La place de l'immunologie dans le screening toxicologique

Laurence LABAT

Biologie du Médicament et Toxicologie - Groupe COCHIN (AP-HP)

Faculté de Pharmacie Paris Descartes

INSERM UMR-S1144 Variabilité de réponse aux psychotropes

Ann Toxicol Anal. 2009; 21(1): 49-53
© Société Française de Toxicologie Analytique 2009
DOI: 10.1051/ata/2009024

Disponible en ligne
www.ata-journal.org

ANNALES DE TOXICOLOGIE ANALYTIQUE

Article court

Immunochimie : quelle place en 2008 ?

Immunochemistry in 2008

Jean-Pierre Goullé[1,2]*, Elodie Saussereau[1], Michel Guerbet[2], Christian Lacroix[1]

[1] Laboratoire de pharmacocinétique et de toxicologie Cliniques, Groupe Hospitalier du Havre, BP 24, 76083 Le Havre Cedex, France
[2] Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 22 boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex, France

Résumé – Au cours des deux dernières décennies, des avancées déterminantes ont été réalisées dans le domaine de l'analyse toxicologique. Le détecteur de masse s'impose désormais comme l'outil universel, couplé à un chromatographe en phase gazeuse, à un chromatographe en phase liquide ou à un spectromètre à plasma induit. Dans un tel environnement, on pourrait penser que l'immunochimie n'a plus sa place. Il n'en est rien, l'immunoanalyse s'avère être un moyen de dépistage utile dans les différents domaines de la toxicologie clinique, judiciaire et à l'exception de la recherche de nouveaux produits chimiques, professionnelle, environnementale. Il s'agit d'une méthode rapide, simple et qui permet le traitement de grandes séries d'échantillons pour un coût réduit. Qu'elle soit utilisée comme moyen de dépistage sur le terrain ou comme méthode de criblage en laboratoire, dans les deux cas, l'absence de faux négatifs et la confirmation de tout résultat positif par une méthode chromatographique séparative couplée à la spectrométrie de masse.

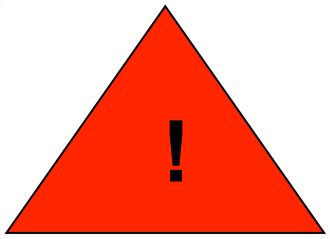
Introduction : immunoanalyse

- Actuellement l'immunoanalyse (I.A.) occupe toujours une place importante dans le panel des analyses toxicologiques
- Quasiment tous les aspects de la toxicologie sont couverts:

  du suivi thérapeutique au screening large

  de la simple détection au dosage

  du test unitaire à l'automate à haut débit



Technologie pertinente
Rapide
Automatisable
Nombreux paramètres proposés…

Les différents tests sur le marché

Deux grandes familles:

en phase homogène

pas de séparation des formes liées et libres

EMIT Enzyme Multiplied ImmunoAssay Technique

FPIA Fluorescence Polarization Immuno Assay

CEDIA Clone Enzyme Donor Immuno Assay

KIMS Kinetic Interaction of Microparticules in Solution

en phase hétérogène

avec une phase de séparation

RIA Radio Immuno Assay

ELISA Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

Immuno-chromatographie

Biochip Array Technology

BMD, Concateno, Microgenics, (Thermo), Randox, Roche, Abbott, Alere, Narcocheck, Neogen, Nal van minden…

Comment utiliser un test d'immunochimie ?

- Dépistage de la présence d'un stupéfiant ou médicaments (unique ou famille): opiacés, cannabinoïdes, amphétaminiques, benzodiazépines…
- Dosage direct : éthanol, méthadone, buprénorphine, LSD, benzoylecgonine, certains opioïdes, certains antiépileptiques, cotinine, EthylGlucuronide…

- Tests souvent utilisés pour un **PREMIER SCREENING** avant d'envisager une étape de confirmation en chromatographie couplée à de la spectrométrie de masse

  Pour les résultats positifs : « seconde méthode »

  Pour les résultats négatifs : exclusion des analyses par d'autres tests de confirmation

- Peut permettre **d'ESTIMER UNE DILUTION échantillon** nécessaire lors étape de confirmation

- **Ne peut pas et ne doit pas être utilisé comme méthode de confirmation**

Les matrices utilisées aujourd'hui… La salive

Ne pas utiliser des tests rapides urinaires car :
- Salive contient généralement les drogues parentes alors que les urines contiennent généralement les métabolites
- Les concentrations salivaires beaucoup plus faibles que dans les urines
- Problèmes techniques : salive plus visqueuse

Pour le dépistage dans la salive, **TROIS TECHNIQUES**

- **tests ELISA**
(Orasure, IDS, Neogen, Cozart)
- **tests rapides :** très développés des dernières années avec les dépistages en bord de route
(Securetec Drugwipe, Cozart RapiScan….)
- **tests homogènes adaptables sur automates de chimie**

(Le dépistage salivaire, A Verstraete, Drogues et accidentalité, 2011)

La salive et les tests rapides

Alere iScreen® OFD Test

A rapid, screening test for the simultaneous, qualitative detection of multiple drugs and drug metabolites in human oral fluid.

Name	Abbreviation	Cut off (ng/mL)
Amphetamine	AMP	50
Methamphetamine	MET	50
Cocaine	COC	20
Cannabis *	THC *	12
Opiate	OPI	40

* 11-nor-Δ9-THC-9-COOH

Niveau de détection :

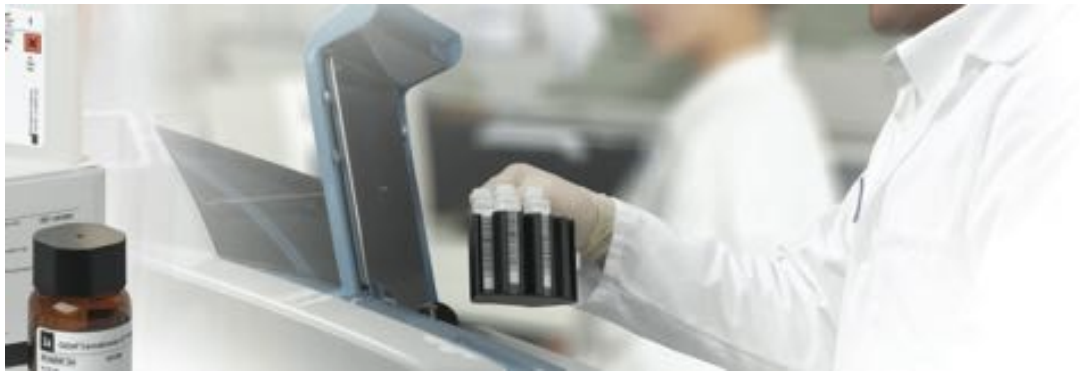
Δ9-THC 25 ng/ml - Cocaïne 20 ng/ml - MET/MDMA 50 ng/ml - OPI 10 ng/ml - AMP 50 ng/ml

La salive sur automates

Recueil

Témoin

Conservation



- MGC 240
- Beckman Coulter AU640™ and AU680™
- Hitachi 917
- Thermo Scientific Indiko/Indiko Plus

Cut off (réactifs CEDIA, Thermo Scientific) :

Amphetamines 50 ng/mL
Cocaine (BZE) 5 ng/mL
Opiacés (morphine) 10 ng/mL
Phencyclidine 1 ng/mL
Methamphétamine 40 ng/mL
THC 1 ng/mL

Les matrices utilisées aujourd'hui… Les cheveux

- Tests immunologiques pour l'analyse des cheveux nécessitent :

  - croisement avec molécule (drogue) parent et métabolites lipophiles retrouvés dans les cheveux

  - Absence d'interférence avec la matrice dissoute

  - Quantification avec CUT OFF approprié aux concentrations retrouvées dans les cheveux

- En général dans les cheveux, molécules parents (ou métabolites lipophiles) : tests immunologiques développés pour les urines non valables
- Nécessité tests avec AC lié à un support solide (tubes recouverts en RIA ou plaques ELISA)

  évitent les interférences avec la matrice

ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE DIRECT

Forensic Science International 159 (2006) 189–199

Forensic Science International

www.elsevier.com/locate/forsciint

Determination of opiates and cocaine in hair using automated enzyme immunoassay screening methodologies followed by gas chromatographic–mass spectrometric (GC–MS) confirmation

Katrin Lachenmeier *, Frank Musshoff, Burkhard Madea

Institute of Legal Medicine, Rheinische Friedrich-Wilhelms-University, Stiftsplatz 12, D-53111 Bonn, Germany

[illegible]

ELISA
Cut off : cocaine 0,1 ng/mg
morphine 0,05 ng/mg
Pour 50 mg cheveux

Application of ORAL-screen™ Saliva Drug Test for the Screening of Methamphetamine, MDMA, and MDEA Incorporated in Hair

[illegible]

(J Anal Toxicol 2004)

[illegible]

Les matrices utilisées aujourd'hui…

Humeur vitrée

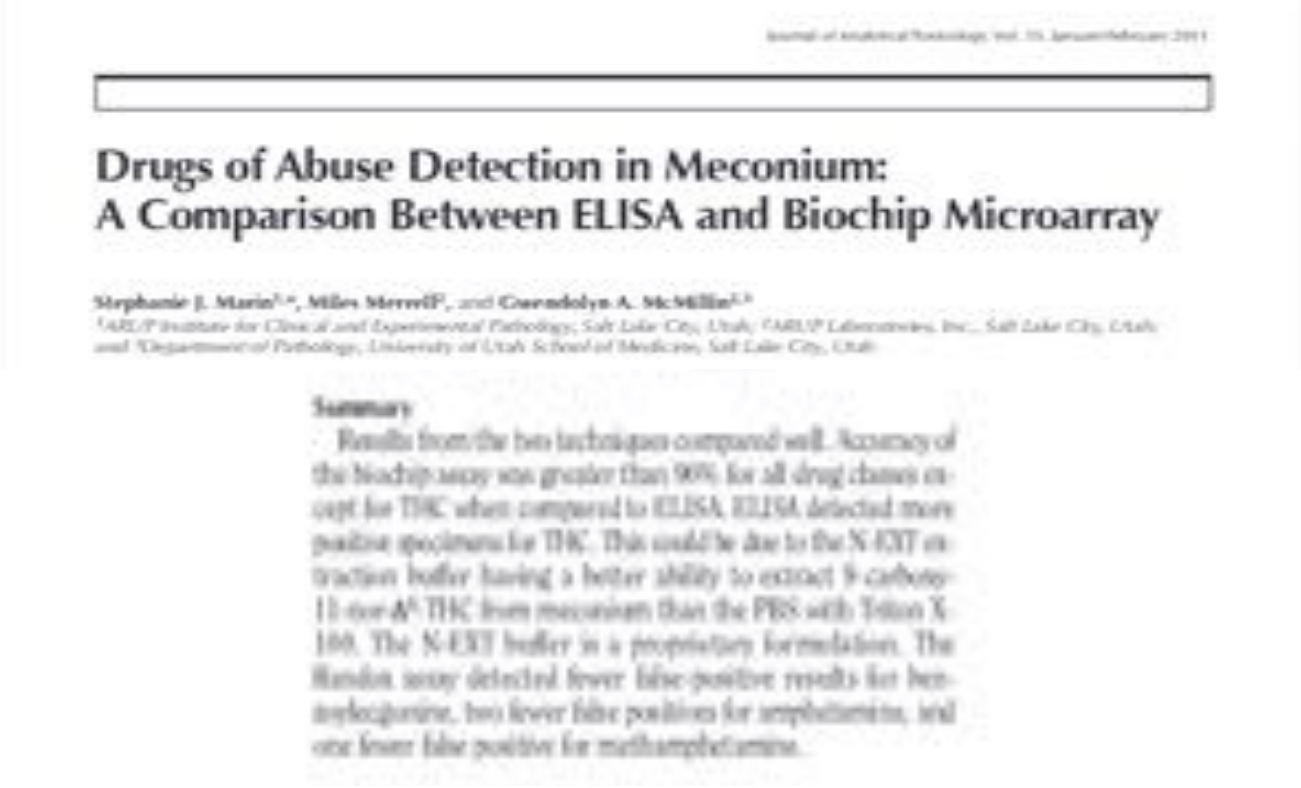
Biochip, Volume échantillon restreint

avec préparation minimale, possibilité analyse dizaine drogues

Recherche Pubmed négative

Méconium

Test ELISA ou Biochip (test multiplex 13 drogues)



Drugs of Abuse Detection in Meconium:
A Comparison Between ELISA and Biochip Microarray

Stephanie J. Marin, Miles Merrell, and Gwendolyn A. McMillin

Summary

Des technologies qui évoluent…

Biochip Array technology (randox)

Principe

La technique des Biochips est une technique permettant de quantifier simultanément jusqu'à 25 molécules.

Les ligands (antigènes ou anticorps) sont fixés sur une plaque de silice miniature.
Après dépôt sur la biopuce d'un échantillon de patient, si les molécules recherchées sont présentes, elles se lient aux ligands spécifiques.
Le degré de liaison est déterminé par chimioluminescence à l'aide d'une caméra CCD et les signaux lumineux sont simultanément mesurés pour toutes les biomolécules présentes sur la biopuce.

Le principe général de cette méthode est un **Elisa de type sandwich avec ou sans compétition**.

Exemple DoA IV :
Ethylglucuronide, méthylphénidate, Tramadol, Salicylate, halopéridol, sertraline…

Matrices disponibles : sang total, post mortem, urine, salive, cheveux, humeur vitrée, méconium, tissu…

Clinica Chimica Acta

Evaluation of the first immunoassay for the semi-quantitative measurement of meprobamate in human whole blood or plasma using biochip array technology

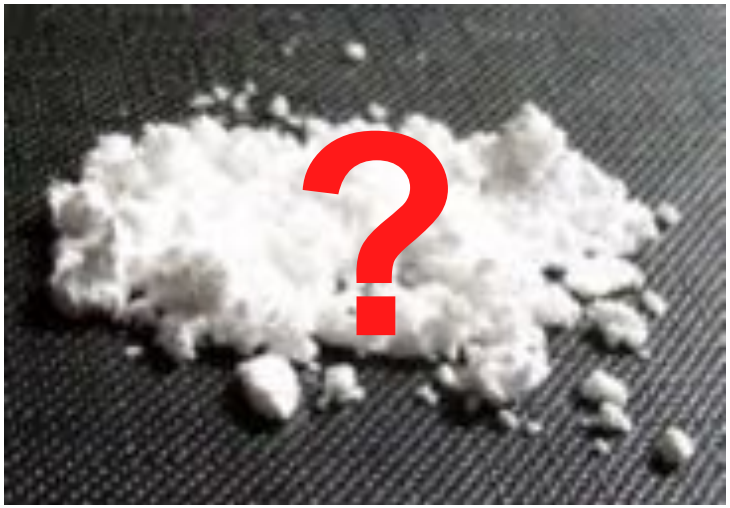
Des technologies qui s'adaptent…

Test urinaire pré-dosage !

Avec trois cut off, indique si la concentration en THC est faible, moyenne ou élevée

Détection et dosage des NPS en immunochimie??

- Sont elles consommées en France?
  “Early warning reports”, analyse des saisies, appels CAP…
- Sont elles métabolisées?
- Quelles sont les concentrations attendues ?
- Les test disponibles?
- Dépistage dans matrices biologiques /Identification poudres ?



Détection et dosage des NPS en immunochimie??

- **Certains dépistages spécifiques :**

1/ BIOPUCES

Randox, DoA V chip :

Cannabinoides de synthèse

Kratom

Sels de bains (MDPV, méthcathinone, méphédrone)

Benzylpipérazine, mescaline, salvinorine…

2/ TESTS ELISA

(Neogen)

- dépistage de **30 cathinones** (drogues et métabolites) : methcathinone, methylone, mephedrone….

avec 20 µL d'échantillons : sang total (dilution 1/20), sérum (dilution 1/5) ou salive (dilution 1/4)

45 minutes d'incubation avec enzyme

3 lavages

30 minutes d'incubation avec substrat

Arrêt réaction et lecture avec DO 450 nm

- tests pour **cannabinoides de synthèse**

JWH-018	dilution 1/5 sang total, serum, urine
JWH-250	dilution 1/5 sang total, serum et 1/10 urine
UR-144/XLR-11	dilution1/4 salive, 1/5 sang total, serum et 1/10 urine

Croisement avec autres molécules

Compound	I-50 (µg/ml)	Percent Cross-Reactivity
JWH-018 *	0.88	100
JWH-073-N-(4-hydroxybutyl) metabolite	0.10	880
JWH-018 N-5-hydroxypentyl	0.13	754
JWH-200 *	0.16	613
JWH-019- N-pentanoic acid	0.16	613
JWH-073 *	0.20	490
AM2232	0.19	448
JWH-073 N-butanoic acid	0.23	426
(±) JWH-018-N-(4-hydroxypentyl) metabolite	0.25	392
AM2201 *	0.28	350
AM1220	0.21	288
JWH-022	0.42	233
AM-2201 N-(4-hydroxypentyl) metabolite	0.59	166
3-(1-naphthoyl)-1H-indole	0.64	153
JWH-018 N-(5-hydroxypentyl) 5-O glucuronide	0.49	136
WAM2201	1.1	132
JWH-018 6-hydroxyindole	0.78	126
AM694 *	0.90	109
JWH-019 *	1.0	94
JWH-015	1.2	83
JWH-018 4-hydroxyindole	1.5	60
JWH-122 *	1.8	51
JWH-018 5-hydroxyindole	2.0	50
AM-2201 6-hydroxyindole	2.0	50
JWH-007	2.9	34
JWH-398 *	7.5	13
WIN 55,212-3 mesylate	9.2	11
JWH-081 *	16	6.1
JWH-210	21	4.8
JWH-250- N-(5-carboxypentyl) metabolite	51	1.9
JWH-250- N-(4-hydroxypentyl) metabolite	82	1.2
JWH-250 *	188	0.5
JWH-203 *	205	0.5
RCS-4 *	250	0.4
RCS-8 *	365	0.3

Compound	I-50 (ng/ml)	Percent Cross-Reactivity
JWH-250*	0.40	100
JWH-250 N-(5-carboxypentyl) metabolite	0.25	159.9
JWH-250 N-(4-hydroxypentyl) metabolite	0.32	123.4
JWH-073 N-(4-hydroxybutyl) metabolite	0.37	106.8
JWH-250 N-(5-hydroxypentyl) metabolite	0.37	106.8
JWH-073*	0.42	94.1
(+/-)-JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) metabolite	0.44	89.8
AM 2232	0.44	89.8
AM 1220	0.46	85.9
JWH-200*	0.47	84
JWH-203*	0.53	74.5
JWH-018 N-pentanoic acid	0.62	63.7
JWH-018 N-(5-hydroxypentyl) 5-O-glucuronide	0.67	59
JWH-015	0.67	59
JWH-250 5-hydroxyindole metabolite	0.72	54.9
AM 2201*	0.74	53.4
JWH-073 N-butanoic acid metabolite	0.75	52.7
JWH-022	0.85	46.5
JWH-018*	1.2	32.9
AM 2201 5-hydroxyindole metabolite	1.2	32.9
RCS-8*	1.2	32.9
WAM 2201	1.3	30.4
PB-22 N-(5-hydroxypentyl) metabolite	1.7	23.2
JWH-018 6-hydroxyindole metabolite	1.9	20.8
5-fluoro PB-22	2.1	18.8
PB-22 N-(4-hydroxypentyl) metabolite	2.1	18.8
1' Naphthoyl indole	2.2	18
JWH-018 5-hydroxyindole metabolite	2.5	15.8
PB-22 N-pentanoic acid	2.8	14.1
JWH-019*	2.9	13.6
JWH-007	3.3	11.3
PB-22	3.63	10.9
JWH-018 4-hydroxyindole metabolite	4	9.9
JWH-122*	4.1	9.6
(+) WIN 55212-2 (mesylate)	4.75	8.3
JWH-081*	5.75	6.9
BB-22	9.22	6.4
AM 2201 N-(4-hydroxypentyl) metabolite	6.8	5.8
JWH-398*	9	4.4
JWH-210	30	1.3
AM 694*	39	1

Compound	I-50 (ng/ mL)	Percent Cross-Reactivity
UR-144 N-pentanoic acid	0.4	100
A-796260	0.43	88.69
UR-144 N-(5-hydroxypentyl) metabolite	0.43	88.69
(+/-)-UR-144 N-(4-hydroxypentyl) metabolite	0.65	61.34
XLR-11	0.68	64.84
A-834735	1.1	36.36
XLR11 N-(4-pentenyl) analog	2	20
UR-144	2.3	17.78
UR-144 N-(2-hydroxypentyl) metabolite	3.8	10.53
XLR-11 N-(4-hydroxypentyl) metabolite	6.1	6.56
XLR11 Degradant	6.5	6.15
UR-144 Degradant	19	2.11
STS-135 (RM)	91	0.44
AKB48 N-(5-fluoropentyl) metabolite	120	0.33
AKB48	220	0.18
JWH-250 N-(5-hydroxypentyl) metabolite	400	0.1
JWH-203*	510	0.08
JWH-250 N-(5-carboxypentyl) metabolite	550	0.07
JWH-250 N-(4-hydroxypentyl) metabolite	550	0.07
JWH-250*	1100	0.04
AM 694*	1300	0.03
RCS-8*	2200	0.02
AM 1220	2100	0.02
JWH-200*	4500	0.01
JWH-073*	8100	0.01
AM 2232	6600	0.01
JWH-073 N-(4-hydroxybutyl) metabolite	6900	0.01
JWH-018 N-(5-hydroxypentyl) metabolite	6900	0.01

For Forensic Use Only

3/ IMMUNOCHROMATOGRAPHIE

Test par immersion

Temps de détection :
1 à 3 jours après la prise

Détection et dosage des NPS en immunochimie??

- Dépistages avec **tests immunochimiques plus "traditionnels":**

  - **CEDIA, EMIT et KIMS** pour des screening drogues

  - **CEDIA Amphetamine/Ecstasy** et **EMIT d.a.u. Amphetamine** : réactivité croisée avec certaines NPS

Dérivés type amphétaminiques

Gandemer L, Turcant A (congrès STC 2014)

Patients hospitalisés état agitation +/- hallucinations

52 substances évaluées
conc. ajout = 10 µg/mL

16 amphétamines
15 cathinones
11 séries 2C
3 pipérazines
7 divers

4 réactifs testés : **EIA Multigent amphétamine-AM**, **ecstasy-E**, **test FPIA** sur Architect et Axsym
IC-multiline 5, BMD (immunochromatographie)

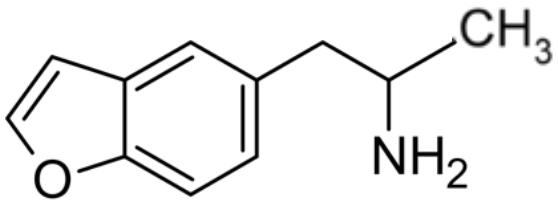
Résultats : réaction croisée 4 MEC et cathinones
séries C et pipérazines : réponse négative

Conclusion : molécules structures proches amphétaminiques présentent réaction croisée

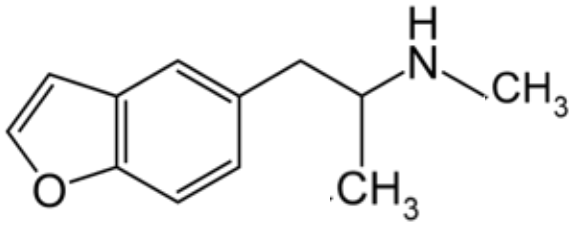
Phénéthylamines
5 APB = 5-(2-Aminopropyl)benzofuran
5 MAPB = N-methyl-5-(2-Aminopropyl)benzofuran

- Dérivé N-methyl du 5 APB →benzofury, legal high, vente Internet

→ positive les tests immunochimiques amphétamine/MDMA

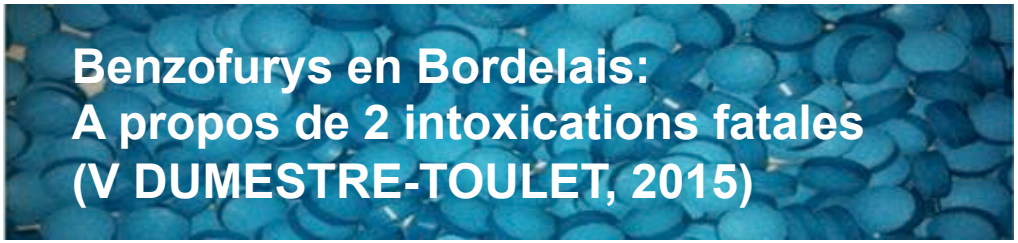


5 APB
$C_{11}H_{13}NO$
PM: 175



5MAPB
$C_{12}H_{15}NO$
PM: 189

- Métabolisé en 5 APB via les CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19 et CYP2D6



% réactivité croisée CEDIA® Amphetamine/ Ecstasy test cut-off 500 ng/mL

Detectability of new psychoactive substances, 'legal highs', in CEDIA, EMIT, and KIMS immunochemical screening assays for drugs of abuse

Drug Testing and Analysis

Drug	% cross reactivity	Drug	% cross reactivity
1-BZP	2	Dimethocaine	4
2-FA	10	Ethylone	3
2-FMA	19	mCPP	9
3-FMA	58	Methedrone	2
4-FA	7	Methylone	2
4-FMA	80	MPA	13
4-MA	6	Pentedrone	3
5-APB	31	Pentylone	6
5-IT	8	p-FPP	3
6-APB	12	PMA	18
Buphedrone	3	PMMA	113
Butylone	5	TFMPP	8

Dépistage en IA sur des échantillons réels

Substance	n	Detection rate (%)
2-FA	8	25
2-FMA	2	100
3-FMA/4-FMA*	8	25
4-FA	18	11
4-MA	9	11
5-APB/6-APB*	8	38
5-IT	18	56
Butylone	5	20
Buphedrone	4	75
Dimethocaine	2	100
Ethylon	15	13
Methedrone	2	50
Methylone	14	36
MPA	12	8
Pentedrone	19	16
p-FPP	1	100
PMA	4	100
PMMA	8	25
TFMPP	2	100
2-DPMP	9	11
3,4-DMMC	3	67
4-MEC	5	40
MDPV	104	7
Naphyrone	3	33

Beck O, et al. DTA 2014, DOI 10.1002/dta.1641

Exemples d'application

Au bord de la route, la salive…

En santé au travail…

(Moore C, Drug Test Anal 2011)
IA dans le cheveux et dans la salive
Utilisation screening en santé au travail

En addictologie…

Ethylglucuronide urinaire
Marqueur direct
Fenêtre de détection augmentée > alcool
Possibilité dosage urinaire par tests immunologiques :
- Biochip Array technology
- DRI, Microgenics (cut off 0,5 mg/L)
- EIA Immunoenzymologie, Randox
- *ELISA tests (moins performants)*

Ethylsulfate urinaire ?

Screening « Pain management »

Assay	CEDIA	DRI
Amphetamine		✓
Amphetamine/Ecstasy	✓	
Barbiturate	✓	✓
Benzodiazepine	✓	✓
Buprenorphine	✓	
Cocaine	✓	✓
Cotinine		✓
Ecstasy		✓
Ethyl Alcohol		✓
Ethyl Glucuronide*		✓
Fentanyl*		NEW
Heroin Metabolite (6-Acetylmorphine)	✓	
Hydrocodone*		NEW
LSD	✓	
Methadone	✓	✓
Methadone Metabolite(EDDP)	✓	✓
Methaqualone		✓
Opiate	✓	✓
Opiate 2K	✓	✓
Oxycodone		✓
Phencyclidine (PCP)	✓	✓
Propoxyphene	✓	✓
THC (Cannabinoid)	✓	✓

Urine
CEDIA, DRI
Automate laboratoire

Conclusion

D'une façon générale, le screening en toxicologie par méthode immunologique a évolué et a toujours sa place….

L'immunochimie sur bandelettes réactives : intérêt en santé au travail, au bord de la route, si pas de laboratoire de proximité…

A garder en mémoire :
- pas toujours évident d'interpréter un résultat qu'il soit positif ou négatif
- Dans de très nombreuses situations, si test positif en immunologie, nécessité de confirmation avec identification par méthode chromatographique/SM
- Ne pas oublier de pratiquer des prélèvements conservatoires qui permettront ultérieurement de confirmer les résultats et éventuellement de procéder à des investigations complémentaires.