

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère De l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri
Faculté de médecine
Département de Pharmacie
TIZI OUZOU

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة مولود معمري
كلية الطب
قسم صيدلة
تيزي وزو



N° D'ordre

٢٠٢٤/٢٠٢٣

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Présenté sous forme d'article et soutenu publiquement
En vue de l'obtention du diplôme de docteur en Pharmacie

Le : 20 Juin 2024

Thème :

**Mise au point et validation d'une technique de dépistage urinaire
de la prégabaline par spectrophotométrie UV/Visible**

Présenté par :

M^{lle} ALIANE Yasmine

M^{lle} CHERFI Melissa

M^{lle} BOUZID Dihia

Encadré par :

D^r BELAZOUGUI Ourdia

Membres du jury :

P^r MEKACHER L.R

Professeur en Toxicologie CHU de TIZI-OUZOU

Président

D^r MATMAR.A

Assistant en toxicologie CHU de TIZI-OUZOU

Examineur

D^r BEN SI SAID.H

MAHU en chimie analytique CHU de TIZI-OUZOU

Examineur

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2023/2024

Résumé

La prégabaline, analogue de l'acide gamma-aminobutyrique, a été approuvée par la Food and Drug Administration pour le traitement de l'épilepsie, de la fibromyalgie et des douleurs neuropathiques. De nombreux cas d'abus et de mésusage ont été signalés principalement aux États-Unis et au Royaume-Uni, mais également en Algérie où on lui a attribué le nom Saroukh. Ceci a incité la mise en œuvre d'une technique de dépistage de la prégabaline dans les matrices biologiques. Au cours de notre travail, une méthode spectrophotométrique permettant sa détection dans les urines, a été optimisée et validée, suivant les recommandations de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques et de la Société Française de Toxicologie Analytique, puis comparée à une technique immuno-chromatographique. Notre méthode est semi-quantitative, basée sur une réaction colorimétrique entre la ninhydrine et la fonction amine de la prégabaline dans des conditions optimisées, formant ainsi un chromophore de couleur violette absorbant à 410 nm et 560 nm. Au cours de cette réaction, un effet matrice a été observé, ce qui a nécessité une extraction liquide-liquide de la molécule recherchée. Dans l'intervalle d'analyse [100 mg/l ; 500 mg/l], les paramètres de linéarité, fidélité et répétabilité ont été vérifiés. Aucune interférence endogène ni exogène n'a été détectée, avec certains médicaments utilisés en routine, lors de l'étude de la spécificité, à l'exception de la gabapentine. Notre méthode permet de dépister les échantillons ayant une concentration supérieure à 20 mg/l (LOD), conservés jusqu'à 1 mois à +4°C. Cette technique est simple, rapide et peu coûteuse, pouvant être utilisée en routine comme alternative aux méthodes chromatographiques.

Mots-clés : Prégabaline, dépistage, spectrophotométrie, urines, semi-quantitative, réaction colorimétrique, ninhydrine.

Abstract

Pregabalin, a gamma-aminobutyric acid analogue, has been approved by the Food and Drug Administration for the treatment of epilepsy, fibromyalgia, and neuropathic pain. Many cases of abuse and misuse have been reported mainly in the United States and the United Kingdom, but also in Algeria where it was given the name Saroukh. This prompted the implementation of a screening technique for pregabalin in biological matrices. During our work, a spectrophotometric method allowing its detection in urine was optimized and validated, following the recommendations of the French Society of Pharmaceutical Sciences and Techniques and the French Society of Analytical Toxicology, then compared to an immuno-chromatographic technique. Our method is semi-quantitative, based on a colorimetric reaction between ninhydrin and the amine function of pregabalin under optimized conditions, thus forming a violet-colored chromophore absorbing at 410 nm and 560 nm. During this reaction, a matrix effect was observed, which required a liquid-liquid extraction of the target molecule. In the analysis range [100 mg/l; 500 mg/l], the linearity, precision and repeatability parameters were verified. No endogenous or exogenous interference was detected, with certain routinely used medications, during the specificity study, except for gabapentin. Our method allows for the screening of samples with a concentration higher than 20 mg/l (LOD), stored for up to 1 month at +4°C. This technique is simple, fast, and inexpensive, serving as a routine alternative to chromatographic methods.

Keywords: Pregabalin, screening, spectrophotometry, urine, semi-quantitative, colorimetric reaction, ninhydrin.

1. Introduction

La prégabaline est un médicament non opioïde (1) faisant partie de la famille des gabapentinoïdes, dont la gabapentine est le chef de file (2). Sa formule chimique est désignée sous le nom d'acide (S)-3-(aminométhyl)-5-acide méthylhexanoïque (3). C'est l'analogue de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) (1), principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. Elle se distingue par l'ajout d'une chaîne aliphatique "isobutyl" en position 3 sur la structure du GABA (Figure 1), donnant ainsi le 3-isobutylgaba (4) qui existe sous forme d'isomères, le S-(+)-3-isobutylgaba étant l'énantiomère pharmacologiquement actif (4). Cette substitution lui confère une lipophilie accrue qui facilite sa diffusion à travers la barrière hémato-encéphalique (4), améliorant ainsi son efficacité dans le traitement de diverses affections du système nerveux central. Des études in vitro suggèrent que cette similitude structurelle que possède la prégabaline avec le GABA ne fait pas d'elle un agoniste des récepteurs GABA (5), mais que ses effets pharmacologiques semblent découler de son interaction sélective avec la sous-unité alpha-2-delta, associée aux canaux calciques présynaptiques voltage-dépendants du système nerveux central (SNC) (4); Entraînant une inhibition de la libération de neurotransmetteurs excitateurs, notamment du glutamate (6).

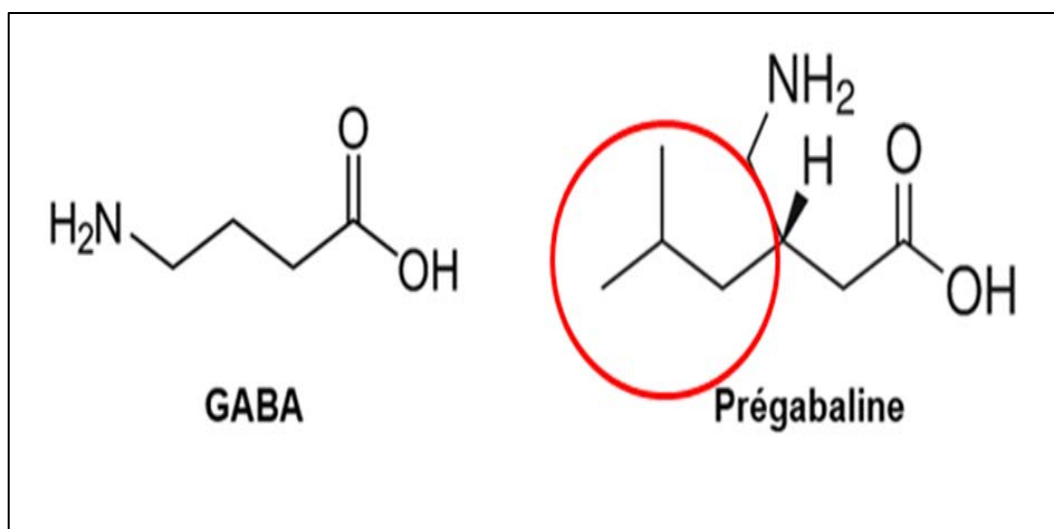


Figure 1. Structure chimique du GABA et son dérivé la prégabaline

La prégabaline a reçu l'approbation de la Food and Drug Administration (FDA) en 2004 pour le traitement de l'épilepsie, de la fibromyalgie et des douleurs neuropathiques (7), avec des doses généralement comprises entre 150 mg et 600 mg par jour (8). Toutefois, malgré ses effets bénéfiques bien documentés, la prégabaline suscite des préoccupations croissantes en raison de son potentiel à induire des effets euphorisants (9). Cette problématique s'est accentuée

avec l'élargissement des indications, qu'elles soient approuvées ou non approuvées (hors AMM) (7) (9), pour inclure le traitement d'appoint chez les adultes souffrant de troubles tels que le trouble d'anxiété généralisée (TAG) ou le trouble d'anxiété sociale (TAS), les troubles bipolaires et les insomnies (7). Ceci a conduit à une augmentation notable des cas d'abus et de dépendance à la prégabaline, principalement observée aux États-Unis (10) et au Royaume-Uni (11).

Une tendance alarmante émerge également en Algérie (12), où le détournement de cette substance est devenu un phénomène préoccupant en raison de sa disponibilité sur le marché noir (13). Elle est désignée sous le nom de "Saroukh", un terme arabe qui évoque une fusée en raison de l'état d'euphorie qu'elle confère et de sa couleur rouge et blanche distinctive (10) (14). Selon les statistiques de 2023, fournies par le Centre National de Toxicologie d'Algérie, la prévalence de consommation de la prégabaline dans le cadre de toxicomanie était de 51.3%.

Il est souvent décrit que l'ingestion isolée de la prégabaline à doses élevées donne généralement des symptômes légers (sommolence, céphalées, tremblements et tachycardie) (2). Cependant, des cas de coma ont été signalés à des concentrations plasmatiques allant jusqu'à 66.5 mg/l (15), alors que les concentrations sériques à doses thérapeutiques de prégabaline variaient de 0.9 à 14.2 mg/l (15). En outre, une utilisation concomitante de cette molécule avec des médicaments psychotropes, tels que les opioïdes et les benzodiazépines, est souvent décrite (16). Cette association entraîne une potentialisation des effets de ces médicaments (17), augmentant ainsi le risque de complications graves (16).

Les laboratoires de toxicologie sont donc confrontés à une demande croissante de la part des professionnels de santé, pour son dépistage chez les consommateurs de drogues, les incitant à mettre en œuvre des méthodes sophistiquées pour détecter la présence de prégabaline dans les matrices biologiques. Compte tenu de sa cinétique particulière dans l'organisme, caractérisée par son faible métabolisme chez l'homme, représentant moins de 2%, et son élimination principale par voie rénale sous forme inchangée (4), diverses méthodes chromatographiques (18), électrophorétiques (19), spectro-fluorimétriques (20) et spectrophotométriques (21) (22) sont en cours de développement dans le but de parvenir à une méthode fiable pour détecter la présence de cette substance dans la matrice urinaire.

L'objectif de notre étude est d'optimiser et valider une méthode spectrophotométrique, permettant la détection de la prégabaline dans la matrice urinaire, puis la comparer avec une technique immuno-chromatographique couramment utilisée dans les laboratoires.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

2.1.1. Matière première et réactifs

L'étalon **prégabaline** a été fourni par le laboratoire Pharmalliance.

Acétonitrile (C₂H₃N) CAS N°75-05-8, PM= 41.05 g/mol, Densité= 0.79 g/cm³, TB= 81.6°C, laboratoire Honeywell.

Chlorure de sodium (NaCl) PM= 58,44 g/mol, Densité= 2,16 g/cm³ (20 °C), laboratoire SIGMA-ALDRICH.

Ninhydrine (C₉H₆O₄) CAS N°485-47-2, PM= 178.14 g/mol, laboratoire BIOCHEM Chemopharma.

Alcool éthylique ou Ethanol (C₂H₆O) CAS N° 64-17-5, PM= 46.07 g/mol, laboratoire SIGMA-ALDRICH.

Eau distillée (H₂O) PM= 18 g/mol.

2.1.2. Instrumentation

Spectrophotomètre UV/Visible

Spectrophotomètre à faisceau unique Modèle 752N : Gamme spectrale de 200 à 1000 nm. Longueur d'onde de Précision : ±2 nm.

Type de monochromateur : Czerny-Turner. Détecteur : cellule photoélectrique de silicium (23).

Spectrophotomètre à double faisceau Modèle SHIMADZU UV-1900i : Gamme spectrale de 190 à 1100 nm.

Type de monochromateur : Czerny-Turner. Détecteur : Silicone photodiode (24).

Bain marie : Memmertwnb 22, Gamme de température allant jusqu'à +95°C.

Balance : Kern ABJ, Linéarité ± 0,0003g, Reproductibilité 0,0002g.

Centrifugeuse : Hettich EBA 20, Vitesse maximale 6000 tours par minute.

Vortex : Nahita 681/5.

Logiciels : Microsoft office EXCEL.

Test immuno-chromatographique : Kashif Narcotest, procuré par le laboratoire KING DIAGNOSTICS.

2.2. Méthodes

2.2.1. Principe de la méthode

Il s'agit d'une méthode semi-quantitative basée sur une réaction colorimétrique qui permet la mise en évidence de la pré-gabaline en présence de la ninhydrine, un puissant agent oxydant connu pour sa réactivité envers les fonctions amines, formant ainsi un chromophore qui lui sera identifié ultérieurement par spectrophotométrie.

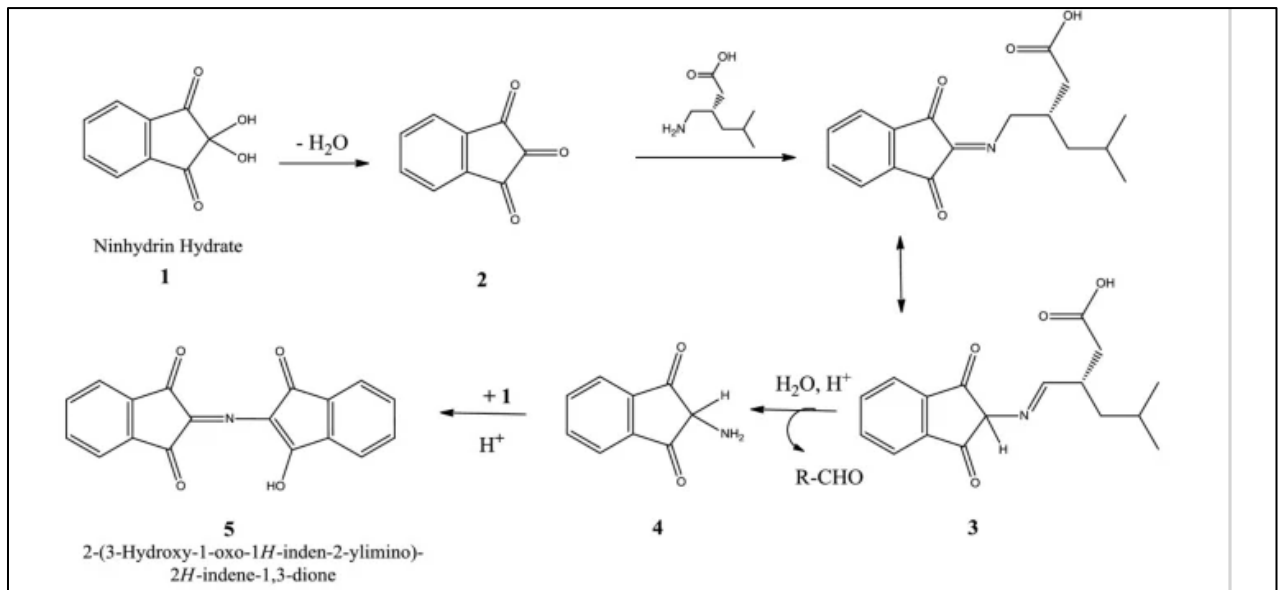


Figure 2. La réaction de la pré-gabaline avec la ninhydrine

2.2.2. Préparation des solutions de travail

Préparation de la solution de ninhydrine (2,2-dihydroxyindane-1,3-dione) à 2% (m/v)

2g de ninhydrine sont pesés et solubilisés dans 100 ml de solution éthanolique, à l'abri de la lumière, ensuite homogénéisés à l'aide d'un agitateur magnétique sans chauffage. La solution devra être conservée dans un flacon brun à +4°C.

Préparation d'une solution mère de pré-gabaline (1000 mg/l)

Une solution mère à une concentration de 1000 mg/l est préparée dans une fiole jaugée, en faisant dissoudre 50 mg de pré-gabaline dans 50 ml d'eau distillée, ensuite bien homogénéiser la solution pour que toute la quantité soit dissoute.

Cette solution mère sera utilisée ultérieurement pour la préparation des solutions étalons. Elle devra être stockée à +4°C.

Préparation des solutions standards

Les solutions étalons d'urines chargées en prégabaline sont préparées comme suit : A partir de la solution mère de prégabaline (1000 mg/l), des quantités ont été prélevées et transférées dans des tubes en verre puis complétées au volume final par l'urine d'un individu sain suivant le tableau ci-dessous :

Tableau I. Préparation des solutions standards

Concentrations (mg/l)	Blancs	100	200	300	400	500
Volume de la solution mère (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Volume d'urine à ajouter (ml)	2	1.8	1.6	1.4	1.2	1
Volume final (ml)	2	2	2	2	2	2

2.2.3. Mode opératoire

Le protocole suivi au cours de notre étude se réfère à l'article de Anissa Zergui et co.(22), après optimisation de certaines conditions.

Aux solutions étalons et aux blancs préparés précédemment, rajouter 2ml d'acétonitrile et mélanger pendant quelques secondes.

Ajouter 0.5g de chlorure de sodium dans chaque tube.

Vortexer les tubes pendant 2 minutes, puis centrifuger à 3000 tours par minute pendant 3 minutes.

Récupérer les surnageants dans des tubes propres en verre.

Réaliser une deuxième extraction sur le culot de la même manière, puis récupérer les surnageants dans les mêmes tubes précédents.

Une fois la double extraction est réalisée, rajouter 1 ml de la solution de ninhydrine à 2% (m/v) dans tous les tubes.

Mélanger et mettre les tubes au bain marie réglé à 70-75°C pendant 20 minutes, puis les refroidir pendant 5 minutes à l'abri de la lumière.

Faire un scan (200-800 nm) puis une lecture des absorbances à la longueur d'onde 560 nm en utilisant un spectrophotomètre UV/Visible.

Préparer un échantillon de prégabaline dans l'eau à une concentration de 500 mg/l puis faire un scan au spectrophotomètre à balayage.

2.2.4. Protocole de validation

Il s'agit d'une méthode semi-quantitative, dont la validation de certains paramètres essentiels pour l'analyse semi-quantitative a été effectuée suivant les recommandations de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP 2003-2006) et de la Société Française de Toxicologie Analytique (25). Les paramètres exigés sont : la spécificité, la fonction de réponse, la linéarité, la limite de détection, la stabilité, la fidélité intermédiaire et la répétabilité.

2.2.4.1. Spécificité et sélectivité

Spécificité exogène

Afin de démontrer que la majorité des substances exogènes n'interfère pas avec la détection de la prégabaline en utilisant la méthode décrite, nous avons testé une large gamme de médicaments (39 médicaments) à des concentrations de 500 mg/l. Ces médicaments ont été choisis car souvent retrouvés lors de dépistages de drogues (psychotropes) ou utilisés en automédication (anti-infectieux, antalgiques...).

Les médicaments étudiés :

Diazépam, prazépam , clonazépam , tétrazépam , oxazépam , halopéridol, dépakine, codéine, rispéridone, sulpiride, levomépromazine, escitalopram, zolpidem, carbamazépine, paroxétine, fluoxétine, tramadol, sertraline, levetacetam, amitrypyline, gabapentine, paracétamol, hydroxyzine, cyproheptadine, doxycycline, pristinamycine, spiramycine, céfalexine, griséofulvine, métronidazole, fluconazole, loratadine, ibuprofène, acide acétylsalicylique, lévothyroxine, furosémide, celecoxib, métoprolamide, amlodipine.

Pour compléter l'étude, des échantillons urinaires de personnes consommant des médicaments notamment métronidazole, néomycine, nystatine, polymyxine B, céfalexine, barbituriques, benzodiazépines, antidépresseurs tricycliques, ont été analysés afin d'évaluer d'éventuelles interférences avec la prégabaline dues à leurs métabolites.

Spécificité endogène

Plusieurs substances présentes dans notre organisme pourraient interférer avec la détection de la prégabaline dans la matrice urinaire. Pour cela, cinq échantillons blancs d'urines d'individus sains, ainsi qu'un échantillon d'un patient (non traité par la prégabaline) atteint d'une protéinurie, ont été testés.

2.2.4.2. Fonction de réponse (courbe d'étalonnage)

Selon le protocole de la SFSTP, on a effectué 3 séries de 5 concentrations chacune (100, 200, 300, 400, 500) mg/l, a raison d'une série par jour.

Une relation s'établit entre les absorbances (Y) et la concentration de prégabaline (X) présente dans l'échantillon urinaire.

Celle-ci se caractérise par une fonction $Y = f(X) + \epsilon$ et doit être strictement monotone sur l'intervalle d'analyse envisagé. (ϵ : erreur résiduelle)

2.2.4.3. Linéarité

Selon le protocole de la SFSTP, il est nécessaire d'obtenir des concentrations calculées proportionnelles aux concentrations introduites pour établir la relation suivante :

$$\text{Concentrations calculées} = f(\text{concentrations introduites}).$$

2.2.4.4. Limite de détection (LD)

C'est la concentration calculée à partir des écarts-types des résultats des courbes d'étalonnage, en appliquant la relation suivante :

$$\text{LD} = 3 \cdot \sigma / S$$

S: pente

σ : écart-type

2.2.4.5. Stabilité

Stabilité de l'échantillon

La stabilité a été évaluée à 2 niveaux de concentration (100 mg/l et 200 mg/l), en faisant varier certains paramètres de conservation :

Le délai entre le prélèvement et l'analyse : 7 jours, 15 jours, 1 mois.

La température : conservation au congélateur à -20°C, au réfrigérateur à +4°C et à température ambiante à +24°C.

La lumière et l'obscurité.

Stabilité des réactifs

La stabilité de la ninhydrine a été évaluée en l'utilisant au moment et après une semaine de sa préparation.

2.2.4.6. Fidélité intermédiaire et Répétabilité

Des standards de validation à trois niveaux de concentrations (150 mg/l, 250 mg/l et 450 mg/l) ont été effectués pendant 3 jours à raison de trois répétitions par série (J1, J2, J3).

Le coefficient de variation (CV) a été calculé :

$$\text{CV} = \text{Ecart type} \times 100 / \text{moyenne}$$

CV de répétabilité : à partir des absorbances du même jour.

CV de fidélité intermédiaire : à partir des absorbances des trois jours.

2.2.5. Comparaison avec une technique immuno-chromatographique (kashif)

Principe de la technique kashif narcotest

Ce test immuno-chromatographique est conçu pour la détection qualitative de plusieurs substances psychoactives dans un échantillon d'urine. Il repose sur le principe de la liaison compétitive, où l'échantillon d'urine migre par capillarité. Si la drogue est présente dans l'échantillon à un niveau inférieur au seuil de détection, une ligne colorée visible apparaîtra dans la région de la ligne de test (T). En revanche, si la concentration de la drogue dépasse le seuil de détection, tous les sites de liaison de l'anticorps anti-drogue correspondant seront saturés, empêchant l'apparition de la ligne colorée. Le seuil de détection de la prégabaline par ce test est de 2 mg/l (26).

Afin de confirmer la validité des résultats de notre étude, une comparaison a été effectuée entre la technique immuno-chromatographique kashif et notre méthode précédemment validée, en analysant 27 échantillons urinaires positifs et négatifs à la prégabaline.

3. Résultats

La réaction entre la fonction amine de la prégabaline et la ninhydrine a donné lieu à un chromophore de couleur violette, dont le spectre a été obtenu par spectrophotométrie à balayage (200-800 nm). Les pics maximaux d'absorbance de la prégabaline ont été révélés à 410 nm et à 560 nm.

Le scan effectué pour l'échantillon de prégabaline dans l'eau ainsi que dans l'urine donne les spectres suivants :

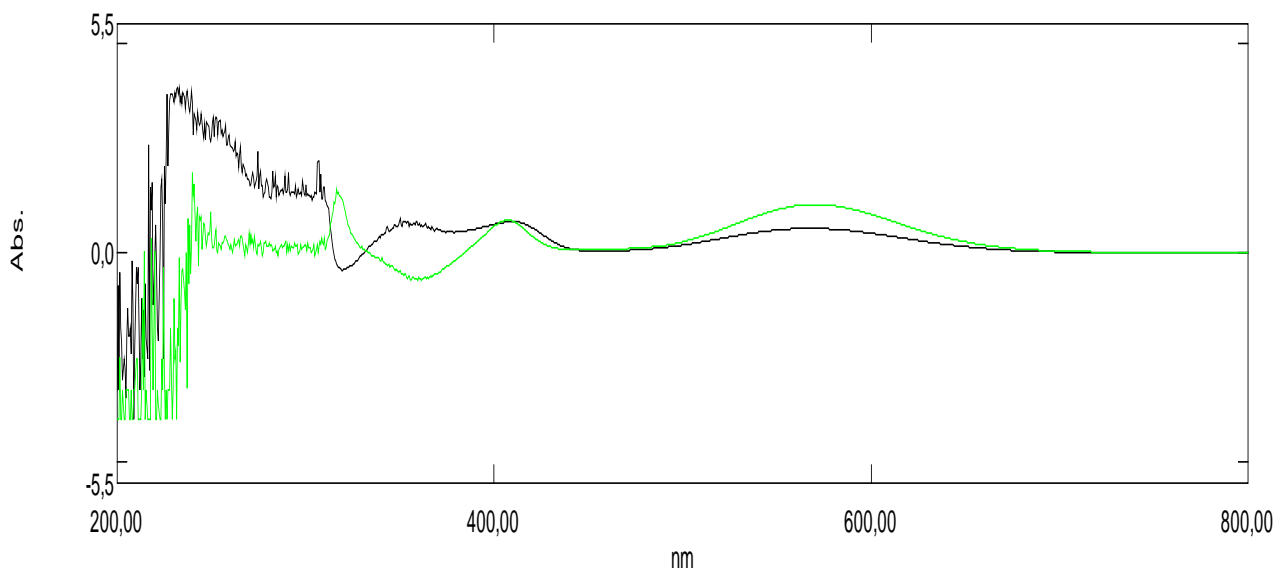


Figure 3. Spectres UV/Visible du produit chromophore de la prégabaline dans l'eau (vert) et dans l'urine (Noir)

Nous présentons dans la figure ci-dessous les spectres des concentrations croissantes de la prégabaline :

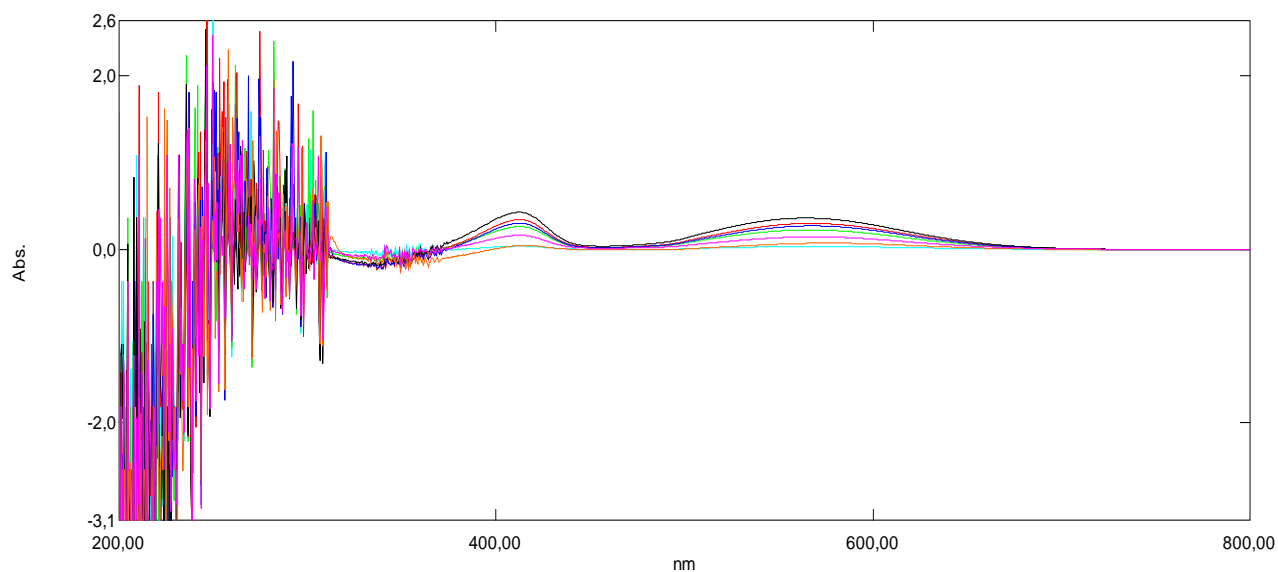


Figure 4. Spectres UV/Visible des concentrations croissantes de la prégabaline (orange : 100 mg/l, rose : 200 mg/l, vert : 300 mg/l, bleu : 400 mg/l, noir : 500 mg/l)

3.1. Spécificité

Spécificité exogène

Les spectres obtenus après balayage indiquent qu'aucun des 39 médicaments ni métabolites analysés n'a présenté d'interférences avec la prégabaline, à l'exception de la gabapentine (Figure 5 et 6).

Spécificité endogène

En analysant les échantillons d'urines issus d'individus sains « blancs échantillons » ainsi que l'échantillon du patient présentant une protéinurie, aucune interférence n'a été observée à la longueur d'onde d'absorption de la prégabaline (560 nm) (Figure 5).

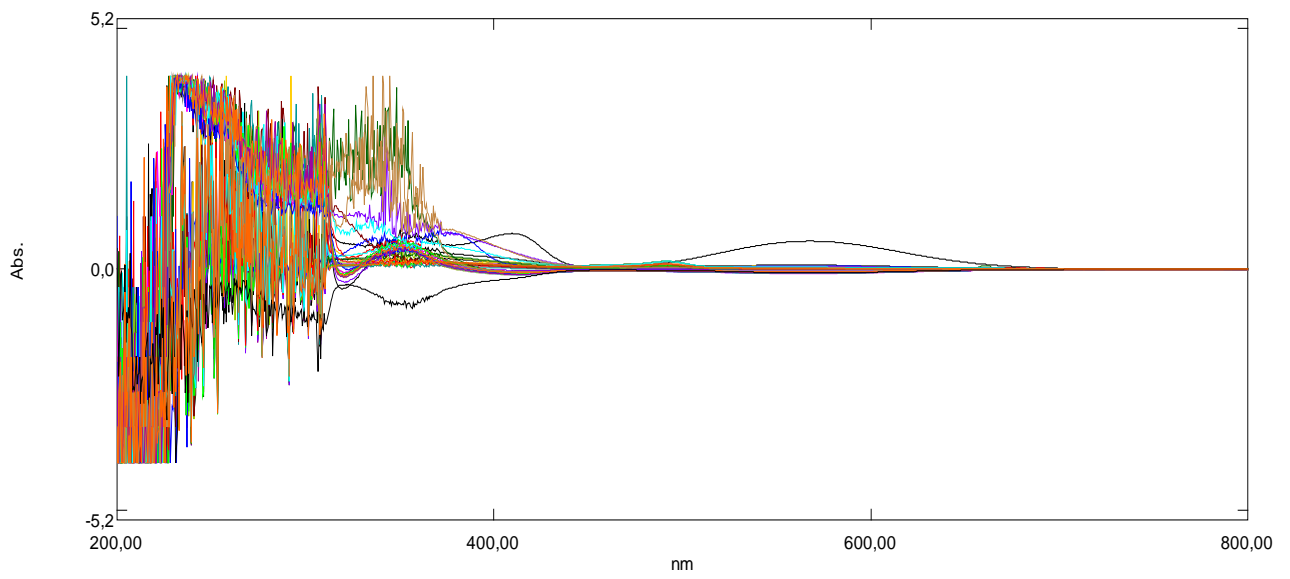


Figure 5. Spectres UV/Visible du produit chromophore de la prégabaline (Noir), des médicaments analysés et des échantillons (sains/malade présentant une protéinurie)

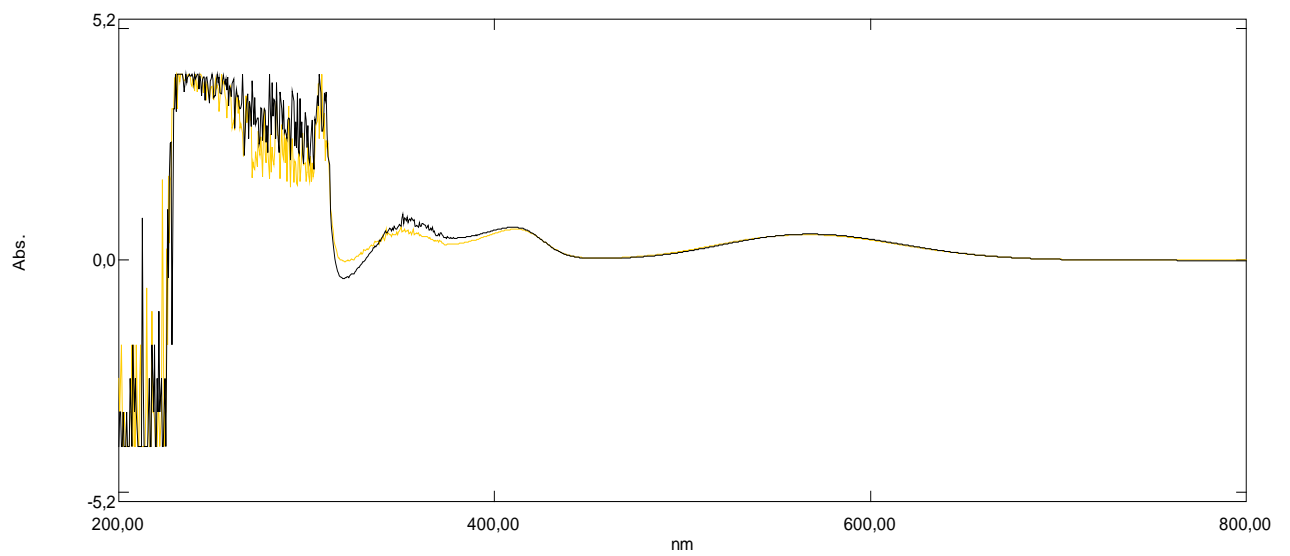


Figure 6. Spectres UV/Visible du produit chromophore de la prégabaline (Noir) et de la Gabapentine (Jaune)

3.2. Courbe d'étalonnage

Selon les recommandations de la SFSTP, nous avons obtenu les trois courbes d'étalonnage suivantes :

Tableau II. Les résultats obtenus des trois courbes d'étalonnage à 560 nm

Concentrations (mg/l)	J ¹		J ²		J ³	
	Concentration introduite(mg/l)	Absorbances	Concentration introduite(mg/l)	Absorbances	Concentration introduite(mg/l)	Absorbances
100	100	0,080	100	0,085	100	0,096
200	200	0,185	200	0,180	200	0,211
300	300	0,262	300	0,300	300	0,300
400	400	0,370	400	0,394	400	0,410
500	500	0,480	500	0,510	500	0,540

J : jour

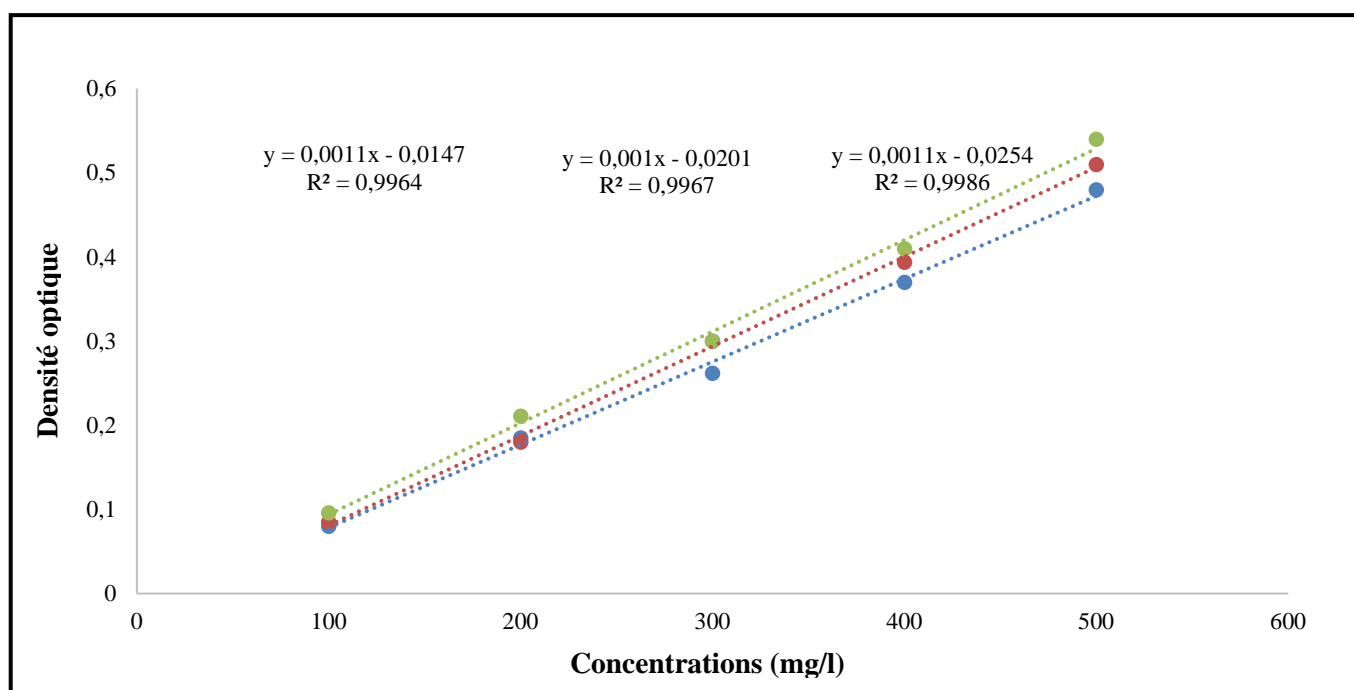


Figure 7. Courbes d'étalonnage des trois jours

3.3. Linéarité

La linéarité a été vérifiée pour : concentrations calculées = f (concentrations introduites).

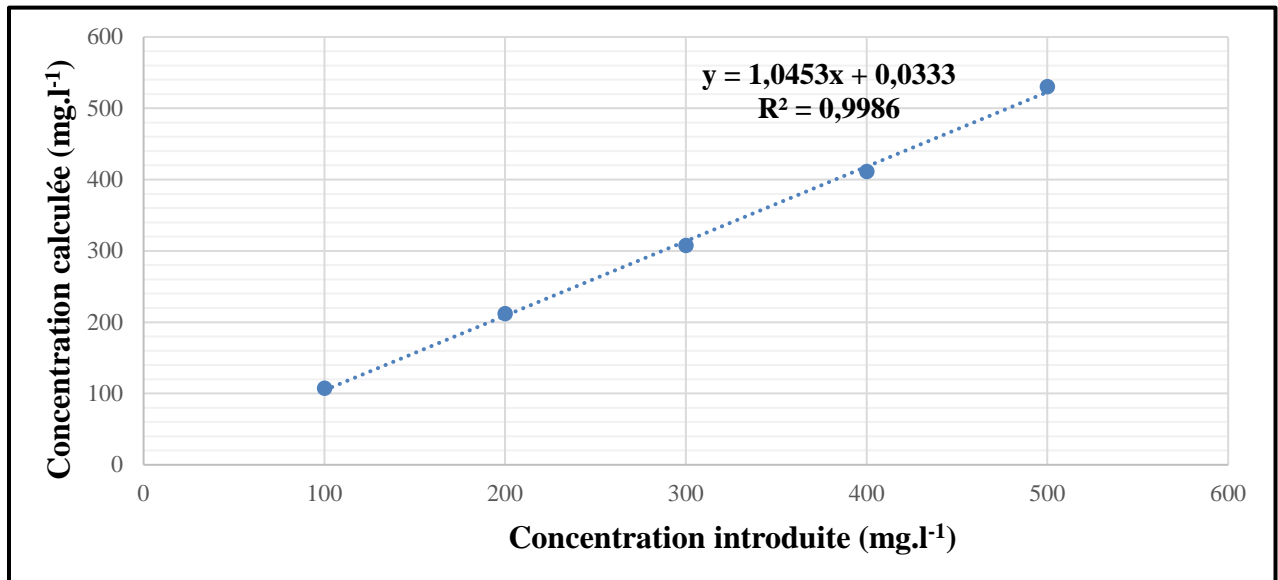


Figure 8. Droite de régression linéaire entre les concentrations calculées et les concentrations introduites

3.4. Limite de détection

Selon les calculs effectués, la limite de détection est évaluée à 20 mg/l.

3.5. Stabilité

L'analyse des solutions chargées par la prégabaline à des concentrations de 100 mg/l et 200 mg/l, conservées à des températures de -20°C, +4°C et +24°C ; pendant 7 jours, 15 jours et 1 mois, a révélé des résultats positifs à la prégabaline. La présence ou l'absence de lumière n'influence pas sur ces résultats.

L'utilisation de la ninhydrine au moment de sa préparation a donné des résultats instables. En revanche, les résultats obtenus étaient stables après une semaine de conservation à +4°C.

3.6. Fidélité intermédiaire et répétabilité

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau IV. Résultats de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire

Concentrations (mg/l)	150	250	450
Moyenne des concentrations (mg/l)	151,22	251,94	407,25
Ecart-type de répétabilité	8,48	19.94	27.04
Ecart-type inter série	13,69	0	16.71
Ecart-type de fidélité intermédiaire	16,11	19.94	31.79
CV de répétabilité	5,60	7.91	6.64
CV de fidélité intermédiaire	10,65	7.91	7.80

3.7. Comparaison avec la technique immuno-chromatographique Kashif

Tableau V. Résultats de la comparaison entre les deux méthodes

Echantillons Urinaires	Résultats de dépistage sur Kashif		Résultats de dépistage de la prégabaline par spectrophotométrie
	Prégabaline	Autres substances Positives	
01	POSITIF	/	POSITIF
02	POSITIF	/	POSITIF
03	POSITIF	TCA /BNZ	POSITIF
04	POSITIF	/	POSITIF
05	POSITIF	COC/THC	POSITIF
06	POSITIF	/	POSITIF
07	POSITIF	BUP /THC /BZD /TRAMADOL	POSITIF
08	POSITIF	/	POSITIF
09	POSITIF	/	POSITIF
10	POSITIF	THC	POSITIF
11	POSITIF	THC	POSITIF
12	POSITIF	THC	POSITIF
13	POSITIF	/	POSITIF
14	POSITIF	BNZ /OPIACES	POSITIF
15	POSITIF	/	POSITIF
16	POSITIF	/	POSITIF
17	POSITIF	/	POSITIF
18	POSITIF	THC /BZD /TCA /BAR /BUP	POSITIF
19	POSITIF	OPIACES	POSITIF
20	POSITIF	COC /BUP	POSITIF
21	NEGATIF	/	NEGATIF
22	NEGATIF	BZD /TCA	NEGATIF
23	NEGATIF	COC /AMP /THC	NEGATIF
24	NEGATIF	THC /TCA	NEGATIF
25	NEGATIF	BUP	NEGATIF
26	NEGATIF	COC /AMP /BNZ /TCA /THC	NEGATIF
27	NEGATIF	THC	NEGATIF

AMP : amphétamines/ BAR : barbituriques

BZD : benzodiazépines/ BUP : buprénorphine/ COC : cocaïne

TCA : antidépresseurs tricycliques/ THC : delta-9-tétrahydrocannabinol

4. Discussion

Au cours des dernières années, le phénomène d'abus et de mésusage de la prégabaline a pris de l'ampleur à travers le monde, avec une préoccupation particulière en Algérie.

Egalement, de nombreux cas de décès ont été rapportés lors de l'association de la prégabaline à d'autres substances psychoactives (27), suscitant la mise au point de méthodes de dépistage rapides afin de répondre aux urgences toxicologiques. Cependant, les techniques immuno-chromatographiques souvent utilisées dans les laboratoires de toxicologie ne donnent généralement que des résultats préliminaires, nécessitant ainsi une confirmation par d'autres techniques plus fiables, telles que les techniques chromatographiques (28). Mais bien que performantes, ces techniques restent coûteuses et l'acquisition d'appareillage chromatographique demeure difficile pour certains laboratoires.

Nous proposons donc une alternative à ces techniques (immuno-chromatographiques et chromatographiques) assez rapide, moins coûteuse avec des performances analytiques acceptables, pouvant répondre aux besoins des laboratoires de toxicologie en matière de dépistage de la prégabaline.

Le développement de cette technique a comporté plusieurs étapes :

4.1. Optimisation de la méthode

Spectre UV/Visible et choix des longueurs d'ondes

La prégabaline présente un mauvais profil d'absorbance UV/Visible (29), une dérivatisation avec la ninhydrine est donc nécessaire (Figure 2) (30) formant ainsi un chromophore de couleur violette appelé Pourpre de Ruhemann (RP) (31), dont le spectre UV/Visible présente deux maximums d'absorption, l'un à 410 nm et l'autre à 560 nm (Figure 3).

Le spectre UV/Visible du complexe prégabaline-ninhydrine préparé dans l'urine correspond à celui préparé dans l'eau, attestant de la spécificité du spectre (Figure 3).

Le spectre UV/Visible du complexe prégabaline-ninhydrine préparé dans l'urine correspond à celui publié par Anissa Zergui et co.(22) (Figure 9).

Le pic d'absorbance le plus large a été obtenu à 560 nm, justifiant notre choix pour la lecture ultérieure des densités optiques à cette longueur d'onde. Nous avons également pris en considération la légère absorbance de certaines substances à 410 nm (Figure 5).

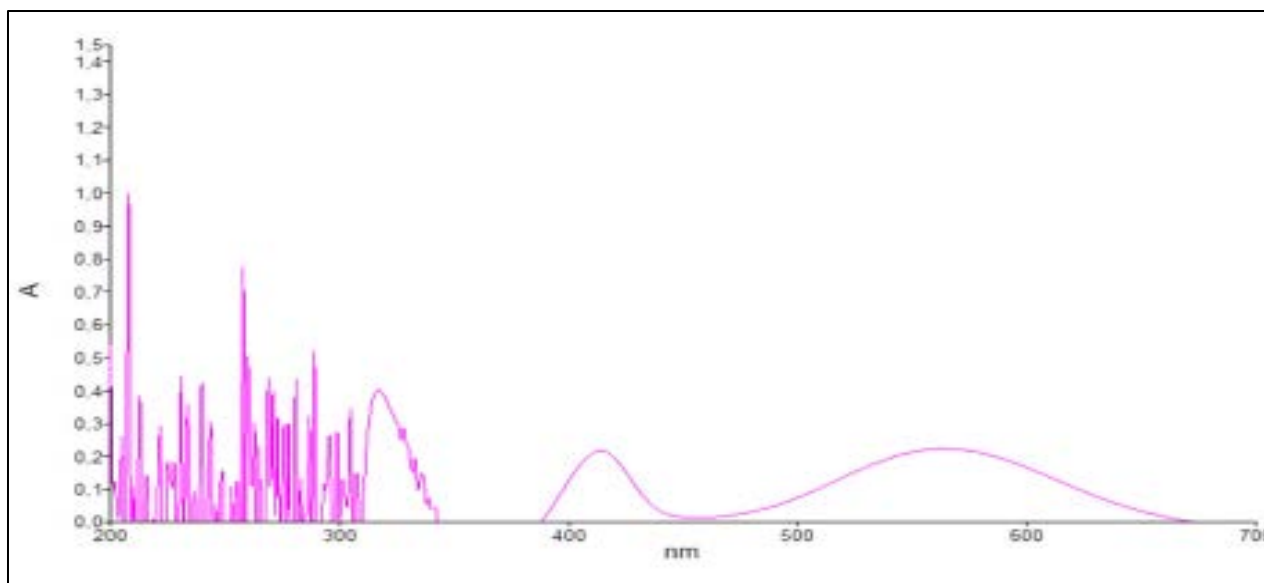


Figure 9. Spectre UV/Visible du produit chromophore de la prégabaline (article de Anissa zergui et co.)(22)

Préparation des solutions étalons

Selon la pharmacopée européenne 11.0, la prégabaline est soluble dans l'eau, nous avons donc préparé la solution mère dans ce solvant. Certains auteurs, préconisent la préparation de la solution mère dans un tampon phosphate (29), cependant ce tampon pourrait interagir avec les substances urinaires formant des composés réactifs, entraînant des colorations intenses non mesurables par spectrophotométrie.

Choix du protocole d'analyse

La procédure impliquant la formation du complexe prégabaline-ninhydrine suit un protocole similaire à l'article de Anissa Zergui et co.(22), avec une solution éthanolique de ninhydrine à 2% pour saturer les fonctions amines de la prégabaline (Figure 2). Cependant, pour amorcer la réaction, il est nécessaire de chauffer le mélange à une température comprise entre 70 et 75°C pendant environ 20 minutes, afin de déshydrater la ninhydrine et permettre sa réaction avec la prégabaline (29) (Figure 2). Ce qui concorde avec ce qui a été testé par Alka Bali et co.(29) mais qui va à l'encontre du protocole d'Anissa Zergui et co.(22), dans lequel la réaction se déroule à température ambiante pendant 60 minutes (22).

Le chromophore prégabaline-ninhydrine formé reste stable à l'obscurité, pendant une durée de 24 heures à température ambiante. Cette durée peut être prolongée en le conservant à une température de +4°C.

Lors des essais d'optimisation, un important effet matrice a été observé avec des colorations intenses des blancs réactifs en raison de la réaction de la ninhydrine avec les substances endogènes présentes dans les urines non chargées (la ninhydrine étant largement utilisée dans la détection des acides aminés dans diverses matrices (32), principalement par chromatographie sur couche mince CCM (33)). Une étape d'extraction/précipitation est donc nécessaire.

Une extraction liquide-liquide a été réalisée avec de l'acétonitrile, qui a été choisi comme solvant d'extraction en raison de son inertie vis-à-vis de divers substances organiques et de sa miscibilité avec la phase aqueuse (l'eau) (34).

Cette extraction est assistée par un relargage, également connue sous le nom de salting-out, réalisée en présence d'une quantité significative de sel (34) (35). Ce processus repose sur le fait que le chlorure de sodium entraîne la diminution de la solubilité des molécules organiques, essentiellement les protéines, ce qui entraîne leur précipitation (34) (36). Cette dernière se produit avant la séparation des deux phases, ce qui empêche le passage des substances interférentes dans la phase organique assurant ainsi une étape de purification et enfin d'extraction de la prégabaline (34).

En outre, l'étape du vortex est une composante essentielle du processus de salting-out. Cette technique favorise la dissolution du sel, par augmentation du phénomène de solvation dans la phase aqueuse, ce qui conduit à une élévation de la température de la solution pouvant entraîner une éventuelle dégradation de certains composés instables (34). Une centrifugation est nécessaire afin d'améliorer la séparation des deux phases.

Une double extraction a été réalisée, en vue d'augmenter le rendement d'extraction. Il est à noter la nécessité de l'utilisation de tubes en verre.

L'extraction liquide-liquide assistée par l'effet relargage nécessite l'utilisation d'une faible quantité d'acétonitrile et n'exige ni évaporation ni reconstitution, permettant ainsi de récupérer un maximum de substance. De nombreuses études exploitent ces avantages dans l'analyse de certains médicaments dans diverses matrices tels que le piroxicam (37), les tétracyclines (38), les sulfonamides (39), les azolés (40) et les immunosuppresseurs (41).

4.2. Validation de la méthode

La méthode qu'on propose de valider est semi-quantitative, permettant de confirmer ou d'infirmer la présence de prégabaline dans un échantillon urinaire. Certains de ces paramètres : la spécificité,

la fonction de réponse, la linéarité, la limite de détection, la stabilité, la fidélité intermédiaire et la répétabilité ; ont été validés selon les recommandations de la SFSTP (2003-2006).

Sur les 39 médicaments et certains métabolites couramment utilisés, seule la gabapentine a montré un pic d'absorbance qui se superpose à celui de la prégabaline (Figure 5), suggérant une importante interférence. Il sera important de signaler cette interférence lors du dépistage. A noter que du fait de leur analogie structurale, appartenant tous les deux à la famille des gabapentinoïdes, le mésusage de la gabapentine commence à être observé et décrit (42), rendant cette technique aussi utile pour le dépistage des gabapentinoïdes.

En analysant des blancs échantillons d'individus sains et d'une personne présentant une protéinurie, aucune interférence n'a été détectée. Néanmoins, notre étude n'a pas examiné les urines d'individus sous supplémentation protéique, mais en se référant à l'étude de Anissa Zergui et co. (22), le résultat était également négatif.

Le coefficient de détermination linéaire de la relation existante entre la concentration introduite et la concentration calculée est acceptable ($R^2= 0.9986$), avec une pente comparable à 1 et une ordonnée à l'origine comparable à 0, ce qui permet de conclure que la méthode est linéaire dans le domaine de validité, avec une perte de linéarité au-delà de 500 mg/l.

Les coefficients de variation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire sont conformes aux limites fixées (<15%). La méthode est donc fidèle et répétable.

La méthode spectrophotométrique utilisée au cours de notre travail présente une limite de détection de 20 mg/l, ce qui la rend utilisable pour le dépistage dans le but de toxicomanie. Elle est basée sur la technique de salting-out qui la rend facile et spécifique pour la substance recherchée.

Les conditions de conservation des échantillons urinaires, chargés par la prégabaline, n'influencent pas sur leur positivité, mais des écarts de densités optiques ont été constatés. Les résultats négatifs obtenus après conservation des échantillons blancs d'urine montrent que les fluctuations sont probablement dues à la réaction de la molécule recherchée avec l'un des composés urinaires. La validité de cet essai démontre que la possibilité d'avoir des faux négatifs est faible sauf si le prélèvement urinaire n'est pas effectué dans les conditions optimales, en raison de son temps de demi-vie qui est de 6.3 heures (2).

Les résultats instables obtenus avec la ninhydrine fraîchement préparée expliquent l'intérêt de son utilisation après conservation une semaine à +4°C, dans un flacon brun hermétiquement fermé, afin d'éviter sa photo-dégradation et son évaporation dans l'air.

4.3. Comparaison avec la technique immuno-chromatographique (Kashif)

Nous avons analysé 27 échantillons urinaires provenant de patients préalablement testés par la technique immuno-chromatographique kashif, afin de les comparer avec notre méthode. Les résultats obtenus étaient similaires entre les deux méthodes ce qui permet la validité de nos conclusions.

Pour les échantillons urinaires revenus positifs aux autres drogues (cocaïne, amphétamines, buprénorphine, antidépresseurs tricycliques, benzodiazépines, tramadol, opiacés, barbituriques, delta-9-tétrahydrocannabinol) et négatifs à la prégabaline avec le test immuno-chromatographique, les résultats sont aussi revenus négatifs avec notre méthode, attestant de sa spécificité.

Conclusion

La méthode spectrophotométrique UV/Visible permettant le dépistage de la prégabaline dans la matrice urinaire est simple, rapide et peu coûteuse. Au cours de son développement des optimisations ont été effectuées afin d'améliorer ses performances, complétées par une validation des paramètres de spécificité, fonction de réponse, linéarité, limite de détection, stabilité, fidélité intermédiaire et de répétabilité, suivant les recommandations de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP 2003-2006) et de la Société Française de Toxicologie Analytique. La fiabilité des résultats obtenus suite à sa comparaison avec la méthode immuno-chromatographique permet de l'adapter en routine afin de faire face aux nombreux cas d'abus et de mésusage qui ne cessent d'augmenter.

Références

1. Manjushree N, Chakraborty A, Shashidhar K, Narayanaswamy S. A review of the drug pregabalin. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*. 2015;4(4):601-5.
2. Bargel S, Becam J, Chanu L, Lanot T, Martin M, Vaucel J, et al. Les gabapentinoïdes: une revue de la littérature. *Toxicologie Analytique et Clinique*. 2021;33(1):44-63.
3. Schulze-Bonhage A. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of pregabalin and its role in the treatment of epilepsy. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. janv 2013;9(1):105-15.
4. Ben-Menachem E. Pregabalin Pharmacology and Its Relevance to Clinical Practice. *Epilepsia*. 2004;45(s6):13-8.
5. Taylor C, Angelotti T, Fauman E. Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: The calcium channel alpha2-delta (alpha2-delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery. *Epilepsy research*. 1 mars 2007;73:137-50.
6. Gajraj NM. Pregabalin: Its Pharmacology and Use in Pain Management. *Anesthesia & Analgesia*. déc 2007;105(6):1805-15.
7. Cross AL, Viswanath O, Sherman A I. Pregabalin. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cité 15 mars 2024]. Disponible sur: [://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470341/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470341/)
8. Laboudi F, Slimani G, Ouanass A. La dépendance à la prégabaline : à propos d'un cas. *L'information psychiatrique*. 2019;95(7):535-8.
9. Roche S, Blaise M. Prégabaline et risque d'addiction: une nouvelle demande de soin? *L'Encéphale*. 2020;46(5):372-81.
10. Bourgeois M. Usage et mésusage des gabapentinoïdes: connaissances et modalités de prescription: enquête auprès des médecins généralistes des régions de l'EST de la France [Internet] [PhD Thesis]. 2021 [cité 15 mars 2024]. Disponible sur: https://docnum.univ-lorraine.fr/public/PHA_T_2021_2087_BOURGEOIS_MAEVA.pdf
11. HAKIMI Y. ABUS ET MÉSUSAGE DE PRÉGABALINE: ENQUÊTE AUPRÈS DES PROFESSIONNELS DE SANTÉ [Internet] [PhD Thesis]. UNIVERSITE TOULOUSE III; 1994 [cité 15 mars 2024]. Disponible sur: <https://2pao.fr/wp-content/uploads/2022/12/Pregabaline-These-Yan-Hakimi-Abus-et-mesusage-de-pregabaline-min.pdf>
12. Zergui A, Kerdoun MA, Baamar K, Kouadria H, Mekhloufi S, El-Kheir Adjaine O. Pregabalin misuse and abuse in the region of Ouargla, Algeria. *Toxicologie Analytique et Clinique*. avr 2024;S2352007824001161.
13. Marcot D, Camargo HC. Prégabaline sous la loupe carcérale. Réflexions sur une problématique émergente. *L'Encéphale*. 1 juin 2022;49.
14. Dufau M. Le mésusage de la Prégabaline chez les toxicomanes. 11 déc 2020;99.
15. Wood DM, Berry DJ, Glover G, Eastwood J, Dargan PI. Significant Pregabalin Toxicity Managed with Supportive Care Alone. *J Med Toxicol*. déc 2010;6(4):435-7.

16. Jouanjus E, Mathevet M, Lapeyre-Mestre M. Association des gabapentinoïdes à des médicaments opioïdes ou à des benzodiazépines (ou substances apparentées) : une analyse des ordonnances suspectes de falsification identifiées en France depuis 2001. *Therapies*. 1 nov 2022;77(6):768.
17. Richelle L, Hogge M. Mésusage de prégabaline en Belgique francophone: enquêtes de terrain. *Rev Med Brux*. 2023;44:96-105.
18. Kasawar G, Farooqui M. Development and Validation of HPLC Method for the Determination of Pregabalin in Capsules. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 1 juill 2010;72:517-9.
19. Flores J, Castañeda G, Muñoz L. Direct determination of pregabalin in human urine by nonaqueous CE-TOF-MS. *Electrophoresis*. 6 mars 2013;34.
20. Shaalan R. Spectrofluorimetric and Spectrophotometric Determination of Pregabalin in Capsules and Urine Samples. *International Journal of Biomedical Science*. 1 janv 2011;6.
21. Gujral RS, Haque SM, Shanker P. A Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Pregabalin in Bulk, Pharmaceutical Formulations and in Human Urine Samples. *Int J Biomed Sci*. déc 2009;5(4):421-7.
22. Zergui A, Bilel C, Atika B, Saliha B, Rezk-Kallah H. Qualitative determination of pregabalin in urine by spectrophotometric method. *Toxicologie Analytique et Clinique*. 9 avr 2023;
23. Made-in-China.com [Internet]. [cité 31 mai 2024]. [Hot Item] Spectrophotomètre 752n vis à faisceau unique. Disponible sur: https://fr.made-in-china.com/co_cnprosperitybiotech/product_752n-Vis-Spectrophotometer-Single-Beam_uoyhohoihy.html
24. Spectrophotomètre SHIMADZU UV-1900 [Spectrophotomètre] [Internet]. [cité 31 mai 2024]. Disponible sur: https://www.grosseron.com/shimadzu-spectrophotometre-uv-1900i_48-365-1-2665-1-12984.html
25. Dingeon B, Dreyfuss MF, Gaillard Y, Le Bouil A, Lhermitte M, Mazzega S, et al. Aide à la validation des méthodes en Toxicologie et Suivi Thérapeutique Pharmacologique. *Ann Toxicol Anal*. 2005;17(3/supplément 1):1-20.
26. King diagnostics. fiche technique Kashif.
27. Sastre C, Baillif-Couniou V, Gaulier JM, Allorge D, Piercecchi MD, Leonetti G, et al. Usage détourné de la prégabaline : à propos de trois cas de décès en région marseillaise. *Toxicologie Analytique et Clinique*. 1 déc 2020;32(4, Supplement):S33-4.
28. Gujral R, Haque S, Kumar S. A novel method for the determination of pregabalin in bulk pharmaceutical formulations and human urine samples. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1 juin 2009;3:327-34.
29. Bali A, Gaur P. A novel method for spectrophotometric determination of pregabalin in pure form and in capsules. *Chem Cent J*. 7 oct 2011;5:59.
30. Bottom CB, Hanna SS, Siehr DJ. Mechanism of the ninhydrin reaction. *Biochemical Education*. 1978;6(1):4-5.

31. Rashid M, Hussain T, Sarfraz M, Arafat M, Hussain A, Abbas N, et al. Precise and sensitive ambient temperature based analytical colorimetric method for Pregabalin. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2023;58:e201048.
32. Friedman M. Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *J Agric Food Chem*. 1 févr 2004;52(3):385-406.
33. Laskar S, Sinhababu A, Hazra KM. A modified spray reagent for the detection of amino acids on thin layer chromatography plates. *Amino Acids*. 1 sept 2001;21(2):201-4.
34. Tang YQ, Weng N. Salting-out assisted liquid–liquid extraction for bioanalysis. *Bioanalysis*. juin 2013;5(12):1583-98.
35. Selmane D. Etude de l'extraction des protéines de coproduits d'abattage et de leur valorisation comme ingrédients fonctionnels [Internet] [PhD Thesis]. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II; 2010 [cité 11 juin 2024]. Disponible sur: <https://theses.hal.science/tel-00719205/>
36. AM Elessawy, RH Abdel Elaziz, Ahmed MA Shihata. Determination of Pregabalin in Tissues and Fluids by Using GC. *Archives of Clinical Toxicology* [Internet]. 31 déc 2019 [cité 11 juin 2024];(1). Disponible sur: <http://probiologists.com/Article/Determination-of-Pregabalin-in-Tissues-and-Fluids-by-Using-GC>
37. Tok KC, Gumustas M, Sengel-Turk CT, Amasya G, Bayram B, Arioglu-Inan E. Development of salting-out extraction methodology for the determination of piroxicam from polymeric based nanocarriers and biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 20 sept 2022;219:114966.
38. Hassan J, Shams GR, Pourrastegar M, Pourshaban-Shahrestani A. Application of salting-out assisted liquid-liquid extraction for the determination of oxytetracycline, tetracycline, tilmicosin, and tylosin in cow milk by liquid chromatography with photodiode array detection. *MethodsX*. 1 juin 2024;12:102616.
39. Liu J, Jiang M, Li G, Xu L, Xie M. Miniaturized salting-out liquid–liquid extraction of sulfonamides from different matrices. *Analytica Chimica Acta*. 29 oct 2010;679(1):74-80.
40. Manousi N, Vlachaki A, Kika FS, Markopoulou CK, Tzanavaras PD, Zacharis CK. Salting-out homogeneous liquid-liquid microextraction for the determination of azole drugs in human urine: Validation using total error concept. *Journal of Separation Science*. mars 2022;45(6):1240-51.
41. Kvamsøe MM, Hansen KR, Skadberg Ø, Vethe NT, Brede C. Salting Out-Assisted Liquid–Liquid Extraction for Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Measurement of Tacrolimus, Sirolimus, Everolimus, and Cyclosporine a in Whole Blood. *Therapeutic Drug Monitoring*. oct 2020;42(5):695.
42. Häkkinen M, Vuori E, Kalso E, Gergov M, Ojanperä I. Profiles of pregabalin and gabapentin abuse by postmortem toxicology. *Forensic Science International*. 1 août 2014;241:1-6.