

XIII^{ème} Congrès Annuel
de la Société Française
de Toxicologie Analytique
Pau, 8-10 juin 2005

*XIII Annual Meeting
of the Société Française
de Toxicologie Analytique
Pau, 8-10 June 2005*

Résumés des communications orales

- alcool
- soumission chimique
- toxicologie hospitalière
- toxicologie judiciaire
- thèmes libres
- toxicologie des métaux, spéciation, ICP/MS

Résumés des communications affichées

COMMUNICATIONS ORALES

Alcool

Techniques analytiques de mise en évidence de la falsification des vins et des alcools

B. MEDINA, M.H. SALAGOÏTY, F. GUYON, S. CHAUVET

Laboratoire de la DGCCRF, Direction des Laboratoires 33405 - Talence

Objectif : Les exemples sont nombreux de fraudes et falsifications dans le domaine des vins et alcools ; Les méthodes modernes utilisées récemment au laboratoire ont pour objectif de s'adresser à deux points encore difficilement vérifiés : l'origine géographique et le millésime.

La contrefaçon, la recherche de la traçabilité des produits ainsi que d'autres investigations davantage du ressort criminel donnent l'occasion d'utiliser des techniques éprouvées dans d'autres domaines.

Méthodes : Les méthodes mises en œuvre dans cet exposé et listées ci-dessous sont celles mises en œuvre pour résoudre des problèmes difficiles posés à un laboratoire de contrôle officiel

Radioactivité ultra-faible (en collaboration avec l'IN2P3), RMN, SMRI, Méthodes classiques (CPG, AA), ICP/MS, thermo-ionisation et méthodes statistiques avancées, ECHP

Résultats : Les problèmes réels suivants ont été en grande partie résolus en utilisant dans l'ordre les méthodes décrites dans le paragraphe précédent : authenticité des vins d'un millésime prestigieux ; origine des alcools : vodka ; conformité des pratiques : chaptalisation des vins ; traçabilité : appellation Saint Emilion ; contrefaçons d'appellations : Médoc ; origine géographique des vins : vins de France et des pays tiers ; enquête criminelle : la chemise tachée de vinaigre !

Conclusion : Les problèmes posés par l'authenticité des produits agro-alimentaires et des boissons alcoolisées en particulier sont complexes mais peuvent être en grande partie résolus avec la mise en œuvre de techniques analytiques puissantes et souvent très sophistiquées.

Références :

1. Médina B. et coll. Food Add. Contam. 2000, 17, 435-45.
2. Augagneur S. Thèse Doctorat Université de Bordeaux I, 1996.
3. Barbaste M., Thèse Doctorat Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2001.

Alcohol markers in hair to determine chronic alcoholism

C. JURADO

Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Sevilla, Espagne

Introduction : Alcoholism is a widespread addiction and an important problem for the toxicologist since its diagnosis is very difficult. Moreover in a large variety of clinical and forensic cases, long term use or abuse of alcohol must be established. Consequently, it is of a great importance to have diagnostic tools, or adequate markers, to detect excessive alcohol consumption and alcoholism. Up to now no hematological or urinary laboratory test exists that is reliable enough for the exact diagnosis of alcoholism. Sensitivity and selectivity of these alcohol markers vary considerably and they may be influenced by many nonalcoholic related diseases, nutritional factors, metabolic disorders, etc. Hair has become the third most fundamental biological matrix used for drug testing after blood and urine, mainly because of the wide diagnostic window of detection allowed by this specimen and the possibility of segmental analysis.

The alcohol markers in hair mostly used for diagnosis of chronic alcoholism are reviewed in this presentation, with emphasis on our original results on this topic. A wide number of alcohol markers have been investigated in blood and urine, but only two non-oxidative direct ethanol metabolites, ethyl glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEE), mainly have been analyzed in hair.

Ethyl glucuronide : EtG is phase II metabolite of ethanol which is formed by the conjugation of ethanol with activated glucuronic acid in the presence of membrane-bound mitochondrial UDP glucuronyl transferase. Only 0.02-0.06 % of total ethanol is eliminated as EtG. EtG is a stable and water-soluble compound, and consequently, analytical methods involve its extraction from the hair matrix by incubation with water or aqueous mixtures, mainly with methanol. Some authors perform a purification step by SPE with aminopropyl columns, while others directly evaporate the solution obtained. Due to the polarity of this compound, when the analysis is performed by GC/MS, derivatization, with PFPA or BSTFA, is required. LOD and LOQ have improved over time : while in 1994 they ranged from 1 to 5 ng/mg, in 2004 they were 0.05 or even 0.002 ng/mg.

Results : The concentrations of EtG reported in the literature are very low. In our case, from 406 hair samples analyzed last year, they ranged from 0.05 to 1.49 ng/mg. Due to the low ethanol metabolism to EtG and the low concentrations of this compound detected in hair, all the authors conclude that EtG is only detected in the hair of alcoholics or heavy alcohol abusers, whereas it is not detected in the hair of social drinkers or teetotalers.

Fatty acid ethyl esters : Two enzymatic activities catalyze the formation of FAEE : acyl-coenzyme A : ethanol *O*-acyltransferase (AEAT) and fatty acid ethyl ester synthases. As a result of their hydrophobic nature, FAEE enter the hair shaft and remain as components of the extractable hair lipids, which are found to be between 1 and 9 % of the hair total mass. In spite of including ethyl palmitate and ethyl oleate, as the most predominant FAEE, the sum of the concentrations of the four esters : ethyl myristate, ethyl palmitate, ethyl oleate and ethyl stearate, is used as an alcohol marker. The analytical determination of the four FAEE is performed by external decontamination of the hair with *n*-heptane, liquid-liquid extraction with dimethylsulphoxide/*n*-heptane mixture, followed by solid phase microextraction of the extracts and GC/MS analysis. In all the reviewed studies, FAEE concentrations are found not only in hair samples from alcoholics, but also in the hair of social drinkers and even teetotalers. For this reason, an adequate cut-off value, to avoid false positive results, is an extremely important matter. The results from the different studies confirm that by using a cut-off of the sum of FAEE higher than 1 ng/mg, excessive alcohol consumption can be established using hair analysis.

Étude multicentrique sur la quantification de la transferrine déficiente en hydrates de carbone dans le sérum : influence des conditions de stockage et de la technique d'analyse

B.M.R. APPENZELLER⁽¹⁾, M. AUGSBURGER⁽²⁾, N. CARDON⁽³⁾, J. THIX⁽⁴⁾, R. WENNIG⁽¹⁾

(1) CRP-Santé / LNS, Division de Toxicologie, Luxembourg ;

(2) IUML, Laboratoire de Toxicologie et Chimie Forensiques, Lausanne ;

(3) H.I.A. Clermont-Tonnerre, Laboratoire de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie Cliniques, Brest ;

(4) Clinique Sainte-Marie, Esh/Alzette

Objectifs : La transferrine déficiente en hydrates de carbone (CDT) est actuellement décrite comme l'un des marqueurs les plus performants pour la mise en évidence d'une consommation abusive chronique et récente d'alcool. Cependant, de nombreux facteurs physiologiques, (maladies ou variants génétiques, hépatopathies non liées à l'alcool, co-migration d'analytes avec la transferrine, etc) peuvent interférer dans la quantification de la CDT et conduire ainsi à des interprétations erronées. De même, les différentes techniques actuellement utilisées (électrophorèse capillaire, immuno-essais, HPLC...) n'offrent pas la même sensibilité et ne sont pas identiquement affectées par les facteurs interférents. Les travaux présentés ici visent dans un pre-

mier temps, à mettre en évidence l'influence des conditions de stockage (température) sur la stabilité de la CDT dans le sérum, ce paramètre pouvant être particulièrement préoccupant pour des échantillons exposés à une température élevée/ambiante (transport d'échantillons, rupture de chaîne du froid, échantillons provenant d'autopsie...) ou en cas de stockage sur le long terme. Dans un second temps, certains échantillons atypiques (sérum vieillis, variants génétiques, abuseurs d'alcool) ont été analysés par plusieurs laboratoires par immuno-essais (IE) et par électrophorèse capillaire (CE), afin de comparer les performances respectives de ces techniques face à de tels échantillons.

Méthodes : Afin d'observer l'influence des conditions de stockage sur la stabilité de la CDT dans le sérum, chacun des échantillons étudiés (provenant de 8 abuseurs d'alcool et 6 buveurs occasionnels) a été divisé en 3 sous-échantillons stockés respectivement à -20°C, à +4°C et à 25°C. Les analyses de CDT ont ensuite été réalisées périodiquement par électrophorèse capillaire afin d'observer l'évolution des différents isoformes de la transferrine (Tf) au cours du temps. La comparaison entre les techniques CE et IE a été réalisée sur 9 sérums analysés en parallèle par les laboratoires de Luxembourg (CE), Esch/Alzette (IE), Lausanne (CE/IE) et Brest (IE).

Résultats : Alors que la CDT apparaît stable dans les sérums placés à -20°C et +4°C sur la période étudiée, le maintien à température ambiante conduit à une rapide (dès la 1^{ère} semaine) modification des proportions respectives des différents isoformes de la Tf, avec pour conséquence un risque potentiel de faux négatifs. La validité des mesures effectuées peut néanmoins être estimée à l'aide des proportions relatives de l'hexasialo-Tf et du rapport pentasialo-Tf / hexasialo-Tf. L'efficacité des techniques IE et CE apparaît comparable pour l'analyse des sérums classiques, mais pour les échantillons atypiques, l'IE présente un risque de faux-négatif ou faux-positif selon les cas.

Conclusion : L'exposition de sérum à température ambiante doit être évitée dans le cadre d'analyse de CDT. En cas de doute, seule la technique CE permet d'estimer la validité des mesures. Les deux techniques conviennent à l'analyse des échantillons classiques, mais la CE est à privilégier pour l'analyse d'échantillons atypiques.

Dosage de l'éthyl glucuronide dans les cheveux de patients anciens alcooliques en cure de sevrage

B.M.R. APPENZELLER⁽¹⁾, R. AGIRMAN⁽¹⁾, P. NEUBERG⁽²⁾, M. YEGLES⁽¹⁾, R. WENNIG⁽¹⁾

(1) CRP-Santé / LNS, Division de Toxicologie, Luxembourg ;

(2) CTU-CHNP, Useldange

Objectifs : L'éthyl glucuronide (EtG) a été dosé dans des prélèvements capillaires segmentés, provenant de patients anciens alcooliques et actuellement en cure de sevrage, afin de mettre en évidence des informations relatives à leur consommation d'alcool. Ces informations ont par la suite été confrontées aux valeurs des marqueurs classiques de consommation abusive d'alcool (γ -GT, transaminases, VGM, CDT), ainsi qu'à la consommation (quantitative et historique) déclarée par les patients.

Méthodes : Les prélèvements capillaires ont été réalisés sur 12 patients tous volontaires. Après des lavages successifs à l'eau et à l'acétone, les cheveux ont été segmentés en portions allant de 0,5 à 1cm selon les cas, puis pulvérisés par broyage. L'EtG a ensuite été extrait par addition d'eau aux cheveux pulvérisés et sonication. Après purification des extraits sur colonne (Isolute® SPE NH₂), l'EtG a ensuite été dosé par chromatographie gazeuse couplée à une détection par spectrométrie de masse en mode d'ionisation chimique négative : GC/MS-NCI (Hewlett Packard, 6890 series CG System – MSD 5973).

Résultats : Les concentrations en EtG observées dans les segments de cheveux correspondant aux périodes de consommation abusive d'alcool vont de 36 à 261 pg par mg de cheveux. Lorsque l'arrêt de consommation d'alcool était suffisamment ancien, une diminution progressive de la concentration d'EtG dans les segments capillaires successifs jusqu'à des valeurs de l'ordre de 10 pg par mg de cheveux a été observée. Ces valeurs sont comparables à celles observées chez des buveurs occasionnels. Les valeurs des marqueurs classiques n'ont pas fourni d'information exploitable dans le cadre de cette étude. En revanche, les concentrations en EtG étaient dans la plupart des cas fortement corrélées avec la consommation déclarée des patients.

Conclusions : Le dosage de l'EtG dans les cheveux segmentés apporte des informations relatives à la consommation d'alcool particulièrement intéressantes dans le cadre de la prise en charge des patients. Il permet ainsi par exemple de mettre en évidence des augmentations importantes de consommation d'alcool, ou encore des tentatives préalables d'arrêt de consommation de la part du patient, impossibles à observer à l'aide des marqueurs classiques. L'analyse capillaire permet également de confirmer l'abstinence des patients au cours de la durée de leur cure de sevrage ou de mettre en évidence une éventuelle rechute.

Soumission chimique

Le Centre d'Accueil en Urgence des Victimes d'Agression (CAUVA) au CHU de Bordeaux

S.GROMB, L.BENALI

Unité de Médecine Légale, CHU, Bordeaux

Introduction : Le Centre d'Accueil en Urgence des Victimes d'Agression (CAUVA) est une structure hospitalière faisant partie intégrante du Service de Médecine légale du CHU de Bordeaux. Les procédures de prise en charge des victimes d'agression utilisées au CAUVA sont pour la plupart uniques en France.

Problématique : Déjà traumatisée par l'agression, la victime subit trop souvent les effets morbides d'une mauvaise prise en charge. Il existe donc une réelle spécificité de prise en charge des victimes d'agression dans les unités médico-judiciaires comme le CAUVA. Les victimes doivent trop souvent encore réaliser un «véritable parcours du combattant» après une agression, à fortiori si elles veulent donner une suite judiciaire à leur traumatisme en déposant une plainte. Le CAUVA lutte contre ce «labyrinthe médico-judiciaire» car d'une part il facilite le constat légal des blessures par un médecin légiste et d'autre part il permet d'accéder plus aisément à la justice en simplifiant les procédures administratives.

Mission du CAUVA : L'objectif premier est d'assurer par une approche multidisciplinaire en une unique unité de lieu et de temps une prise en charge des victimes d'agression sur un plan : médico-légal, psychologique, social et judiciaire. Le CAUVA permet de faire converger les compétences nécessaires vers les victimes d'agression afin de diminuer le phénomène de victimisation secondaire.

Fonctionnement du CAUVA : La prise en charge des victimes d'agression demande de s'adapter à des situations particulièrement hétérogènes.. Le problème est à travers cette souplesse de ne pas léser la personne agressée d'où une adaptabilité des équipes indispensable malgré le cadre légal strict des procédures. La médecine légale, au centre de ce dispositif ne peut pas ignorer les impératifs et besoins des services enquêteurs, du Parquet et de la justice en général, mais également de la victime. Il a donc été créé en collaboration avec ces institutions trois types de procédures de traitement des agressions.

Conclusion : L'approche du CAUVA se veut être par une multidisciplinaire quelque soit la typologie de cette violence. La prévention et la lutte contre la violence impliquent une multiplicité de partenaires : institutions judiciaires, institutions sociales, structures associatives, structures de soins tant somatiques (service d'Urgence) que médico-psychologiques, structures médico-judiciaires. Ces structures ont trop longtemps travaillé de manière non synergique : le CAUVA grâce à une volon-

té multi-institutionnelle a permis de faire converger en une même unité de lieu et de temps ces compétences vers les victimes d'agression.

Soumissions chimiques : un bilan sur trois années

C. DUVERNEUIL⁽¹⁾, B. MATHIEU⁽¹⁾, M. DURIGON⁽²⁾, P. de MAZANCOURT⁽¹⁾, J.C ALVAREZ⁽¹⁾

(1) Laboratoire de toxicologie ;

(2) Service de médecine légale, CHU Poincaré, Garches

Objectifs : L'objet de cette étude est de réaliser une analyse statistique rétrospective des dossiers de suspicion de soumission chimique traités dans notre laboratoire en trois ans, soit 107 expertises.

Méthodes : L'analyse toxicologique a été réalisée sur le sang et les urines en systématique, et depuis 2 ans, de plus en plus fréquemment sur les cheveux. Les recherches ont portées sur l'alcool (dosage par CG/DIF), les stupéfiants (CG/SM), les benzodiazépines (CL/SM/SM), les neuroleptiques (CL/BD et CG/SM), les antidépresseurs (CL/BD et CG/SM), le GHB (CG/SM) et tout autre psychotrope grâce à un screening CL/BD et CG/SM [1]. Toutes les recherches effectuées sur les cheveux ont été réalisées par CL/SM/SM.

Résultats : L'étude a porté sur 107 suspicions de soumission chimique. Huit dossiers seulement concernent des victimes masculines, le plus souvent violées. Pour le reste, il s'agit de femmes (n=99) agressées sexuellement (84%), volées (7%), empoisonnées (6%) ou enlevées (1%). Dans la plupart des dossiers (85 sur 107), nous n'avions pas de renseignements sur le profil de l'agresseur, le plus souvent par amnésie de la victime. Dans 16 des 22 dossiers restants, l'agresseur était un homme seul, dont 13 étaient connus de la victime. Dans un seul cas, l'agresseur était une femme connue de la victime. Dans 5 cas, la victime a été agressée par plusieurs hommes (jusqu'à 5). Pour 36 dossiers (33%), aucune molécule n'a été mise en évidence mais, dans 10 de ces dossiers, le délai entre faits et prélèvements était supérieur à 36 heures. Pour les 26 autres dossiers négatifs, le délai n'était pas connu. Parmi les substances mises en évidence, les benzodiazépines sont les plus fréquentes (présentes 37 fois dans 25 dossiers) notamment du bromazépam (10 cas), du nordazépam (8 cas), de l'oxazépam (5 cas) et de l'alprazolam (4 cas). Dans 6 cas, la benzodiazépine faisait partie du traitement habituel. Viennent ensuite l'alcool et le cannabis, présents chacun dans 27 dossiers, les opiacés et les neuroleptiques (5 dossiers), les amphétamines, la cocaïne, la méthadone, le méprobamate (2 dossiers) et le phénobarbital (1 dossier). D'autres molécules ont été retrouvées, notamment des antidépresseurs, appartenant le plus souvent à des traitements habituels. Pour

22 des 37 benzodiazépines retrouvées, l'absence de cheveux n'a pas permis de préciser s'il s'agissait d'une soumission ou d'un usage chronique. L'analyse des cheveux prélevés simultanément avec le sang et les urines a permis de déterminer que la benzodiazépine était utilisée de manière chronique dans 3 cas, rendant peu plausible une soumission. Par contre, dans 6 autres cas (bromazépam 3 cas, zolpidem 1 cas, alprazolam 1 cas, midazolam 1 cas), la benzodiazépine n'a été retrouvée sur aucun des segments du cheveu, en faveur d'une vraie soumission chimique. Sur 7 prélèvements différés de cheveux effectués au moins 1 mois après les faits, un seul a permis la mise en évidence, sur le premier segment de cheveu, d'une substance susceptible d'avoir entraîné une soumission, à savoir le cannabis. La recherche de cannabis sur les cheveux présente un grand intérêt car elle permet la plupart du temps d'exclure une soumission par la mise en évidence d'une consommation chronique.

Conclusion : cette étude montre que les benzodiazépines restent les molécules les plus souvent rencontrées lors de soumission chimique et que l'analyse des cheveux est indispensable aussi bien pour la mise en évidence d'une soumission chimique que pour différencier une prise unique d'une prise chronique.

Référence :

(1) Kintz P. Soumission chimique : prise en charge toxicologique. Ann. Toxicol. Anal. 2003 ; 15 : 395-406.

Fenêtres de détection du tétrazépam dans les urines, la salive, la barbe et les cheveux, avec une attention particulière pour les cas de soumission chimique

M. CONCHEIRO^(1,2), M. VILLAIN⁽²⁾, M. LÓPEZ-RIVADULLA⁽¹⁾, P. KINTZ⁽²⁾

(1) Laboratorio de Toxicología, Instituto de Medicina Legal, Santiago de Compostela, Espagne ;

(2) Laboratoire ChemTox, Illkirch-Graffenstaden

Objectif : La soumission chimique, ou administration de substances psychoactives à une personne à des fins délictueuses ou criminelles, est un phénomène en constante augmentation. A priori, le produit idéal pour l'agresseur est celui qui est actif à faible dose, rapidement soluble en milieu aqueux, sans goût appréciable, dont l'action sur l'organisme est rapide et qui provoque un processus amnésique sur les faits qui vont être commis. Les produits les plus fréquemment observés sont l'alcool éthylique, le cannabis, les benzodiazépines et les hypnotiques. Les méthodes analytiques doivent être très sensibles, cette nécessité naît de la combinaison de deux facteurs principaux qui caractérisent cette pratique délictueuse, à savoir l'administration d'une dose unique de xénobiotique et le délai entre les faits et les

prélèvements. Nous avons étudié les fenêtres de détection du tétrazépam dans les urines, la salive, la barbe et les cheveux après une prise unique de 50 mg.

Méthodes : Les deux volontaires, un homme et une femme, ont pris une dose unique de tétrazépam (50mg) dans un verre d'eau. Les urines ont été prélevées sur 240 heures (homme et femme), le salive sur 515 minutes (femme), la barbe sur 34 jours (homme) et les cheveux après 4 semaines (homme et femme). Le dosage du tétrazépam a été réalisé par LC-MS/MS, en mode d'ionisation ESI, après une extraction liquide/liquide avec un mélange dichlorométhane/éther à pH = 8,4 en présence d'un étalon interne, le diazepam-d₅. La colonne utilisée était une XTerraMS C18 3,5µm, 2,1x100mm, en gradient de 5% d'acétonitrile-95% d'acide formique 0,1% à 80-20% en 10 min à 0,2 mL/min.

Résultats : Dans les urines, le pic de concentration a été de 2586 ng/mL, observé après 8 heures (femme) et 924 ng/mL après 12 heures (homme). Les urines sont restées positives 240 heures (14 ng/mL et 13 ng/mL, respectivement). Le pic de concentration dans la salive a été obtenu après 150 minutes (6,6 ng/mL). Le tétrazépam était détectable pendant les 515 minutes. Dans le cas des cheveux, il a été retrouvé du tétrazépam dans les premiers segments (0 à 2 cm) aux concentrations de 123 et 175 pg/mg. La barbe était positive après 6 jours et l'est restée pendant 27 jours.

Conclusion : Avec comme objectif d'établir les fenêtres de détection du tétrazépam, les auteurs ont développé une méthode sensible, spécifique et reproductible pour sa détection et son dosage dans les urines, la salive, la barbe et les cheveux. A partir des résultats obtenus, il est possible de mieux documenter les observations de soumission chimique où le tétrazépam est présent.

Le glibenclamide utilisé comme arme chimique : cas rare d'une intoxication criminelle

M. VILLAIN⁽¹⁾, F.FLESCHE⁽²⁾, C.TOURNOUD⁽²⁾, V.CIRIMELE⁽¹⁾, P. KINTZ⁽¹⁾

(1) Laboratoire ChemTox, Illkirch-Graffenstaden ;

(2) CAP, Hôpital Civil, Strasbourg

Objectif : Développer une méthode de dosage du glibenclamide (sulfamide hypo-glycémiant) par LC-MS/MS, applicable au sang et aux cheveux, afin de documenter un cas d'intoxication criminelle.

Description du cas : Un homme, âgé de 30 ans, est hospitalisé pour coma profond et convulsions au lendemain d'une soirée bien arrosée. Une première glycémie mesurée par le SAMU à son arrivée au domicile est à 0,33 g/l. Les services de secours mettent en place une intubation et une perfusion de Valium et de Glucosé 30%. Au service de réanimation, le bilan biologique

retrouve une glycémie à 0,40 g/l et une cytolyse hépatique modérée. L'évolution est rapidement défavorable, le patient est depuis en coma végétatif chronique. La famille signale, quelques jours après l'admission, que le frère du patient lui aurait mis plusieurs comprimés de glibenclamide (traitement de leur grand-mère) dans sa bière au cours de la soirée précédente.

Méthode : Après une extraction liquide/liquide (éther/dichlorométhane, 50/50) en milieu acide (pH 5,5), les résidus de sang et de cheveux ont été injectés au travers d'une colonne XTerra C18 (3,5µm, 2,1x100mm) d'un système LC-MS/MS Waters. La séparation a été réalisée par un gradient d'acétonitrile et de tampon formiate 2mM + 0.1% acide formique et chaque composé a été identifié par 2 transitions (m/z 494 à 169 et 369 pour le glibenclamide et m/z 324 à 110 et 127 pour l'étalon interne, le gliclazide) en mode ES positif.

Résultats : Après vérification de la linéarité dans le sang (de 1 à 100 ng/ml) et dans les cheveux (de 5 à 100 pg/mg), le glibenclamide a été dosé à 41 ng/ml dans le sang, 23 pg/mg dans le premier segment de cheveux analysé (0 à 2 cm) et 31 pg/mg dans le second (2 à 4 cm). La concentration sanguine apparaît comme thérapeutique et l'analyse des cheveux élimine l'hypothèse d'un incident unique.

Conclusion : La LC-MS/MS apparaît comme un outil satisfaisant pour doser le glibenclamide dans différentes matrices. Dans ce cas, le résultat sanguin est en accord avec le tableau clinique du patient et l'analyse des cheveux apporte une information supplémentaire. La prochaine étape sera de comparer ces concentrations à celles retrouvées chez des sujets traités au long cours.

Soumission chimique sur l'autoroute : le véhicule était du bromazépam

V.DUMESTRE-TOULET⁽¹⁾, M. VILLAIN⁽²⁾, P. KINTZ⁽²⁾

(1) Laboratoire TOXGEN, Bordeaux ;

(2) Laboratoire ChemTox, Illkirch-Graffenstaden

Objectif : Nous présentons ici un cas de discrimination entre une exposition unique et un usage répété de bromazépam par l'analyse séquentielle des cheveux lors de l'agression sexuelle d'un sujet soumis chimiquement par son agresseur.

Description du cas : Une jeune femme de 21 ans est victime d'un viol sur une aire d'autoroute. Elle déclare que le conducteur lui a donné un comprimé blanc allongé peu de temps avant de s'arrêter car elle ne se sentait pas bien. Une expertise toxicologique avec analyse de sang et de cheveux est requise afin de mettre en évidence les éventuelles substances absorbées.

Matériels et méthodes : Des prélèvements sanguins et de cheveux ont été analysés selon les procédures habituelles du laboratoire. L'alcool est mesuré par GC/FID,

les stupéfiants et les médicaments psychoactifs sont recherchés par technique ELISA sur microplaques, LC/DAD et GC/MS. Le bromazépam identifié et quantifié dans le sang par LC/DAD a été recherché dans 3 segments de cheveux par LC-MS/MS après incubation dans un tampon à pH 8,4 et extraction liquide/liquide en présence de diazépam-d₅ comme étalon interne.

Résultats et discussion : Le bromazépam a été identifié dans le sang à une concentration de 151 ng/ml, résultat en faveur d'une prise récente. La recherche d'alcool et de stupéfiants s'avère négative. Les analyses réalisées dans les segments de cheveux mettent en évidence le bromazépam à des concentrations respectivement de 7,5 et 0,9 pg/mg dans les segments 0-2 cm et 2-4 cm et négative dans le dernier segment. Les concentrations retrouvées dans les cheveux de 2 volontaires après la prise unique d'un comprimé de 6 mg de bromazépam sont très faibles : 0,8 et 4,7 pg/mg (1). Plusieurs cas de soumission chimique avec du bromazépam ont été décrits dans la littérature (2, 3) avec des concentrations également très faibles (2 à 10 pg/mg) mesurées par technique LC-MS/MS.

Conclusion : La concentration de bromazépam mesurée dans le sang du sujet indiquait une prise récente. L'agresseur présumé prétendait une prise chronique et depuis longtemps par la victime. Les analyses de cheveux par la technique LC-MS/MS sont en faveur d'une exposition unique et récente au bromazépam, infirmant les déclarations de l'agresseur.

Références :

- (1) Chèze M. et coll. Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC-MS/MS. Application to forensic cases of drug facilitated crimes. *Forensic Sci. Int.* 2004 ; 145 : 123-30.
- (2) Marc B. et coll. Sexual assault under benzodiazepine submission in a Paris suburb. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2000 ; 263 : 193-7.
- (3) Villain M. et coll. Hair to document drug-facilitated crimes. About 4 cases involving bromazepam. *J. Anal. Toxicol.* 2004 ; 28 (6) : 516-9.

Une rencontre sur Internet : source de soumission chimique

J.C. ALVAREZ⁽¹⁾, E. GUILLOT⁽¹⁾, E. ABE⁽¹⁾, C. DUVERNEUIL⁽¹⁾, B. MATHIEU⁽¹⁾, N. BOUROUK-BA⁽¹⁾

(1) Laboratoire de toxicologie ;

(2) Service de médecine légale, CHU Poincaré, Garches

Description du cas : Un homme âgé de 58 ans (M. X), communique sur un forum Internet avec des individus. Un contact s'établit avec l'un d'entre eux, qui lui demande son numéro de portable afin de l'appeler. Une fois contacté, l'individu demande à Mr X son adresse

pour lui rendre visite et passer une soirée avec lui. Cette soirée a lieu le soir même. L'individu se présente à 18h30. Les deux hommes prennent un verre, et ont une relation homosexuelle. L'individu propose à Mr X de finir leurs verres avant de se séparer. Celui-ci se souvient avoir fini son verre vers 19h30, puis c'est le trou noir. Il se réveille le lendemain matin vers 7h, seul dans l'appartement. Manquent alors dans l'appartement un certain nombre d'objets, dont son téléphone portable, sa chaîne HiFi, son appareil photo numérique, son blouson de cuir. M. X porte plainte dans l'après-midi, et des prélèvements sanguins et urinaires sont réalisés au CMJ à 15h, soit 19,5 heures après les faits. Les cheveux ne sont pas prélevés.

Méthodes : Une recherche urinaire des stupéfiants (amphétamines, cannabis, cocaïne, opiacés, LSD) est réalisée par immunoanalyse (Abbott® et Microgenics®). Une recherche non spécifique ("screening") après extraction liquide/liquide en milieu acide et basique et des recherches spécifiques des psychotropes (barbituriques, benzodiazépines, antidépresseurs et neuroleptiques) sont effectuées par CPG/SM, CLHP/BD et CL/SM/SM. Le GHB est dosé par CPG/SM et l'alcool par CPG/FID.

Résultats : L'examen clinique de Mr X ne montre aucune lésion. Aucune ITT n'est fixée. Mr X dit ne jamais prendre de médicaments. D'un point de vue toxicologique, aucun stupéfiant n'est retrouvé. La recherche des psychotropes révèle l'absence d'antidépresseurs, de barbituriques et de neuroleptiques. Le GHB est à concentration physiologique (< 0,25 mg/L) aussi bien dans le sang que dans l'urine. L'alcool est négatif dans le sang et l'urine. La recherche des benzodiazépines en LC/MS/MS révèle la présence de lorazépam dans le sang à la concentration de 14 ng/mL et de 10 ng/mL dans les urines non hydrolysées. Après hydrolyse par β -glucuronidase des urines, la concentration retrouvée est de 2,2 μ g/mL, le lorazépam étant une benzodiazépine faiblement éliminée sous forme inchangée (<10%) car fortement glucuroconjuguée. Des échantillons de sang et d'urine sont analysés par CLHP/BD afin de déterminer si cette technique aurait permis de déceler cette substance. Seule l'urine hydrolysée permettait d'affirmer la présence de lorazépam. Après contact avec la police afin de récupérer des cheveux, et compte tenu de nos résultats, il nous est fait part de la disponibilité d'écouvillons qui ont été passés dans le verre de la victime et dans celui de l'auteur, ainsi qu'un flacon en plastique vide retrouvé dans l'appartement. L'analyse des écouvillons montre la présence de lorazépam uniquement dans l'écouvillon passé dans le verre de la victime. L'analyse du flacon vide montre également la présence de lorazépam, ce flacon ayant probablement servi à introduire dans le verre de la victime le lorazépam préalablement dissous dans du liquide. Compte tenu de ces résultats, les cheveux de la victime n'ont pas été prélevés.

Conclusion : La soumission chimique peut intervenir aussi bien pour des viols que pour des vols, appelés "vols par ruse". Notre cas démontre l'intérêt de la CL/SM/SM par rapport à la CLHP/BD, notamment dans la recherche des benzodiazépines, l'utilisation de la CLHP/BD passant nécessairement par une hydrolyse des urines. Les rencontres occasionnelles sur Internet peuvent s'avérer dangereuses, d'autant plus que l'auteur de cette soumission court toujours.

A propos d'un cas d'utilisation criminel-le d'acépromazine

H. PAUTHIER⁽¹⁾, F. CHARVIER⁽¹⁾, F. SAINT-MARCOUX⁽¹⁾, F.L. SAUVAGE⁽¹⁾, C. CABOT⁽²⁾, J.-M. GAULIER⁽¹⁾

(1) Service de Pharmacologie et Toxicologie, CHU Dupuytren, Limoges ;

(2) Centre Antipoison et de Toxicovigilance, CHU Purpan, Toulouse

Objectif : La question de la prise en charge analytique des cas de soumission chimique est un problème complexe : substances de nature et de mode d'action pharmacologique très variés, actives parfois à faibles concentrations, vitesses d'élimination parfois rapides, instabilité dans les prélèvements biologiques (dégradation ou production *in vitro*). Nous présentons ici un cas illustrant une situation compliquée par deux éléments supplémentaires : implication d'une substance pour laquelle aucune zone de concentrations sanguines «habituellement observées» n'est définie et pour laquelle il existe très peu de données pharmacocinétiques d'une part, et utilisation d'une spécialité vétérinaire d'autre part.

Description du cas : Au petit matin, une jeune femme victime d'une agression sexuelle est découverte par ses voisins à son domicile, ligotée et inconsciente. Des échantillons de sang sont prélevés 8 heures après les faits, et divers contenants susceptibles d'avoir été utilisés lors de l'agression (verres, cuillères) sont saisis à son domicile. Un mois et demi après les faits, un échantillon de cheveux est prélevé sur la victime.

Méthode : Une recherche large de médicaments et toxiques a été effectuée dans le sang et les contenants saisis, par chromatographie liquide couplée à la spectrophotométrie UV à barrette de diodes et par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Dans le sang, des recherches spécifiques de substances ou familles de substances susceptibles d'être utilisées aux fins de soumission chimique ont été réalisées à l'aide de différentes techniques chromatographiques. Dans les cheveux, une recherche spécifique d'acépromazine par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem a été réalisée après ajout de l'étalon interne (chlorpromazine-D₃), hydrolyse alcaline et extraction sur colonne Oasis HLB. La détection a été réalisée en mode MRM sur les transitions m/z 327 →

254, 86 et 58 (acépromazine) ; m/z 322 → 89 (chlorpromazine-D₃).

Résultats : Les investigations dans les échantillons sanguins se sont révélées négatives. Toutefois, la présence d'acépromazine a été mise en évidence dans le résidu d'un des verres saisis. Cette découverte surprenante (absence d'acéprométazine et de clorazépate), les rares données pharmacocinétiques qui permettent notamment d'envisager une courte demi-vie d'élimination sanguine, ainsi que les quelques cas d'intoxications rapportés [1,2] ont alors conduit à indiquer aux enquêteurs l'éventuelle utilisation d'une spécialité vétérinaire ayant l'acépromazine comme seul principe actif. Au cours des jours qui ont suivi, un des suspects a fini par avouer l'agression au cours de laquelle il avait utilisé un tranquillisant vétérinaire (Vétranquil® : acépromazine) pour calmer sa victime. La présence d'acépromazine (31 pg/mg de cheveux) dans le segment capillaire correspondant à la période des faits a permis de confirmer les aveux de l'agresseur.

Conclusion : Dans un contexte de soumission chimique, ce cas illustre la possibilité d'avoir des analyses toxicologiques sanguines et urinaires négatives malgré des prélèvements biologiques précoces et la mise en œuvre de méthodologies spécifiques et sensibles.

Références :

- (1) Clutton R.E. Attempted suicide with acepromazine maleate : a case report. *Vet. Hum. Toxicol.* 1985 ; 27(5) : 391.
- (2) Berns S.D. et coll. Pediatric acepromazine poisoning : the importance of child-resistant packaging for veterinary drugs. *Am. J. Emerg. Med.* 1993 ; 11(3) : 247-8.

Tiapride et vieilles dentelles : une observation inusitée de soumission chimique

J.S. RAUL, C. JAMEY, A. TRACQUI, A. GERAUT, B. LUDES

Institut de Médecine Légale, Strasbourg

Objectif : Présenter une observation originale de soumission chimique (administration occulte de sédatifs à plusieurs personnes âgées démentes jugées "agitées"), élucidée grâce à l'analyse capillaire, notamment par couplage HPLC-MS/MS.

Méthodes : Les analyses sont réalisées sur les prélèvements capillaires (5 à 8 cm) de 4 femmes âgées de 79 à 95 ans pensionnaires de la même maison de retraite, suite à une enquête pour suspicion d'administration occulte de sédatifs par un membre du personnel soignant. Après section de chaque mèche en 2 tronçons (1^{er} cm proximal + reste de la mèche) et décontamination par CH₂Cl₂, les cheveux sont pulvérisés et environ 50 mg sont incubés 12 h à 56°C en tampon pH 9,5, en présence de prazépam utilisé comme standard interne. Extraction par CH₂Cl₂/2-propanol/n-heptane (25/10/65,

v/v) puis reprise de l'extrait sec par méthanol et analyse par méthodes HPLC-DAD, GC-MS et HPLC-MS/MS.

Résultats : Les résultats des analyses capillaires sont présentés dans le tableau suivant (toutes les concentrations sont exprimées en ng/mg) et peuvent être comparés au traitement médical prescrit aux 4 personnes âgées, selon dossiers médicaux communiqués à l'expert :

	A... (F, 79 ans)	B... (F, 95 ans)	C... (F, 84 ans)	D... (F, 90 ans)
Traitement prescrit	Effexor® 50 Théralène® gtttes Doliprane®	Théralène® gtttes Doliprane®	Théralène® gtttes Doliprane Lasilix® Lévothyrox®	Risperdal® Stilnox® Aldactone® Motilium®
Cheveux (0 à 1 cm)	Venlafaxine 20,20 Alimémazine 0,99 Tiapride 22,70	Alimémazine 3,60 Tiapride 1,50	Alimémazine 3,60 Paracétamol 86,60 Tiapride 0,028	Risperidone 0,90 Zolpidem 0,021 Tiapride 0,026
Cheveux (reste de la mèche)	Venlafaxine 4,90 Tiapride 7,50	Alimémazine 0,86 Tiapride 0,35	Alimémazine 1,49 Paracétamol 87,40 Tiapride 0,040	Risperidone 1,08 Zolpidem 0,074 Tiapride 0,012

Ces résultats montrent la présence, en plus des principes actifs des traitements prescrits, de tiapride dans tous les segments capillaires des 4 sujets. Le tiapride, principe actif de Tiapridal® ou Equilium®, est une benzamide neuroleptique, essentiellement utilisé comme sédatif, notamment pour le traitement bref des états d'agitation et d'agressivité chez l'éthylique chronique ou le sujet âgé. Sa mise en évidence dans le présent contexte apparaît donc fortement suggestive d'une administration occulte (hors prescription médicale) d'un médicament à base de tiapride aux 4 personnes âgées - probablement dans un but de sédation accrue.

Conclusion : A côté des finalités classiques de la soumission chimique (vol, agression sexuelle), l'administration occulte de sédatifs à certains sujets (enfants, handicapés mentaux, personnes âgés démentes) afin d'améliorer le "confort" de leur entourage constitue un phénomène peu documenté dans la littérature médico-légale, et dont l'ampleur est difficile à apprécier. La présente observation démontre une nouvelle fois le rôle central du laboratoire de toxicologie dans l'élucidation de telles violences faites à autrui.

La soumission chimique : des analyses ultra performantes

M. CHÈZE, G. PÉPIN, M. DEVEAUX

Laboratoire TOXLAB, 7 rue Jacques Cartier, 75018 Paris

Objectif : Nous rapportons 4 cas de soumission chimique illustrant la nécessité de repousser le plus possible les limites de détection, par l'amélioration de la sensibilité et de la spécificité des techniques analytiques.

Méthodes : Les fluides biologiques sont extraits par Toxitude®A en présence de 10 ng/mL de clonazépam-d4 (standard interne), puis repris après évaporation par 60 µL d'acétonitrile/méthanol (50/50). Les cheveux sont segmentés, décontaminés au dichlorométhane, séchés puis coupés finement. Vingt milligrammes sont

incubés une nuit dans du tampon Soerensen pH 7,6 en présence de 100 pg/mg de clonazépam-d4 (standard interne), puis extraits par 2 mL de dichlorométhane. Après centrifugation, la phase organique est filtrée sur PTFE 0,2 µm puis évaporée à sec et reprise par 60 µL d'acétonitrile/méthanol (50/50). Les extraits sont injectés 3 fois en LC-ESI-MS/MS triple quadripôle TSQ Quantum Ultra (ThermoElectron) en mode SRM, sur colonne Uptisphere C18 150x2mm (Interchim, France) thermostatée à 30°C. La phase mobile est délivrée en mode gradient (tampon formiate d'ammonium 2 mM pH 3/ ACN) pour une durée d'analyse de 17 min. Cette méthode permet la recherche simultanée de 21 benzodiazépines, de zopiclone, zolpidem, doxylamine, hydroxyzine, cyamémazine et d'alimémazine. Les dosages utilisent des droites de calibration de 0,1 à 100 ng/mL dans les fluides biologiques et de 0,5 à 100 pg/mg dans les cheveux.

Résultats : Cas #1 : Un homme est drogué à son insu lors d'un dîner en famille. Le lendemain, considéré comme ivre, on lui refuse l'accès à l'avion qu'il devait prendre. Il constate le vol de pierres précieuses. L'analyse, par un laboratoire de biologie médicale, de ses urines prélevées le lendemain des faits montre la présence de lormétazépam (Noctamide®) et de son métabolite le lorazépam. L'analyse des cheveux sur Quantum Ultra montre la présence de lormétazépam (0,91 pg/mg) sur le segment correspondant à la période des faits, alors que la recherche était négative sur Quantum Discovery car inférieure à la LOD. Cas #2 : Une jeune femme est droguée à son insu lors d'une soirée arrosée. Le laboratoire requis pour l'analyse évoque, sans pouvoir être formel, la présence de nordazépam par LC-MS/MS dans les urines prélevées 5 à 8 heures après les faits. L'analyse réalisée sur Quantum Ultra nous a permis de confirmer et de doser le nordazépam (0,17 ng/mL) et de mettre en évidence de l'oxazépam (0,45 ng/mL), son principal métabolite. Cas #3 : Une étudiante reçoit dans sa chambre un ami qui lui offre une tartelette aux fraises au goût très amer. Elle pense avoir été violée. Les OPJ interpellent l'auteur qui aurait avoué avoir utilisé du Temesta® (lorazépam). L'analyse des cheveux de la victime montre cependant la présence de zolpidem (18,9 pg/mg) sur le segment correspondant à la période des faits. Par contre le lorazépam n'a pas été mis en évidence. Cas #4 : Une jeune fille rend visite à un ami qui lui sert une tisane à la camomille. Elle se souvient que l'homme lui aurait tendu 3 comprimés blancs ovales. L'analyse du sang prélevé 24 heures après les faits montre la présence de clonazépam (42,4 ng/mL), 7-aminoclonazépam (28,4 ng/mL), lorazépam (86,4 ng/mL) et d'hydroxyzine (5,8 ng/mL). L'analyse des cheveux montre sur le segment correspondant à la période des faits la présence de clonazépam (28,5 pg/mg), 7-aminoclonazépam (16,4 pg/mg), lorazépam (15,9 pg/mg) et d'hydroxyzine (40,9 pg/mg). Les sachets de tisane usagés et jetés, saisis au domicile de l'auteur, contenaient du clonazépam

et du lorazépam.

Conclusion : Cette méthode de détection des benzodiazépines et autres agents de soumission a de très faibles concentrations, dotée d'une grande spécificité et d'une grande sensibilité grâce au spectromètre de masse tandem triple quadripôle Quantum Ultra, nous permet le plus souvent d'apporter la preuve scientifique de l'acte criminel de la soumission chimique.

Toxicologie hospitalière

Approche clinique des intoxications aiguës aux antalgiques opioïdes

V. DANEL

Toxicologie Clinique & Toxicovigilance, CHU, 38043 Grenoble cedex 9

Objectif : Décrire les principales caractéristiques cliniques de l'intoxication aiguë aux antalgiques opioïdes en se limitant aux faits validés. Rappeler les principes thérapeutiques. Les aspects physiopathologiques connus ou supposés ne sont pas envisagés.

Méthodes : Consultation des principaux ouvrages récents, français et anglo-saxons, de toxicologie clinique. Recherche bibliographique limitée à des mises au point et à des revues de littérature récentes.

Résultats : L'intoxication aiguë par antalgique opioïde est une urgence vitale, l'hospitalisation est impérative. Le pronostic initial est lié à la survenue d'une insuffisance respiratoire aiguë, sa correction est l'objectif essentiel du traitement en urgence. La cause de l'intoxication est souvent accidentelle chez le toxicomane : dose toxique du fait d'une composition variable en principes actifs, baisse ou rupture de la tolérance, rupture d'emballage intracorporel. Il peut s'agir dans d'autres cas d'une tentative de suicide.

Le diagnostic de l'intoxication aiguë non compliquée est facile le plus souvent. Le tableau clinique associe des troubles de conscience, une bradypnée et un myosis serré en tête d'épingle. La fréquence respiratoire est souvent inférieure à 12 c/min, une cyanose peut être observée. Le patient est stimuable et réactif à la douleur.

L'intoxication compliquée peut comporter une infection broncho-pulmonaire, un coma, des convulsions, un collapsus cardio-vasculaire, une hypothermie, un œdème pulmonaire non cardiogénique, une rhabdomyolyse.

Un coma profond et/ou prolongé, l'inefficacité du traitement antagoniste, sont les témoins d'une hypoxie cérébrale sévère ou la conséquence d'une association toxique, à des psychotropes en particulier. Une mydriase peut être observée en cas d'intoxication par la péthidine, de prise associée d'anticholinergique ou d'anoxie cérébrale prolongée. Quelques molécules opioïdes peuvent modifier le profil clinique habituel, comme la méthadone (intervalle libre, effets prolongés), le dextropropoxyphène (convulsions, choc cardiogénique

avec troubles du rythme et de la conduction, hypoglycémie) ou le tramadol (syndrome sérotoninergique, convulsions).

Le traitement essentiel de l'intoxication est celui de l'insuffisance respiratoire aiguë ; il peut être symptomatique (assistance respiratoire) ou pharmacologique (antagonisme spécifique par la naloxone). En pratique, les circonstances et les moyens disponibles guident le choix, l'objectif étant dans tous les cas d'obtenir une ventilation efficace. La naloxone, antagoniste spécifique (qui ne modifie donc pas l'élimination du toxique), peut avoir une efficacité incomplète avec les agonistes partiels comme la buprénorphine et n'a aucun effet sur les convulsions ou l'état de choc cardiogénique du dextropropoxyphène. La possibilité d'une intoxication mixte dextropropoxyphène – paracétamol peut nécessiter un traitement par la N-acétylcystéine.

Conclusion : Les aspects cliniques de l'intoxication par antalgique opioïde sont bien connus et documentés. Quelques particularités peuvent être liées à la voie d'administration, à la dose ou à certaines molécules. Le risque principal est la survenue d'une dépression respiratoire pouvant entraîner le décès. Le traitement, dont l'objectif est la restauration d'une ventilation efficace, est symptomatique (assistance respiratoire) ou spécifique (naloxone).

Épidémiologie des cas d'intoxication par le dextropropoxyphène et le tramadol : revue des cas du centre antipoison (CAP) de Lille

P. NISSE

Centre antipoison-Toxicovigilance, CHRU, 5 avenue Oscar Lambret, 59037 Lille cedex

Introduction : Suite à la décision britannique de retrait des antalgiques à base de dextropropoxyphène (DPX), l'Afssaps a lancé une analyse nationale des données des centres antipoisons français (recueil en cours). Dans l'attente des résultats définitifs français, nous présenterons les résultats des cas d'intoxication par le DPX et le tramadol (T) déclarés au CAP de Lille.

Méthode : Analyse rétrospective des cas d'intoxication volontaire ou accidentelle impliquant la prise de DPX ou de T seul (en mono intoxication) au cours des 10 dernières années. La gravité a été évaluée rétrospectivement à l'aide du *Poisoning Severity Score* (PSS)

Résultats : Entre le 1^{er} janvier 1995 et le 31 mars 2005, 280 870 cas d'intoxication dont 89 310 tentatives d'auto-lyse ont été rapportés au CAP de Lille. La répartition des cas impliquant le DPX ou le tramadol est la suivante :

Intoxication par le DPX ou le tramadol	DPX (dont autolyse)	T (dont autolyse)
- associé à un autre produit	3 670 (3 041)	768 (508)
- seul (mono intoxication)	1 059 (654)	342 (143)
- associé à une substance illicite	14 (13)	5 (5)
- évolution létale	25 (25)	1 (1)

Vingt six décès sont rapportés dont 5 en mono intoxication (DPX : 4 cas – T : 1 cas) et 2 associés à une drogue (cocaïne-cannabis : 1 cas ; héroïne : 1 cas). Un dosage du DPX et du T a été effectué pour 10 des 25 décès impliquant le DPX (de 16,63 à 10 000 ng/mL) et dans le seul décès avec le T (1,18 µg/mL).

Nous nous sommes intéressés aux 1401 cas d'intoxications mono-médicamenteuses par ingestion de DPX ou de T. L'analyse des circonstances retrouve une tentative de suicide dans 797 cas (57%). Plus de la moitié des intoxications volontaires (406 cas) ont lieu dans la tranche d'âge des 15-30 ans. L'âge moyen est de 32 ans (extrêmes 10 mois – 88 ans) avec un écart type de 18 ans. Le sexe ratio montre une prédominance féminine quelques soient les circonstances (accidentelle 57% - volontaire 74,5%). Si le nombre d'appel pour intoxication accidentelle avec l'un de ces 2 produits est peu évolutif, leur implication au décours d'une tentative de suicide est en constante augmentation.

Tous les cas graves (PSS 3 : 15 cas) ou mortels (PSS 4 : 5 cas) sont rapportés au décours de tentative de suicide avec notamment la présence de troubles de conscience sévères (6 cas), d'une bradypnée (4 cas), de crises convulsives généralisées prolongées et répétées (4 cas) et d'un arrêt cardiaque récupéré dans 3 cas. La symptomatologie est absente ou bénigne dans 100% des cas d'intoxication accidentelle (accident domestique, erreur ou accident thérapeutique).

Conclusion : Avant de pouvoir conclure qu'en France, le DPX n'est pas un problème de santé publique comparable à celui de notre voisin britannique, il serait souhaitable d'attendre la publication des résultats de l'analyse nationale de l'Afssaps.

Intoxications au dextropropoxyphène ou au tramadol : bilan d'un an de recueil par la commission de Toxicologie Clinique de la SFTA

M. ARTUR, B. CAPOLAGHI, S. COHEN, R. DENOOZ, N. HOUDRET, N. JOURDIL, MF. KERGUERIS, D. LAMIABLE, M. MOULSMA, N. SADEG, A. TURCANT

Groupe de Travail Toxicologie Hospitalière de la SFTA

Objectifs : Le dextropropoxyphène et le tramadol sont deux antalgiques opioïdes très prescrits. Il a paru intéressant aux membres de la commission de faire le point sur leur toxicité clinique observée.

Matériels et méthodes : L'étude a consisté au recueil des cas où une mise en évidence de dextropropoxyphène ou de tramadol dans le sang ou les urines a été observée au décours d'un screening toxicologique. Ce travail a été pratiqué dans les établissements des membres du Groupe de Travail Toxicologie Hospitalière de la SFTA. Ont été exclus les dossiers rapportant l'utilisation de l'une ou l'autre de ces deux molécules dans un but de

toxicomanie.

Pour chaque patient devaient être recueillis les données démographiques, les concentrations en dextropropoxyphène (DP), norpropoxyphène (NP) ou tramadol, la concentration en paracétamol, les médicaments associés et les signes cliniques (digestifs, respiratoires, cardiaques, neurologiques).

Résultats :

	Dextropropoxyphène	Tramadol
Population	180 cas : 138 sang + 51 urines 111 femmes / 69 hommes 34,6 ± 18 ans	116 cas : 101 sang + 28 urines 69 femmes / 47 hommes 45 ± 20,3 ans
Concentration moyenne	DP : 0,18 mg/L ± 0,27 NP : 0,75mg/L ± 3,79	1,38 mg/L ± 1,47 pas de métabolites quantifiés
Concentration maximale	DP : 2,2 mg/L - NP : 40 mg/L DP: 2 cas > 1mg/L	7,3 mg/L 22 cas > 2mg/L
Paracétamol	99 dosages soit 55%	14 dosages soit 12%
Concentration moyenne	52,4 mg/L ± 57,8	23,2 mg/L ± 28,2
Associations	dans 58% des cas	dans 45% des cas
Renseignements cliniques	dans 52 % des cas	dans 45% des cas
Comas	12 soit 6,6%	8 soit 6,9%

Les comas sont le plus souvent observés dans les cas d'intoxications poly médicamenteuses. Il n'y a pas de corrélation entre les concentrations de dextropropoxyphène et de paracétamol ni entre les concentrations de dextropropoxyphène ou de tramadol et la gravité clinique.

Discussion : Le dextropropoxyphène et le tramadol font désormais partie du profil des médicaments rencontrés dans les intoxications médicamenteuses volontaires. Le dextropropoxyphène étant toujours associé au paracétamol et compte tenu des proportions des deux molécules dans ces associations (27 ou 30 mg de dextropropoxyphène pour 400mg de paracétamol), l'intoxication au paracétamol est toujours au premier plan. Les concentrations en dextropropoxyphène sont faibles mais doivent attirer l'attention sur une éventuelle intoxication au paracétamol. Les concentrations plasmatiques de tramadol peuvent être élevées mais les intoxications sont dans l'ensemble peu sévères. Les concentrations toxiques semblent très supérieures à la concentration maximale thérapeutique de 1 mg/L.

Dextropropoxyphène et tramadol : existe-t-il un modèle pharmacocinétique prédictif ?

H. BELHADJ-TAHAR

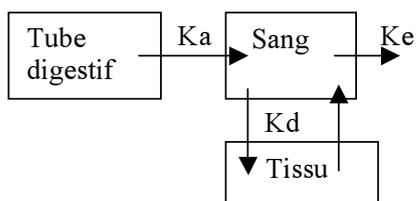
Groupe Santé Recherche, Toulouse

Objectifs : Le dextropropoxyphène (DP) et le tramadol (T) sont deux antalgiques opioïdes couramment prescrits. Cette grande disponibilité explique leur implication dans de nombreux cas d'intoxication dont la gravité ne semble pas corrélée avec la concentration retrouvée dans les milieux biologiques directement accessibles (sang et urine). Ce manque de prédictibilité du dosage quantitatif remet en question la pertinence des modèles pharmacocinétiques actuels qui ne prennent pas en compte les différents équilibres dynamiques mis en jeu lors de l'overdose. Le but de cet exposé est de proposer un modèle pharmacocinétique

prédictif permettant d'aider le praticien toxicologue dans l'interprétation des résultats.

Méthodes : Nous avons exploré les différentes voies métaboliques du tramadol et du dextropropoxyphène ainsi que la caractérisation physicochimique et pharmacologique des différents métabolites produits. Nous avons alors modélisé mathématiquement la cinétique de ces produits en prenant en compte 3 compartiments (digestif/vasculaire/tissulaire).

Résultats : La cinétique des 2 antalgiques étant similaire, nous avons choisi de représenter DP.



T _{+x}	Durée de survie				
	survivant	30 min	1 h	2 h	5 h
1 h	100,0%	66,0%	95,0%	100,0%	100,0%
4 h	59,7%	43,6%	49,6%	59,7%	59,7%
8 h	28,1%	25,0%	28,5%	20,5%	21,5%
24 h	3,6%	21,3%	24,0%	17,9%	12,0%

Tableau 1 : Concentration relative du DP en fonction de la durée de survie (la concentration à un temps de prélèvement donné (T_{+x}) est exprimée en % de C_{max}).

Avec Ka : constante d'absorption ;

Ke : constante d'élimination ; Ke : f(métabolisation + élim.rénale)

Kd : constante de distribution ; Kd : f([DP];logP, pKa, pH)

On observe une décroissance bi-exponentielle traduisant la distribution tissulaire (en moyenne K_{d_{DP}}: 0,13h⁻¹ ; K_{d_T}: 0,4h⁻¹) et l'élimination (en moyenne Ke_{DP}: 0,05h⁻¹ ; Ke_T: 0,13h⁻¹). La demi-vie ainsi que la concentration à l'équilibre suit l'évolution du pH sanguin. Partant de pH 7,4, la fraction diffusible relative (e^{2,3(pH-pKa)}) du DP varie de 0,7 à pH 7,5 (cas d'alcalose par hyperventilation) à 1,5 pour pH 7,2 (acidose).

Discussion : La demi-vie apparente (ln2/[Ke+Kd]) dépend des vitesses de métabolisation hépatique, d'élimination rénale et de diffusion tissulaire. DP subit une N-déméthylation aboutissant au norpropoxyphène cardiotoxique ainsi qu'une inactivation par hydrolyse de la fonction ester et par hydroxylation des deux cycles benzéniques. La O-déméthylation du tramadol par le CYP2D6 hépatique inductible, donne M1 (O-déméthyl-Tramadol) beaucoup plus actif et donc plus toxique que la molécule native et les autres métabolites en particulier les N-déméthylés. Suivant ce modèle la concentration plasmatique du DP post-mortem est d'autant plus basse que le décès survient à distance de l'ingestion et ceci pour la même dose. Dans le tableau

1, cette concentration diminue d'un facteur 2 (24% à 12% de C_{max} respectivement de 1 à 5 h).

Tentative d'autolyse polymédicamenteuse sévère d'un professionnel de santé

F. KLINZIG, L. HUMBERT, C. RICHEVAL, R. ELJOURI, N. HOUDRET, M. LHERMITTE

Laboratoire de Toxicologie & Génopathies, Hôpital Calmette, CHRU, 59037 Lille cedex

Cas clinique : Une femme de 43 ans (psychiatre et ancienne urgentiste) est retrouvée inconsciente dans sa voiture par une équipe du SMUR avec suspicion d'intoxication médicamenteuse. L'heure de prise et les quantités ingérées restent inconnues. Elle présente lors de son admission un score de Glasgow de 4, une TA 75/50 mm Hg, une température corporelle de 34,2°C. Elle est immédiatement intubée, ventilée, l'électrocardiogramme montre un bloc auriculoventriculaire de 1^{er} degré avec un discret élargissement du QRS. Lors de son séjour elle présente une instabilité hémodynamique (pouls 72, TA 7/4, Temp. 33,2°C) résolutive après traitement par l'adrénaline. Les prélèvements biologiques (sang, urine, liquide gastrique) sont adressés au laboratoire pour recherche toxicologique large.

Méthode : Un dépistage immunologique est réalisé sur le sérum pour la recherche du phénobarbital, des benzodiazépines et des antidépresseurs tricycliques. Les urines et le liquide gastrique sont, après extraction large, analysés par les couplages CLHP/DAD et CLHP/SM munis chacun d'une librairie de spectres de référence.

Résultats : Les recherches immunologiques sur le sérum ont été positives pour les benzodiazépines et les antidépresseurs tricycliques, le phénobarbital étant négatif. Les différents profils chromatographiques obtenus mettent en évidence un grand nombre de molécules qui ont ensuite été dosées. Les résultats sont rapportés dans le tableau ci dessous.

	Liquide gastrique (ng/mL)	Sérum (ng/mL)	Urines (ng/mL)
Diacétolol	11 100	1 170	12 150
Acébutolol	836 300	350	11 570
Propranolol	1 748 900	220	2 650
Mirtazapine	86 300	60	240
N-desmethylmirtazapine	-	70	ND
Venlafaxine	215 000	530	2 420
O-demethylvenlafaxine	-	480	1 740
Cyamémazine	1 349 700	170	830
Cyamémazine métabolites	-	+	+
Amitriptyline	556 900	1 310	2 510
Nortriptyline	-	170	90
Méprobamate	91 000	4 430	11 580
Clonazépam	6 500	170	280
7-aminoclonazépam	-	50	60
Diazépam	2 000	6 860	ND
Nordiazépam	7 400	1 940	100
Oxazépam	16 200	2 350	3 570

Conclusion : Les tentatives d'autolyses d'un professionnel de santé sont souvent gravissimes du fait d'un accès beaucoup plus aisé aux médicaments. Une identification rapide et la plus exhaustive possible des différents composés ingérés permet aux services de réanimation une meilleure prise en charge de ces patients.

Identification et quantification de 18 antidépresseurs dans le sang total, le plasma et les urines, par LC-MS/MS

K. TITIER, M. LE DEODIC, E. TEILHET, D. DUCINT, M. MOLIMARD

Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, CHU-Université Victor Ségalen, Bordeaux

Objectifs : Les antidépresseurs sont largement prescrits chez les patients présentant des états dépressifs et donc à risque suicidaire. Compte tenu également de leur toxicité importante, ils restent à l'heure actuelle une des principales causes d'intoxications graves et de morts toxiques en France. Ces molécules sont donc fréquemment rencontrées dans le cadre de la toxicologie clinique et médico-légale. Parmi les antidépresseurs, on distingue schématiquement les antidépresseurs tricycliques, les inhibiteurs de la monoamine oxydase et les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (IRS). Nous présentons ici une méthode permettant d'identifier et de doser la majorité des antidépresseurs « non IRS », dans le sang total, le plasma et les urines, par chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) : doxépine, nordoxépine, miansérine, buspirone, clomipramine, desmethylclomipramine, trimipramine, maprotiline, hydroxyzine, amitriptyline, imipramine, nortryptiline, dosulépine, desipramine, amoxapine, viloxazine, toloxatone, moclobémide.

Méthodes : 1 ml d'échantillon sont extraits par un mélange d'hexane et d'alcool isoamylique (99/1) en milieu alcalin (NaOH 2N) après ajout de l'étalon interne (methylrispéridone). La phase organique est reprise en milieu acide (HCl 0,05N). 20ml de la phase acide sont injectés dans le système chromatographique (Alliance®, Waters) équipé d'un détecteur de masse triple quadrupole avec une interface electrospray (QuattroMicro®, Waters) et d'un logiciel de gestion chromatographique (MassLynx®). La colonne utilisée est une Xterra RP18® (100x2,1mm, 5 µm, waters®). La phase mobile est un gradient tampon formiate 4mM (pH 3,2) / acétonitrile. Le débit est fixé à 0,3 ml/min. Le spectromètre de masse est utilisé en mode d'ionisation positif. L'acquisition se fait en mode MRM en détectant pour chaque molécule une transition de quantification et une transition d'identification.

Résultats : Cette méthode a été validée dans le sang total pour sa reproductibilité et répétabilité (CV < 12%) à partir de 2 niveaux de contrôles (n=5, 3 jours). Dans le plasma et l'urine, seule la répétabilité (2 niveaux de contrôles, n=5, 1 jour), exprimée en coefficient de variation, a été étudiée et est inférieure à 11,5%. La méthode est linéaire de 5 à 100 ng/ml ($r^2 > 0,99$) dans tous les milieux. Le biais est inférieur à 13% pour l'ensemble des concentrations et des milieux étudiés. La limite de quantification est de 5 ng/ml pour toutes les molécules (CV, biais < 20%). Le rendement

d'extraction moyen ($m \pm SD$) pour l'ensemble des molécules est de $59,2\% \pm 21,4$ dans le sang total, $76,9\% \pm 21,4$ dans le plasma, $76,9\% \pm 38,4$ dans les urines. Aucun effet de suppression ionique n'a été observé avec les 3 milieux. L'ensemble des molécules est chromatographié en 20 minutes. La tianeptine n'est pas détectée par cette méthode car elle n'est pas extraite en milieu basique du fait de ses propriétés physico-chimiques.

Conclusion : Cette méthode permet d'identifier et de quantifier facilement la plupart des antidépresseurs (tricycliques, IMAO) « non IRS » en une seule analyse. La précision, la sensibilité et la spécificité de cette technique permettent son utilisation en toxicologie médico-légale, en toxicologie clinique ainsi que dans le cadre du suivi thérapeutique pharmacologique.

Méthode de quantification de quatorze phénothiazines dans le sang, le plasma et les urines, en LC-MS/MS après extraction liquide-liquide

E. TEILHET, K. TITIER, D. DUCINT, N. MOORE, M. MOLIMARD

Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, CHU-Université Victor Ségalen, Bordeaux

Objectif : Les phénothiazines sont des neuroleptiques largement utilisées pour leurs propriétés antipsychotiques, antiparkinsoniennes et antihistaminiques. Ces molécules sont fréquemment rencontrées en toxicologie clinique et toxicologie médico-légale par leur implication dans des suicides et intoxications. Le but de cette étude a été de développer une méthode LC-MS/MS simple et sensible pour détecter et quantifier, dans les liquides biologiques (plasma, sang total et urines), la majorité des phénothiazines ayant des applications thérapeutiques : oxoméamazine, acéprométazine, prométhazine, propéricyazine, alimémazine, cyamémazine, lévomépromazine, pipothiazine, thiopropérazine, chlorpromazine, perphenazine, fluphénazine, thioridazine et trifluopérazine.

Méthodes : Les échantillons biologiques ont été soumis à une extraction en milieu basique (Na_2CO_3 0,5M), une contre-extraction en milieu acide (H_2SO_4 0,05M) puis une ré-extraction en milieu basique (Na_2CO_3 0,5M). Le solvant utilisé pour l'ensemble des extractions était un mélange pentane-isopropanol (95/5 ; v/v). Les molécules ont été séparées sur une colonne à polarité de phases inversée (XTerra® RP18, 100x2,1, 1mm, 5µm) avec un gradient d'acétonitrile- tampon formiate (4mM, pH 3,2) à un débit de 0,3mL/min. Le système HPLC est couplé à un spectromètre de masse en tandem (QuattroMicro®, Waters) par l'intermédiaire d'une interface electrospray en mode d'ionisation positif. La détection et la quantification ont été effectuées en mode MRM par le suivi de 2 transitions pour chacune des molécules. Le temps total d'analyse était de 20 minutes.

Résultats : La limite de quantification pour chaque molécule est de 1ng/mL dans le plasma et les urines et de 3ng/mL dans le sang total. Les droites de calibration sont linéaires dans ces matrices, respectivement, entre 1 ou 3 et 100ng/mL, avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,992. Les reproductibilité et répétabilité, exprimées en coefficients de variation mesurés pour 3 valeurs de contrôles (n=6, 3 jours), sont inférieures à 12,7% pour les échantillons de plasma. Concernant les urines et le sang total, seule la répétabilité a été évaluée pour 3 valeurs de contrôles (n=6, 1 jour) et est inférieure à 12,1%. Les rendements d'extraction moyens pour l'ensemble des molécules (M+/-ESM) sont de 63,7% +/- 25,4 dans le sang, 65,3% +/- 8,7 dans l'urine et de 67,8% +/- 17,4 dans le plasma. Aucun effet de suppression ionique significatif n'est observé.

Conclusion : Quatorze phénothiazines ont pu être extraites d'échantillons humains d'urines, sang et plasma par une triple extraction liquide-liquide et quantifiées en LC-MS/MS. La grande majorité des phénothiazines actuellement commercialisées peuvent ainsi être détectées et dosées par une seule méthode analytique. La précision et la sensibilité de cette technique permettent son utilisation pour des applications de routine telles que le suivi thérapeutique ou la toxicologie clinique et médicolégal.

Toxicologie judiciaire

Eau de javel et engrais : une surprenante combinaison fatale

Y. GAILLARD⁽¹⁾, M. KING-SIONG⁽²⁾, F. BEVALOT⁽¹⁾, V. CHEMINEL⁽³⁾

(1) Laboratoire LAT, La Voulte/Rhône ;

(2) Cabinet Médical, Saint Pierre de La Réunion ;

(3) Fédération de Biochimie, HIA Desgenettes, Lyon

Objectifs : Le but de cette investigation était de déterminer les causes de la mort d'un jeune homme de 20 ans, étudiant en horticulture. Il se serait suicidé en ingérant de l'eau de javel et quatre engrais : liquide et en poudre. Si individuellement ces 5 produits ne possèdent pas une toxicité notable qui pourrait conduire à un décès, le mélange de ces composés a abouti à la formation dans l'estomac de composés mono et tri halogénés fortement toxiques.

Matériels et méthodes : L'analyse a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne Poraplot Q couplée à un spectromètre de masse après une injection en espace de tête de l'ensemble des prélèvements de la victime et des engrais.

Résultats : les différents composés volatils ont été mesurés dans les fluides et organes prélevés sur la victime (exprimés en µg/mL ou µg/g) :

Molécules identifiées	Sang	Gastrique	Foie	Rein	Cœur	Poumon	Cerveau	Pancréas
Méthanol	36,8	512,7	13,3	112,6	50,6	199,1	38,4	317,2
Acétaldéhyde	12,7	20,6	30,5	12,3	13,9	12,6	37,2	14,0
Chlorométhane	< 0,1	183,8	< 0,1	< 0,1	0,3	6,4	< 0,1	14,0
Bromométhane	0,3	746,6	0,2	< 0,1	0,5	2,5	0,1	40,4
Chloroforme	0,2	13,4	0,2	0,2	0,7	21,9	1,4	15,7
Chloro-dibromo-méthane	< 0,1	3,9	< 0,1	< 0,1	< 0,1	1,8	< 0,1	1,2
Bromo-dichloro-méthane	< 0,1	373,3	< 0,1	< 0,1	0,2	985,9	< 0,1	878,6
Trichloro-acétaldéhyde	< 0,1	82,8	0,2	< 0,1	< 0,1	48,3	< 0,1	30,3
Acide dichloro-acétique	< 0,5	795,9	< 0,5	< 0,5	2,0	402,2	2,0	271,8
Ethyl-benzène	7,4	363,0	20,9	1,8	1,8	8,7	38,2	16,5
1,2 diméthyl-benzène	26,2	1257,0	69,6	7,4	7,8	27,3	140,1	63,8
1,3 diméthyl-benzène	5,5	391,5	22,0	1,8	2,0	7,5	43,7	16,5

Conclusions : Chloro et bromométhane sont deux gaz, narcotiques et très fortement neurotoxiques. La synthèse *in-situ* de tri halogénés a déjà été décrite [1] tout comme celle de chlorométhane [2]. Nous avons pu reproduire expérimentalement la synthèse de l'ensemble des composés identifiés chez la victime. Le décès est essentiellement imputable aux dérivés mono halogénés selon les données de la littérature [3].

Références :

- Olson D.A. et coll. In-home formation and emission of trihalomethanes : the role of residential dishwaters. J Expo Anal Environ Epidemiol 2004 ; 14 : 109-19.
- Minami M. et coll. Dangerous mixture of household detergents in an old-style : a case report with simulation experiments of the working environment and warning of potential hazard relevant to the general environment. Hum Exp Toxicol 1992 ; 11 : 27-34.
- Michalodimitrakis M.N. et coll. Death following intentional methyl bromide poisoning: toxicological data and literature review. Vet Hum Toxicol 1997 ; 39 : 30-4.

Dosage rapide des cyanures dans le sang total, au cours de décès par asphyxie, par chromatographie gazeuse avec injection en espace de tête

I. MOREL, S. LEPAGE, A. FEUILLU, J.P. ANGER

Laboratoire des urgences-réanimation, CHU Pontchaillou, 35033 Rennes

Objectifs : Les méthodes de dosage des cyanures dans le sang total font appel à des techniques diverses allant de l'ancienne méthode colorimétrique manuelle à des techniques chromatographiques mettant en jeu des réactions complexes de dérivation ou utilisant un matériel de détection de type spectrométrie de masse. Dans le cadre d'expositions aux fumées d'incendie et de recherche générale de décès par asphyxie, nous avons développé une méthode simple et rapide de dosage des cyanures, basée sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à une injection en espace de tête (GC-HS) utilisant le même appareillage et les mêmes conditions que celles requises pour la détermination de l'alcôolémie, selon la méthode officielle.

Méthode : L'acide cyanhydrique libéré par acidification du prélèvement de sang total, est dosé par GC-HS

couplée à un détecteur à ionisation de flamme et utilisant le n-propanol comme étalon interne. Les échantillons sanguins supplémentés en étalon interne sont sertis dans des flacons de 10 ml pour injecteur en espace de tête (HS 2000, Thermoelectron) et incubés pendant 20 min à 80°C après ajout extemporané d'acide sulfurique. L'analyse par chromatographie gazeuse (CG-Trace, Thermoelectron) est réalisée en 5 minutes en mode isotherme à 40°C avec des températures d'injection et de détection de 200°C et de 250°C respectivement. La colonne utilisée HPWax (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) est adaptée à la séparation des composés volatils légers tels que les alcools et autres solvants classiques. Complémentairement, le dosage de la carboxyhémoglobine est réalisé par CO-oxymétrie sur un automate à gazométrie sanguine (Omni S, Roche).

Résultats : La méthode de dosage a été validée sur des échantillons de sang total surchargés en cyanure de potassium (0,1- 7 mg/l). Des essais de reproductibilité et répétabilité ont été effectués après stabilisation des échantillons par l'acide ascorbique selon les recommandations de la littérature. La limite de détection est de 0,05 mg/l et la limite de quantification de 0,1 mg/l. La méthode a été utilisée à l'occasion de plusieurs cas d'intoxication de victimes d'incendie présentant une teneur en carboxyhémoglobine (HbCO) significative et une alcoolémie positive. La méthode requiert un total de 25 minutes, comprenant la préparation manuelle de l'échantillon, le temps d'incubation et la durée de la chromatographie. L'analyse du chromatogramme permet à la fois le dosage des cyanures, des alcools et le dépistage éventuel d'autres toxiques volatils (acétonitrile, éther éthylique).

Conclusion : La méthode décrite est adaptée au diagnostic rapide d'intoxications par les cyanures en toxicologie d'urgence hospitalière et judiciaire. Cette technique présente les avantages d'être simple et rapide. La sensibilité est suffisante dans le cadre d'une intoxication par les cyanures, elle ne permet cependant pas d'estimer les concentrations endogènes de cyanures, comme le peuvent les techniques analytiques basées sur une détection par spectrométrie de masse [1]. La méthode s'applique toutefois à de grandes séries d'échantillons et utilise l'appareillage classique employé pour la réalisation du dosage de l'éthanolémie selon la méthode officielle.

Référence :

1. Dumas P. et coll. Isotope dilution mass spectrometry determination of blood cyanide by head space gas chromatography. *J. Anal. Toxicol.* 2005 ; 29 : 71-5.

Dépistage des xénobiotiques dans la moelle osseuse par GC-MS

F. BÉVALOT^(1,2), L. FANTON⁽³⁾, L. MAGNÉ⁽¹⁾, Y. GAILLARD⁽²⁾, D. MALICIER⁽³⁾, C. LE MEUR⁽¹⁾

(1) Laboratoire Lumière, Lyon ;

(2) Laboratoire LAT, La Voulte/Rhône ;

(3) Institut de Médecine Légale, Lyon

Objectif : Un corps très putréfié, momifié ou réduit à l'état de squelette rend difficile ou même impossible les analyses toxicologiques post mortem par absence de liquides biologiques ou de tissus parenchymateux exploitables. Cependant il est important que le toxicologue puisse apporter des éléments de réponse pour aider à la détermination de la cause médicale ou médico-légale du décès. La moelle osseuse est un tissu largement vascularisé et protégé par l'os. Il est donc possible de retrouver dans cette matrice des molécules exogènes qui se trouvaient dans le sang en ante mortem, même de nombreuses années après le décès [1,2]. L'analyse de cette matrice est particulièrement complexe de par sa consistance et sa forte proportion de lipides. L'objectif de cette étude était de développer une technique d'analyse permettant de réaliser un dépistage par technique chromatographique des xénobiotiques dans la moelle osseuse.

Méthodes : La moelle osseuse est prélevée lors des autopsies au niveau du fémur. Après dissection des tissus mous et isolement de l'os, un tronçon est découpé. La moelle osseuse est ensuite collectée par raclage du fut fémoral. 200 mg de moelle osseuse sont hydrolysés par de la protéinase K 12 heures à 35°C sous agitation. L'hydrolysate obtenu est extrait à pH 9,5 par un mélange chloroforme/isopropanol. Après évaporation, l'extrait sec est repris par un mélange éthanol/eau/hexane puis vortexé et centrifugé. La phase aqueuse est collectée et évaporée à sec. Après acétylation, 1 µl sont injectés en GC-MS. Les chromatogrammes ainsi obtenus sont exploités de manière manuelle et automatique par l'utilisation de la macro-commande Caribou développée au laboratoire.

Résultats : Les analyses réalisées sur 20 prélèvements de moelle osseuse ont permis la mise en évidence d'amitriptyline, de nortriptyline, de nordazepam, de citalopram, de dextropropoxyphène, de norpropoxyphène, et de caféine. Les molécules ainsi détectées dans la moelle osseuse étaient aussi présentes dans le sang à concentration thérapeutique.

Conclusion : La nature et la composition de la moelle osseuse en font une matrice complexe à analyser. La technique présentée prend en compte la préparation des échantillons mais aussi l'exploitation des données obtenues par l'utilisation d'outils informatiques développés au laboratoire. Cet outil analytique a permis de mettre en évidence dans la moelle osseuse des molécules de différentes classes thérapeutiques.

Références :

1. Winek C. et coll. The use of bone marrow in the study of postmortem redistribution of nortriptyline. *J. Anal. Toxicol.* 1993 ; 17 : 93-7.

2. McIntyre I. et coll. Post-mortem drug analyses in bone and bone marrow. *Ther. Drug. Monit.* 2000 ; 22 : 79-83.

Intoxications par la réglisse : identification et dosage de l'acide glycyrrhétique par chromatographie liquide-spectrométrie de masse tandem (LC-MS/MS)

M. DEVEAUX, M. CHÈZE G. PÉPIN,

Laboratoire TOXLAB, 7 rue Jacques Cartier, 75018 Paris

Objectif : De nombreuses intoxications sont dues à l'utilisation inappropriée ou abusive de plantes dont l'usage n'est pas réglementé, mais qui sont potentiellement toxiques. Parmi celles-ci, la réglisse commune (*Glycyrrhiza glabra*, *Fabaceae*), couramment utilisée en alimentation pour son pouvoir aromatisant et sucrant, dans le pastis sans alcool ou dans des confiseries (rouleaux et batons de réglisse). Elle n'est toxique qu'à forte dose et en cas d'usage chronique [1]. Nous présentons une méthode de chromatographie liquide-spectrométrie de masse tandem triple quadripôle (LC-MS/MS) pour le dosage de l'acide glycyrrhétique (AG), métabolite de la glycyrrhizine, dans les milieux biologiques.

Patients et méthode : Cas #1 : Un consommateur occasionnel avait ingéré 5 rouleaux de réglisse sur une journée. Des prélèvements sanguins et urinaires ont été réalisés le lendemain matin. Cas #2 : Un homme de 56 ans était retrouvé mort dans ses toilettes, un baton de réglisse à côté de lui. L'autopsie concluait à une mort d'origine cardiaque et n'excluait pas une participation toxique. Du sang cardiaque, de l'urine, du contenu gastrique et du vitré étaient prélevés. **Méthode :** Nous avons recherché et dosé l'AG total par LC-MS/MS, après hydrolyse enzymatique de la glycyrrhizine. Après ajout de l'étalon interne (clonazépam-d4), 1 mL de liquide biologique est hydrolysé par la bêtaglucuronidase, puis l'extraction est réalisée par du chloroforme en milieu acide. La séparation chromatographique est faite sur une colonne C18 Uptisphere ODB, avec un gradient de tampon formiate d'ammonium/acétonitrile, à un débit de 200 µL/min. La détection se fait en MS/MS triple quadripôle avec une source électrospray en mode SRM positif. Les paramètres de la source sont optimisés sur l'ion pseudomoléculaire de l'AG (471), et les énergies de collision sur 4 ions fils (189, 235, 149 et 119).

Résultats et discussion : Le rendement d'extraction est de 57% à 20 ng/mL. La méthode est linéaire jusqu'à 20 ng/mL, la limite de détection est estimée à 0,5 ng/mL et la limite de quantification à 1 ng/mL. Les concentrations d'AG total sont données dans le tableau suivant, exprimées en ng/mL :

	Sang	Urine	Estomac	Vitré
Cas #1	13,7	75,0	-	-
Cas #2	7,6	18,2	83,3	5,1

Dans le cas n°2, les concentrations d'AG sont plus faibles que dans le cas n°1, mais la victime était un gros consommateur chronique de batons de réglisse, ce qui permet de conforter la contribution cardiotoxique de la réglisse.

Conclusion : La méthode de dosage de l'acide glycyrrhétique par LC-MS/MS que nous proposons est plus sensible que celle validée en 2005 par Lin et coll. [2], qui de surcroît, ne donnent aucun résultat pour le sang. A notre connaissance, les concentrations que nous avons retrouvé dans le cas de décès (sang, urine, estomac et vitré) sont les premières à être signalées.

Références :

1. Bedock B. et coll. Fatal poisoning by alcohol free anised aperitif. *Presse Med.* 2001 ; 30 : 1879-90.
2. Lin Z.J. et coll. Simultaneous determination of glycyrrizin, a marker component of radix *Glycyrrhizae*, and its major metabolite glycyrrhetic acid in human plasma by LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B.* 2005 ; 814 : 201-7.

Distribution tissulaire des cannabinoïdes : étude in vivo chez le porc

B. BRUNET^(1,2), T. HAUET^(1,2), W. HEBRARD⁽³⁾, Y. PAPET⁽²⁾, G. MAUCO^(1,2), P. MURA⁽²⁾

(1)ERM 324, INSERM, Poitiers ;

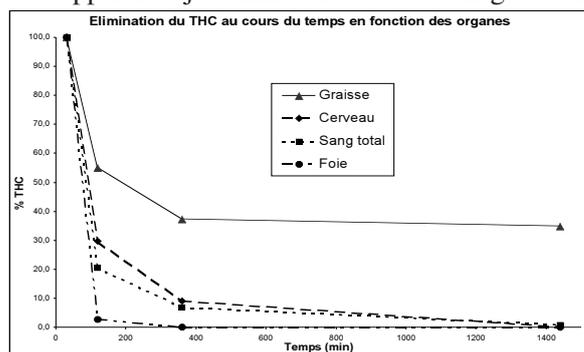
(2) Laboratoire de Biochimie-Toxicologie, CHU, Poitiers

(3) Laboratoire de chirurgie expérimentale, INRA, Surgères

Objectif : La distribution tissulaire du Δ⁹-tetrahydrocannabinol (THC) et celle de ses métabolites 11-OH-THC et THC-COOH est étudiée in vivo chez le porc de race Large White.

Méthodes : Huit porcs de 35 à 44 kg ont reçu 200µg/kg de THC par voie intraveineuse. Deux porcs ont été sacrifiés 30 minutes après l'injection puis 2 autres à 2 heures, 6 heures et 24 heures. Après sacrifice, différents tissus et liquides biologiques sont prélevés. Chaque tissu est homogénéisé au Potter dans un tampon phosphate à pH 7,4 avant extraction liquide-liquide en présence d'étalons internes deutérés. L'analyse s'effectue ensuite par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Résultats : Les résultats obtenus pour les 8 porcs sacrifiés ont permis de déterminer les cinétiques d'élimination du THC au cours du temps en fonction des différents organes. Il apparaît nettement que l'élimination est la plus rapide au niveau du foie. Au niveau du cerveau l'élimination du THC est légèrement plus lente que dans le sang. Enfin, avec un modèle d'administration unique, la graisse apparaît déjà comme un site de stockage du THC.



Les tissus tels que le rein, la rate, le cœur, le muscle et le poumon ont des cinétiques d'élimination proches de celle observée pour le sang total.

Le 11-OH-THC a été retrouvé en concentration importante uniquement dans le foie. Le THC-COOH a été détecté en concentration non mesurable (< 5ng/g) dans différents organes. Seule la bile présente des concentrations en THC-COOH importantes et qui augmentent au cours du temps.

Conclusion : En plus de confirmer des données connues chez l'homme, le modèle animal utilisé ouvre des perspectives intéressantes dans le but d'étudier des phénomènes encore méconnus chez l'homme tels que la redistribution post-mortem des cannabinoïdes ou les relations entre les concentrations cérébrales et les effets du THC.

Ingestion de « cristalline » : une nouvelle formulation de cocaïne. Etude par spectroscopie RMN ¹H et CPG-SM

M. IMBENOTTE⁽¹⁾, B. CARTIGNY⁽²⁾, N. HOUDRET⁽²⁾, N. AZAROUAL⁽³⁾, G. VERMEERSCH⁽³⁾, L. HUMBERT⁽²⁾, M. LHERMITTE^(1,2)

(1) Laboratoire de Toxicologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Lille 2 ;

(2) Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpital Calmette, CHRU, Lille ;

(3) Laboratoire de Physique d'Application RMN, UMR CNRS 8009, Université de Lille 2.

Objectif : La spectroscopie RMN ¹H est une méthode permettant l'identification des xénobiotiques rapidement dans les liquides biologiques ou à partir de différents liquides, ceci sans avoir besoin de les extraire. Dans ce travail, nous nous proposons de tester son applicabilité au cas d'un homme de 34 ans retrouvé inanimé par l'un de ses proches environ 12 heures après la prise de poudre communément appelée « cristalline ». Admis aux urgences, il ne se souvient de rien et présente des difficultés à parler, à marcher, ainsi que des vertiges et une mydriase. Un premier bilan biologique donne des résultats quasi dans la norme. L'objectif de ce travail est de mettre en évidence dans la poudre consommée des composés chimiques pouvant expliquer son état, de les quantifier au niveau sanguin et de préciser les perturbations métaboliques éventuelles par l'analyse des composés urinaires.

Matériel et méthodes : La poudre a été analysée par spectroscopie RMN ¹H (spectromètre Bruker Avance 500 MHz) sans prétraitement et par CLHP-SM. Un échantillon de sang a été analysé par CPG/SM et un échantillon d'urine a été analysé, à la fois par CPG-SM, CLHP-SM et par RMN proton.

Résultats : L'analyse de la poudre a révélé la présence de cocaïne, d'atropine, de phénacétine et de procaine. Pour la poudre mise en solution, les LOD et LOQ

de la cocaïne et de l'atropine, pour la spectroscopie RMN ¹H sont de 10 et 20 µmol/L (3 et 6 mg/L). Pour l'urine, les LOD et LOQ RMN ¹H sont de 10 et 30 µmol/L (3 et 9 mg/L) alors qu'en CPG/SM, les LOD et LOQ sont de 3 et 10 µg/L. Dans le sang, la cocaïne a été quantifiée à 1557 ng/mL et la benzoyl ecgonine à 725 ng/mL. Dans l'urine, la présence de cocaïne et d'atropine, établie par CPG/SM a été confirmée par spectroscopie RMN proton, en particulier par détection du pic à 2,89 ppm attribué au groupe N-CH₃ de la benzoyl ecgonine et de la cocaïne, et du pic à 2,7 ppm attribué au groupe N-CH₃ de l'atropine, et au signal centré sur 7,40 ppm du aux protons aromatiques de l'atropine.

	cocaïne	benzoyl ecgonine	EME	atropine
sang (CPG-SM)	1,56 mg/L	0,725 mg/L	-	-
urine (CPG-SM)	5,5 mg/L 18 µmol/L	38 mg/L 133 µmol/L	8 mg/L 40 µmol/L	-
urine(RMN ¹ H)	somme des trois : 180 µmol/L			700 µmol/L

De plus, un profil métabolique particulier a pu être observé : augmentation de la concentration en taurine à 1,87 mmol/L, ainsi que de l'histidine à 0,69 mmol/L. Ces modifications métaboliques peuvent être mises en relation avec des effets connus de la cocaïne. La poudre consommée contient de forts taux de cocaïne et d'atropine. Plusieurs cas d'intoxication ont été recensés par l'Observatoire Français des Drogues et Toxicomanies, dont 9 en décembre 2004 dans la région Nord-Pas de Calais.

Validation de méthode en toxicologie judiciaire : application à l'analyse de la cocaïne et de trois de ses métabolites par GC/CI/MS²

Ch. STAUB, E. COGNARD

Institut Universitaire de Médecine Légale, Genève, Suisse

Objectifs : Présenter les différents critères nécessaires à la validation d'une méthode d'analyse en toxicologie judiciaire et montrer les atouts retirés grâce à une meilleure connaissance des performances d'une méthode analytique. Illustration avec la validation de l'analyse simultanée de la cocaïne (COC) et de trois de ses métabolites, l'anhydroecgonine méthylester (AEME), l'ecgonine méthylester (EME) et la cocaéthylène (COET), dans les cheveux par GC/CI/MS² au moyen d'une trappe ionique.

Méthodes : Après leur décontamination par lavages successifs avec différents solvants, les cheveux sont segmentés, puis broyés, avant d'être hydrolysés par incubation pendant une nuit à 60°C dans une solution de HCl 0,1 M (1,2). Une extraction automatique est ensuite effectuée sur phase solide (cartouche HCX Isolute) avant l'analyse des extraits de cheveux par GC/CI/MS/MS (liquide de CI = isobutane) au moyen d'une trappe ionique Saturn 2000 Varian® [1,2]. L'analyse simultanée de la COC et de ses trois métabo-

lites, AEME, EME, et COET, a été validée selon l'approche proposée par la *Société Française des Sciences et Techniques* (SFSTP) qui est conforme aux recommandations suggérées lors de la Conférence de Washington sur la validation (1990) et par la *Food and Drug Administration* (FDA) ; elle a ensuite été adaptée au cas particulier et spécifique de la toxicologie judiciaire.

Résultats : les différents essais réalisés ont permis de choisir le modèle le plus approprié pour les droites d'étalonnage (régression linéaire pondérée en $1/x^2$) et d'évaluer les performances de la méthode (linéarité, justesse, fidélité - précision et fidélité intermédiaire-) sur trois jours. Pour valider l'ensemble de ces critères, deux types d'échantillons ont été préparés : des standards de calibration (CAL) et des contrôles qualité (CQ). L'ensemble de la validation a également permis d'établir les profils d'exactitude pour chacun des quatre composés et de déterminer les domaines d'analyse appropriés pour chacun d'entre eux de manière à respecter les limites d'acceptation suivantes : justesse égale à $\pm 20\%$, répétabilité inférieure à 15% et déviation standard relative (RSD) inférieure à 25% de fidélité intermédiaire.

Conclusion : La méthode a ainsi été validée pour l'analyse GC/CI/MS² dans les cheveux entre 0,10 – 5,00 ng/mg pour AEME et entre 0,05 – 5,00 ng/mg pour COC, EME et COET.

Références :

1. Girod C. et coll. Analyse des drogues dans les cheveux par extraction automatisée en phase solide : validation et utilisation en routine. *Toxicorama* 1999 ; 11 : 46-50.
2. Girod C. et coll. Analysis of drugs of abuse in hair by automated solid-phase extraction, GC/EI/MS and GC ion trap/CI/MS. *Forensic Sci. Int.* 2000 ; 107 : 261-71.

Intoxication mortelle par le GHB : le premier cas français

A.L. PELISSIER-ALICOT⁽¹⁾, M. VILLAIN⁽²⁾, G. LEONETTI⁽¹⁾, P. KINTZ⁽²⁾

(1) Service de Médecine Légale, Faculté de Médecine, Marseille ;

(2) Laboratoire ChemTox, Illkirch-Graffenstaden

Objectif : rapporter le premier cas d'intoxication mortelle au GHB en France.

Description du cas : un homme de 43 ans est retrouvé inanimé à son domicile et décède rapidement malgré l'intervention des secours. L'individu était connu des services de police pour usage de stupéfiants. L'autopsie ne révèle qu'une congestion pulmonaire intense. Des prélèvements de sang cardiaque et fémoral, urine, contenu gastrique, bile et humeur vitrée sont effectués et conservés à 4°C. En l'absence de cheveux, des poils

pubiens sont prélevés et conservés à température ambiante.

Matériels et méthodes : Le GHB est recherché et dosé dans les échantillons de sang, urines, bile, contenu gastrique et humeur vitrée par CPG-SM. Après précipitation par l'acétonitrile, en présence de GHB-d₆ comme étalon interne, la dérivation est effectuée par du BSTFA avec 1% de TMCS [1]. Après décontamination, les poils pubiens sont coupés en 3 segments de 8 mm puis incubés en présence de GHB-d₆. Après neutralisation, acidification et extraction dans l'acétate d'éthyle, les composés sont dérivés par le MTBSTFA. L'identification et la quantification sont réalisées par CPG-SM/SM [2].

Résultats : les concentrations de GHB dans les différents échantillons sont présentés dans le tableau suivant :

Echantillons	Concentrations
Sang cardiaque	3385 mg/L
Sang fémoral	2937 mg/L
Urine	33727 mg/L
Bile	1800 mg/L
Humeur vitrée	2856 mg/L
Contenu gastrique	7,08 g/100 mL
Poils pubiens, segment 1	25 ng/mg
Poils pubiens, segment 2	22,6 ng/mg
Poils pubiens, segment 3	19,4 ng/mg

Discussion et conclusion : la concentration en GHB dans le sang fémoral est très supérieure aux concentrations sanguines *post-mortem* mentionnées dans la littérature (< 50 mg/L) [1], laissant suspecter une intoxication potentiellement létale au GHB. La présence de GHB dans le contenu gastrique est en faveur d'une absorption par voie orale. Enfin, la présence de GHB dans les 3 segments de poils pubiens à des concentrations supérieures aux concentrations physiologiques (< 2 ng/mg) [2] témoigne d'un usage répété du produit. Il s'agit donc très probablement d'une intoxication mortelle au GHB chez un consommateur chronique.

Références :

1. Villain M. et coll. Ultra-rapid procedure to test for gamma-hydroxybutyric acid in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2003 ; 792 : 83-7.
2. Duhem C. et coll. Détermination du GHB dans les poils pubiens par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem. *Ann. Toxicol. Anal.* 2004 ; 16 : 253-6.

Thèmes libres

Effets du cannabis oral sur la capacité à conduire

C. GIROUD⁽¹⁾, A. MENETREY⁽²⁾, M. AUGSBURGER⁽¹⁾, M.A. PIN⁽³⁾, B. FAVRAT^(3,4), L.E. ROTHUIZEN⁽⁵⁾, M. APPENZELLER⁽⁵⁾, T. BUCLIN⁽⁵⁾, P. MANGIN^(1,4)

(1) Laboratoire de toxicologie et chimie forensiques, Institut universitaire de médecine légale, Lausanne ;

(2) Debiopharm SA, Lausanne ;

(3) Policlinique médicale universitaire de Lausanne ;

(4) Unité de médecine du trafic, IUML, Lausanne ;

(5) Division de pharmacologie et toxicologie cliniques, CHUV, Lausanne, Suisse

Objectifs : Le cannabis ou un cannabinoïde de synthèse (par ex. le dronabinol) pourraient entrer prochainement dans la pharmacopée suisse. Le cannabis est aussi un ingrédient de certains aliments du commerce et est consommé dans un but récréatif ou abusif sous forme de décoctions et de gâteaux. Les conséquences d'une prise orale sur la capacité à conduire sont toutefois peu connues et méritent d'être étudiées. Un essai clinique contre placebo, dont le volet pharmacocinétique a déjà été présenté [1,2], a été réalisé pour comparer les effets sur la capacité à conduire d'une prise orale de 20 mg de dronabinol, de 2 décoctions de chanvre contenant en moyenne 16,5 ou 45,7 mg de THC dans 200 mL de lait.

Méthodes : Une étude croisée, randomisée en double aveugle et approuvée par les autorités suisses et le comité d'éthique de l'université, a été réalisée chez 8 volontaires sains masculins, consommateurs occasionnels de cannabis et âgés de 22 à 30 ans. Les 3 traitements et le placebo ont été administrés à chaque sujet, à 2 semaines d'intervalle. Les cannabinoïdes ont été dosés dans le sang par GC/MS-NCI. Une série d'observations cliniques, et d'évaluation des effets subjectifs et de la motivation à conduire dans diverses circonstances ont été réalisées, notamment au moyen de questionnaires. Des tests psychotechniques (test des panneaux routiers) et de conduite sur simulateur ont été effectués parallèlement. Le moment de la prise a été évalué au moyen des modèles de Huestis et les résultats confrontés aux temps réels. La cinétique du Facteur d'Influence Cannabique (CIF) proposé par Daldrup a été comparée à celles des effets subjectifs et à l'évolution des performances obtenues sur simulateur (test de poursuite de trajectoire).

Résultats : La motivation à conduire est influencée par l'importance et l'urgence de la mission proposée. Elle est plus élevée pour les déplacements urgents et augmente avec le temps écoulé depuis la prise. Les sujets sont conscients d'être sous l'emprise du cannabis et semblent capables de peser le risque d'accident et l'urgence de la course. Comparées aux résultats obtenus sous placebo, les performances des tests des panneaux routiers et de poursuite de trajectoire sont significativement diminuées, particulièrement après avoir ingéré la dose de THC la plus forte (45,7 mg). Une valeur de CIF supérieure à 10 correspond à une forte sensation d'intoxication, à une diminution élevée de la motivation de conduire et à une baisse des résultats au test de poursuite de trajectoire. Les modèles de Huestis

développés à partir de données obtenues après inhalation de cannabis ont donné une estimation très approximative du moment de l'ingestion du dronabinol et des décoctions.

Conclusions : Cette étude soutient l'hypothèse d'un effet défavorable de la prise orale de cannabis sur la capacité à conduire, notablement sur la poursuite de trajectoire.

Références :

1. Ménétreay A. et coll. Ann. Toxicol. Anal. 2004 ; 16 : 186.

2. Ménétreay A. et coll. Ann. Toxicol. Anal. 2004 ; 16 : 231-43.

Usage de stupéfiants chez les conducteurs d'automobiles de moins de 30 ans en France. Le cannabis et la cocaïne en hausse

P. MURA⁽¹⁾, C. CHATELAIN⁽²⁾, V. DUMESTRE-TOULET⁽³⁾, J.M. GAULIER⁽⁴⁾, M.H. GHYSEL⁽⁵⁾, C. LACROIX⁽⁶⁾, M.F. KERGUERIS⁽⁷⁾, M. LHERMITTE⁽⁸⁾, M. MOULSMA⁽⁹⁾, G. PÉPIN⁽¹⁰⁾, F. VINCENT⁽¹¹⁾, P. KINTZ⁽¹²⁾

(1) Laboratoire de biochimie et toxicologie, CHU, Poitiers ;

(2) Laboratoire, CH, Valenciennes ;

(3) Laboratoire TOXGEN, Bordeaux ;

(4) Laboratoire de pharmacologie et toxicologie, CHU, Limoges ;

(5) Laboratoire de Police Scientifique, Lille ;

(6) Laboratoire de toxicologie, GH, Le Havre ;

(7) Laboratoire de toxicologie, CHU, Nantes ;

(8) Laboratoire de toxicologie, CHU, Lille ;

(9) Laboratoire de biochimie et toxicologie, CHU, Lyon ;

(10) Laboratoire TOXLAB, Paris ;

(11) Laboratoire de toxicologie, CHU, Grenoble ;

(12) Laboratoire ChemTox, Illkirch-Graffenstaden

Objectif : Déterminer la prévalence de l'usage de stupéfiants chez des conducteurs d'automobiles en France impliqués dans un accident de la circulation pendant la période du 1^{er} janvier 2003 au 31 août 2004, et de comparer ces résultats à ceux d'une étude menée en 2000 et 2001 [1].

Méthodes : Ont été inclus les conducteurs de moins de 30 ans impliqués dans un accident mortel ou corporel de la circulation, décédés ou chez lesquels un dépistage urinaire n'avait pas pu être réalisé. Dans tous les cas, il s'agissait de réquisitions judiciaires effectuées par des experts en pharmacologie et toxicologie dans le cadre de la loi Gayssot, modifiée par la loi du 3 février 2003 et le décret du 31 mars 2003. Les analyses sanguines ont été réalisées par GC-MS, selon les procé-

dures recommandées par la Société Française de Toxicologie Analytique.

Résultats : Parmi les 4135 analyses sanguines réalisées par les 12 experts sur des conducteurs décédés ou n'ayant pas subi de dépistage urinaire, 2003 ont concerné des sujets de moins de 30 ans et ont donc été inclus dans l'étude. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

	THC-COOH (> 2 ng/mL)	THC (> 0,2 ng/mL)	Benzoylécgonine (> 20 ng/mL)	Morphine (> 20 ng/mL)	Amphétamines (> 20 ng/mL)
Nombre	793	578	59	70	61
Prévalences moyennes	39,6 %	28,9 %	3,0 %	3,5 %	3,1 %
Prévalences extrêmes	27,0 – 58,3	18,2 – 38,0	0 – 6,8	0 – 9,0	0 – 6,5

Le cannabis était le stupéfiant le plus fréquemment retrouvé, avec 39,6 % de consommateurs et 28,9 % de sujets ayant consommé dans les heures précédentes et donc sous influence de ce produit. Le THC était le seul stupéfiant présent dans 80,2 % des cas, l'association la plus fréquente étant observée avec les amphétamines (7,4 %). L'association avec l'alcool n'a pu être prise en considération en raison du fait que dans de trop nombreux cas, la valeur de l'alcoolémie n'était pas connue (réalisée par éthylomètre ou par un autre expert).

Conclusion : Une étude réalisée en 2000 et 2001 sur le sang de 900 conducteurs impliqués dans un accident corporel de la circulation avait montré, chez les moins de 27 ans, des prévalences de 20 % pour le THC et de 0,2 % pour la cocaïne. Les résultats de la présente étude révèlent une augmentation tout à fait significative de l'usage de ces deux substances psychoactives, malgré la mise en place d'une législation spécifique depuis 2001. Un tel constat souligne, si besoin était, la nécessité de mettre en place dès que possible des dépistages aléatoires au bord des routes.

Référence :

1. Mura P. et coll. Comparison of the prevalence of alcohol, cannabis and other drugs between 900 injured drivers and 900 control subjects : results of a French collaborative study. *Forensic Sci. Int.* 2003 ; 133 : 79-85.

Dosage des corticoïdes dans les cheveux : solution dans la lutte contre le dopage ?

V. CIRIMELE⁽¹⁾, M. VILLAIN⁽¹⁾, J.S. RAUL⁽²⁾, P. KINTZ⁽¹⁾

(1) Laboratoire ChemTox, Illkirch-Graffenstaden ;

(2) IML, Strasbourg, France

Objectif : Développement d'une méthode de dosage des corticoïdes suivants, triamcinolone, prednisolone, cortisol, prednisone, cortisone, méthylprednisolone, beta- et dexaméthasone, fluméthasone et bécloéthasone, dans les cheveux par LC-MS/MS.

Sujets et méthodes : Les échantillons de cheveux ont été prélevés sur des sujets témoins, sur des patients traités par corticoïdes et sur des sportifs suspectés de dopage. La méthode comprend une décontamination de

l'échantillon dans du dichlorométhane, sa pulvérisation et l'incubation (16h à 40°C) de 50 mg de la poudre obtenue dans un tampon phosphate pH 7,6 en présence de cortisol deutéré utilisé comme étalon interne. Les analytes sont successivement purifiés sur colonne C18 (lavage spécifique par acétone eau et hexane) et extraction liquide-liquide par diéthyléther à pH alcalin. Après évaporation, l'extrait sec est repris et injecté dans une colonne C18 (100 x 1mm de diamètre interne) d'un système Alliance 2695 (Waters). La séparation chromatographique a été obtenue à l'aide d'un gradient acétonitrile/tampon formiate d'ammonium 2 mM additionné de 0,1% d'acide formique. Les analytes ont été identifiés par spectrométrie de masse tandem avec une source de type Electrospray de chez Waters (Quattro Micro) en mode positif. Les conditions étaient les suivantes : tension de capillaire 3,0 KV, température de source 120°C, température du gaz de désolvatation 350°C avec un débit de 550 l/h, et une pression d'argon de 3 mbar. Chaque analyte a été suivi avec une tension de cône et des transitions spécifiques.

Résultats : L'introduction de la LC/MS-MS a permis d'améliorer les performances analytiques de la méthode précédemment publiée [1]. En premier lieu, les concentrations physiologiques de cortisone (2 à 132 pg/mg, moyenne 42 pg/mg) et de cortisol (2 à 57 pg/mg, moyenne 15 pg/mg) ont pu être déterminées dans les cheveux d'une population témoin (n = 25). La prednisone a été identifiée (concentrations : 30 à 130 pg/mg) dans les cheveux de 9 patients traités par Cortancyl® (posologie : 5 à 60 mg/j), avec l'existence d'une corrélation dose-concentration ($R^2 = 0,578$, $p < 0,03$). Un traitement thérapeutique unique de 9 jours par bécloéthasone a pu être identifié dans les cheveux d'un patient traité avec une dose journalière de 4 mg. La bécloéthasone a pu être identifiée à la concentration de 4,7 pg/mg dans le segment proximal de la mèche prélevée. L'analyse de cheveux prélevés chez des coureurs cyclistes a permis de révéler la présence de triamcinolone, de betaméthasone et de bécloéthasone dans plusieurs segments, preuve d'une conduite dopante sur plusieurs mois.

Conclusions : Les performances de la méthode ont non seulement permis de doser les corticoïdes dans un panel d'individus malades atteints de sarcome, d'asthme ou ayant été greffés et suivant un traitement au long cours, mais aussi dans un cas de traitement de durée courte. La méthode développée apparaît suffisamment sensible pour déterminer les taux physiologiques de cortisol et cortisone ainsi que les abus non autorisés chez certains sportifs.

Référence :

1. Cirimele V. et coll. Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography-ion-spray mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 2000 ; 107 : 381-8.

Alpha-chloralose : vers un possible détournement de l'usage du produit

C. RAGOUCY-SENGLER⁽¹⁾, M.F. PETCHY⁽²⁾, N. GARRIGUE⁽³⁾, C. SUEUR⁽⁴⁾, M. SIMONETTI⁽²⁾, J. SALIN⁽⁵⁾

(1) Laboratoire de Biochimie,

(2) Urgences Médicales,

(3) SAMU/SMUR,

(4) Psychiatrie Adulte,

(5) Réanimation Adulte, CHU, BP 465, Pointe à Pitre, Guadeloupe.

Objectif : L'alpha-chloralose, produit de condensation du glucose avec l'hydrate de chloral est un principe actif connu depuis le XIX^{ème} siècle. Tout d'abord employé pour ses propriétés somnifères, tout comme l'hydrate de chloral, il est par la suite utilisé comme raticide. Le climat, l'abondance des arbres fruitiers sauvages, le traitement non rigoureux des déchets se traduit aux Antilles par la prolifération des rongeurs. De nombreux produits phytosanitaires sont utilisés pour leur éradication dont l'alpha-chloralose. Depuis quelques années nous constatons une augmentation du nombre d'hospitalisations liées à une mono intoxication par ce produit. L'objet de ce travail a été d'analyser les cas au regard des circonstances et des signes cliniques observés.

Méthode : Nous avons analysé rétrospectivement tous les dossiers de patients hospitalisés depuis 2001 au CHU de Pointe à Pitre (Guadeloupe). Seuls les cas de mono intoxication suffisamment détaillés ont été inclus. Le diagnostic de l'intoxication a été réalisé par le dosage semi-quantitatif de l'alpha-chloralose dans les urines par la méthode colorimétrique de Fujiwara-Ross.

Résultats : L'alpha-chloralose est distribué aux Antilles sous la forme d'une préparation magistrale réalisée à 20% ou 40% dans du saindoux. Depuis ces dernières années nous assistons à une augmentation du nombre des intoxications : celles ci ont concerné 3 patients en 2001(intoxication collective pour deux d'entre eux), 1 en 2002, 4 en 2003 et 9 en 2004. Ce qui représente un nombre particulièrement élevé par rapport au nombre de cas rapportés en Métropole. Les concentrations urinaires en principe actif, mesurées par la réaction alcalino-pyridinique en milieu alcalin après hydrolyse étaient dans 2 cas comprises entre 12,5 et 25 mg/L, dans 1 cas comprise entre 25 et 50 mg/L et dans 11 cas supérieures à 50 mg/L (dont 8 en 2004). La population intoxiquée a évolué depuis ces deux dernières années en effet, cette intoxication concerne à ce jour essentiellement les hommes : 0 en 2001, 0 en 2002, 2 en 2003 et 6 en 2004. De même les circonstances de l'intoxication se sont elles mêmes modifiées. D'accidentelle et concernant uniquement des enfants, à volontaire et concernant essentiellement les femmes, l'origine de l'intoxication est inconnue ou n'est pas

immédiatement avouée dans la plupart des cas masculins. Notre étude s'est particulièrement concentrée sur l'analyse des cas masculins dont l'intoxication aiguë était d'origine inconnue, ces patients ayant été retrouvés convulsant et inconscients à leur domicile (6 cas). Ces patients avaient entre 41 et 74 ans, éthyliques pour 3 d'entre eux et avec antécédent psychiatrique pour l'un d'entre eux. L'anamnèse réalisée au cours de la consultation psychiatrique permet d'évoquer une utilisation détournée du produit à des fins de stimulation sexuelle.

Conclusion : L'alpha-chloralose est un produit connu pour son action hypnotique et rodenticide. Son utilisation est courante aux Antilles. L'augmentation préoccupante du nombre de cas d'intoxications aiguës d'origine inconnue ou non avouée immédiatement intéressant des hommes de plus de 40 ans au CHU de Pointe à Pitre nous a conduit à réaliser une étude rétrospective des cas. Cette étude conclut à un probable usage détourné de l'alpha-chloralose comme stimulant sexuel sans que l'on puisse expliquer pharmacologiquement cet effet.

Quelques cas récents d'intoxications chez des animaux sauvages et domestiques

M. AUGSBURGER⁽¹⁾, F. SPORKERT⁽¹⁾, C. GIROUD⁽¹⁾, M.P. RYSER-DEGIORGIS⁽²⁾, P. BOUJON⁽³⁾, P. MANGIN⁽¹⁾

(1) Institut Universitaire de Médecine Légale, Lausanne ;

(2) Centre pour la Médecine des Poissons et des Animaux sauvages, Faculté Vetsuisse, Berne ;

(3) Institut Galli-Valerio, Lausanne, Suisse

Objectif : La cohabitation de l'Homme et de l'animal sur un territoire restreint pose parfois des problèmes que certains bipèdes ont résolu de manière toxicologique et définitive, au détriment de la faune sauvage ou domestique [1,2]. Ces dernières années, plusieurs cas d'intoxications chez des animaux ont été observés en Suisse, dont une sélection fait l'objet de cette présentation.

Méthodes : Des échantillons biologiques prélevés sur un chat, des chiens, des renards et des lynx ont été analysés, afin de rechercher la présence de substances toxiques. Des appâts retrouvés dans l'environnement des animaux ont également été analysés. En fonction des échantillons à disposition, des tests de dépistage (cyanure) et des analyses de screening par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) ont été effectués, selon les mêmes procédures que celles utilisées pour des échantillons humains [3]. Des analyses de confirmation et de quantification ont ensuite été réalisées par spectrophotométrie (cyanure) ou par CPG-SM (chloralose, fonofos et strychnine).

Résultats : #1. Du chloralose a été détectée dans l'urine d'un lynx paralysé et tremblant, qui avait été abattu à cause de la gravité des symptômes observés. A proximité de l'animal, une carcasse de chamois a été trouvée et identifiée comme une proie du lynx. Un poisson éviscéré et contenant une poudre blanche (chloralose), a été trouvé à côté de ce chamois. #2. Un renard et un chat domestique ont été découverts morts dans la même région. Dans les contenus stomacaux des deux animaux, de la strychnine (155 et 6 mg/L) a été détectée. #3. Deux lynx (une femelle et son petit) agonisant à côté de leur proie et présentant des symptômes de paralysie ont dû être abattus. Du cyanure a été mis en évidence dans le contenu stomacal (0,4 mg/L) d'une des deux bêtes. Certains échantillons musculaires de la proie, un chamois, contenaient du cyanure (0,9, 0,5 et 1,2 mg/kg). #4. Trois chiens sont décédés subitement en milieu urbain en quelques jours, après s'être promenés au même endroit. Du fonofos a été détecté dans le sang (27, 32 et 14 µg/L), la bile (436, 367 et 292 µg/L) et le contenu stomacal (97, 999 et 13 mg/L) des trois bêtes. Sur les lieux, une substance grasse contenant du fonofos (900 mg/kg) a été trouvée.

Conclusion : Chloralose, cyanure, strychnine et fonofos, telles sont les substances détectées dans des prélèvements effectués sur des animaux sauvages (renards et lynx) et domestiques (chat et chiens) qui présentaient des signes d'intoxication avant leur décès, ainsi que sur des appâts.

Références :

1. Calzetta L. et coll. Incidence of intentional poisoning of dogs in Abruzzo region of Italy. *Vet. & Human Toxicol.* 2002 ; 44(2) : 111-3.
2. Murphy M.J. Rodenticides (Review). *Vet. Clin. Small Anim.* 2002 ; 32(2) : 469-84.
3. Romain N. et coll. Case report : Fatal flecainide intoxication. *Forensic Sci. Int.* 1999 ; 106 : 115-23.

Préparation des échantillons biologiques après déprotéinisation et concentration-purification en ligne. Quantification par LC- MS/MS

C. LACROIX, G. BODIN, J.P. GOULLE

Laboratoire de Pharmacocinétique et de Toxicologie, Centre Hospitalier, Le Havre.

Objectif : La préparation d'extraits sanguins ou urinaires avant la phase chromatographique est toujours consommatrice de temps, polluante par l'évaporation des solvants et coûteuse. La MS/MS couplée à l'HPLC permet, par sa puissance d'acquisition, d'automatiser la phase extractive en ligne dans des temps très courts [1].

Méthode : Le déroulement de cette préparation nécessite des vannes de commutation et des pompes HPLC d'appoint ainsi qu'une colonne de type Oasis (copolymère, 20 x 2,1 mm, 25 µm). Les prélèvements plasma-

tiques, sériques ou sanguins sont injectés directement, après simple déprotéinisation et les urines diluées ou non au demi par de l'eau. Après différentes phases de lavage, dont de la sophistication dépendra la limite de quantification, les différents composés retenus sont élués en back flush sur une colonne analytique X Terra C18 (100 x 2,1 mm, 3,5 µm)

Résultats : Différentes familles chimiques ont été évaluées : Benzodiazépines, Béta-bloquants, amphétamines, neuroleptiques, antidépresseurs... Les coefficients de variation intra série varient de 3 à 5 %. La limite de quantification retenue est de 1 ng/ml pour 300 µl injectés (échantillons sanguins déprotéinisés au tiers).

Conclusion : Les applications de ce type de préparation en ligne ouvrent de nombreuses perspectives mais ne doivent pas faire oublier que chaque composé ou famille chimiques exigent une mise au point échelonnée : rétention sur la colonne Oasis, purification par élution des substances endogènes parasites tout en conservant les solutés à doser, élution sur la colonne chromatographique avec focalisation des composés, quantification par MS/MS.

Référence :

1. Mallet C.R. et coll. Evaluation of several solid phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry on-line configurations for high-throughput analysis of acidic and basic drugs in rat plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001 ; 15 : 1075-83.

Développement d'une méthode de GC-MS/MS associant l'ionisation chimique négative et le mode "Multiple Reaction Monitoring" avec collisions dans le xénon pour l'analyse de benzodiazépines

S. BOUCHONNET, S. KINANI

Laboratoire des Mécanismes Réactionnels, Ecole Polytechnique, Palaiseau

Objectifs : L'ionisation négative par attachement électronique est particulièrement adaptée à l'analyse par GC-MS de composés très électrophiles comme les benzodiazépines : elle fournit d'excellents rendements en ions M⁻ et s'avère très sélective vis-à-vis des interférents matriciels. La plupart des méthodes d'analyse de benzodiazépines utilisant l'ionisation chimique négative sont des méthodes de SIM car ce mode d'ionisation fournit des ions moléculaires tellement stables qu'ils sont incassables dans des conditions standards de MS/MS. Notre objectif est de développer une méthode particulièrement spécifique associant ionisation chimique négative et "Multiple Reaction Monitoring" (MRM) en triple quadripôle. Le diazépam, le nordazépam et l'oxazépam ont été retenus pour cette étude.

Méthodes : La méthode développée pour quantifier les 3 benzodiazépines dans l'urine humaine utilise un protocole d'extraction liquide/liquide sur toxitubes A.

L'appareillage utilisé est un couplage GC-MS avec Triple quadripôle 1200 Varian. L'ionisation est réalisée par attachement électronique ; la thermalisation des électrons est assurée par une pression source en méthane de 4 Torr. La séparation chromatographique utilise une colonne capillaire de 30 m (id : 0,25 mm, ep : 0,25 µm). L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 1,4 ml/min. 1 µl d'extrait urinaire est injecté en splitless. La programmation de température est la suivante : 50°C (1 min.) à 300°C (3 min.) à 20°C/min. L'injecteur est à 280°C ; la décomposition thermique de l'oxazépam est totale et celui-ci est donc quantifié via son produit de décomposition. La méthode MRM détecte 2 transitions résultant de la fragmentation de l'isotope M⁻ majoritaire.

Résultats : Les ions M⁻ ne se fragmentent pas par collisions dans l'argon, quelque soit la pression partielle de ce dernier. Seule l'augmentation de la masse du gaz cible permet de fragmenter efficacement sans perdre trop de signal. L'utilisation de xénon à une pression partielle de 0,3 mTorr a permis d'optimiser une méthode MRM efficace avec des tensions d'accélération des ions M⁻ de 45 V. Pour une prise d'essai de 2 ml d'urine, les limites de quantification (LOQ) obtenues sont de 0,15, 1,0 et 1,50 et 1 ng par ml d'urine pour le diazépam, le nordazépam et l'oxazépam, respectivement. Le coefficient de corrélation r² de la droite de calibration est supérieur à 0,99 sur une gamme de concentrations de LOQ à 50 fois LOQ (n= 8). La répétabilité sur 10 injections consécutives fournit un coefficient de variation (CV) de 10 % à 20 ng/ml. La reproductibilité sur 10 jours fournit un CV de 14 % à 20 ng/ml.

Conclusions : L'utilisation de xénon comme gaz de collision permet de profiter des atouts de l'ionisation chimique négative tout en s'affranchissant de sa principale limite : la difficulté, voire l'impossibilité de fragmenter les ions M⁻ résultants pour faire de la MS/MS. Dans le modèle dit « du centre de masse », le xénon augmente d'un facteur 4 l'efficacité des collisions, comparé à l'argon classiquement utilisé. La méthode développée pour la quantification du diazépam, du nordazépam et de l'oxazépam est plus sensible et surtout plus spécifique que les méthodes de SIM existantes.

Toxicologie des métaux, spéciation, ICP/MS

Apport de la technologie ICP-MS à l'analyse toxicologique : les analyses de spéciation des métaux

H. GARRAUD

Ultra Traces Analyses Aquitaine (UT2A), Pau

Introduction : Le développement de la technologie ICP-MS pour la détermination des métaux traces a permis de franchir un pas important en terme d'analyse multi-élémentaire à de basses concentration.

Parallèlement, les techniques de détermination des formes chimiques des métaux ou analyses de spéciation ont, elles aussi, connues un nouvel essor grâce à l'association de l'ICP-MS avec des techniques chromatographiques. Il est en effet aujourd'hui largement accepté que le dosage de la teneur totale ne permet pas de connaître de façon précise l'impact d'un métal ou d'un métalloïde sur l'environnement ou les organismes vivants. La mobilité, la réactivité, la toxicité ou l'essentialité sont étroitement contraintes par la forme chimique. Ainsi la spéciation prend toute sa valeur.

Méthode : D'un point de vue technique, le couplage de l'ICP-MS avec la chromatographie en phase liquide (HPLC-ICPMS) ou la chromatographie en phase gazeuse (GC-ICP-MS) permet d'accéder à cette information de façon précise et sensible. A travers cette approche la préparation des échantillons reste toutefois une phase critique car l'enjeu consiste à préserver l'intégrité des formes chimiques à déterminer tout en obtenant des rendements d'extraction maximum.

Exemples : Pour illustrer l'apport de l'ICP-MS à l'analyse toxicologique, plusieurs exemples sont présentés. #1 Le couplage HPLC-ICP-MS utilisé pour déterminer les formes chimiques de l'arsenic dans les cheveux ou l'urine. On remarque dans le cas de l'urine, la présence d'arsénobétaine, composé organique de l'arsenic qui n'est pas métabolisé par l'organisme humain et excrété de manière rapide. La présence majoritaire d'arsénobétaine dans les produits de la mer montre les enjeux de la spéciation de l'arsenic dans le cadre de l'alimentation. #2 Dans le cas du mercure, le composé méthyl-mercure (1000 fois plus toxique que la forme inorganique) peut être analysé par couplage GC-ICP-MS. Ici aussi cette détermination permet de juger de façon pertinente du risque alimentaire notamment par la consommation de poissons carnassiers situés en fin de chaîne alimentaire (phénomène de bioaccumulation du mercure dans les tissus sous forme de méthyl-mercure). #3 Enfin, la chromatographie multidimensionnelle couplée à l'ICP-MS permet d'accéder à la détermination de bio-molécules où se rejoignent la protéomique et les métaux, le terme métallomique commence à apparaître et induit une plus grande connaissance du cycle des métaux dans le vivant. Ces approches ont permis notamment de lever le doute sur la présence de certains métaux lourds dans le vin ou le cacao. Dans ces cas, les éléments sont complexés par des molécules de forts poids moléculaires non assimilables par l'organisme.

Conclusion : L'approche de spéciation, bien qu'encore complexe dans certains cas, permet d'aborder la présence de métaux traces sous un angle raisonné. Le rapprochement de la toxicologie et des sciences analytiques est aujourd'hui indispensable pour la définition de protocoles d'études adaptés.

Apport des techniques de spectrométrie d'émission et d'absorption atomiques à l'étude toxicologique élémentaire du contenu de l'urne funéraire d'Agnès Sorel (1422-1450)

J. POUPON⁽¹⁾, P. CHARLIER⁽²⁾, S. VÉLASQUEZ⁽³⁾

(1) Laboratoire de Toxicologie Biologique, GH Lariboisière-Fernand Widal, Paris ;

(2) Laboratoire d'Anatomo-Pathologie, CHU Lille ;

(3) Horiba-Jobin Yvon, Longjumeau

Objectif : À l'occasion de sa réinhumation, le contenu de l'urne funéraire d'Agnès Sorel (1422-1450) a fait l'objet d'une étude multidisciplinaire coordonnée par P. Charlier afin d'approfondir les connaissances sur la vie et la mort d'Agnès Sorel, maîtresse de Charles VII. Il a notamment été pratiqué une analyse élémentaire des divers éléments de l'urne dans le but, entre autres, de confirmer la présence d'un sarcophage en plomb et de rechercher une éventuelle intoxication métallique susceptible d'éclairer les causes de son décès.

Méthodes : Treize échantillons provenant des 5 niveaux de l'urne et 4 prélèvements effectués sur du crâne ont fait l'objet d'une recherche et d'un dosage des éléments présents. Les échantillons (fragments de sarcophage, jus de putréfaction, échantillons non identifiés, prélèvements crâniens) ont été mis en solution par attaque acide assistée par micro-ondes puis analysés par spectrométrie d'émission atomique en plasma induit (ICP-OES) multi-raies ou par spectrométrie d'absorption atomique électrothermique (SAAET) simultanée selon la quantité d'échantillon disponible.

Résultats : Les teneurs en plomb mesurées sur 5 échantillons (53 à 75 g Pb/100 g) confirment la présence d'un sarcophage en plomb dont la composition élémentaire différente en surface et dans la masse (ex. Ca : 10% vs 0,3%, P : 0,4 vs 0,02%) permet de mettre en évidence des contaminations, vraisemblablement par des produits de décomposition du corps. L'analyse multiélémentaire des autres échantillons permet de distinguer ceux provenant du sarcophage de ceux dont la composition évoque une origine humaine. Tous les échantillons contiennent du mercure mais les taux les plus élevés sont retrouvés au niveau du jus de putréfaction (jusqu'à 40 mg/100 g). Nous montrons, de plus, que les traces de cet élément mesurées au niveau du sarcophage (0,7 mg/100 g) sont dues à une contamination externe et que l'analyse des échantillons recueillis sur le crâne semble exclure l'application de composés mercuriels à des fins conservatoires. Le dosage séquentiel dans les cheveux, notamment du mercure, est actuellement en cours.

Conclusion : L'analyse élémentaire du contenu de l'urne funéraire d'Agnès Sorel apporte des éléments nouveaux sur les circonstances de sa mort. La présence d'un sarcophage en plomb est vérifiée ce qui confirme

l'authenticité de l'urne. La présence, inhabituelle, de traces de mercure dans tous les échantillons analysés sont cohérents avec les résultats obtenus par ailleurs sur les cheveux. Les teneurs retrouvées permettent, a priori, d'exclure une contamination externe, notamment par le sarcophage.

Métaux et métalloïdes chez des malades hémodialysés. Proposition pour une meilleure prise en charge médicale

J.P. GOULLÉ, S. DE BONNECHOSE, A. HERMELIN, L. MAHIEU J.M., BATHO, D. BOUIGE, G. LAINE, C. LACROIX

Groupe Hospitalier du Havre, B.P. 24, 76083 LE HAVRE.

Objectif : Nous avons examiné le statut en métaux et métalloïdes chez des malades insuffisants rénaux chroniques hémodialysés. En effet, ce groupe de patients connaît une mortalité élevée, c'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés aux facteurs métalliques pour voir si certains d'entre eux ne pouvaient contribuer à ce pronostic péjoratif.

Méthodes : Les dosages sont réalisés sur un Spectromètre X7 CCT Thermo Elemental (ThermoOptek, Courtaboeuf), sans cellule dynamique de réaction, équipé d'un passeur d'échantillon et du logiciel PlasmaLab selon une technique déjà décrite [1]. Cent huit malades des deux sexes, insuffisants rénaux chroniques, provenant de deux centres normands (Le Havre, Caen) hémodialysés sont inclus. A l'occasion du bilan de dialyse, des dosages de métaux et métalloïdes sont effectués dans le sang total et le plasma. Le sang est prélevé dans un tube sous vide de 7 mL pour éléments traces (BD vacutainer, réf 367735). Trente métaux sont quantifiés simultanément : Li, Be, B, Al, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Rb, Sr, Mo, Pd, Ag, Cd, Sn, Sb, Te, Ba, W, Pt, Hg, Tl, Pb, Bi, U. Les résultats sont comparés à ceux obtenus chez 100 adultes témoins des deux sexes indemnes de toute affection [2] grâce à des analyses statistiques : corrélation selon la méthode des rangs de Spearman, analyse en composantes principales, analyse par classification hiérarchique ascendante.

Résultats : L'examen des résultats montre pour un certain nombre de paramètres, une différence très nette, sans chevauchement, entre les malades et les témoins ($p < 0,001$) tant dans le plasma que dans le sang total. Il s'agit d'augmentations pour certains éléments, de diminutions pour d'autres. Parmi les variations les plus notables qui pourraient avoir un impact sur la santé de ces insuffisants rénaux chroniques, citons les déficits en sélénium et en zinc, et l'excès de plomb en particulier plasmatique. Sa concentration dans le plasma représente seulement 1 % du plomb sanguin total et serait un meilleur reflet du stock osseux. Quant au sélénium, il est bien connu que celui-ci joue un rôle primordial dans

les mécanismes fondamentaux de protection des cellules contre le stress oxydatif.

Conclusion : Nous proposons que tous les insuffisants rénaux chroniques puissent bénéficier régulièrement de bilans multiélémentaires. En cas de déficit en sélénium ou/et en zinc, nous préconisons une supplémentation et nous recommandons pour ces malades la consommation de boissons et d'aliments pauvres en plomb.

Références :

1. Goullé J.P. et coll. Validation d'une technique de dosage multiélémentaire des métaux par ICP-MS dans les milieux biologiques. Ann. Toxicol. Anal. 2003 ; 15 : 271-80 et Ann. Toxicol. Anal. 2004 ; 16 : 257-60.
2. Goullé J.P. et coll. Dosage multiélémentaire des métaux et métalloïdes dans les milieux biologiques par ICP-MS : valeurs usuelles chez 100 témoins. Ann. Toxicol. Anal. 2004 ; 16 : 261-8.

Étude multicentrique de la variabilité de la mesure de la plombémie pour de faibles concentrations proches du seuil de 100 µg/L

L. LABAT^(1*), D. Olichon^(2*), J. Poupon^(3*), M. BOST^(4*), V. HAUFROID^(5*), C. MOESCH^(6*), A. NICOLAS^(7*), Y. FURET⁽⁸⁾, J.P. GOULLE⁽⁹⁾, O. GUILLARD⁽¹⁰⁾, A. LE BOUIL⁽¹¹⁾, A. PINEAU⁽¹²⁾

- (1) CHRU, Lille ;
- (2) Laboratoire Pasteur Cerba, Cergy Pontoise ;
- (3) CHU Lariboisière, Paris ;
- (4) CHU, Lyon ;
- (5) UCL, Bruxelles ;
- (6) CHRU, Limoges ;
- (7) LaboratoireToxilabo, Nantes ;
- (8) CHU, Tours ;
- (9) GH, Le Havre ;
- (10) CHU, Poitiers ;
- (11) CHU, Angers ;
- (12) UFR de Pharmacie, Nantes

* Groupe de Travail «Toxiques Industriels» de la SFTA.

Objectif : En 1991, les CDC (Centers for Disease Control and Prevention) définissent comme critère d'acceptabilité pour le dosage de la plombémie une variation de +/- 40 µg/L pour les valeurs inférieures à 400 µg/L et de 10 % pour les valeurs supérieures [1]. Actuellement, avec un seuil de décision de déclaration obligatoire du saturnisme de 100 µg/L et l'évolution des techniques, les critères annoncés pour les valeurs inférieures à 400 µg/L ne semblent plus acceptables. Le groupe de travail « Toxiques Industriels » de la SFTA propose d'actualiser ces données en réalisant une étude multicentrique sur la variabilité du dosage de la plombémie.

Méthodes : Cette étude a été réalisée dans 12 laboratoires dosant habituellement le plomb sanguin pour la surveillance de l'exposition professionnelle ou pour la surveillance du saturnisme infantile. Quatre pools de sang prélevé sur EDTA ont été constitués. Ils ont été transmis congelés à chaque laboratoire après échantillonnage et codification. Ils ont été préparés de façon à obtenir une valeur dans chacun des quatre niveaux de concentrations suivants : <30, 31 à 70, 71 à 100 et 101 à 150 µg/L. Pour chaque laboratoire, cinq séries (comportant chacune 8 échantillons) sont constituées de façon aléatoire et transmises congelées après échantillonnage et codification. Les séries ont ensuite été analysées par les laboratoires sur 5 jours différents par spectrométrie d'absorption atomique électrothermique (SAAE) ou par spectrométrie d'émission en plasma induit couplée à la spectrométrie de masse (ICP-MS).

Résultats : Les plombémies ont été mesurées par SAAE (n=12) et/ou ICP-MS (n=4). Les moyennes obtenues par ces deux techniques ne diffèrent pas significativement mais les coefficients de variation (CV) de la SAAE sont en moyenne deux fois plus élevés que ceux observés pour l'ICP-MS. Les principaux résultats sont résumés dans le tableau ci dessous :

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	Niveau 4
Moyenne (µg/L)	30,3	47,5	82,8	129,4
Ecart-type général (CV %)	4,5 (14,8 %)	5,8 (12,1 %)	7,6 (9,1 %)	9,8 (7,6 %)
(µg/L) (n = 160)				
Minimum - maximum (µg/L)	20,4 - 43,0	35,2-70,0	66,9-107,0	109,0-161,0
Percentiles 2,5 - 97,5 % (µg/L)	21,9- 41,0	38,9-60,0	70,3-100,0	109,6-150,0
CV intra laboratoire moyen	7,6 %	6,5 %	5,2 %	4,9 %

Conclusion : Cette étude permet d'actualiser les données de la littérature sur les performances du dosage de la plombémie par deux techniques couramment utilisées dans les laboratoires : la SAAE et l'ICP-MS. Pour des valeurs proches du seuil de décision de la déclaration obligatoire du saturnisme (100 µg/L), nous montrons que les dispersions des mesures sont plus faibles que celles qui servent encore aujourd'hui de référence.

Référence :

1. Preventing lead poisoning in young children. Atlanta : Centers for Disease Control and Prevention, 1991.

La biométhylation des métaux chez l'homme et dans l'environnement : succès ou échec sur le plan toxicologique ?

J.P. ANGER⁽¹⁾, L. LABAT⁽²⁾, M. LHERMITTE⁽²⁾

- (1) Faculté de Pharmacie, Université de Rennes 1, 35043 Rennes cedex.
- (2) Laboratoire de Toxicologie et Génopathies, Hôpital Calmette, 59037 Lille cedex.

Introduction : Le terme de biométhylation (méthylation biologique) correspond au transfert d'un groupe méthyle (-CH₃), à partir d'un donneur de méthyle grâce à une enzyme, à l'intérieur d'un organisme vivant [1]. Chez les microbes comme chez les mammifères,

les donneurs biologiques sont le plus souvent la S-adenosylméthionine (S.A.M) et la méthylcobalamine (Vit B 12). Les enzymes qui contrôlent de tels transferts sont appelées méthyltransférases. Si la biométhylation de substances organiques sur les atomes de carbone, d'azote, de soufre ou d'oxygène est fréquente au cours du métabolisme chez tous les organismes supérieurs, d'autres éléments la subissent également : c'est le cas de plusieurs métaux et métalloïdes comme l'arsenic, le mercure, le bismuth ou l'étain. On sait aujourd'hui que ces composés méthylés présentent pour l'homme des risques non négligeables pour sa santé [2].

Méthodes : Dans cette revue très générale et non exhaustive, nous rappelons la découverte et le mécanisme de biométhylation de quelques métaux et métalloïdes ayant entraîné au cours du siècle dernier, des intoxications dramatiques chez l'homme des suites d'une contamination accidentelle de l'environnement (cas du mercure à Minamata) ou d'une utilisation thérapeutique (cas des sels de bismuth et de l'étain) ou enfin qui apparaissent au cours du métabolisme de l'élément et dont on ignorait jusqu'alors la toxicité (cas de l'arsenic). Les circonstances et la symptomatologie de chaque intoxication sont succinctement évoquées.

Résultats et conclusion : Si la biométhylation des métaux dans l'environnement est en fait un processus général de détoxification et donc un succès pour les bactéries, il apparaît que la formation ou l'utilisation chez l'homme de ces composés organométalliques et organométalloïdiques est plutôt un échec ainsi qu'en témoignent les intoxications gravissimes qui ont marqué l'histoire de la toxicologie au cours du vingtième siècle. L'imprudence, l'ignorance ou l'irresponsabilité en ont été la cause. Il importe donc de surveiller la présence de ces formes organométalliques dans l'environnement et dans les milieux biologiques. Les méthodes modernes de spéciation alliant la séparation chromatographique en phase gazeuse ou liquide à une détection très spécifique et très sensible comme l'ICP-MS, permettent aujourd'hui de surveiller les niveaux d'exposition et devraient à l'avenir éviter de tels problèmes de santé.

Références :

1. Bentley R et coll. Microbial methylation of metalloids : arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002, 66 : 250-71.
2. Dopp. E et coll. Environmental distribution, analysis and toxicity of organometal(oid) compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 2004, 34 : 301-33.

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

La détermination de l'alcoolémie dans le cadre de la circulation routière en Suisse. Organisation, exigences et assurance de qualité

M. PELLETIER, C. STAUB

Institut universitaire de médecine légale, Genève, Suisse

Objectif : Présentation des bases légales concernant la constatation de l'ébriété et les exigences concernant les laboratoires accrédités, les méthodes admises et la réalisation des analyses. Nous présentons ensuite l'assurance de qualité telle qu'elle est exigée en Suisse, en particulier les contrôles de qualité internes et externes.

Bases légales : La constatation de l'ébriété, les limites légales, la réalisation des analyses et l'accréditation des laboratoires autorisés à effectuer les analyses sont fixées dans une loi fédérale, des ordonnances d'application et des instructions. La limite légale est, depuis le 1^{er} janvier 2005, de 0,5 g d'éthanol par kg de sang.

Quand les circonstances le permettent, une première mesure dans l'haleine est effectuée par la Police au moyen d'éthylomètres électroniques. Une prise de sang est effectuée d'office au-dessus de 0,8 g/kg et entre 0,5 et 0,8 g/kg si le conducteur n'accepte pas le résultat donné par l'éthylomètre. Au dessus de 0,8 g/kg, une prise de sang est effectuée dans tous les cas et seul le résultat de l'analyse du sang a une valeur administrative et judiciaire. Pour pouvoir effectuer des analyses légales d'alcoolémie, les laboratoires doivent être accrédités par le Département fédéral de l'environnement, des transports, de l'énergie et de la communication, après un examen d'aptitude et un audit par une commission *ad hoc*. Ils sont soumis régulièrement à des audits de contrôle. Les analyses doivent être effectuées par deux méthodes différentes et deux fois par chaque méthode. Les méthodes admises sont la chromatographie en phase gazeuse et la méthode enzymatique (de moins en moins utilisée). Le résultat rendu correspond à la moyenne des quatre mesures, avec indication de la limite de tolérance.

Assurance de qualité : A/Contrôle de qualité externe : quatre fois par an, chaque laboratoire reçoit deux échantillons, sanguin et aqueux, à analyser de la même manière que les échantillons réels. Si l'écart entre les valeurs rendues et la valeur cible dépasse les limites fixées dans l'ordonnance, le laboratoire est mis en demeure d'en expliquer les causes et d'y remédier dans un court délai. Si la situation n'est pas corrigée ou que le cas se reproduit, l'autorisation d'effectuer ces analyses lui est retirée. B/Contrôle de qualité interne : trois exigences doivent être satisfaites pour que le résultat puisse être communiqué aux autorités a/ sur l'échantillon : la limite de tolérance des quatre mesures effectuées sur un échantillon ne doit pas dépasser 5% pour

une alcoolémie au-dessus de 1 g/kg et 0,05 g/kg en dessous de cette valeur ; b/ sur la série : la variance de l'ensemble de la série d'analyse doit satisfaire les mêmes critères ; c/ entre série : un standard doit être introduit dans chaque série d'analyse et le résultat obtenu doit également satisfaire les limites de tolérance ci-dessus, une dérive ne doit pas être constatée d'une série à l'autre. Les méthodes de calcul et des exemples de résultats sur des cas réels sont présentés.

Conclusion : Les exigences sur la qualification des laboratoires, les techniques utilisées et les différents contrôles externes et internes permettent d'assurer une grande fiabilité des résultats communiqués aux autorités.

Évaluation de l'utilité du dosage de l'éthyl glucuronide dans les échantillons de sang total prélevés lors de suspicion de conduite en état d'ivresse.

N. DONZE⁽¹⁾, M. AUGSBURGER⁽²⁾, F. SPORKERT⁽²⁾, P. MANGIN⁽²⁾

(1) Consilia Laboratoires et Conseils Médicaux SA, Valais, Suisse ;

(2) Institut Universitaire de Médecine Légale, Lausanne, Suisse

Objectif : L'éthyl glucuronide (ETG) est un métabolite mineur de l'éthanol. Depuis quelques années, plusieurs auteurs ont souligné l'intérêt de la détermination de l'ETG dans un contexte clinique ou médico-légal [1-3]. Dans un premier temps, une méthode de dosage de l'ETG dans le sang complet par GC-MS (NCI) a été développée, en s'inspirant d'une méthode de dosage de l'ETG dans le sérum [1]. Dans une deuxième phase de l'étude, l'ETG a été dosé dans des échantillons pour lesquels un dosage d'éthanol avait été demandé, afin d'étudier la relation entre les taux d'alcool sanguins, la concentration d'ETG, et le délai entre l'évènement et la prise de sang.

Méthodes : La méthode développée pour la détermination de la concentration d'ETG dans le sang complet consiste en une extraction liquide/liquide, suivie d'une dérivation avec du PFFA. Ainsi, à 200 µL de sang complet, 40 µL d'ETG-d5 (10 mg/L) et 1 mL de méthanol ont été ajoutés. Après agitation, centrifugation et évaporation, le résidu est dérivé avec 50 µL de PFFA (30 min, 90°C). Après évaporation de l'agent de dérivation, le résidu est repris dans 100 µL d'acétate d'éthyl et 2 µL sont analysés par GC-MS (NCI en mode SIM) (LdQ : 0,10 mg/L). Après validation de la méthode, 49 échantillons de sang complet prélevés chez des personnes suspectées de conduire sous influence de l'éthanol ont été analysés.

Résultats : Les concentrations d'éthanol dans les échantillons de sang se situaient entre 0,10 et 3,03 g/kg et les concentrations d'ETG se situaient entre 0,10 et

13,7 mg/L. De manière générale, les concentrations les plus élevées d'ETG se retrouvaient dans les échantillons de sang où la concentration d'éthanol était la plus élevée. Si dans la plupart des cas, la détermination de la concentration d'ETG n'apporte pas d'informations supplémentaires par rapport à l'éthanolémie, dans quelques cas particuliers la concentration d'ETG apporte des informations utiles pour l'expert médico-légal. Ainsi, dans un cas où l'éthanolémie était très faible (< 0,10 g/kg), le résultat du dosage de l'ETG (2,97 mg/L) a permis de confirmer la consommation de boissons alcoolisées avant l'interpellation par la police.

Conclusion : La méthode développée permet le dosage de l'ETG dans des échantillons de sang complet. Ces résultats apportent dans certains cas des informations utiles pour l'expert médico-légal.

Références :

1. Schmitt et coll. Ethyl glucuronide concentration in serum of human volunteers, teetotalers, and suspected drinking drivers. *J. Forensic Sci.* 1997 ; 42 : 1099-102.
2. Droenner et coll. A kinetic model describing the pharmacokinetics of ethyl glucuronide in humans. *Forensic Sci. Int.* 2002 ; 126 : 24-9.
3. Wurst et coll. Ethyl glucuronide : a marker of recent alcohol consumption with clinical and forensic implications. *Alcohol* 2000 ; 20 : 111-6.

Un cas de viol chimiquement facilité conduisant à un décès par le chloroforme

Y. GAILLARD⁽¹⁾, M.F. MASSON-SEYER⁽²⁾, M. GIROUD⁽³⁾, J.F. ROUSSOT⁽⁴⁾, J.M. PREVOSTO⁽⁵⁾

(1) Laboratoire LAT, La Voulté/Rhône ;

(2) Centre médical, Saint Denis les Bourg ;

(3) Cabinet médical, Corveissiat ;

(4) Cabinet médical, Mâcon ;

(5) Fédération de Biochimie, HIA Desgenettes, Lyon

Objectifs : Le but de cette investigation était de déterminer les causes de la mort d'une fillette de 13 ans où rien n'était évident lors de la découverte du corps. Les analyses ont mis en évidence un cas original de viol avec soumission chimique qui tragiquement a conduit au décès de l'enfant et au suicide de son agresseur.

Matériels et méthodes : L'analyse a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne Poraplot Q (injection à 50°C à 120 KPa) couplée à un spectromètre de masse (balayage 29 à 300 u.m.a.) après une injection de 1 ml en espace de tête (incubation 12 min à 90°C) de l'ensemble des prélèvements de la victime et de l'agresseur (500 µL d'étalon interne : 1-butanol à 0,1% dans l'eau sont ajoutés 500 µL de liquide biologique ou 1 g de tissus). Compte tenu de la forte différence de concentration entre la victime et l'agresseur, deux courbes de régression quadratiques différentes sont utilisées pondération en 1/X²). La limite de

détection est de 0,01 mg/L dans le sang tandis que la limite de quantification est de 0,04 mg/L.

Résultats : L'agent incapacitant utilisé était le chloroforme dont la concentration *post-mortem* chez la fillette était de 833,9 mg/L, cause directe du décès [1-3]. L'analyse de différents tissus et fluides prélevés sur le corps de l'agresseur indique une récente manipulation du solvant par ce dernier. On note chez ce dernier une différence de concentration d'un facteur 20 entre les tissus gras et les autres prélèvements biologiques [1-3].

Conclusions : Tandis que la littérature rapporte l'usage répandu en soumission chimique de l'alcool, du cannabis, de la cocaïne, de l'ecstasy, du zolpidem, des benzodiazépines ou du GHB, ce rapport porte l'attention sur le chloroforme en particulier et les solvants enivrants en général, qui bien que démodés, représentent des substances particulièrement efficaces. Nous ne pouvons qu'insister sur la pratique en routine de recherches analytiques systématiques très larges même en l'absence d'éléments d'orientation de l'enquête policière. Par ailleurs, l'analyse des tissus adipeux se révèle très intéressante dans les cas d'utilisation de solvants lipophiles, tandis que l'analyse des phanères est inopérante.

Références :

1. Storms W.W. Chloroform parties. J. Am. Med. Asso. 1973 ; 225 : 160.
2. Mc Gee M.B et coll. A double homicide as a result of chloroform poisoning. J. Forensic Sci. 1987 ; 32 : 1453-9.
3. Allan A.R. et coll. A chloroform inhalation fatality—an unusual asphyxiation. Med. Sci. Law 1988 ; 28 : 120-2.

Mise au point d'une technique rapide de dosage du tramadol et de ses métabolites dans le plasma par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-SM)

S. MACHUCA⁽¹⁾, H. EYSSERIC^(1,2), J. BESSARD⁽¹⁾, F. VINCENT⁽¹⁾, N. JOURDIL⁽¹⁾, L. BARRET⁽²⁾, G. BESSARD⁽¹⁾

(1) UF de Pharmacologie, Département de Biologie et Pathologie de la Cellule, CHU, Grenoble ;

(2) Laboratoire de Médecine Légale, UFR de Médecine, Grenoble

Objectif : Le tramadol (TRA) est un analgésique central opioïde dont la diffusion et la consommation sont en constante augmentation en France. Le développement d'une technique chromatographique d'identification et de quantification est rendu nécessaire par l'absence de méthode d'analyse immunochimique simple. Le but de ce travail est de proposer une méthode de dosage du tramadol et de ses principaux métabolites le

N-desméthyl-tramadol (M1) et le O-desméthyl-tramadol (M2) par CLHP/SM, applicable en toxicologie tant hospitalière que médico-légale. Les phénomènes de suppression d'ionisation par les matrices biologiques ou par interaction entre le tramadol et son analogue isotopique utilisé comme standard interne (SI) sont étudiés.

Méthodes : L'extraction est réalisée sur 100 µL de plasma en présence de 50 ng du standard interne, le ¹³C-D₃-tramadol (seul analogue isotopique disponible sur le marché), par 1,5 ml d'un mélange méthylterbutyléther/chlorobutane/méthanol (45/45/10). La séparation chromatographique est réalisée sur colonne Nucléodur® C18, 4 µm, 2x150 mm à un débit de 200 µL/mn. La phase mobile se compose d'un mélange de phases A (tampon formiate d'ammonium 5 mM, pH3) et B (méthanol) délivré selon un gradient T0 : A 85 %, T10 mn : A 45 % maintenu pendant 1 min. Les micro-pompes et l'injecteur automatique sont de marque Perkin Elmer, série 200. La détection est réalisée par un spectromètre de masse API 150 EX de Sciex. La source d'ionisation de type TurboIonSpray® est utilisée en mode positif. La quantification est réalisée en mode fragmentométrique. Les ions de quantification sont respectivement *m/z* 264.2 (TRA), 250.3 (M1 et M2) et 268.3 (SI). Le phénomène de suppression d'ionisation a été étudié par infusion continue post-colonne d'une solution de TRA (0,5 mg/L) et injections parallèles d'extraits de matrices biologiques diverses ou de solutions du standard interne [1].

Résultats : Les 3 composés d'intérêt sont séparés en moins de 8 min. La quantité de SI a été optimisée à 50 ng pour éviter tout phénomène de suppression d'ionisation. La méthode décrite est sélective. Elle est linéaire pour les 3 composés entre 10 et 2000 µg/L et de ce fait, couvre les zones thérapeutiques décrites pour le TRA entre 100 et 600 µg/L. Les rendements d'extraction réalisés aux concentrations 30, 300 et 900 µg/L sont de 89 % (TRA), 91 % (M1) et 86% (M2). La répétabilité (30, 300 et 900 µg/L) est comprise entre 1,43 et 10,60 % ; la reproductibilité (30, 300 et 900 µg/L) est comprise entre 1,92 et 8,42 % et la limite de quantification est de 10 µg/L. Des essais sur d'autres matrices biologiques : sang total, urines, bile, contenu gastrique et cheveux sont encourageants. Une validation partielle est en cours.

Référence :

1. Liang H.R. et coll. Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable-isotope labeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2003 ; 17 : 2815-21.

Comparaison de trois méthodes immuno-chimiques de détection des amphétamines

C. BAZIN, X. DECLEVES, S. BADRE-SENTENAC, J.P. DUPEYRON, F. CHAST

Service de Pharmacie-Toxicologie, Hôtel-Dieu, Paris

Objectif : Etablir la comparaison entre 3 trousse de dépistage immuno-chimique des amphétamines et dérivés apparentés, notamment la MDMA 3,4-méthylènedioxyméthamphétamine (ou ecstasy). Le but consiste à évaluer ces trousse dans le cadre du dépistage (diagnostic d'orientation) de la présence de MDMA et plus généralement d'amphétamines dans l'urine de patients placés en garde à vue.

Méthodes : Trois techniques immuno-chimiques qualitatives ont été étudiées : 1/ Trousse Syva® EMIT® II Plus Monoclonal Amphetamine/Methamphetamine Assay utilisée sur l'automate COBAS® Mira Plus (Roche), avec un seuil de détection de 1000 ng/mL en D-méthamphétamine (Dade Behring) ; 2/ Trousse Syva® EMIT® II Plus Ecstasy Assay utilisée sur l'automate COBAS® Mira Plus (Roche), avec un seuil de détection de 500 ng/mL en MDMA (Dade Behring) ; 3/ Trousse FPIA Amphetamine/Methamphetamine II utilisée sur l'automate TDX® (Abbott), avec un seuil de détection de 1000 ng/mL en D-amphétamine (Abbott). La recherche d'amphétamines a été réalisée sur 104 échantillons urinaires par chacune des trois techniques, après répartition en 2 lots composés de 52 « positifs » et 52 « négatifs ». Le tri des échantillons « positifs » et « négatifs » a été fait selon les résultats de la technique FPIA.

Résultats : Sur les 52 échantillons urinaires du lot « positif », 38 sont retrouvés « positifs » (soit 73 %) quelle que soit la méthode. 7 échantillons sur 52 (13,5 %) ont été « positifs » avec les techniques (1) et (3) mais trouvés « négatifs » avec la technique (2), suggérant une prise d'autres dérivés amphétaminiques. 7 échantillons sur 52 (13,5 %) ont été « positifs » avec les techniques (2) et (3), mais « négatifs » avec la technique (1) vraisemblablement dû à la sensibilité plus importante de la trousse « Ecstasy Assay ». Sur 52 patients témoins « négatifs », 51 (98 %) ont également été trouvés « négatifs » avec les 2 autres méthodes. Un échantillon urinaire initialement isolé comme « négatif » avec la technique (3), confirmé avec la technique (1) a néanmoins donné un résultat « positif » avec la trousse « Ecstasy Assay », suggérant la meilleure sensibilité dans ce cas, lorsque les concentrations urinaires sont faibles.

Conclusion : La comparaison des trois méthodes est bonne : 45 patients « positifs » avec (1), 46 « positifs » avec (2) et 52 « positifs » avec (3). Elle peut justifier la préférence de la méthode EMIT® II Plus Ecstasy pour le dépistage de routine au laboratoire : temps d'analyse plus faible et coût inférieur. La trousse

« Ecstasy Assay » montre que 87 % des patients « positifs » aux amphétamines ont absorbé de l'ecstasy. L'amélioration de la sélectivité et de la sensibilité de la méthode contribue à renforcer les arguments favorables à l'emploi de la trousse « Ecstasy Assay » en première intention, complété si besoin par la trousse « Monoclonal Amphetamine/Methamphetamine Assay » dans les cas de prise d'autres dérivés amphétaminiques que la MDMA.

Analyse par spectrométrie Raman du dextropropoxyphène

H. BELHADJ-TAHAR⁽¹⁾, P. VISINONI⁽²⁾, A. BOUSSEKSOU⁽³⁾

(1) Groupe Santé Recherche, Toulouse ;

(2) Laboratoire de Police Scientifique, Toulouse ;

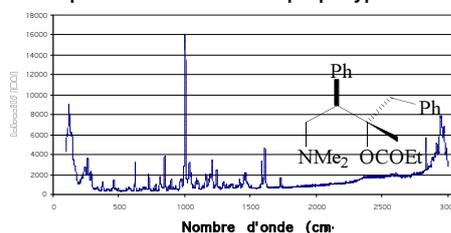
(3) Laboratoire de Chimie de Coordination, CNRS UPR-8241, Toulouse

Objectif : Le dextropropoxyphène (DPX) est un des antalgiques le plus prescrit en France, puisqu'en 2001, il arrivait en tête du classement des génériques les plus vendus en officine. La grande accessibilité publique du DPX ainsi que la survenue précoce de la défaillance cardio-respiratoire lors de la prise massive rend indispensable son identification rapide par des méthodes fiables et ceci dans le cadre de la prise en charge efficace des personnes intoxiquées et notamment les enfants. Dans ce contexte, nous avons récemment développé au sein de l'équipe de propriétés physiques moléculaires du LCC/CNRS Toulouse en collaboration avec le Groupe Santé Recherche une méthode de dépistage et d'analyse *in situ* (sans préparation préalable) du DPX par la spectroscopie Raman non destructive sur des échantillons solides et liquides (urinaire et gastrique).

Méthode : Le spectre Raman du chlorhydrate de dextropropoxyphène, sous forme pulvérulente, a été obtenu dans l'intervalle 30-3000 cm^{-1} grâce au spectromètre haute résolution (LABRAM HR, Jobin Yvon) sous microscope muni d'un laser rouge ($\lambda = 632 \text{ nm}$). D'autre part, cette étude a été complétée par une spectroscopie infrarouge.

Résultats : Le spectre Raman du dextropropoxyphène a été extrait avec une excellente résolution permettant de caractériser parfaitement ce composé sans préparation préalable et ceci en présence de paracétamol et d'aspirine. Le spectre IR se caractérise principalement par les bandes situées à 1700-1750 et 2400-2600 cm^{-1} signant respectivement la présence des fonctions ester et amine tertiaire.

Spectre raman du dextropropoxyphène



Caractéristiques Raman

fonction	bande
$\lambda_{\text{C(=O)}}$	$\approx 1731 \text{ cm}^{-1}$
$\lambda_{\text{C(CH}_2)}$	$\approx 1468 \text{ cm}^{-1}$

Conclusion : La spectroscopie Raman non destructive permet de caractériser des échantillons sans préparation de dextropropoxyphène et de ce fait peut être indiquée pour orienter le diagnostic en extrême urgence. Cette méthode est très spécifique puisqu'elle permet d'identifier le dextropropoxyphène sur des préparations solides ou liquide en présence d'autres composants chimiques et notamment ceux contenant des fonctions carboxyliques estérifiées.

Deux intoxications graves au paracétamol documentées grâce aux toxiques associés.

S. COHEN⁽¹⁾, S. ROSSELLI⁽³⁾, F. BADET⁽²⁾, M. MANCHON⁽¹⁾

(1) Biochimie et toxicologie,

(2) Urgences médicales,

(3) Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre Bénite ; Réanimation, Hôpital Saint Joseph-Saint Luc, Lyon

Objectif : Le dosage sanguin du paracétamol permet le plus souvent de diagnostiquer et d'établir le pronostic d'une intoxication. Cependant, devant une hépatite aiguë admise en réanimation sans orientation diagnostique, il peut être difficile d'évoquer une telle intoxication, le dosage ne permettant pas à ce stade de la maladie, de détecter le médicament. Nous rapportons 2 intoxications où le diagnostic a pu être posé grâce à la mise en évidence dans le sang, dans un cas de morphine et dans l'autre de dextropropoxyphène.

Patients et méthodes : cas #1° Madame J. est adressée en réanimation dans un état de coma profond aréactif avec une hypoglycémie majeure. Le bilan biologique met en évidence une acidose lactique importante, une insuffisance rénale et une insuffisance hépato-cellulaire avec cytolysse. Cas #2° Madame F., a sa prise en charge, présente une hépatite aiguë avec cytolysse intense et ictère ainsi qu'une insuffisance rénale. Les constantes hémodynamiques sont normales. Un screening toxicologique sur REMEDI est pratiqué dans ces deux cas.

Résultats : cas #1 Le bilan toxicologique sanguin révèle la prise de grandes quantités d'opiacés : morphine = 0,13 mg/l ; normorphine = 11,9 mg/l ; codéine = 0,5 mg/l et de benzodiazépines ; la paracétamolémie est inférieure à 10 mg/L, limite inférieure de la zone thérapeutique. A son réveil la patiente dit «n'avoir absorbé aucun médicament inhabituel pour elle». L'évolution se fait vers une aggravation très rapide de l'état hépatique avec décès en trois jours. L'anamnèse révélera l'intoxication à la Lamaline®. Cas #2 Le bilan toxicologique sanguin révèle la présence de norpropoxyphène à 0,1mg/L ainsi que de l'oxazépam à 2,4 mg/L. Le paracétamol est inférieur à 10 mg/L. Après dégradation très importante du bilan hépatique qui fait discuter la greffe de foie, l'évolution est cependant favorable. Dans ce cas, l'anamnèse révélera que la prise de médicaments (Seresta® et Diantalvic®) est antérieure de 3 jours à l'hospitalisation.

Discussion : Le dextropropoxyphène étant toujours associé au paracétamol, sa mise en évidence dans le sang témoigne d'une ingestion concomitante de paracétamol. La mise en évidence dans le sang de morphine à une concentration supérieure à 0,1 mg/L et surtout de normorphine à plus de 10 mg/L signifie une consommation très importante d'un produit contenant un opiacé avec une prise en charge tardive. L'association paracétamol-opiacé se voit dans la Lamaline® et l'association paracétamol-tramadol se voit dans Ixprim® ou Zaldiar®.

Conclusion : Devant une hépatite aiguë, sans étiologie connue, il est très important de réaliser un screening toxicologique large même, et surtout, en cas de dosage négatif du paracétamol. La mise en évidence d'un principe actif pouvant être associé au paracétamol dans une spécialité pharmaceutique permet alors de confirmer le diagnostic d'hépatite toxique imputable à une prise de paracétamol.

Dépistages toxicologiques au Centre Hospitalier Lyon Sud : résultats de l'année 2004

S. COHEN, M. PRAT, L. SELMAN, M. VICTOR, C. BERNY

Laboratoire de Biochimie et de Toxicologie, Centre hospitalier Lyon Sud, Pierre-Bénite

Objectif : Le laboratoire réalise les dépistages toxicologiques des patients admis aux urgences ; il a paru intéressant d'établir le profil toxicologique des intoxications relevées en 2004.

Méthodes : 1/ Méthodes analytiques : elles sont constituées du Remedi® Biorad® (HPLC avec extraction en ligne et détection UV à réseau tournant), du Dimension® Xpand™ Dade Behring®, d'une CPG Perkin Elmer® ainsi que de techniques manuelles. 2/ Population analysée : intoxications volontaires du CHLS et du Centre Hospitalier Saint Joseph-Saint Luc, les bilans des comas, les accidents de la voie publique. Les bilans des essais thérapeutiques ainsi que la surveillance des patients suivis au Centre Méthadone sont exclus de cette étude.

Résultats : Au CHLS, les dépistages toxicologiques sont réalisés 24h/24. Au cours de l'année 2004, nous avons réalisé 812 dépistages toxicologiques sanguins sur Remedi®, 5055 analyses sur le Dimension® Xpand™, 2910 dosages d'alcool et 194 dosages de méprobamate. Les 1149 molécules mises en évidence (sans prise en compte des alcoolémies positives) se répartissent de la façon suivante :

Benzodiazépines (nordiazépam, bromazépam...)	24 %	Antalgiques	6.4 %
Sédatifs (hydroxyzine, zolpidem...)	8.7 %	Bêta bloquants	3 %
Antidépresseurs tricycliques	4.9 %	Cardiotropes (autres)	2.2 %
Antidépresseurs IRS	12.1 %	Anticonvulsivants divers	4.8 %
Neuroleptiques phénothiazines	9.4 %	Stupéfiants	3.8 %
Autres neuroleptiques	5.5 %	Divers	15.2 %

Dans 53 % des cas, on met en évidence des associations médicamenteuses. Dans 32 % des cas, il s'agit de la prise concomitante de deux médicaments, dans 14 % de trois médicaments et dans 7 % de quatre ou plus...

Conclusion : la comparaison avec les études antérieures, montre surtout une diversification des médicaments dans les intoxications, impliquant la nécessité d'avoir recours à des méthodes séparatives à large panel qui sont un complément indispensable aux méthodes traditionnelles immunologiques, enzymatiques et chimiques utilisées pour les bilans d'urgence.

Convulsions et complications cardiaques après intoxication polymédicamenteuse

A. TURCANT⁽¹⁾, P. HARRY⁽²⁾, A. LE BOUIL⁽¹⁾, L. GAMELIN⁽²⁾, A. BORDESSOULE⁽³⁾, M. PIERROT⁽³⁾, B. DIQUET⁽¹⁾.

(1) Service Pharmacologie-Toxicologie ;

(2) Centre Antipoison ;

(3) Réanimation Médicale, CHU, Angers.

Observation : Une femme de 35 ans, 166 cm et 129 kg, est admise à l'hôpital pour des troubles de la conscience et 3 crises convulsives suite à une suspicion d'intoxication par au moins 6 médicaments. Elle vomit pendant le transfert et à l'admission (H1) la patiente présente un Glasgow Score à 5, une absence de respiration spontanée, une hémodynamique stable, un bilan biologique normal et un ECG perturbé avec une fréquence cardiaque à 110/min et des complexes QRS à 114 ms. Une intubation et une ventilation sont réalisées ainsi qu'une sédation par du midazolam. Elle est transférée en réanimation à H6 et présente à H8 une hypotension sévère à 40mmHg de maxima et une bradycardie à 50/min associée à un bloc auriculo-ventriculaire du 1^{er} degré (PR à 450 ms). Elle est traitée par soluté de remplissage et noradrénaline ce qui permet une amélioration de la conduction et une reprise de la diurèse. La patiente est maintenue 34 jours en réanimation en raison d'une pneumopathie d'inhalation et de difficultés de sevrage de la ventilation artificielle ayant nécessité une trachéotomie.

Matériel et méthodes : 13 prélèvements sanguins sont effectués sur une période de 9 jours. L'analyse toxicologique est effectuée par CLHP couplée à la spectrophotométrie UV à barrette de diodes après extraction de 500µL de plasma en milieu alcalin par le dichlorométhane (colonne Hypersil BDS 120x2,1 mm). La quantification du tramadol et de l'hydroxyzine est effectuée sur le même appareil après extraction alcaline de 500µL de plasma par le mélange hexane-alcool isoamylique et réextraction acide par HCl 0,02N. L'analyse de la codéine est effectuée par CLHP-SM/SM.

Résultats : Le 1^{er} plasma montre la présence de 11 molécules : codéine, fenspiride, hydroxyzine, nimésu-

lide, paracétamol (24 mg/L), piroxicam, rofécoxib, tétrazépam, tramadol et 2 associées aux premiers soins (thiopental et midazolam). On note l'absence d'alcool. Les résultats pour les molécules dont la quantification a été réalisée sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

Produit mg/L	H1	H11	H21	h26	h32	h39	h45	h58	h69	h81
tramadol	13	24	9	8,8	9	8	7	4,8	3,3	0,7
hydroxyzine	5	4	4	4,5	4,2	3,7	2,6	2,4	2,3	1,3
tétrazépam	1,3	1,1	2,1	2,4	-	1,9	2,2	2,3	2,4	1,7
fenspiride	0,7	2,7	1,2	1,1	1,1	1	0,8	0,4	0,25	-
codéine	0,63	1,44	0,33	0,24	0,25	0,19	0,19	0,13	-	-

Discussion : Les analyses ont montré la présence de concentration de tramadol potentiellement létales en l'absence de soins. La dépression respiratoire et les convulsions sont imputables à cette molécule mais le rôle de la codéine ne peut être négligé. Les troubles hémodynamiques et les troubles conductifs peuvent être imputés au tramadol, car ils ne sont pas décrits dans les surdosages en hydroxyzine. Cette dernière, présente en concentrations importantes, a pu renforcer la sédation et favoriser les convulsions. Dans notre expérience, pour des concentrations en fenspiride comprises entre 2 et 5 mg/L, seule une tachycardie sinusale modérée est observée. La persistance des concentrations élevées de ces différentes molécules pendant 3 jours est le témoin d'un stockage digestif important. La prise en charge en réanimation a permis par un traitement symptomatique une évolution lente mais favorable.

Mise au point d'une technique de dosage de la zopiclone en LC-MS. Étude de sa stabilité dans les milieux biologiques

N. JOURDIL, H. EYSSERIC, F. VINCENT

UF Pharmacologie-Département de Biologie et Pathologie de la Cellule, CHU, Grenoble

Objectifs : La zopiclone est une cyclopyrrolone d'activité hypnotique souvent incriminée dans des cas de surdosage médicamenteux ou de soumission chimique. Sa dégradation en 2-amino-5-chloropyridine décrite dans les urines par ouverture du cycle pyrrolidone [1] ainsi que sa grande instabilité dans le sang d'autopsie [2] nous ont conduit à poursuivre l'étude de la stabilité à des concentrations plus faibles (10 et 20 ng/mL) à l'occasion du développement d'une méthode en LC-MS.

Matériels et méthodes : L'extraction est réalisée sur 1 mL de plasma ou urine en présence de 100 ng de standard interne (SI) (méthylclonazépam) par 4 mL d'un mélange hexane/dichlorométhane (4/3, v/v) en présence de 2 mL de tampon carbonate pH 9,2. La séparation chromatographique LC est réalisée sur colonne Nucléodur Gravity® C18 5 µm, 2 x 125 mm, thermostatée à +30°C. La phase mobile se compose d'un mélange de phase A (eau + acide formique 0.1%)

et B (acétonitrile + acide formique 0.1%) délivré selon un gradient : A T_{0min} 75%, A T_{1min} 45%, A T_{19.8min} 65%, A T_{23.9min} 75% (débit 200 µL/min). La détection est réalisée par un spectromètre de masse API 150 EX (Sciex®). La source d'ionisation est de type electrospray, utilisée en mode positif et pulsé. La quantification est réalisée en mode fragmentométrique. Les ions de quantification et de *qualification* sont : zopiclone 389,1 (345,1), zopiclone-N-oxyde 405,1 (245,0), N-desméthyl-zopiclone 375,1 (331,1), 2-amino-5-chloropyridine 129,5, méthylclonazépam 330,0 (284,0). La stabilité est étudiée par surcharge à 10 et 20 ng/mL d'échantillons de plasma, sang total et urine provenant de toxicologie clinique ou médico-légale, conservés pendant 3 à 60 jours à -20°C, +4°C et +20°C.

Résultats : 1/ Paramètres de validation de la méthode (urine et plasma) : La méthode décrite est linéaire entre 1 et 50 ng/mL ($y = 0.163 (+/-0.016)x + 0.001 (+/-0.001)$). La répétabilité étudiée à 2,5 ; 10 et 20 ng/mL est comprise entre 2,3 et 4,5 %, la reproductibilité à 2,5 ; 10 et 20 ng/mL est comprise entre 2,0 et 9,7%. Le rendement d'extraction moyen réalisé aux mêmes concentrations est de 60%. La limite de quantification est de 1 ng/ml, la limite de détection est de 0,75ng/mL. 2/ Tests de stabilité de la zopiclone après surcharge dans les milieux biologiques : la zopiclone se conserve bien dans les urines pendant 3 jours à +20°C, 8 jours à +4°C et 60 jours à -20°C. Par contre, les résultats divergent pour le sang selon son origine (sang frais ou sang d'autopsie). En Toxicologie Clinique, le plasma doit être conservé à -20°C le plus rapidement possible. On constate en effet une perte de 36,2 % en 8 jours à +4°C, et de 97,3 % en 3 jours à +20°C. En toxicologie médico-légale, la conservation de la zopiclone ne peut être correctement appréciée dans les sangs et plasmas d'autopsie conservés 8 jours à +4°C ou 3 jours à +20°C, l'intensité du SI (ajouté extemporanément au moment de l'extraction) étant abaissée de façon significative pour ces 2 types d'échantillons. Le phénomène est en cours d'investigation.

Références :

1. Mannaert E. et coll. Detection of 2-amino-5-chloropyridine in urine as a parameter of zopiclone (Imovane) intake using HPLC with diode array detection. J. Anal. Toxicol. 1997 ; 21 (3) : 208-12.
2. Pépin G. et coll. Etude de la dégradation post-mortem de 20 benzodiazépines, 9 métabolites, de la buspirone, du zolpidem et de la zopiclone dans le sang total par -20°C, 4°C, 25°C, 40°C pendant 6 mois. Toxicorama, 1998 ; X (3) : 153-63.

Recherche et dosage de 8 sulfamides hypoglycémiantes dans le plasma humain par CLHP-ESI-SM/SM à trappe d'ions : validation et application à la recherche des hypoglycémies factices

G. HOIZEY, S. HAVET, T. TRENQUE, L. BINET, H. MILLART, D. LAMIABLE

Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie, CHU, Reims

Objectif : Les hypoglycémies factices, observées après la prise clandestine d'agents hypoglycémiantes, sont une des manifestations du syndrome de Münchhausen. Elles sont souvent la conséquence de l'administration volontaire de sulfamides hypoglycémiantes ou d'insuline. C'est ainsi que devant un tableau clinique d'hypoglycémie inexplicée, il est essentiel de rechercher la possibilité d'une intoxication par les sulfamides hypoglycémiantes. A ce jour, le diagnostic définitif ne peut souvent se faire que par l'identification de ces molécules dans les liquides biologiques, sang et/ou urine le plus souvent. Nous proposons une méthode par CLHP-SM/SM à trappe d'ions permettant d'identifier et de quantifier 8 sulfamides hypoglycémiantes (glibenclamide, glibornuride, glicazide, glimepiride, glipizide, tolbutamide, carbutamide, chlorpropamide) dans le plasma humain.

Matériel et méthodes : La technique présentée comporte au préalable une simple extraction liquide-liquide en milieu acide de l'échantillon plasmatique (500 µL) par l'éther, après ajout de l'étalon interne (glisoxepide). Après agitation du mélange, centrifugation, et évaporation du solvant organique, l'extrait sec est repris par la phase mobile (acétonitrile/acide formique 0,1%, 50/50 v/v) et injecté dans le système chromatographique. Ce dernier comporte une CLHP couplée à un détecteur SM/SM à trappe d'ions. Après séparation chromatographique isocratique (colonne Hypurity® C18, 5µm, 150x2,1mm d.i.) et ionisation en mode électrospray (ESI) positif ou négatif, l'identification de la ou des molécule(s) incriminée(s) est réalisée par comparaison des spectres obtenus en mode full scan SM/SM avec les spectres de référence enregistrés dans une bibliothèque spectrale initialement établie. La quantification est effectuée au moyen de gammes étalons préparées dans les mêmes conditions. L'effet de suppression d'ions a également été recherché.

Résultats : L'ensemble de ces substances sont chromatographiées en moins de 8 minutes. Le tableau ci-dessous rassemble les principaux paramètres de validation de la méthode (seuls les résultats obtenus à la limite de quantification sont présentés).

Molécule	LdD µg/L	LdQ µg/L	Linéarité µg/L	CV Intra-jour	% CV Inter-jour	Biais Intra-jour	% Biais Inter-jour	Rendement d'extraction
Carbutamide	1,98	31,2	→ 2000	15,9	9,6	-18,5	-12,6	37%
Chlorpropamide	1,98	31,2	→ 2000	6,8	8,8	18,2	16,6	36%
Glibenclamide	0,24	3,91	→ 250	17,8	9,8	-4,9	-3,5	87%
Glibornuride	1,95	7,81	→ 500	12,0	9,4	-17,0	-8,2	81%
Glicazide	0,49	7,81	→ 500	7,4	6,9	4,3	2,2	78%
Glimepiride	0,98	15,6	→ 1000	12,3	9,8	-1,8	9,9	86%
Glipizide	1,95	7,81	→ 500	7,4	9,9	-15,2	-5,7	68%
Tolbutamide	4,90	78,1	→ 5000	8,6	17,2	-18,7	-7,1	21%

LdD = limite de détection, LdQ = Limite de quantification, CV → n = 10, Biais → n = 20

Conclusion : Cette méthode rapide et spécifique est bien adaptée à l'identification et la quantification dans le plasma, des sulfamides hypoglycémisants dans un contexte d'hypoglycémie factice chez des patients atteints du syndrome de Münchhausen. A titre d'illustration, entre 2003 et 2004, notre laboratoire a pratiqué ces recherches chez 134 patients présentant des hypoglycémies inexplicables, pour le compte de 33 services cliniques répartis sur le territoire national. Sur l'ensemble des patients, nous avons identifié la présence d'au moins un sulfamide hypoglycémiant dans 9 cas.

Intoxication médicamenteuse à la colchicine : intérêt du dosage par CLHP-SM/SM

A.S. LEMAIRE-HURTEL⁽¹⁾, C. MAUGARD⁽¹⁾, J.C. ALVAREZ⁽²⁾, M. ANDREJAK⁽¹⁾, L. HARY⁽¹⁾

(1) Laboratoire de Pharmacologie, Groupe Hospitalier Sud, Amiens ;

(2) Pharmacologie-Toxicologie, CHU Poincaré, AP-HP, Garches

Objectifs : La colchicine est un alcaloïde extrait de *Colchicum autumnale* indiqué dans le traitement de l'accès aigu de goutte mais également en prophylaxie de ces accès. Les intoxications sont rares mais potentiellement graves. Elles sont marquées dans les premières heures par des troubles digestifs (douleurs abdominales, vomissements, diarrhées), induisant parfois une hypovolémie, puis dans les jours suivants par une profonde leucopénie, une arythmie cardiaque, une insuffisance rénale aiguë, un collapsus cardiovasculaire avec détresse respiratoire pouvant mettre en jeu le pronostic vital. Un rebond hématologique (hyperleucocytose) et une alopécie peuvent survenir environ une semaine après l'intoxication. Nous décrivons le cas d'une patiente de 70 ans qui a présenté, après 10 jours de traitement par Colchimax®, des vomissements et une diarrhée profuse nécessitant son hospitalisation. Quatre heures après son admission, elle a présenté une acidose métabolique, une insuffisance rénale aiguë et fait un arrêt cardio-respiratoire nécessitant une réanimation. Dans les jours suivants, une leucopénie est survenue.

Méthodes : Le dosage sanguin de la colchicine à partir d'un échantillon sanguin collecté 24 heures après l'admission aux urgences (soit au moins 36 heures après la dernière prise) a été réalisé dans un premier

temps par CLHP-BD (WatersTM, Alliance) après extraction solide/liquide. Devant une limite de détection insuffisante (identification spectrale impossible à moins de 5 ng/mL pour un échantillon de 1 mL [1]), ce dosage a été effectué par CLHP-SM/SM. La colchicine a été extraite par technique liquide/liquide par le dichlorométhane à pH 8. La colchicine deutérée n'étant pas disponible sur le marché, l'embutramide, molécule jamais présente chez les patients, extraite comme la colchicine et bien séparée de celle-ci a servi d'étalon interne. La séparation chromatographique a été faite sur colonne C18 HighpurityTM (Thermohypersil) (150 x 2,1 mm), la phase mobile étant composée de tampon 2mM NH₄COOH pH 3,8/acétonitrile (50 : 50, v/v) et le débit de 200 µL/min. L'acquisition a été faite en mode SRM en étudiant les transitions m/z 400,1 → 358,1 pour la colchicine et 294,1 → 207,9 pour l'embutramide.

Résultats : L'analyse de l'échantillon par CLHP-BD n'a pas mis en évidence de colchicine malgré un tableau clinique typique d'intoxication. L'analyse a posteriori du même échantillon par CLHP-SM/SM a permis de retrouver un taux sérique de 4,55 ng/mL malgré un prélèvement tardif ; les concentrations sanguines sont habituellement comprises entre 0,3 et 2,4 ng/mL après une prise quotidienne de 1 mg [2]. Par cette nouvelle technique, les temps de rétention sont respectivement de 2,4 et 4,25 min pour la colchicine et l'embutramide. La validation de la méthode a montré une bonne linéarité (r > 0,997) pour des concentrations comprises entre 0,5 et 50 ng/mL. Les limites de détection et de quantification sont respectivement de 0,05 ng/mL et de 0,5 ng/mL.

Conclusion : L'exemple de ce cas clinique démontre les limites d'un dosage par technique CLHP-BD, les limites de détection étant parfois supérieures aux taux thérapeutiques. Nous avons pu toutefois confirmer à posteriori ce surdosage en colchicine par une technique CLHP-SM/SM, corrélant ainsi le tableau clinique avec un taux sérique élevé malgré un prélèvement tardif.

Références :

1. Deveaux M. et coll. ; Colchicine poisoning : case report of two suicides. *Forensic Sci. Int.* 2004 ; 219-22.
2. Halkin H. et coll. ; Colchicine kinetics in patients with familial Mediterranean fever. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1980 ; 28 : 82.

Dosage en urgence de l'éthylène glycol par CLHP/UV/BD après dérivation par le chlorure de benzoyle. Application à un cas d'intoxication mortelle

E. HUTASSE⁽¹⁾, L. JONARD⁽¹⁾, S. CAVORET⁽¹⁾, M.C. BERTHELIER⁽¹⁾, F. PARANT⁽¹⁾, J.B. COGNET⁽²⁾, M. MOULSMA⁽¹⁾

(1) Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie-Élé-

ments Trace (UF 21.303), Fédération de Biochimie, Hôpital Herriot, Lyon ;

(2) Réanimation, Centre Hospitalier Dr. Récamier, Belley

Objectif : Après l'arrêt de la commercialisation de la glycérol déshydrogénase (Roche®) utilisée pour le dosage enzymatique de l'éthylène glycol en urgence [1], nous avons opté pour une technique séparative par CLHP-UV-BD adaptée de Vollmer et coll. après benzoyle de l'éthylène glycol par la réaction de Schotten-Baumann [2].

Méthode : Un ml de sérum (patient ou calibrant) dilué au 1/5 additionné de l'EI (1,3-propanediol) est alcalinisé (NaOH 8M). La dérivation est effectuée avec du chlorure de benzoyle. Les dérivés benzoylés sont ensuite extraits par du pentane. Le résidu est repris par du méthanol et 10 µL sont injectés. La séparation chromatographique est réalisée selon une technique en gradient sur une colonne Atlantis®, C18, 3µm (150 mm x 2,1 mm d.i.), Waters®. La phase mobile est composée d'un tampon phosphate 100 mM, pH 6 et d'acétonitrile sous un débit de 0,4 mL/min. La détection est réalisée grâce à un détecteur UV-BD d'un ensemble Agilent®11000.

Résultats : La technique s'est montrée précise (CV% répétabilité : 2,7 ; CV% reproductibilité : 9,6 pour une concentration moyenne de 8 mmol/L, n = 10). La LdD a été estimée à 0,18 mmol/L et la LdQ à 0,65 mmol/L. La linéarité est vérifiée au moins jusqu'à 10 mmol/L. La technique a montré une bonne spécificité notamment vis à vis du 1,2-propanediol.

Application à un cas d'intoxication : Mme P. est une patiente de 59 ans, aux antécédents de diabète insulino-dépendant et d'éthylisme chronique. Elle a été admise en réanimation, en raison d'un coma Glasgow 6 associé à une acidose lactique majeure, une hypothermie à 30,5°C et une hyperkaliémie à 6,2. Une acidose lactique par surdosage en metformine a été écartée après dosage de la metformine plasmatique à 0,45 mg/L (N : 0,16 à 1 mg/L) et érythrocytaire à 1,05 mg/L (N : 0,01 à 1,60 mg/L). L'éthylène glycolémie a été retrouvée à 3,3 mmol/L soit 205 mg/L (CLHP-UV-BD) et 3,1 mmol/L (enzymatique). Le dosage de l'oxalémie réalisée secondairement a donné une concentration de 93,2 µmol/L (N < 5 µmol/L).

Conclusion : La technique de dosage de l'éthylène glycol par CLHP-UV-BD permet l'identification et la quantification en urgence de ce glycol et d'autres glycols (diéthylène glycol). Elle constitue donc un outil alternatif aux techniques enzymatiques, puissant et résolutif.

Références :

1. Mahly M. et coll. Automated Cobas Mira kinetic enzymatic assay for ethylene glycol applied to emergency situations. *J. Anal. Toxicol.* 199 ; 18 : 269-71.
2. Vollmer P.A. Serum ethylene glycol by HPLC. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 1996 ; 685: 370-4.

A propos d'un cas d'intoxication par le mévinphos (Phosdrin®)

A. FERRAND⁽¹⁾, S. COHEN⁽¹⁾, F. PARANT⁽²⁾, M. MOULSMA⁽²⁾, P.L. CARRON⁽³⁾, M.MANCHON⁽¹⁾

(1) Biochimie et Toxicologie, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite ;

(2) Pharmacologie-Toxicologie-Éléments Trace (UF 21.303), Hôpital Herriot, Lyon ;

(3) Réanimation médicale, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite

Objectif : Les insecticides organo-phosphorés rassemblent un grand nombre de molécules, plus de 70 différentes. Ils sont responsables d'intoxications rares en France mais graves et nécessitant une prise en charge rapide avec traitement par pralidoxime (Contrathion®) et atropine. Nous rapportons le cas d'une intoxication volontaire par ingestion d'une bouteille de 50 ml de mévinphos (Phosdrin®).

Matériels et méthodes : Monsieur R, 43 ans, sans antécédents psychiatriques, est adressé en réanimation inconscient (Glasgow à 3), en myosis serré bilatéral, hypothermie, hypotension et avec hypersialorrhée. Il aurait ingéré une bouteille de Phosdrin®. Le bilan biologique montre une hyperglycémie (18,3 mmol/L) et hypocalcémie (2,18 mmol/L). Le patient est, dès sa prise en charge, intubé, ventilé et sédaté (Hypnovel®) ; un lavage gastrique est réalisé. L'antidote, pralidoxime-atropine, est immédiatement administrée. Un screening toxicologique est réalisé sur Remedi®

Résultats : L'analyse chromatographique sérique révèle la présence de mévinphos à la concentration de 6 mg/L. L'intoxication aux organo-phosphorés est également confirmée par la diminution de l'activité des pseudocholinestérasas plasmatiques (1,5 UI/mL, normales 7 à 19 UI/mL) et des cholinestérasas globulaires (38 %, normales 75 à 125 %). A noter que les mesures des activités cholinestérasiques globulaires sont réalisées après injection de Contrathion®. L'évolution lente est compliquée par une pneumopathie d'inhalation (CRP : 382 mg/L). Les sécrétions bronchiques abondantes et épaisses persistent plusieurs jours. L'atropine devra être maintenue en injection continue durant 3 jours jusqu'à l'obtention de la mydriase. A son réveil, le patient est très agité mais ne présente pas de signe neurologique déficitaire.

Discussion et conclusion : Ce cas dont les signes cliniques sont évocateurs d'une intoxication grave aux organo-phosphorés montre la nécessité d'une prise en charge rapide pour une évolution favorable. La base de données du Remedi®renfermant environ 27 molécules appartenant à cette classe d'insecticides est parfaitement adapté au diagnostic d'une telle intoxication en complément du dosage des cholinestérasas.

Le profilage de la cocaïne comme outil de rapprochement entre saisies. Présentation d'un projet transfrontalier entre la France et la Suisse

L. DUJOURDY⁽¹⁾, F. BESACIER⁽¹⁾, S. LOCICIRO⁽²⁾, P. HAYOZ⁽²⁾, P. ESSEIVA⁽²⁾, P. MARGOT⁽²⁾, J. GUITTON⁽³⁾

(1) Laboratoire de police scientifique, Ecully ;

(2) Institut de police scientifique, Lausanne ;

(3) Institut des sciences pharmaceutiques et biologiques, Faculté de pharmacie, Lyon

Objectif : Le but de ce projet est de développer une méthode statistique et analytique harmonisée entre deux laboratoires en Suisse et en France (Institut de Police Scientifique de Lausanne) et Laboratoire de Police Scientifique de Lyon) afin de réaliser des rapprochements entre des échantillons de cocaïne saisis à la frontière et dans les deux pays. Ce projet est soutenu financièrement par un programme européen, Interreg IIIA, qui promeut la co-opération transfrontalière.

Méthodes : Les échantillons de cocaïne contiennent de nombreux alcaloïdes, dont l'origine est naturelle, mais qui par la suite sont transformés partiellement lors des processus d'extraction et de purification. Plusieurs alcaloïdes cibles, représentant la signature de l'échantillon de cocaïne sont dérivés avec du MSTFA et ensuite injectés dans un GC-FID. Les profils chromatographiques obtenus sont comparés afin de déterminer des liens entre les saisies effectuées dans les deux zones concernées.

Résultats : Les liens chimiques entre les échantillons de cocaïne sont stockés et gérés dans une base de données commune (CASTEL) accessible sur Internet. Des protocoles de protection de données assurent la sécurité et la confidentialité des échanges entre les deux laboratoires. La mise à jour de la base est réalisée en temps réel. Le défi est ensuite de confronter les liens chimiques avec les informations traditionnelles de police pour interpréter et valider leur valeur.

Conclusion : Les résultats attendus de ce projet sont : faire connaître aux services de police les outils de comparaison utilisés dans les laboratoires pour leur faire intégrer ces informations dans leurs enquêtes ; promouvoir les échanges entre services de lutte antidrogue des deux pays ; aider à identifier les réseaux de distribution entre la Suisse et la France avec des conséquences prévisibles sur la santé publique ; fournir des informations aux professionnels de santé sur la qualité et la toxicité des produits.

Dosage de péthidine et de norpéthidine dans les cheveux par HPLC-MS/MS

C. JAMEY, A. TRACQUI, J.S. RAUL, B. LUDES

Institut de Médecine Légale, Strasbourg

Objectif : Dans le cadre d'une expertise judiciaire, démontrer une consommation chronique de péthidine chez un jeune homme par analyse de cheveux en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS).

Méthodes : Les cheveux sont décontaminés, divisés en segments d'environ 3 cm de longueur puis pulvérisés au broyeur à boulet. 50 mg de poudre sont incubés 18 heures à 56° C en milieu acide, en présence de 25 ng de péthidine-d4 et de norpéthidine-d4 utilisées comme étalon interne. Une triple extraction liquide/liquide à pH 9,5 est ensuite réalisée. L'extrait sec est repris par le méthanol puis injecté dans un système HPLC Alliance™ (Waters) couplé à un spectromètre de masse Quattro Micro™ (Waters). L'élution est réalisée sur une colonne XTerra C18, 3,5 µm (Waters), 100 x 2,1 mm, i.d., avec un gradient acétonitrile/tampon HCOOH 2 mM ajusté à pH 9,5. L'acquisition se fait en mode MRM en sélectionnant les transitions suivantes : péthidine 248,3>174,2 et 248,3>220,3 (RT 12,1 min) ; norpéthidine 234,3>160,2 et 234,3>55,9 (RT 9,2 min) ; péthidine-d4 252,4>178,3 ; norpéthidine-d4 238,3>164,2.

Résultats : La validation de la méthode a été établie à l'aide des paramètres suivants :

	Linéarité	LOQ (pg/mg)	LOD (pg/mg)	CV (n = 6)
Péthidine	2-5000 pg/mg (r ² > 0.999)	2	1	4,5 % (50 pg/mg) 2,7 % (500 pg/mg)
Norpéthidine	5-5000 pg/mg (r ² > 0.999)	5	2	5,7 % (50 pg/mg) 4,8 % (500 pg/mg)

Les rendements d'extraction de la péthidine sont de 72 % (50 pg/mg) et 78,8 % (500 pg/mg) et ceux de la norpéthidine de 81,4 % (50 pg/mg) et 86 % (500 pg/mg). L'effet matrice est négligeable (< 3 %). L'exactitude est comprise entre 98,9 % et 112,1% pour la péthidine et entre 88,2 % et 99,6 % pour la norpéthidine. L'analyse segmentaire des cheveux expertisés a donné les résultats suivants (en ng/mg) :

	0-3 cm	3-6 cm	6-9 cm	9-12 cm
Péthidine	2,32	0,91	0,99	0,85
Norpéthidine	3,25	1,69	0,33	0,29

Conclusion : L'analyse des cheveux par HPLC-MS/MS a permis la mise en évidence d'une consommation régulière de péthidine au cours des mois écoulés, suggérant notamment une augmentation de la prise sur le segment le plus récent. De par sa sensibilité et sa spécificité, cette méthode analytique apparaît également appropriée à la détection d'une consommation occasionnelle de péthidine.

Applications du couplage UPLC™-MS/MS en toxicologie médico-légale : résultats préliminaires

A. TRACQUI, E. SZWARC, C. JAMEY, J.S. RAUL, B. LUDES

Institut de Médecine Légale, Strasbourg

Objectif : Présenter les performances analytiques du couplage chromatographie liquide ultra haute perfor-

mance/spectrométrie de masse en tandem (UPLCTM-MS/MS), à l'aide d'une étude préliminaire portant sur trois groupes d'analytes courants : cannabinoïdes (THC, 11-OH-THC, THC-COOH), morphiniques (morphine (MOR), codéine (COD), 6-MAM), buprénorphine (BUP) et norbuprénorphine (nBUP).

Méthodes : 1°) *Matériel.* Les analyses sont réalisées sur système Acquity (Waters) UPLCTM, à partir de standards méthanoliques des analytes, puis testées sur des extraits (extractions simples liquide/liquide) de sang et/ou d'urines provenant d'expertises toxicologiques confiées à l'IML. 2°) *Chromatographie.* Colonne : Acquity C18, 1,7 µm (Waters), 100 x 2,1 mm, i.d. ; phase mobile : acétonitrile (pour cannabinoïdes, BUP et nBUP) ou méthanol (pour morphiniques) + HCOOH 0,1%/HCOOH 0,1% ; gradient : organique 35-85% en 2 min à 0,7 ml/min (cannabinoïdes), 0-80% en 2,5 min à 0,6 ml/min (morphiniques), 20-95% en 2,5 min à 0,6 ml/min (BUP, nBUP) ; volume injecté : 10 µl ; durées d'analyse : 4 ou 5 min, rééquilibrage compris. 3°) *Détection.* Spectromètre MS/MS Quattro PremierTM (Waters) en mode électrospray positif, voltage capillaire 3,2 kV, analyse en mode MRM selon les tensions de cône (V)/énergies de collision (eV)/transitions suivantes : TCH 30/23/315,4>193,2 ; 11-OH-THC 30/14/331,4>313,4 ; THC-COOH 35/20/345,4>299,4 ; MOR 45/36/286,4>165,1 ; COD 45/40/300,4>165,1 ; 6-MAM 45/38/328,4>165,1 ; BUP 55/48/468,4>55,2 ; nBUP 55/38/ 414,4>101,1.

Résultats : Selon ces conditions les analytes testés sont tous élués en moins de 3 min (RT moyens (min) : THC 2,64 ; 11-OH-THC 2,00 ; THC-COOH 2,02 ; MOR 1,03 ; COD 1,30 ; 6-MAM 1,41 ; BUP 1,24 ; nBUP 0,99). Les méthodes développées ont été partiellement validées sur les standards méthanoliques : la linéarité a été testée sur 5 points entre 0,2 (morphiniques, cannabinoïdes) ou 0,1 (BUP, nBUP) et 100 ng/ml, avec r^2 toujours > 0,9977 pour les 8 analytes. Les limites de quantification sont de 0,2 (morphiniques, cannabinoïdes) et 0,1 (BUP, nBUP) ng/ml. La variabilité intra- et inter-séries n'a pas été testée dans cette étude préliminaire. Sur un plan qualitatif, tous les analytes déjà identifiés lors des expertises d'échantillons sanguins et urinaires ont pu être retrouvés dans les mêmes échantillons à l'aide du couplage UPLCTM-MS/MS, avec de plus caractérisation de la 6-MAM dans 2 des 3 échantillons sanguins provenant d'overdoses à l'héroïne (non détectée en GC-MS).

Conclusion : La chromatographie liquide ultra haute performance se caractérise par l'emploi de phases stationnaires à très faible granulométrie (< 2 µm), nécessitant un système LC dédié aux très hautes pressions (1-1,5.10⁴ psi) avec une réduction drastique des espaces morts garantissant l'obtention de pics chromatographiques de très faible largeur (< 5 s). Cette avancée technologique permet une augmentation nette du pou-

voir de séparation (résolution > 2.10⁵ plateaux théoriques/m) ainsi qu'un élargissement de la gamme optimale de débits d'éluant. Couplée à un détecteur MS/MS et testée sur des analytes courants en toxicologie médico-légale, cette technique démontre une réduction importante des temps d'analyse (d'un facteur 5 par rapport à l'HPLC conventionnelle), un gain en résolution des pics chromatographiques, une amélioration de la sensibilité et une excellente linéarité. Ces performances analytiques apparaissent très prometteuses au regard des problématiques multiples d'un laboratoire de toxicologie médico-légale.

Utilité du dépistage urinaire de drogues au bord de la route chez les conducteurs suspectés de conduite sous l'influence des drogues en Belgique

E. RAES, A.G. VERSTRAETE

Laboratoire de biologie clinique-toxicologie, Hôpital Universitaire, Gand, Belgique ; Département de biologie clinique, de microbiologie et d'immunologie, Université de Gand, Gand, Belgique.

Introduction : Depuis 1999, la Belgique a une législation *per se* pour la conduite sous influence de drogues. La procédure débute avec l'observation de signes extérieurs de consommation récente de drogue par un officier de police, suivi d'un test au bord de la route pour les amphétamines, les cannabinoïdes, la cocaïne et les opiacés dans l'urine et le prélèvement de sang par un médecin pour l'analyse par CG-SM. Le conducteur est sanctionné si dans le plasma le THC est >2 ng/mL, la morphine est >20 ng/mL ou l'amphétamine, la MDMA, la MDEA, la MBDB, la cocaïne ou le benzoylecgonine sont >50 ng/mL.

Méthode : Nous avons analysé les résultats de 451 échantillons de sang pris de mai 2000 à février 2005. Le nombre d'échantillons analysés a augmenté de 26 entre mai 2000 et décembre 2002 à 141 en 2003, 234 en 2004 et 50 en janvier et février 2005.

Résultats : Le cannabis a été détecté le plus souvent (73,5%), suivi de la MDMA (20,6%), de l'amphétamine (19,9%), de la benzoylecgonine (17,9%), de la cocaïne (6,7%) et de la morphine (2,7%). La MDEA et le MBDB n'ont jamais été détectés au-dessus de la limite légale. Une classe de drogue a été trouvée dans 72,0% des cas, deux drogues dans 22,6%, trois drogues dans 5,2% et 4 drogues dans 0,25%. Dans 10,6% des échantillons de sang aucune drogue n'a été trouvée au-dessus de la limite légale. Quand la procédure a été suivie et que l'urine a été obtenue et testée sur place, ce pourcentage n'était que de 8,4% (31 cas sur 369) alors qu'il était de 21,2 % (14 cas sur 66) quand aucune urine n'a été obtenue. Cette différence était statistiquement significative ($X^2 = 8,26$, $P = 0,003$).

Dans 66,7% des échantillons où aucune drogue n'a été

trouvée au-dessus du seuil légal, elles étaient présentes à une concentration inférieure au seuil. Dans 75% de ces échantillons il s'agissait de THC, dans 6,4% d'amphétamine, dans 6,4% de benzoylecgonine et de morphine, dans 3,2% une des drogues ou combinaisons suivantes : amphétamine + THC, MDMA, benzoylecgonine ou morphine.

Conclusion : Ces données indiquent qu'un dépistage de drogues dans les urines au bord de la route diminue de manière significative le nombre d'analyses de sang inutiles.

Application de la GC-MS/MS à la technique de dosage des cannabinoïdes sanguins recommandée par la SFTA

J.P. GOULLÉ⁽¹⁾, L. PASCHAL⁽¹⁾, M. LESIEUR⁽²⁾, P. DANGER⁽¹⁾, C. LACROIX⁽¹⁾

(1) Groupe Hospitalier du Havre, 76083 Le Havre ;

(2) Varian S.A., 91941 Les Ulis.

Objectif : Le dosage des cannabinoïdes sanguins est classiquement réalisé par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) [1]. La limite de détection minimale imposée par la loi est de 1 ng/mL pour le THC. Celle-ci n'est pas toujours atteinte en raison d'effets de matrice qui sont parfois constatés. Aussi, nous avons adapté en GC-MS/MS la technique SFTA, après une extraction en phase liquide ou en phase solide.

Matériel et méthode : Les dosages sont effectués sur un GC-MS/MS triple quadripôle Varian (CP-3800 couplé au quadripôle 1200 MS/MS). Les cannabinoïdes du plasma et du sang total sont extraits par deux méthodes différentes : soit en phase liquide (LLE) soit en phase solide (SPE). Ces préparations sont comparées et font l'objet d'une validation à plusieurs niveaux de concentrations en cannabinoïdes. La principale modification de la technique SFTA porte sur la prise d'essai qui est réduite à 1 mL. L'extraction LLE est réalisée à l'aide d'un mélange hexane/acétate d'éthyle. La SPE utilise des colonnes de silice C18. Les extraits obtenus sont silylés avec du BSTFA (N, O-bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide) puis injectés dans le GC-MS/MS.

Résultats : Les performances sont les suivantes :

	LLE		SPE	
	Limite de Détection	Limite de Quantification	Limite de Détection	Limite de Quantification
THC	0,09	0,21	0,20	0,29
11OH-THC	0,03	0,06	0,11	0,19
THC-10OH	0,13	0,19	0,68	1,30

Les résultats sont exprimés en ng/mL.

Les équations des droites de régression reliant les concentrations mesurées aux concentrations obtenues sont satisfaisantes ($r^2 > 0,99$ pour la LLE et la SPE). Les mesures de THC et de 11-OH-THC sont répétables et reproductibles avec les deux modes d'extraction puisque les coefficients de variation (CV) sont inférieurs à 12 % (n=10), y compris pour la plus faible

concentration (1 ng/mL). En revanche, le THC-COOH montre des CV beaucoup plus importants compris entre 11 et 29 %, pour cette même concentration. La GC-MS/MS a été appliquée avec succès à des dosages médico-légaux. Dans un certain nombre de cas, elle montre une nette supériorité sur la GC-MS où des effets de matrice sont parfois observés, négativant le dosage du THC. Sur le sang total, la LLE, même si elle est d'exécution plus longue, constitue la méthode de choix. Pour le plasma, la SPE s'avère être une alternative très intéressante.

Conclusion : L'emploi de la GC-MS/MS permet, tout en réduisant la prise d'essai, d'améliorer de manière sensible les performances de la technique de dosage des cannabinoïdes sanguins recommandée par la SFTA.

Référence :

1. Kintz P. et coll. Identification et dosage des cannabinoïdes dans le sang total. Toxicorama, 1996, 2 : 29-33.

Conduite automobile : résultats stupéfiants

C. GANIERE-MONTEIL, M.F. KERGUERIS, A. PINEAU, P. JOLLIET

Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, Hôtel Dieu, CHU, Nantes

Objectif : Notre laboratoire réalise des dosages de produits stupéfiants dans le sang chez des conducteurs de véhicules, depuis octobre 2001 suite à la parution de l'arrêté du 5 septembre 2001 et maintenant dans le cadre de la loi n°2003-495 du 12 juin 2003 renforçant la lutte contre la violence routière. En 2003, 427 dosages ont été effectués et 588 en 2004. Nous nous sommes intéressés à deux cas ayant des résultats extrêmement élevés. Nous avons confronté ces chiffres avec les circonstances de l'accident et le comportement du sujet.

Méthodes : Les dosages de cannabinoïdes, cocaïnes, opiacés et amphétamines ont été réalisés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, après extraction liquide-liquide et dérivation [1,2].

Résultats : Ces deux dossiers datent de 2003 (A) et de 2004 (B). Le sujet A a consommé du cannabis (THC = 544 ng/mL, THC-COOH = 20 ng/mL), de la cocaïne (cocaïne = 175 ng/mL, benzoylecgonine = 2136 ng/mL, ecgonine méthylester = 862 ng/mL). Les analyses montrent aussi une concentration de morphine à 56 ng/mL et l'absence d'amphétamines. L'alcoolémie est à zéro. C'est un sujet de sexe masculin, âgé de 24 ans. Le prélèvement sanguin a été réalisé à la suite d'un accident de voiture, au cours duquel le sujet est décédé. Il était seul en cause et a perdu le contrôle de son véhicule. L'accident a eu lieu au milieu de la nuit (2 heures). Le sujet B est aussi de sexe masculin et a aussi

24 ans au moment des faits. Il est impliqué dans un accident corporel, accident qu'il a provoqué, blessant grièvement la conductrice venant en face de lui. L'accident a eu lieu en début de soirée (20 heures 10). Il avait consommé du cannabis (THC = 26,5 ng/mL, THC-COOH = 32,1 ng/mL, 11-OH-THC = 12,5 ng/mL), de la cocaïne (cocaïne = 80,4 ng/mL, benzoylecgonine = 936 ng/mL, ecgonine méthylester = 112 ng/mL). Les résultats montrent aussi une concentration de morphine à 351 ng/mL et de codéine à 38,8 ng/mL, avec l'absence d'amphétamines. Il n'y a pas d'alcool dans le sang. La fiche E, complétée par le médecin intervenu sur les lieux de l'accident, ne décèle aucune anomalie comportementale ou clinique particulière. La personne déclare être traitée par Skénan®.

Conclusion : Ces résultats montrent que des sujets qui consomment de grandes quantités de produits stupéfiants sont parfois retrouvés au volant de leur voiture. Ces cas sont, fort heureusement, assez rares (2 sur 1015). Nous n'avons jamais encore croisé de tels résultats pour le THC et la morphine, pour des sujets prenant le volant. Jusqu'à quelle limite les consommateurs de produits stupéfiants peuvent-ils aller, tout en conduisant leur voiture ?

Références :

1. Kintz P. et coll. Identification et dosage des cannabinoïdes dans le sang total. *Toxicorama*. 1996 ; 2 : 29-33.
2. Molinaro R. et coll. Analyse simultanée des principaux stupéfiants et métabolites dans le sang total. *Toxicorama*. 1997; IX(3) : 183-95.

Évaluation d'un test urinaire multiparamétrique dans l'étude de la prévalence de la consommation de produits modifiant la vigilance chez des transporteurs routiers à Douai (Nord)

L. LABAT⁽¹⁾, B. DEHON⁽¹⁾, M. LHERMITTE⁽¹⁾ et Groupe Régional « Toxicomanie et Travail »⁽²⁾

(1) Laboratoire de Toxicologie et Génopathies, CHRU, Lille ;

(2) Institut de Santé au Travail du Nord de la France, Lille

Objectif : Dans une précédente étude réalisée sur 1000 chauffeurs routiers dans la région Nord-Pas-de-Calais, un dépistage urinaire de substances modifiant la vigilance avait été décrit par des tests immunologiques (1). Un nouveau dépistage sur une partie de cette population de chauffeurs routiers, restreinte au centre de formation de Douai, a été réalisée, en évaluant un nouveau test urinaire multiparamétrique MultiScreen® (BMD, France).

Méthodes : Les prévalences élevées préalablement observées chez les salariés de ce secteur expliquent le choix de cette population ciblée pour l'évaluation de ce

nouveau test. 95 chauffeurs routiers du centre de Douai avaient été inclus. Sur les urines conservées à -20°C, des dépistages urinaires des métabolites de la cocaïne (seuil de détection = 300 ng/mL), de la D-amphétamine (1000), de la MDMA (500), des cannabinoïdes (50), de la méthadone (300), des opiacés (300), des barbituriques (300), des benzodiazépines (300), des antidépresseurs tricycliques (1000) et de la buprénorphine (10) sont effectués simultanément. Tous les résultats positifs discordants des résultats de la première étude sont confirmés par une technique de chromatographie couplée à la spectrométrie de masse.

Résultats : Les résultats (exprimés en pourcentage) sont résumés dans le tableau suivant :

	Cocaïne	Amphétamines	Cannabis	Méthadone	MDMA
Etude [1]	0	0	17,89	2,10	0
MultiScreen®	1,05	0	17,89	2,10	0
BMD					
	Opiacés	Barbituriques	Benzodiazépines	A. Tricycliques	Buprénorphine
Etude [1]	4,21	0	0	0	1,05
MultiScreen®	6,31	0	0	0	2,10
BMD					

Le test MultiScreen® BMD a permis de dépister une urine positive en cocaïne : la présence de benzoylecgonine a été confirmée en CG-SM. Deux résultats différents sont observés pour le cannabis : une nouvelle urine a été dépistée positive par MultiScreen®, alors qu'une autre urine n'a pas été dépistée alors qu'elle avait été notée positive par Triage® dans la précédente étude (malgré une valeur estimée inférieure au seuil de détection de 50 ng/mL). Deux résultats positifs en opiacés supplémentaires ont été mis en évidence. Une urine supplémentaire positive en buprénorphine est dépistée, ceci n'a pas pu être confirmé en raison d'une quantité insuffisante de prélèvement. Nous n'observons pas de différence pour les autres substances.

Conclusion : Comparé au test utilisé dans notre première étude, ce nouveau test multiparamétrique apparaît très performant pour les mêmes seuils de détection. De plus, il permet de dépister simultanément dans les urines d'autres substances modifiant la vigilance : MDMA et buprénorphine. Le seuil de positivité de la buprénorphine de 10 ng/mL semble adapté au dépistage dans la population étudiée. Ce test urinaire multiparamétrique est simple et pratique d'utilisation mais il reste cependant indispensable de confirmer en spectrométrie de masse tous les résultats dépistés positifs.

Référence :

1. Labat L. et coll. Prévalence de la consommation de produits modifiant la vigilance chez des transporteurs routiers dans la région Nord-Pas-de-Calais. *Ann. Toxicol. Anal.* 2004 ; 16 (4) : 269-74.

Détermination des pesticides organochlorés dans le lait maternel en Tunisie

S. ENNACEUR, M. R. DRISS

Laboratoire de Chimie Analytique et Environnement, Faculté des Sciences, Bizerte, Tunisie

Objectif : Les pesticides organochlorés (POC) sont des polluants ubiquitaires persistants et bioaccumulables. Les intoxications chroniques suites à l'exposition de l'Homme à des faibles doses sur une longue période inquiètent de plus en plus la communauté scientifique. De nombreuses enquêtes épidémiologiques [1] montrent que certains POC possèdent des propriétés estrogéniques tandis que d'autres montrent plutôt des effets anti-estrogéniques, ce qui rend possible leur implication dans différents problèmes de santé reliés à une perturbation de l'équilibre hormonal tant chez l'homme que chez la femme. L'objectif de la présente étude est de développer une méthode d'analyse rapide et fiable des traces de POC dans le lait maternel et à identifier les facteurs expliquant les variations des teneurs en ces composés dans la population.

Méthodes : Les pesticides sont extraits à partir d'un échantillon de 2 mL auquel sont ajoutés 5 mL d'acétonitrile et 1 mL d'éthanol. Après agitation vigoureuse, le mélange est extrait par 10 mL d'hexane (3 extractions successives). La purification des extraits organiques est ensuite réalisée par chromatographie d'adsorption sur colonne de Florisil. L'éluat recueilli est concentré par évaporation douce dans un Kuderna Danish jusqu'à un volume de 0,5 mL. Les pesticides sont séparés par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne capillaire avec une détection à capture d'électrons.

Résultats : les taux de récupération des composés recherchés varient de 87 à 97% avec des déviations standard relatives inférieures à 5%. Les limites de détection de la plupart des solutés examinés sont de l'ordre de 1 ng/g de matière grasse extraite (MGE).

Pour les 87 échantillons traités, l'hexachlorobenzène (HCB) et le p,p'-DDE ont été détectés respectivement à une concentration moyenne de 260 et 2421 ng/g MGE. Les teneurs moyennes du β -et γ -HCH sont respectivement égales à 50 et 8 ng/g MGE. Le DDT et ses métabolites sont mesurés dans nos échantillons à une concentration moyenne de 3863 ng/g MGE. En outre, nous avons enregistré une augmentation des taux des POC avec l'âge de la mère et une diminution de ces teneurs avec le nombre d'enfants.

Conclusion : Ce travail donne une appréciation préliminaire de la contamination du lait maternel en Tunisie par les POC. Les teneurs en POC observées sont dans la gamme des concentrations enregistrées dans les pays industrialisés comme le Suède, le Japon et les Etats Unis [2].

Références :

1. International Joint Commission. Septième rapport biennal sur la qualité de l'eau dans les Grands Lacs, 1994 ; ISBN 1-895085-75-6.
2. Slorach AS et coll. Assessment of human exposure to selected organochlorine compounds through biological monitoring. Global environmental monitoring system UNEP/WHO. Swedish national food administration, Uppsala, 1983 ; 1-77

Dosage du mercure salivaire et urinaire chez les porteurs d'amalgames

S. LALOUI, K. SOBHI, M. AZZOUCZ, B. ALAMIR, M. REGGABI

Laboratoire de Toxicologie ; Département de Pharmacie, Faculté de Médecine, Alger

Objectifs : Le relargage du mercure par l'amalgame dentaire constitue une source d'exposition particulière au mercure des porteurs. L'objectif de notre étude consiste à évaluer les niveaux d'exposition au mercure chez les porteurs d'amalgames à travers le dosage du mercure dans la salive et les urines.

Méthodes : L'étude est menée chez 51 porteurs d'amalgames, la moyenne d'âge est de 27 ans, le nombre d'amalgames moyen est de 2,7. Pour chaque sujet, une fiche de traçabilité est remplie où sont mentionnés, le nombre d'amalgames dentaires, l'âge, le sexe, la fonction et la région d'origine. La même étude est réalisée chez un groupe témoin (n= 14). Nous avons dosé le mercure dans la salive, après mastication et dans les urines du matin par spectroscopie d'absorption atomique à vapeur froide, l'appareil utilisé est un analyseur spécifique du mercure (Flow Inject Mercury System : FIMS 400),

Résultats : Les concentrations moyennes du mercure dans la salive et les urines des porteurs d'amalgames sont 25,9 $\mu\text{g/L}$ dans la salive, 20,2 $\mu\text{g/L}$ dans les urines. Ces valeurs nettement sont supérieures aux concentrations du groupe témoin qui sont respectivement dans la salive 16,9 $\mu\text{g/L}$ et dans les urines 14,5 $\mu\text{g/L}$.

Conclusion : Les résultats confirment l'influence des amalgames dentaires sur les concentrations du mercure salivaire et urinaire chez les porteurs d'amalgames

Diagnostic de l'intoxication aiguë par les insecticides organophosphorés par la détermination de l'activité cholinestérasique

A. TURCANT^(1*), B. DEHON^(2*), C. GANIERE-MONTEIL^(3*), S. DULAURENT^(4*), O. DELAROCHE⁽⁵⁾, D. LAMIABLE⁽⁶⁾, M. MOULSMA⁽⁷⁾, D. OLICHON⁽⁸⁾, B. CAPOLAGHI⁽⁹⁾, C. CHARLIER^(10*)

- (1) Pharmacologie-Toxicologie, CHU, Angers ;
- (2) Toxicologie, CHU, Lille ;
- (3) Pharmacologie, Hôtel-Dieu, Nantes ;
- (4) Pharmacologie-Toxicologie, CHU, Limoges ;
- (5) Biochimie, Hôpital Laënnec, Nantes ;
- (6) Pharmacologie-Toxicologie, CHU, Reims ;
- (7) Biochimie, CHU, Lyon Nord ;
- (8) CERBA, Paris ;
- (9) Biochimie, CH, Thionville ;
- (10) Toxicologie Clinique et Médico-légale, CHU, Liège ;

*Groupe de Travail Pesticides de la SFTA

Objectif : Le diagnostic de l'intoxication aiguë par les insecticides organophosphorés se base sur la détermination de l'activité cholinestérasique des globules rouges ou du sérum. Bien que cette activité ne soit pas directement liée à l'apparition des symptômes d'intoxication, l'inhibition de ces enzymes peut être considérée comme un indice de l'activité cholinestérasique des autres tissus (système nerveux central en particulier). Cependant, l'activité cholinestérasique du sang varie d'un individu à l'autre, et à un degré moindre, chez un même individu, d'un moment à l'autre. Aussi, la réduction de l'activité cholinestérasique doit au moins atteindre 20 % de la valeur moyenne pour être considérée comme significative. De plus, l'établissement des normes de référence dépend de nombreux paramètres : nature du substrat et des réactifs utilisés, température de travail, mode de mesure. Il est donc indispensable que chaque laboratoire définisse clairement ses normes de référence, dans les conditions de travail qui lui sont propres.

Méthodes : Le groupe de travail Pesticides, en collaboration avec des membres du groupe de travail Toxicologie Clinique de la SFTA, a procédé à des essais interlaboratoires portant sur la détermination de l'activité plasmatique cholinestérasique à J0 et à J15 sur 4 échantillons surchargés ainsi que le plasma de référence correspondant et sur un cas réel d'intoxication.

Résultats : 8 laboratoires utilisent des trousse commerciales et 1 laboratoire une méthode « maison ». Le substrat utilisé est la butyrylthiocholine (n=7), l'acétylthiocholine ou l'acétylcholine (n=1). La température de mesure est 37°C (n=8) ou 25°C (n=1). Différents chromophores sont utilisés : acide dithio-bis-nitrobenzoïque (n=6), dichlorophénol-indophénol (n=2), aminoantipyrine-phénol (n=1). Les résultats bruts obtenus par site à J0 sont comparés à la valeur du plasma témoin trouvée par chaque laboratoire. Le pourcentage d'activité pour le cas réel est exprimé par rapport à la norme basse des valeurs de référence utilisées par chacun. Les pourcentages d'activité cholinestérasique sont comparés entre les différents sites.

activité plasmatique cholinestérasique J0 (%)	Angers	Cerba	Liège	Lille	Limoges	Lyon	Nantes	Reims	Thionville
Dichlorvos 0,14 mg/L	70	65	71	64	68	67	65	63	64
Mévinphos 0,14 mg/L	66	70	69	60	66	67	62	61	66
Mévinphos 0,2 mg/L	44	47	53	37	45	47	39	36	42
Chlorfenvinphos 0,2 mg/L	5	1	1	4	13	5	4	5	1
Cas réel (mévinphos)	48	42	54	41	58	69	52	61	43

Conclusion : Les résultats de l'ensemble des laboratoires participant montrent une assez bonne homogénéité des activités mesurées pour chaque plasma surchargé ainsi que pour le cas réel. Les résultats à J15 sont également très voisins. L'activité cholinestérasique est stable au moins 15 jours si l'échantillon est conservé à 4°C.

Mise au point et validation d'une méthode d'analyse des polluants émergents dans l'environnement aquatique par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, après extraction en phase solide

B. DEFERT, D. BONNEAU, C. FREDERIC, B. HUART

Service de toxicologie environnementale et chimie analytique, Institut de médecine aérospatiale du service de santé des armées, Brétigny sur Orge

Objectif : La contamination de l'environnement par les polluants dits "émergents" est une réalité. Les milieux aquatiques sont contaminés par des médicaments et leurs métabolites appartenant à différentes classes pharmaceutiques. Notre laboratoire a développé et validé une technique analytique capable d'identifier et de quantifier des molécules pharmaceutiques actives dans des échantillons d'eau (AINS : ibuprofen, hypolipémiants : gemfibrosil, antidépresseurs : carbamazépine,) ainsi que la caféine, connue pour ses propriétés éveillantes et largement consommée dans le monde. Ces molécules ont été choisies en raison de la fréquence de leur présence dans les milieux aquatiques.

Méthode : La technique mise au point fait appel à l'extraction en phase solide (SPE) sur colonne de type octadécyle (C18), 500 mg, à partir d'échantillons d'eau de 500 ml alcalinisés à pH 9 pour les molécules à caractère neutre ou basique (caféine, carbamazépine), acidifiés à pH 2.5 pour les molécules à caractère acide (ibuprofen, gemfibrosil). Les extraits obtenus sont analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse au carré (CPG-SM-SM) à l'aide d'une trappe d'ions (GC 3800 - MS Saturn 2200 Varian). La colonne chromatographique utilisée est une colonne capillaire 35% phényl polysilphénylène-siloxane d'une longueur de 25 m, d'un diamètre interne de 0.25 mm et d'une épaisseur de film de 0.25 µm. Le gaz vecteur est de l'hélium N55 à un débit de 1 ml/minute. L'injection de 1 µl de l'extrait est réalisée en mode split 1/20. La séparation utilise une programmation de température de 100°C à 250°C à raison de 10°C/minute.

Résultats : Les rendements d'extraction obtenus sont de 94% pour la caféine, 83% pour la carbamazépine, 96.7% pour l'ibuprofen et 94.5% pour le gemfibrosil. La méthode est linéaire jusqu'à au moins 100 ng/L d'eau pour la caféine, le gemfibrosil et l'ibuprofen et 50 ng/L pour la carbamazépine. La répétabilité a été étudiée et vérifiée sur l'ensemble du domaine de linéarité (test de Cochran, risque $\alpha = 1\%$). Des études environnementales portant sur des échantillons d'eau prélevés dans des rivières et des stations d'épuration sont réalisées en mettant en œuvre cette technique. Les limites de quantification sont de 5 ng/µL pour chaque molécule. Les limites de détection sont de 2,68 ng/µL pour

la caféine, 0,52 ng/μL pour la carbamazépine, 1,9 ng/μL pour l'ibuprofène et 1,5 ng/μL pour le gemfibrozil.

Conclusion : La méthode mise au point permet de réaliser un suivi environnemental de molécules médicamenteuses rejetées dans les milieux aquatiques (rivières, eaux souterraines, eaux de boisson). Elle doit être étendue à d'autres spécialités pharmaceutiques actives couramment utilisées. Cette étude contribue à souligner l'impact des polluants émergents en France, domaine de travail qui reste encore aujourd'hui confidentiel dans notre pays.