J. M., Vorce S. P., Bosy T. & Jacobs A., Quantitative and isomeric determination of amphetamine and methamphetamine from urine using a nonprotic elution solvent and *R*-(-)-α-methoxy-α-trifluoromethylphenylacetic acid chloride derivatization. *J. Anal. Toxicol.,* **29**: 652-657 (2005).

Huang Y.-S., Liu J.-T., Lin C.-H. & Lin L.-C., Chiral separation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and related compounds in clandestine tablets and urine samples by capillary electrophoresis/fluorescence spectroscopy. *Electrophoresis,* **24**: 1097-1104 (2003).

Hübschmann H.-J. *Handbuch der GC/MS*. Weinheim VCH Verlagsgesellschaft mbH (1996)

Hughes R. O., Bronner W. E. & Smith M. L., Detection of amphetamine and methamphetamine in urine by gas chromatography/mass spectrometry following derivatization with (-)-menthyl chloroformate. *J. Anal. Toxicol.,* **15**: 256-259 (1991).

Huy-Pham C., Chikhi-Chorfi N., Galons H., Sadeg N., Laqueille X., Aymard N., Massicot F., Warnet J.-M. & Claude J.-R., Enantioselective high-performance liquid chromatography determination of methadone enantiomers and its major metabolite in human biological fluids using a new derivatized cyclodextrin-bonded phase. *J. Chromatogr. B,* **700**: 155-163 (1997).

Iio R., Chinaka S., Takayama N. & Hayakawa K., Simultaneous chiral analysis of methamphetamine and related compounds by capillary electrophoresis/mass spectrometry using anionic cyclodextrin. *Anal Sci.,* **21**: 15-19 (2005).

Imazawa M. & Hatanaka Y., Micellar electrokinetic capillary chromatography of benzodiazepine antiepileptics and their desmethyl metabolites in blood. *J. Pharm. Biomed. Anal.,* **15**: 1503-1508 (1997).

Iwata Y. T., Garcia A., Kanamori T., Inoue H., Kishi T. & Lurie I. S., The use of a highly sulfated cyclodextrin for the simultaneous chiral separation of amphetamine-type stimulants by capillary electrophoresis. *Electrophoresis,* **23**: 1328-1334 (2002).

Iwata Y. T., Kanamori T., Ohmae Y., Tsujikawa K., Inoue H. & Kishi T., Chiral analysis of amphetamine-type stimulants using reversed-polarity capillary electrophoresis/positive ion electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Electrophoresis,* **24**: 1170-1776 (2003).

Jin H. L. & Beesley T. E., Enantiomeric separation of amphetamine and methamphetamine by capillary gas chromatography. *Chromatographia,* **38**: 595-598 (1994).

Job P., Recherches sur la formation des complexes minéraux en solution et sur leur stabilité. *Ann. Chim.,* **9**: 113-203 (1928).

Jones G., Willet P., Glen R. C., Leach A. R. & Taylor R., Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.,* **267**: 727-748 (1997).

Jorgenson J. W. & Lukacs K. C., Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal. Chem.,* **53**: 1298-1302 (1981).

Jover R., Ponsoda X. & Gomez-Lechon M. J., Potentiation of heroin and methadone hepatoxicity by ethanol: an in vivo study using cultured human hepatocytes. *Xenobiotica,* **22**: 471-478 (1992).

Kalant H., The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs. *CMAJ,* **165**: 917-928 (2001).

Kelly T., Doble P. & Dawson M., Chiral analysis of methadone and its major metabolites (EDDP and EMDP) by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B,* 315-323 (2005).

Kelly T., Doble P. & Dawson M., Chiral separation of methadone, 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP) and 2-ethyl-5-methyl-3,3-diphenyl-1-pyrroline (EDMP) by capillary electrophoresis using cyclodextrin derivates. *Electrophoresis,* **24**: 2106-2110 (2003).

Kidwell D. A., Holland J. C. & Athanaselis S., Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *J. Chromatogr. B,* **713**: 111-135 (1998).

Kikura R. & Nakahara Y., Hair analysis for drugs of abuse XVI. Disposition of fenethylline and its metabolite into hair and discrimination between fenethylline use and amphetamine use by hair analysis. *J. Anal. Toxicol.,* **21**: 291-296 (1997).

Kim E.-M., Chung H.-S., Lee K.-J. & Kim H.-J., Determination of enantiomeric metabolites of l-deprenyl, d-methamphetamine, and racemic methamphetamine in urine by capillary electrophoresis: comparison of deprenyl use and methamphetamine use. *J. Anal. Toxicol.,* **24**: 238-244 (2000).

Kim H., Jeong K., Lee S. & Jung S., Molecular modeling of the chiral recognition of propranolol enantiomers by a β-cyclodextrin. *Bull. Korean Chem. Soc.,* **24**: 95-98 (2003).

Kintz P. *Analytical and pratical aspects of drug testing in hair*. Boca Raton (NY): Taylor & Francis Group (2007)

Kintz P. & Cirimele V., Interlaboratory comparison of quantitative determination of amphetamine and related compounds in hair samples. *Forensic Sci. Int.,* **84**: 151-156 (1997a).

Kintz P., Eser H. P., Tracqui A., Moeller M., Cirimele V. & Mangin P., Enantioselective separation of methadone and its main metabolite in human hair by liquid chromatography/ion spray-mass spectrometry. *J. Forensic Sci.,* **42**: 291-295 (1997b).

Kintz P., Tracqui A. & Mangin P., Sweat testing in opioid users with a sweat patch. *J. Anal. Toxicol.,* **20**: 393-397 (1996).

Kintz P., Tracqui A., Marzullo C., Darreye A., Tremeau F., Greth P. & Ludes B., Enantioselective analysis of methadone in sweat as monitored by liquid chromatography/ion spray-mass spectrometry. *Ther Drug Monit,* **20**: 35-40 (1998).

Kobor F., Angermund K. & Schomburg G., Molecular modelling experiments on chiral recognition in GC with specially derivatized cyclodextrins as selectors. *J. High Resolut. Chromatogr.,* **16**: 299-311 (1993).

Koppenhoefer B., Zhu X., Jakob A., Wuerthner S. & Lin B., Separation of drug enantiomers by capillary electrophoresis in the presence of neutral cyclodextrins. *J. Chromatogr. A,* **875**: 135-161 (2000).

Kraemer T. & Maurer H. H., Toxicokinetics of amphetamines: metabolism and toxicokinetic data of designer drugs, amphetamine, methamphetamine, and their N-alkyl derivates. *Ther. Drug Monit.,* **24**: 277-289 (2002).

Kraemer T., Roditis S. K., Peters F. T. & Maurer H. H., Amphetamine concentrations in human urine following single-dose administration of the calcium antagonist prenylamine-studies using fluorescence polarization immunoassay (FPIA) and GC-MS. *J. Anal. Toxicol.,* **27**: 68-73 (2003).

Kristensen K., Angelo H. R. & Blemmer T., Enantioselective high-performance liquid chromatographic method for the determination of methadone in serum using an AGP and a CN as chiral and analytical column. *J. Chromatogr. A,* **666**: 283-287 (1994).

Kronstrand R., Anderson M. C., Ahlner J. & Larson G., Incorporation of selegiline metabolites into hair after selegiline intake. *J. Anal. Toxicol.,* **25**: 594-601 (2001).

Kupiec T. C. & Chaturvedi A., Stereochemical determination of selegiline metabolites in postmortem biological specimens. *J. Forensic Sci.,* **44**: 222-226 (1999).

Lanz M., Brenneisen R. & Thormann W., Enantioselective determination of 3,4-methylene-dioxymethamphetamine and two of its metabolites in human urine by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis,* **18**: 1035-1043 (1997).

Lanz M. & Thormann W., Characterization of the stereoselective metabolism of methadone and its primary metabolite via cyclodextrin capillary electrophoretic determination of their urinary enantiomers. *Electrophoresis,* **17**: 1945-1949 (1996).

Lehotay D. C., George S., Etter M. L., Graybiel K., Eichhorst J., Fern B., Wildenboer W., Selby P. & Kapur B., Free and bound enantiomers of methadone and its metabolite, EDDP in methadone maintenance treatment: relationship to dosage? *Clin. Biochem.,* **38**: 1088-1094 (2005).

Leis H.-J., Rechberger G. N., Fauler G. & Windischhofer W., Enantioselective trace analysis of amphetamine in human plasma by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.,* **17**: 569-575 (2003).

Liau A.-S., Liu J.-T., Lin L.-C., Chiu Y.-C., Shu Y.-R., Tsai C.-C. & Lin C.-H., Optimization of a simple method for the chiral separation of methamphetamine and related compounds in clandestine tablets and urine samples by beta-cyclodextrin modified capillary electrophoresis: a complementary method to GC-MS. *Forensic Sci. Int.,* **134**: 17-24 (2003).

Lim H. K., Hubbard J. W. & Midha K. K., Development of enantioselective gas chromatographic quantitation assay for dl-threo-methylphenidate in biological fluids. *J. Chromatogr.,* **378**: 109-123 (1986).

Lin S.-N., Andrenyak D. M., Moody D. E. & Foltz R. L., Enantioselective gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry for methylphenidate in human plasma. *J. Anal. Toxicol.,* **23**: (1999).

Lipkowitz K. B., Atomistic modeling of enantioselection in chromatography. Review. *J. Chromatogr. A,* **906**: 417-442 (2001).

Lipkowitz K. B., Applications of computational chemistry to the study of cyclodextrins. *Chem. Rev.,* **98**: 1829-1873 (1998).

Lipkowitz K. B., Coner B., Peterson M. A. & Morreale A., Enantioselective binding in gas chromatography: a computational study of chiral selection by permethyl-β-cyclodextrin. *J. Phys. Org. Chem.,* **10**: 311-322 (1997a).

Lipkowitz K. B., Pearl G., Coner B. & Peterson M. A., Explanation of where and how enantioselective binding takes place on permethylated β-cyclodextrin, a chiral stationary phase used in gas chromatography *J. Am. Chem. Soc.,* **119**: 600-610 (1997b).

Lipkowitz K. B. & Stoehr C. M., Detailed experimental and theoretical analysis of chiral discrimination: enantioselective binding of R/S methyl mandelate by β-cyclodextrin. *Chirality,* **8**: 341-350 (1996).

Liu J.-T. & Liu R. H., Enantiomeric composition of abused amine drugs: chromatographic methods of analysis and data interpretation. *J. Biochem. Biophys. Methods,* **54**: 115-146 (2002).

Liu J. H., Coffey H., Detlefsen D. F., Li Y. & Lee M. S., Chiral recognition and racemic resolution of drug enantiomers by electrophoresis based on host-guest complexation. *J. Chromatogr. A,* **763**: 261-269 (1997).

Liu J. H. & Ku W. W., Determination of enantiomeric *N*-trifluoroacetyl-*l*-prolyl chloride amphetamine derivatives by capillary gas chromatography/mass spectrometry with chiral and achiral stationary phase. *Anal. Chem.,* **53**: 2180-2184 (1981).

Liu J. H., Ku W. W., Tsay J. T., Fitzgerald R. L. & Kim S., Approaches to drug sample differentiation. III: A comparative study of the use of chiral and achiral capillary column gas chromatography/mass spectrometry for the determination of methamphetamine enantiomers and possible impurities. *J. Forensic Sci.,* **27**: 39-48 (1982).

Liu Y.-M., Schneider M., Sticha C. M., Toyooka T. & Sweedler J. V., Separation of amino acid and peptide stereoisomers by nonionic micelle-mediated capillary electrophoresis after chiral derivatization. *J. Chromatogr. A,* **800**: 345-354 (1998).

Liu Z., Hara K., Kashimura S., Liu J., Fujii H., Kashiwagi M., Miyoshi A., Yanai T. & Kageura M., Two simple methods for enantiomeric analyses of urinary amphetamines by GC/MS using deuterium-labeled l-amphetamines as internal standards. *Forensic Toxicol.,* **24**: 2-7 (2006).

Lovecchio F., Pizon A., Riley B., Sami A. & D'Incognito C., Onset of symptoms after methadone overdose. *Am. J. Emerg. Med.,* **25**: 57-59 (2007).

Lurie I., Application of micellar electrokinetic capillary chromatography to the analysis of illicit drug seizures. *J. Chromatogr. A,* **780**: 265-284 (1997).

Lurie I., Hays P. & Parker K., Capillary electrophoresis analysis of a wide variety of seized drugs using the same capillary with dynamic coatings. *Electrophoresis,* **25**: 1580-1591 (2004).

Lurie I., Klein R., Dal Cason T., Lebelle M., Brenneisen R. & Weinberger R., Chiral resolution of cationic drugs of forensic interest by capillary electrophoresis with mixtures of neutral and anionic cyclodextrins. *Anal. Chem.,* **66**: 4019-4026 (1994).

Lurie I. S., Bailey C. G., Anex D. S., Bethea M. J., McKibben T. D. & Casale J. F., Profiling impurities in illicit methamphetamine by high-performance liquid and capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A,* **870**: 53-68 (2000).

Martins L. *Mise au point de méthodes de détection et de dosage des énantiomères d'amphétamines*. DEA CPCM: Univerité Henri Poincaré, Nancy I (2004)

Martins L., Yegles M., Chung H.-S. & Wennig R., Simultaneous enantioselective determination of amphetamine and congeners in hair specimens by negative chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B,* **825**: 57-62 (2005).

Martins L., Yegles M., Chung H. & Wennig R., Sensitive, rapid and validated gas chromatography/negative ion chemical ionization-mass spectrometry assay including derivatization with a novel agent for the enantioselective quantification of amphetamine-type stimulants in hair. *J. Chromatogr. B,* **842**: 98-105 (2006).

Maurer H. H., Role of gas chromatography-mass spectrometry with negative ion chemical ionization in clinical and forensic toxicologiy, doping control, and biomonitoring. *Ther. Drug Monit.,* **24**: 247-254 (2002).

Maurer H. H., Kraemer T., Springer D. & Staack R. F., Chemistry, pharmacology, toxicology and hepatic metabolism of designer drugs of amphetamine (ecstasy), piperzine, and pyrrolidineophenone types. *Ther. Drug. Monit.,* **26**: 127-131 (2004).

Meyer A., Mayerhofer A., Kovar K.-A. & Schmidt W. J., Enantioselective metabolism of the designer drugs 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (eve) isomers in rat brain and blood. *Neuroscience Letters,* **330**: 193-197 (2002).

Meyer E., Van Bocxlaer J. F., Dirinck I. M., Lambert W. E., Thienpont L. & De Leenheer A. P., Tissu distribution of amphetamine isomers in a fatal overdose. *J. Anal. Toxicol.,* **21**: 236-239 (1997).

Miki A., Katagi M. & Tsuchihashi H., Determination of methamphetamine and its metabolites incorporated in hair by column-switching liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.,* **27**: 95-102 (2003).

Moeller M., Althaus C. & Sundmacher R., Bilateral candida endophtalmitis in 2 i. v. drug-dependent patients with oral L-methadone substitution. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.,* **211**: 53-56 (1997).

Moeller M. R., Fey P. & Wennig R., Simultaneous determination of drugs of abuse (opiates, cocaine and amphetamine) in human hair by GC/MS and its application to a methadone treatment program. *Forensic Sci. Int.,* **63**: 185-206 (1993).

Moore K. A., Mozayani A., Fierro M. F. & Poklis A., Distribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) stereoisomers in a fatal poisoning. *Forensic Sci. Int.,* **83**: 111-119 (1996).

Mori M., Uozumi Y., Kimura M. & Ban Y., Total synthesis of prothracarcin and tomaymycin by use of palladium catalyzed carbonylation. *Tetrahedron,* **42**: 3793-3806 (1986).

Mura P., Furlanetto S., Cirri M., Maestrelli F., Corti G. & Pinzauti S., Interaction of naproxen with ionic cyclodextrins in aqueous solution and in the solid state. *J. Pharm. Biomed. Anal.,* **37**: 978-994 (2005).

Musshoff F., Illegal or legimate use? Precursor compounds to amphetamine and methamphetamine. *Drug Metab. Reviews,* **31**: 14-44 (2000).

Musshoff F., Lachenmeier D. W. & Madea B., Methadone substitution: medicolegal problems in Germany. *Forensic Sci. Int.,* **133**: 118-124 (2003).

Musshoff F. & Madea B., New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes. *Forensic Sci. Int.,* **165**: 204-215 (2007).

Musshoff F., Sachs H. & Thieme D., Anlage zu den Richlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen. Anhang B: Qualitätsstandards für spezielle Analyte. 2. Untersuchung von Haarproben. *T + K,* **71**: 140-145 (2004).

Nagai T., Kamiyama S. & Nagai T., Forensic toxicologic analysis of methamphetamine and amphetamine by high performance liquid chromatography. *Z Rechtsmed.,* **101**: 151-159 (1988).

Nagai T., Matsushima K., Nagai T., Yanagisawa Y., Fujita A. & Kurosu A., Interpretation and enantiomer analysis of methamphetamine abusers' urine and illegally brewed methamphetamine crystals. *J. Anal. Toxicol.,* **24**: 140-145 (2000).

Nagai T., Matsushima K., Suzuki A., Saotome A., Kurosu A., Nihei H., Kuroyanagi K. & Tokudome S., Enantiomer analysis of a new street drug, 3,4-methylenedioxy-N-methyl-butanamine, in rat urine. *J. Anal. Toxicol.,* **26**: 104-109 (2002).

Nagai T., Sato M., Nagai T., Kamiyama S. & Miura Y., A new analytical method for stereoisomers of methamphetamine and amphetamine and its application to forensic toxicology. *Clin. Biochem.,* **22**: 439-442 (1989).

Nakahara Y., Detection and diagnostic interpretation of amphetamines in hair. *Forensic Sci. Int.,* **70**: 135-153 (1995).

Nakahara Y. & Kikura R., Hair analysis for drugs of abuse XIII: Effect of structural factors on incorporation of drugs into hair: the incorporation rates of amphetamine analogs. *Arch. Toxicol.,* **71**: 841-849 (1996).

Nakahara Y., Takahashi K. & Kikura R., Hair analysis for drugs of abuse X. Effects of physochemical prooperties on drugs on the incorporation rates into hair. *Biol. Pharm. Bull.,* **18**: 1223-1227 (1995).

Nhujak T., Sastravaha C., Palanuvej C. & Petsom A., Chiral separation in capillary electrophoresis using dual neutral cyclodextrins: theoretical models of electrophoretic mobility difference and separation selectivity. *Electrophoresis,* **26**: 3814-3823 (2005).

Nishi H., Nakamura K., Nakai H. & Sato T., Enantiomeric separation of drugs by mucopolysaccharide-mediated electrokinetic chromatography. *Anal. Chem.,* **67**: 2334-2341 (1995).

Nishida K., Itoh S., Inoue N., Kudo K. & Ikeda N., High-performance liquid chromatographic-mass spectrometric determination of methamphetamine and amphetamine enantiomers, desmethylselegiline, selegiline, in hair samples of long-term methamphetamine abusers or selegiline users. *J. Anal. Toxicol.,* **30**: 232-237 (2006).

Nyström I., Trygg T., Woxler P., Ahlner J. & Kronstrand R., Quantitation of *R*-(-)- and *S*-(+)-amphetamine in hair and blood by gas chromatography-mass spectrometry: an application to compliance monitoring in adult-attention deficit hyperactivity disorder treatment. *J. Anal. Toxicol.,* **29**: 682-688 (2005).

OEDT, Rapport annuel 2006: l'état du phénomène de la drogue en Europe. *http://annualreport.emcdda.europa.eu*, (2006).

Ortelli D., Rudaz S., Chevalley A.-F., Mino A., Deglon J.-J., Balant L. & Veuthey J.-L., Enantioselective analysis of methadone in saliva by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A,* **871**: 163-172 (2000).

Parrot A. C., Is ecstasy MDMA? A review of the proportion of ecstasy tablets containing MDMA, their dosage levels, and the changing perceptions of purity. *Psychopharmacology (Berl.),* **173**: 243-241 (2004).

Paul B. D., Jemionek J., Lesser D. & Jacobs A., Enantiomeric separation and quantification of (±)-amphetamine, (±)-methamphetamine, (±)-MDA, (±)-MDMA and (±)-MDEA in urine specimens by GC-EI-MS after derivatization with (*R*)-(-)- or (*S*)-(+)-α-methoxy-α-(trifluoromethy)phenylacetyl chloride (MTPA). *J. Anal. Toxicol.,* **28**: 449-455 (2004).

Pena Sanchez M., Zhang Y., Thibodeaux S., McLaughlin M. L., Munoz de la Pena A. & Warner I. M., Synthesis of a water-soluble chiral *N*-acycalix(4)arene amino acid derivative. *Tetrahedron Lett.,* **37**: 5841-5844 (1996).

Penn S. G., Bergström E. T. & Goodall D. M., Capillary electrophoresis with chiral selectors: optimization of separation and determination of thermodynamic parameters for binding of tioconazole enantiomers to cyclodextrines. *Anal. Chem.,* **66**: 2866-2873 (1994).

Penn S. G., Goodall D. M. & Loran J. S., Differential binding of tioconazole enantiomers to hydroxypropyl-β-cyclodextrin studied by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.,* **636**: (1993).

Pentney A. R., An exploitation of the history and controversies surrounding MDMA and MDA. *J. Psychoactive Drugs,* **33**: 213-221 (2001).

Perret G., Deglon J. J., Kreek M. J., Ho A. & La Harpe R., Lethal methadone intoxication in Geneva, Switzerland, from 1994 to 1998. *Addiction,* **95**: 1647-1653 (2000).

Peters F. T., Kraemer T. & Maurer H. H., Drug testing in blood: validated negative-ion chemical ionization gas chromatographic-mass spectrometric assay for determination of amphetamine and methamphetamine enantiomers and its application to toxicology cases. *Clin. Chem.,* **48**: 1472-1485 (2002).

Peters F. T., Samyn N., Kraemer T., De Boeck G., Lamers C. & Maurer H. H., Validation and application of a GC-NICI-MS assay for enantioselective determination of amphetamines in oral fluid. *TIAFT Melbourne,* (2003a).

Peters F. T., Samyn N., Kraemer T., Riedel W. J. & Maurer H. H., Negative-ion chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry assay for enantioselective measurement of amphetamines in oral fluid: application to a controlled study with MDMA and drinving under the influence cases *Clin. Chem.,* **53**: 702-710 (2007).

Peters F. T., Samyn N., Lamers C. T., Riedel W. J., Kraemer T., De Boeck G. & Maurer H. H., Drug testing in blood: validated negative-ion chemical ionization gas chromatographic-mass spectrometric assay for enantioselective measurement of the designer drugs 3,4-methylenedioxyamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine and its application to samples from a controlled study with MDMA. *Clin. Chem.,* **51**: 1811-1822 (2005).

Peters F. T., Samyn N., Wahl M., Kraemer T., De Boeck G. & Maurer H. H., Concentrations and ratios of amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, and MDEA enantiomers determined in plasma samples from clinical toxicology and driving under the influence of drugs cases by GC-NICI-MS. *J. Anal. Toxicol.,* **27**: 552-559 (2003b).

Pham-Huy C., Villain-Pautet G., Hua H., Chikhi-Chorfi N., Galons H., Thevenin M., Claude J.-R. & Warnet J.-M., Separation of oxazepam, lorazepam, and temazepam enantiomers by HPLC on a derivatized cyclodextrin-bonded phase: application to the determination of oxazepam in plasma. *J. Biochem. Biophys. Methods,* **54**: 287-299 (2002).

Phinney K. W. & Sander L. C., Liquid chromatographic method for the determination of enantiomeric composition of amphetamine and methamphetamine in hair samples. *Anal. Bioanal. Chem.,* **378**: 144-149 (2004).

Pizarro N., Farré M., Pujadas M., Peiró A. M., Roset P. N., Joglar J. & De La Torre R., Stereochemical analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its main metabolites in human samples including the catechol-type metabolite (3,4-dihydroxymethamphetamine). *Drug Metab. Dispos.,* **32**: 1001-1007 (2004).

Pizarro N., Llebaria A., Cano S., Joglar J., Farré M., Segura J. & De La Torre R., Stereochemical analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its main metabolites by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.,* **17**: 330-336 (2003).

Pizarro N., Ortuno J., Farré M., Lopez-Hernandéz C., Pujadas M., Llebaria A., Joglar J., Roset P. N., Mas M., Segura J., Cami J. & De La Torre R., Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by GC-MS and analysis of enantiomers by capillary electrophoresis. *J. Anal. Toxicol.,* **26**: 157-165 (2002).

Pötsch L. & Skopp G., Stability of opiates in the hair fibers after exposure to cosmetic treatment. *Forensic Sci. Int.,* **81**: 85-102 (1996).

Prost F. & Thormann W., Capillary electrophoresis to assess drug metabolism induced *in vitro* using single CYP450 enzymes (Supersomes™): application to the chiral metabolism of mephenytoin and methadone. *Electrophoresis,* **24**: 2577-2587 (2003).

Ramaekers J. G. & Kuypers K. P., Acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on behavioral measures of impulsivity: alone and in combination with alcohol. *Neuropsychopharmacology,* **31**: 1048-1055 (2006).

Ramseier A., Caslavska J. & Thormann W., Stereoselective screening for and confirmation of urinary enantiomers of amphetamine, methamphetamine, designer drugs, methadone and selected metabolites by capillary electrophoresis. *Electrophoresis,* **20**: 2726-2738 (1999).

Rarey M., Kramer B., Lengauer T. & Klebe G., A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J. Mol. Biol.,* **261**: 470- 489 (1996).

Rasmussen L. B., Olsen K. H. & Johansen S. S., Chiral separation and quantification of *R*/*S*-amphetamine, *R*/*S*-methamphetamine, *R*/*S*-MDA, *R*/*S*-MDMA, and *R*/*S*-MDEA in whole blood by GC-EI-MS. *J. Chromatogr. B,* **842**: 136-141 (2006).

Rentsch K. M., The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory. *J. Biochem. Biophys. Methods,* **54**: 1-9 (2002).

Rizzi A. M., Hirz R., Cladrowa-Runge S. & Jonsson H., Enantiomeric separation of amphetamine, methylamphetamine and ring substitued amphetamines by means of a beta-cyclodextrin chiral stationary phase. *Chromatographia,* 131-137 (1994).

Röhrich J. & Kauert G., Determination of amphetamine and methylenedioxy-amphetamine-derivatives in hair. *Forensic Sci. Int.,* **84**: 179-188 (1997).

Rosas Rodriguez M. E., Medrano J. G., Epstein D. H., Moolchan E. T., Preston K. L. & Wainer I. W., Determination of total and free concentrations of the enantiomers of methadone and its metabolite (2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenyl-pyrrolidine) in human plasma by enantioselective liquid chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A,* **1073**: 237-248 (2005).

Rosas Rodriguez M. E., Preston K. L., Epstein D. H., Moolchan E. T. & Wainer I. W., Quantitative determination of enantiomers of methadone and its metabolite (EDDP) in human saliva by enantioselective liquid chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. B,* **796**: 355-370 (2003).

Rothe M., Pragst F., Spiegel K., Harrach T., Fischer K. & Kunkel J., Hair concentrations and self-reported abuse history of 20 amphetamine and ecstasy users. *Forensic Sci. Int.,* **89**: 111-128 (1997).

Rudaz S., Calleri E., Geiser L., Cherkaoui S., Prat J. & Veuthey J.-L., Infinite enantiomeric resolution of basic compounds using highly sulfated cyclodextrin as chiral selector in capillary electrophoresis. *Electrophoresis,* **24**: 2633-2641 (2003).

Rudaz S., Cherkaoui S., Gauvrit J.-Y., Lantéri P. & Veuthey J.-L., Experimental designs to investigate capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry

enantioseparation with the partial-filling technique. *Electrophoresis,* **22**: 3316-3326 (2001).

Rudaz S., Geiser L., Souverain S., Prat J. & Veuthey J.-L., Rapid stereoselective separations of amphetamine derivatives with highly sulfated γ-cyclodextrin. *Electrophoresis,* **26**: 3910-3920 (2005).

Rudaz S., Ortelli D., Gex-Fabry M., Déglon J.-J., Balant L. & Veuthey J.-L., Development of validated stereoselective methods for methadone determination in clinical samples. *Chirality,* **11**: 487-494 (1999a).

Rudaz S. & Veuthey J.-L., Chiral stationary phases in HPLC for the stereoselective determination of methadone. *Chirality,* **11**: 319-325 (1999b).

Rundlett K. L. & Amstrong D. W., Examination of the origin, variation and proper use of expressions for the estimation of association constants by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A,* **721**: 173-186 (1996).

Rundlett K. L. & Amstrong D. W., Methods for the determination of binding constants by capillary electrophoresis. *Electrophoresis,* **22**: 1419-1427 (2001).

Rundlett K. L. & Amstrong D. W., Methods for estimation of binding constants by capillary electrophoresis. *Electrophoresis,* **18**: 2194-2202 (1997).

Sabbah S., Süss F. & Scriba G. K. E., pH-dependence of complexation constants and complex mobility in capillary electrophoresis separations of dipeptide enantiomers. *Electrophoresis,* **22**: 3163-3170 (2001).

Sachs H., Theoretical limits of the evaluation of drug concentrations in hair due to irregular hair growth. *Forensic Sci. Int.,* **70**: 53-61 (1995).

Sadeghipour F. & Veuthey J.-L., Enantiomeric separation of four methylenedioxylated amphetamines on beta-cyclodextrin chiral stationary phases. *Chromatographia,* **47**: 285-288 (1998).

Saenger W., Jacob J., Gessler K., Steiner T., Hoffmann D., Sanbe H., Koizumi K., Smith S. M. & Takaha T., Structures of the common cyclodextrins and their larger analogues-beyond the doughnut. *Chem. Rev.,* **98**: 1787-1802 (1998).

Salvador A., Varesio E., Dreux M. & Veuthey J.-L., Binding constant dependency of amphetamines with various commercial methylated beta-cyclodextrins. *Electrophoresis,* **20**: 2670-2679 (1999).

Scarcella D., Tagliaro F., Turrina S., Manetto G., Nakahara Y., Smith F. P. & Marigo M., Optimization of a simple method for the chiral separation of phenylethylamines of forensic interest based on cyclodextrin complexation capillary electrophoresis and its preliminary application to the analysis of human urine and hair. *Forensic Sci. Int.,* **89**: 33-46 (1997).

Schaeper J. P., Fox S. B. & Sepaniak M. J., Optimization strategies and modeling of separations of dansyl-amino acids by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. Sci,* **39**: 411-419 (2001).

Schaffer M., Hill V. A. & Cairns T., Hair analysis for cocaine: the requirement for effective wash procedures and effects of drug concentration and hair porosity in contamination and decontamination. *J. Anal. Toxicol.,* **29**: 319-326 (2005).

Schardinger F., Über thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch, sowie über einige Umsetzungsprodukte derselben kohlenhydrathaltigen Nährlösungen, darunter krystaillisierte Polysaccharide (Dextrine) aus Stärke. *Z. Unters. Nahr. u. Genuusm.,* **6**: 865-880 (1903).

Schmidt C. J., Acute administration of methylenedioxymethamphetamine: comparison with the neurochemical effects of its N-desmethyl and N-ethyl analogs. *Eur. J. Pharmacol.,* **136**: 81-88 (1987).

Schramm W., Smith R. H. & Craig P. A., Drugs of abuse in saliva: a review. *J. Anal. Toxicol.,* **16**: 1-7 (1992).

Segal R. J. & Catherman R. L., Methadone - a cause of death. *J. Forensic Sci.,* **19**: 64-71 (1974).

Shulgin A. & Shulgin A. *PiHKAL. A chemical love story*. Berkeley, Ca: TRANSFORM PRESS (1991)

Skopp G., Pötsch L. & Möller M. R., On cosmetic treated hair - Aspects and pitfalls of interpretation. *Forensic Sci. Int.,* **84**: 43-52 (1997).

Spanik I., Oswald P. & Krupcik J., Evaluation of non-polar interactions in chiral recognition by alkylated beta- and gamma-cyclodextrin chiral stationary phases. (2002).

Spitzer M., Franke B., Walter H., Buechler J., Wunderlich A. P., WSchwab M., Kovar K.-A., Hermle L. & Grön G., Enantio-selective cognitive and brain activation effects of N-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine in humans. *Neuropsychopharmacology,* **41**: 263-271 (2001).

Springfield A. C., Cartmell L. W., Aufderhide A., Buikstra J. & Ho J., Cocaine and metabolites in the hair of ancient Peruvian coca leaf chewers. *Forensic Sci. Int.,* **63**: 269-275 (1993).

Srinivas N. R., Evaluation of experimental strategies for the development of chiral chromatographic methods based on diastereoisomer formation. *Biomed. Chromatogr.,* **18**: 207-233 (2004).

Srinivasan K., Zhang W. & Bartlett M., Rapid simultaneous capillary electrophoretic determination of (*R*)- and (*S*)-secobartital from serum and prediction of of

hydroxypropyl-γ-cyclodextrin-secobartital stereoselective interaction using molecular mechanics simulation. *J. Chromatogr. Sci,* **36**: 85-89 (1998).

Stout P. R., Claffey D. J. & Ruth J. A., Incorporation and retention of radiolabeled *S*-(+)- and *R*-(-)-methamphetamine and *S*-(+)- and *R*-(-)-N-(n-butyl)-amphetamine in mouse hair after systemic administration. *Drug Metabob. Dispos.,* **28**: 286-291 (2000).

Stout P. R. & Ruth J. A., Deposition of [3H]cocaine, [3H]nicotine, and [3H]flunitrazepam in mouse hair melanosomes after systemic administration. *Drug Metab. Dispos.,* **27**: 731-735 (1999).

Sun Q. & Olesik S. V., Chiral separation by simultaneous use of vancomycin as stationary phase chiral selector and chiral mobile phase additive. *J. Chromatogr. A,* **745**: 156-166 (2000).

Sutton K. L., Sutton R. M. C., Stalcup A. M. & Caruso J. A., A comparison of vancomycin and sulfated beta-cyclodextrin as chiral selectors for enantiomeric separations of seleno-amino acids using capillary electrophoresis with UV absorbance detection. *Analyst,* **125**: 231-234 (2000).

Swist M., Wilamowski J. & Parczewski A., Determination of synthesis method of ecstasy based on the basic impurities. *Forensic Sci. Int.,* **152**: 175-184 (2005).

Szejtli J., Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.,* **98**: 1743-1753 (1998).

Szöko É., Tábi T., Borbás T., Dalmadi B., Tihanyi K. & Magyar K., Assessment of the *N*-oxidation of deprenyl, methamphetamine and amphetamine enantiomers by capillary electrophoresis: an *in vitro* metabolism study. *Electrophoresis,* **25**: 2866-2875 (2004).

Tábi T., Magyar K. & Szöko É., Chiral characterization of deprenyl-*N*-oxide and other deprenyl metabolites by capillary electrophoresis using a dual cyclodextrin system in rat urine. *Electrophoresis,* **24**: 2665-2673 (2003).

Tagliaro F., Manetto G., Bellini S., Scarcella D., Smith F. P. & Marigo M., Simultaneous chiral separation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDE), ephedrine, amphetamine and methamphetamine by capillary electrophoresis in uncoated and coated capillaries with native beta-cyclodextrin as the chiral selector. Preliminary application to the analysis of urine and hair. *Electrophoresis,* **19**: 42-50 (1998).

Tagliaro F., Smith F. P., Turrina S., Esquisetto V. & Marigo M., Complementary use of capillary zone electrophoresis and micellar chromatography for mutual confirmation of results in forensic drug analysis. *J. Chromatogr. A,* **735**: 227-235 (1996).

Takayama N., Tanaka S., Kizu R. & Hayakawa K., High-performance liquid chromatography study on effects of permanent wave, dye and decolorant treatments on methamphetamine and amphetamine in hair. *Biomed. Chromatogr.,* **13**: 257-261 (1999).

Tanaka Y., Iio R., Chinaka S., Takayama N. & Hayakawa K., Identification of reaction products of methamphetamine and hydrogen peroxide in hair dye and decolorant treatments by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.,* **15**: 45-49 (2001).

Tanaka Y. & Terabe S., Partial separation zone technique for the separation of enantiomers by affinity electrokinetic chromatography with proteins as chiral pseudo-stationary phases. *J. Chromatogr. A,* **694**: 277-284 (1995).

Tao Q. F. & Zeng S., Analysis of enantiomers of chiral phenethylamine drugs by capillary gas chromatography/mass spectrometry/flame-ionization detection and pre-column chrial derivatization. *J. Biochem. Biophys. Methods,* **54**: 130-113 (2002).

Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A. & Ando T., Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Anal. Chem.,* **56**: 111-113 (1984).

Terabe S., Shibata M. & Miyashita Y., Chiral separation by electrokinetic chromatography with bile salt micelles. *J. Chromatogr.,* **480**: 403-411 (1989).

Thormann W., Aebi Y., Lanz M. & Caslavska J., Capillary electrophoresis in clinical toxicology. *Forensic Sci. Int.,* **92**: 157-183 (1998).

Thormann W., Lurie I. S., McCord B., Marti U., Canni B. & Malik N., Advance of capillary electrophoresis in clinical and forensic analysis (1999-2000). *Electrophoresis,* **22**: 4216-4243 (2001).

Toyo'oka T., Resolution of chiral drugs by liquid chromatography based upon diastereoisomer formation with chiral derivatization reagents. *J. Biochem. Biophys. Methods,* **54**: 25-36 (2002).

Trkulja S. & Kovar K.-A., Definite peak identification of (*R*)- and (*S*)-methadone and (*R*)- and (*S*)-EDDP using established HPLC and CE methods. *J. Sep. Sci.,* **27**: 557-559 (2004).

Uhl M., Determination of drugs in hair using GC/MS/MS. *Forensic Sci. Int.,* **84**: 281-294 (1997).

UNODC, World Drug Report. *http://www.unodc.org/unodc/en/world_drug_report.html,* **1 + 2**: (2006).

Uozumi Y., Mizutani K. & Nagai S.-I., A parallel preparation of a bicyclic N-chiral amine library and its use for chiral catalyst screening. *Tetrahedron Lett.,* **38**: 407-410 (2001a).

Uozumi Y., Yasoshima K., Miyachi T. & Nagai S.-I., Enantioselective desymmetrization of meso-cyclic anhydrides catalyzed by hexahydro-1H-pyrrolo[1,2-c]imidazolones. *Tetrahedron Lett.,* **42**: 411-414 (2001b).

Van Bocxlaer J. F., Lambert W. E., Thienpont L. & De Leenheer A. P., Quantitative determination of amphetamine and alpha-phenylethylamine enantiomers in judicial samples using capillary gas chromatography. *J. Anal. Toxicol.,* **21**: 5-11 (1997).

Varesio E. & Veuthey J.-L., Chiral separation of amphetamines by high-performance capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A,* **717**: 219-228 (1995).

Verstraete A. G., Oral fluid testing for driving under the influence of drugs: history, recent progress and remaining challenges. *Forensic Sci. Int.,* **150**: 143-150 (2005).

Vescina M. C., Fermier A. M. & Guo Y., Comparing cyclodextrine derivates as chiral selectors for enantiomeric separation in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A,* **973**: 187-196 (2002).

Villiers M. A., Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. *Compt. Rend Acad. Sci,* **112**: 536-538 (1891).

Walsh J. M., Flegel R., Crouch D. J., Cangianelli L. & Baudys J., An evaluation of rapid point-of-collection oral fluid drug-testing devices. *J. Anal. Toxicol.,* **27**: 429-439 (2003).

Wan H., Wang Y., Ou Q. & Yu W., Improved enantiomeric separation with a 2,6-di-*O*-pentyl-3-O-trifluoroacetylated β-cyclodextrin and OV-7 mixed stationary phase chiral capillary column. *J. Chromatogr.,* **644**: 202-207 (1993).

Wang J., Cieplak P. & Kollman P. A., How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules. *J. Comput. Chem.,* **21**: 1049-1074 (2000).

Wang M., Marriot P. J., Chan W.-H., Lee A. W. M. & Huie C. W., Enantiomeric separation and quantification of ephedrine-type alkaloids in herbal materials by comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. A,* **1112**: 361-368 (2006).

Wedig M., Laug S., Christians T., Thunhorst M. & Holzgabe U., Do we know the mechanism of chiral recognition between cyclodextrins and analytes? *Pharm and Biomed Anal.,* **27**: 531-540 (2002).

Weinberger R. & Lurie I., Micellar electrokinetic capillary chromatography of illicit drug substances. *Anal. Chem.,* **63**: 823-827 (1991).

Weiner P. K. & Kollman P. A., Assisted model building with energy refinement. A general program for modeling molecules and their interactions. *J. Comput. Chem.,* **2**: 287-303 (1981).

Westley J. W. & Halpern B., Effect of solute structure on separation of diastereomeric esters and amides by gas-liquid chromatography. *Anal. Chem.,* **40**: 2046-2049 (1968).

Whittington D., Sheffels P. & Kharasch E. D., Stereoselective determination of methadone and the primary metabolite EDDP in human plasma by automated on-line extraction and liquid chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. B,* **809**: 313-321 (2004).

Wilkins D. G., Valdez A. S., Nagasawa P. R., Gygi S. P. & Rollins D. E., Incorporation of drugs for the treatment of substance abuse into pigmented and nonpigmented hair. *J. Pharm. Sci.,* **87**: 435-440 (1998).

Wind M., Hoffmann P., Wagner H. & Thormann W., Chiral capillary electrophoresis as predictor for separation of drug enantiomers in continuos flow zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A,* **895**: 51-65 (2000).

Wipff G., Weiner P. K. & Kollman P., A molecular mechanics study of a 18-crown-6 and its alkali complexes: an analysis of structural flexibility, ligand specificity and the macrocyclic effect. *J. Am. Chem. Soc.,* **104**: 3249-3262 (1982).

Wistuba D., Czesla H., Roeder M. & Schuring V., Enantiomer separation by pressure-supported electrochromatography using capillaries packed with a permethyl-beta-cyclodextrin stationary. *J. Chromatogr. A,* **815**: 183-188 (1998).

Wistuba D. & Schuring V., Recent progress in enantiomer separation by capillary electrochromatography. *Electrophoresis,* **21**: 4136-4158 (2000).

Wolff K., Characterization of methadone overdose: clinical considerations and the scientific evidence. *Ther. Drug. Monit.,* **24**: 457-470 (2002).

Wolff K., Hay A. & Raistrick D., Methadone in saliva. *Clin. Chem.,* **37**: 1297-1298 (1991).

Wren S. A. C., Theory of chiral separation in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.,* **636**: 57-62 (1993).

Wren S. A. C., Chiral separation in capillary electrophoresis. *Electrophoresis,* **16**: 2127-2131 (1995).

Wren S. A. C. & Rowe R. C., Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrohoresis III. Application to β-blockers. *J. Chromatogr.,* **635**: 113-118 (1993).

Wren S. A. C. & Rowe R. C., Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis II. The role of organic solvent. *J. Chromatogr.,* **609**: 363-367 (1992a).

Wren S. A. C. & Rowe R. C., Thereoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis I. Initial evaluation of a model. *J. Chromatogr.,* **603**: 235-241 (1992b).

Wren S. A. C., Rowe R. C. & Payne R. S., A theoretical approach to chiral capillary electrophoresis with some pratical implications. *Electrophoresis,* **15**: 774-778 (1994).

Wylie F. M., Torrance H., Anderson R. A. & Oliver J. S., Drugs in oral fluid Part I. Validation of an analytical procedure for licit and illicit drugs in oral fluid. *Forensic Sci. Int.,* **150**: 191-198 (2005).

Yegles M., Pitfalls in hair analysis: cosmetic treatment. *Ann. Toxicol. Anal.,* **XVII**: 275-278 (2005).

Yegles M., Marson Y. & Wennig R., Influence of bleaching on stability of benzodiazepines in hair. *Forensic Sci. Int.,* **107**: 87-92 (2000).

Yonamine M., Tawil N., Moreau de Moares R. L. & Silva A. O., Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry and headspace-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples. *J. Chromatogr. B,* **789**: 73-78 (2003).

Zaugg S. & Thormann W., Enantioselective determination of drugs in body fluids by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A,* **875**: 27-41 (2000).

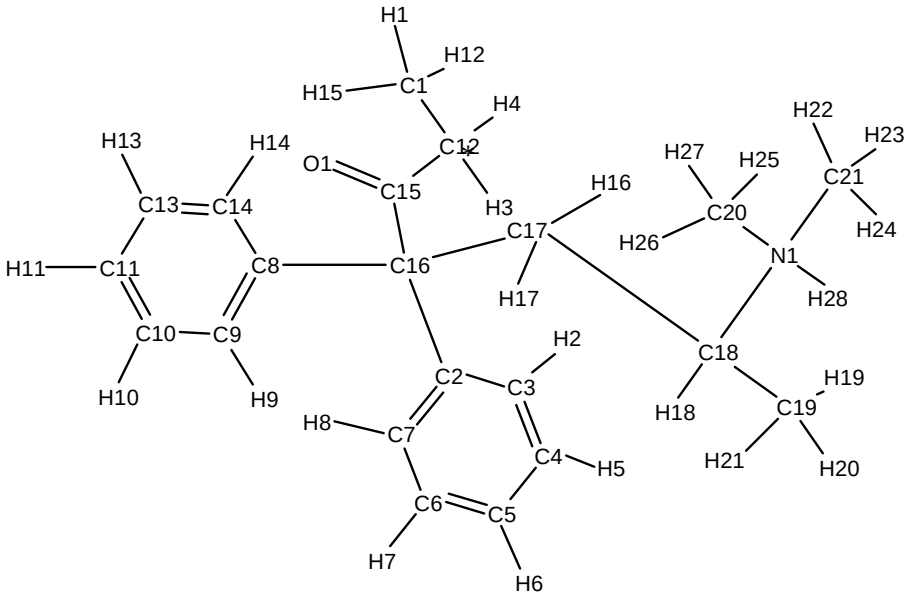
Zhang G., Hong Z., Chai Y., Zhu Z., Song Y., Liu C., Ji S., Yin X. & Wu Y., A study on the chiral recognition mechanism of enantioseparation of adrenaline and its analogues using capillary electrophoresis. *Chem. Pharm. Bull.,* **55**: 324-327 (2007).

Zukowski J., de Biasi V. & Berthod A., Chiral separation of basic drugs by capillary electrophoresis with carboxymethylcyclodextrins. *J. Chromatogr. A,* **948**: 331-342 (2002).

Annexes

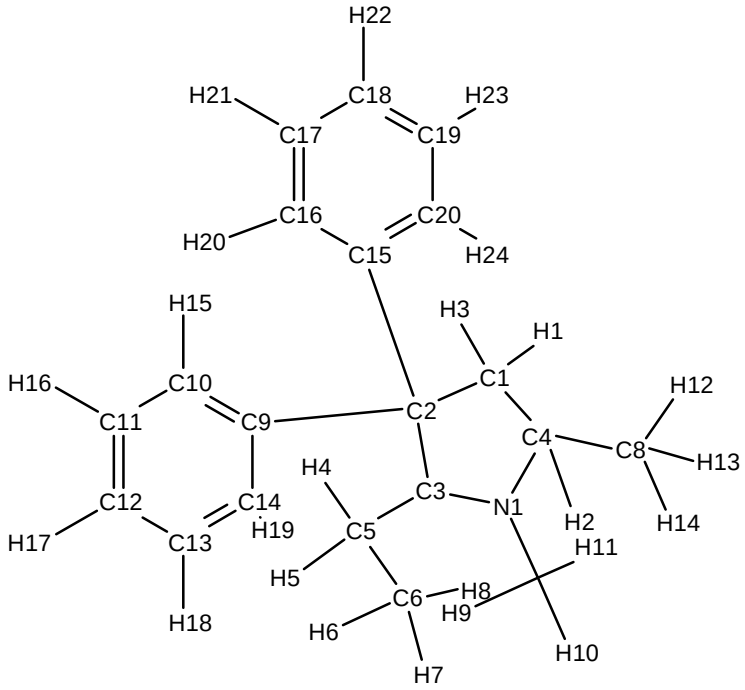
1. Charges atomiques et noms des atomes de la MTD utilisés dans AMBER

Atomes	Charges atomiques
C1	-0,0359
C2	-0,0109
C3	-0,1385
C4	-0,0787
C5	-0,1726
C6	-0,0787
C7	-0,1385
C8	-0,0109
C9	-0,1385
C10	-0,0787
C11	-0,1633
C12	0,0189
C13	-0,0787
C14	-0,1385
C15	0,4853
C16	-0,022
C17	-0,9767
C18	0,1035
C19	-0,3360
C20	-0,2486
C21	-0,2486
O1	-0,4250
N1	0,0097
H1	0,0267
H2	0,1418
H3	0,0353
H4	0,0353
H5	0,1389
H6	0,1605
H7	0,1389
H8	0,1418
H9	0,1418
H10	0,1389
H11	0,1605
H12	0,0267
H13	0,1389
H14	0,1418
H15	0,0267
H16	0,3583
H17	0,3583
H18	0,1732
H19	0,1277
H20	0,1277
H21	0,1277
H22	0,1397
H23	0,1397
H24	0,1397
H25	0,1397
H26	0,1397
H27	0,1397
H28	0,1872



2. Charges atomiques et noms des atomes de l'EDDP utilisés dans AMBER

Atomes	Charges atomiques
C1	-0,0482
C2	0,0160
C3	0,0476
C4	0,2616
C5	-0,0737
C6	-0,0428
C7	-0,2537
C8	-0,0522
C9	0,0354
C10	-0,1100
C11	-0,1966
C12	-0,0599
C13	-0,1966
C14	-0,1100
C15	0,0354
C16	-0,1100
C17	-0,1966
C18	-0,0599
C19	-0,1966
C20	-0,1100
N1	0,0167
H1	0,0410
H2	-0,0116
H3	0,0410
H4	0,0946
H5	0,0946
H6	0,0410
H7	0,0410
H8	0,0410
H9	0,1393
H10	0,1393
H11	0,1393
H12	0,0319
H13	0,0319
H14	0,0319
H15	0,1364
H16	0,1654
H17	0,1503
H18	0,1654
H19	0,1364
H20	0,1364
H21	0,1654
H22	0,1503
H23	0,1654
H24	0,1364



3. Charges atomiques et noms des atomes de la MDA utilisés sous AMBER

Atomes	Charges atomiques
C1	0,3208
C2	-0,2805
C3	-0,2361
C4	0,0208
C5	-0,3463
C6	0,2819
C7	0,2896
C8	-0,1372
C9	0,1628
C10	-0,2097
N1	-0,4211
O1	-0,4034
O2	-0,4003

H1	0,2278
H2	0,1739
H3	0,2122
H4	0,1007
H5	0,1007
H6	0,1069
H7	0,1069
H8	0,1002
H9	0,0915
H10	0,0915
H11	0,0915
H12	0,3182
H13	0,3182
H14	0,3182

