

**La faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse propose la formation suivante :**

**DU « TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES  
APPLIQUEES A LA BIOLOGIE HUMAINE »**

**Lieu : TOULOUSE**

**Année : 2018-2019**

**Responsable de la formation :**

**Pr. Peggy GANDIA**

Université Toulouse III, Faculté de Pharmacie  
Service de Pharmacologie  
118, route de Narbonne, 31063 Toulouse Cedex 09

Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie  
Institut Fédératif de Biologie  
CHU Purpan, Toulouse  
Tel : 05 67 69 03 83  
E-mail : gandia.p@chu-toulouse.fr

## Objectifs

Acquérir des compétences en techniques chromatographiques (LC-UV ; GC-FID ; GC-MS ; LC-MS) et en absorption atomique (SAA ; ICP-MS ; ICP-AES) permettant une mise en application sur des matrices biologiques (sang, urines, salive...)

## Contenu de la formation

- Principes de fonctionnement d'un système chromatographique (HPLC)
- Principe général de la séparation (phase normale, phase inverse)
- Analyses quantitatives
- Grandeurs fondamentales en chromatographie (HPLC)
- Précautions d'usage et problèmes couramment rencontrés en chromatographie (HPLC)
- Critères de validation de méthodes en bioanalyse
- Spectrométrie de masse : aspects théoriques, instrumentaux et applications
- Etapes critiques de la préparation de l'échantillon
- Introduction à l'absorption atomique

## Sélection des candidats

### Titre ou diplôme universitaire recommandé:

- Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie
- Diplôme d'Etat de Docteur en Médecine
- Interne en Pharmacie ou en Médecine
- Diplôme de Biologiste Médical (DES ou autres)
- Ingénieur en Biologie Médicale ou faisant fonction
- Technicien de laboratoire d'analyses médicales ou faisant fonction

Autres professionnels de santé : sur examen des candidatures.

### Jury de sélection :

Examen des candidatures (CV + lettre de motivation) par le responsable de la formation et un des intervenants

## Organisation de la formation

**Formation** : continue et permanente

**Durée de la formation** : 94h eq. TD (42 h CM ; 19 h TD ; 12 h TP) soit 8 ECTS

**Dates** : Février (4 au 8 Février 2019) et Mars (18 au 22 Mars 2019)

**Examen** : Le contrôle des connaissances est organisé à l'issue des enseignements (4 Avril 2018) et comporte deux parties :

- une épreuve écrite d'une demi-journée notée sur 70 points portant sur les connaissances théoriques et un cas pratique

- une épreuve orale de 30 minutes (15 minutes de préparation + 15 minutes d'oral) notée sur 30 points portant sur une question tirée au sort

La validation est prononcée par une note globale supérieure ou égale à 50 points.

Deux sessions sont organisées chaque année.

**Lieu de la formation** : (a) Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 35 Chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse Cedex 09 ; (b) Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie, Institut Fédératif de Biologie, CHU Purpan ; (c) UMR 5623, Université Paul Sabatier, Toulouse ; (d) UMR 1331-TOXALIM, Ecole Vétérinaire de Toulouse

**Evaluation de la formation** : chaque année, un questionnaire d'évaluation sera soumis aux étudiants à l'issue de la formation, afin d'apporter des améliorations l'année suivante.

## Modalités d'inscriptions et tarifs

**Effectif minimum** : 8

**Effectif maximum** : 12 (cet effectif a été fixé en fonction des capacités d'accueil, en particulier lors des séances de TP) – le nombre maximal d'inscrits en formation initiale est limité à 2.

**Pré-inscriptions** : jusqu'à fin Décembre de chaque année, auprès du responsable pédagogique

### **Pr. Peggy GANDIA**

Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie  
Institut Fédératif de Biologie  
CHU Purpan, Toulouse  
Tel : 05 67 69 03 83  
E-mail : gandia.p@chu-toulouse.fr

**Renseignements pour prise en charge par organismes de formation et Inscriptions administratives** : à partir du 1<sup>er</sup> Octobre de chaque année, auprès de la Mission Formation Continue et Apprentissage (MFCA) de l'Université Paul Sabatier.

### Eliane Laffitte

Mission Formation Continue et Apprentissage  
Tel : 05 61 55 87 33  
E-mail : eliane.laffitte@univ-tlse3.fr

### **Tarifs** :

Formation initiale : frais d'inscriptions (droits universitaires : 184 euros)

Formation continue et permanente : 1200 euros + frais d'inscriptions (droits universitaires : 184 euros)

## Equipe pédagogique

### **GANDIA Peggy**

PU-PH

Responsable du Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie  
CHU Purpan, Toulouse

### **SERAISSOL Patrick**

Ingénieur en Biologie Médicale

Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie  
CHU Purpan, Toulouse

### **FOY Jessie**

Ingénieur en Biologie Médicale

Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie  
CHU Purpan, Toulouse

### **BOUAJILA Jalloul**

Maître de Conférences

Service Chimie Analytique

Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Toulouse

### **ARELLANO Cécile**

Maître de Conférence (HDR)

Service Chimie Thérapeutique

Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Toulouse

### **CASSEL Stéphanie**

Maître de Conférence (HDR)

Service de Chimie Organique et Analytique

Université Paul Sabatier, Toulouse

### **GARRIGUES Jean-Christophe**

Responsable Service Analytique

UMR 5623

Université Paul Sabatier, Toulouse

### **LACROIX Marlène**

Ingénieur en Chimie Analytique

UMR 1331/TOXALIM

Ecole Vétérinaire de Toulouse

### **TAFZI Naïma**

Ingénieur en Biologie Médicale

Laboratoire de Pharmacologie

CHU Limoges

### **LANOT Thomas**

Biologiste Médical – Assistant Spécialiste

Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie

CHU Purpan, Toulouse

# Syllabus

## Cours Magistraux (42 h CM)

Les cours magistraux sont répartis en modules dont le contenu est décrit ci-dessous.

### MODULE 1 : PRESENTATION DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (6h)

#### I. Introduction

- Historique
- Définitions

#### II. Instrumentations

- Constituants d'un système HPLC
- Principe de fonctionnement, rôle et intérêt des dégazeurs, pompes, injecteurs
- Colonnes
- DéTECTEURS (UV, DAD, Fluo, MS, DEDL, Corona)

#### III. Instrumentations CPG

- Constituants d'un système CPG
- Principe de fonctionnement
- Colonnes
- DéTECTEURS (FID, NPD, SM...)

#### IV. Principes et grandeurs fondamentales

- Facteur de rétention (k)
- Sélectivité ( $\alpha$ )
- Résolution ( $R_s$ )

#### V. Exploitation des données

- Principe d'intégration
- Calibration avec étalon interne / externe
- Validation analytique

#### VI. Les colonnes et phases mobiles appropriées

- Phase normale
- Phase inverse
- HILIC

### MODULE 2 : APPAREILLAGE EN CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE ET DEPANNAGES (4h)

#### I. Introduction

- Principe et terminologie
- Schéma de base

#### II. Pompes

- Principe de fonctionnement
- Pompe gradient Haute pression

#### III. Injecteurs

- Vanne d'injection
- Solvant d'injection « trop fort » / « trop faible »
- Problèmes de boucle d'injection
- Effet mémoire

#### **IV. Colonnes analytiques**

- Tailles
- Géométrie des phases stationnaires et supports
- Efficacité

#### **V. Tubulures**

#### **VI. Détecteurs**

- UV simple
- DAD
- FLUORIMETRE
- MS
- DEDL
- CORONA

#### **VII. Solvants**

- Propriétés physiques
- Polarité

#### **VIII. Précautions d'usages (Aspects pratiques)**

- Préparation des échantillons et phases mobiles
- Choix des tubulures et raccords
- Installation et utilisation de la colonne
- Démarrage et arrêt du système

### **MODULE 3 : CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE À POLARITE INVERSEE - ASPECTS THEORIQUES (4)**

#### **I. Principes de base**

- Définitions
- Différentes méthodes de séparation
- Différentes chromatographies liquides

#### **II. Principe du partage et de l'adsorption**

#### **III. Le chromatogramme et grandeurs de rétention**

- Pic gaussien (pic idéal pour modélisation)
- Pics réels
- Temps et volume de rétention
- Volume mort

#### **IV. Qualité de la séparation et grandeurs fondamentales**

- Facteur de rétention (k)
- Sélectivité ( $\alpha$ )
- Résolution (Rs)
- Notion de plateaux théoriques (N, HEPT)
- Courbe de van Deemter

### **MODULE 4 : CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE - DEVELOPPEMENTS RECENTS ET CHIMIE DES PHASES STATIONNAIRES (4h)**

#### **I. Phases stationnaires**

- Structure
- Comparaison des greffages
- Influence de la longueur des greffons
- Caractéristiques des silices greffées
- Greffage mono et poly fonctionnel
- Influence du type de synthèse sur la rétention

-Silanols résiduels

## II. De l'HPLC à UHPLC

- Intérêt
- Principes et mécanismes
- Phase stationnaire adaptée à la haute pression

## III. Mécanismes de rétention

- Modèle théorique
- Effet de l'eau
- Greffage mixte

## MODULE 5 : CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE – MECANISMES DE SEPARATION ET INTERACTIONS (4)

### I. Les principales liaisons chimiques mises en jeu

- Liaisons covalentes
- Liaisons ioniques
- Liaisons hydrogènes

### II. Propriétés physico-chimiques des analytes et des solvants

- Notion de lipophilie / hydrophilie
- Notion de polarité
- Miscibilité des solvants

### III. Phénomènes mis en jeu et principales techniques

- Chromatographie d'adsorption et phase normale
- Chromatographie de partage à polarité de phase inversée
- Chromatographie ionique
- Chromatographie d'appariement d'ion
- Chromatographie récente : HILIC, PGC (Hypercarb)

## MODULE 6 : SPECTROMETRIE DE MASSE - ASPECTS THEORIQUES ET INSTRUMENTAUX (4h)

### I- Principe général

### II- Les sources d'ionisation

- Ionisation sous vide
  - Ionisation électronique (EI)
  - Ionisation chimique (IC)
- Ionisation à pression atmosphérique
  - Electrospray
  - APCI
  - APPI

### III- Les analyseurs

- Filtre quadripolaire
- Trappe ionique
- Résonance Cyclotronique ionique (ICR)
- Temps de Vol (TOF)
- Système Hybride

### IV- Les détecteurs

## MODULE 7 : SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ANALYSE DES MEDICAMENTS DANS LES FLUIDES BIOLOGIQUES (4h)

### I- Introduction : Définitions

- II- Spectrométrie de Masse**
  - SCAN
  - MRM (Multi Reaction Monitoring)
- III- Aspect particulier en LC/MS (/MS)**
  - Effet matrice
  - CID (Collision Induced Dissociation)
- IV- Analyses quantitatives de bio-molécules**
  - Choix
    - du matériel
    - de la source et mode d'ionisation
    - de l'étalon interne
  - Premiers réglages MS
  - Les adduits
  - Conditions HPLC
  - Préparation de l'échantillon
- V- Exemples d'application**

#### **MODULE 8 : PRETRAITEMENT DE L'ECHANTILLON ANALYTIQUE - ASPECTS TECHNIQUES (4h)**

- I- Bases fondamentales du processus de fractionnement**
- II- Séparation des constituants d'un mélange : particularités des prétraitements des échantillons biologiques**
  - Extraction liquide/liquide
  - Liquide/solide
- III- Stratégies de choix d'une méthode de préparation de l'échantillon**

#### **MODULE 9 : STRATEGIE EXPERIMENTALE ET STATISTIQUE POUR LA VALIDATION DE METHODE ANALYTIQUE EN BIO-ANALYSES (4h)**

- I- Validation analytique en bio-analyse**
  - Référenciels
  - Probématiques
  - Définitions
  - Objectifs
- II- Critères de Validations**
  - Spécificité, sélectivité
  - Fonctions de réponse
  - Exactitude, biais
  - Précision (répétabilité, reproductibilité)
  - Limite de Quantification (LOQ)
  - Limite de Détection (LOD)
  - Rendement d'extraction
  - Dilution
  - Stabilité
- III- Profil d'exactitude**
  - Principe
  - Construction



## MODULE 10 : INTRODUCTION à l'ABSORPTION ATOMIQUE (4h)

- I- **Théorie de la SAA**
  - Introduction générale
  - Principe général de la SAA
  
- II- **Instrumentation**
  - SAA Flamme (théorie, appareil, applications)
  - SAA four (théorie, appareil, applications)
  - SAA ICP-AES et ICP-MS (théorie, appareil, applications)
  
- III- **Perturbations physiques et chimiques**
  - Interférences
  - Correction
  
- IV- **Dosages par SAA**
  - Calibration ajouts dosés
  - LOD/LOQ
  
- V- **Applications**
  - Biologiques
  - Autres domaines
  
- VI- **Conclusions et perspectives**
  - Avantages/Inconvénients
  - Spéciation (couplages LC et GC)
  - LA ICP-MS (laser ablation)

### Travaux Dirigés (19 h TD)

1h TD pour présenter l'organisation du DU (Accueil)

5 TD (3\*4h + 2\*3h) sont proposés ci-dessous.

- TD1 : Développement de méthodes LC
- TD2 : Interprétation des chromatogrammes
- TD3 : Applications de la LC en pharmacocinétique
- TD4 : Synthèse des 3 TP et analyse des facteurs limitants
- TD5 : Applications de la LC en médico-légal

### Travaux Pratiques (12 h TP)

3 TP (3\*4h) sont proposés :

- 1 TP à la Faculté de Pharmacie: Expérimentations en GC
- 1 TP à l'Université Paul Sabatier : Expérimentations en LC-Fluo
- 1 TP à l'Ecole Vétérinaire de Toulouse : Expérimentation en LC-UV