

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

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

Lieu : TOULOUSE

Année : 2019-2020

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 (03 au 7 février 2020) et Mars (16 au 20 mars 2020)

Examen : Le contrôle des connaissances est organisé à l'issue des enseignements (3 avril 2020) 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^{er} 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 (α)
- 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 (α)
- Résolution (R_s)
- 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