Étude de la stabilité *in vitro* de 21 antidépresseurs et de 16 neuroleptiques dans le sang total

Study of the in vitro stability of 21 antidepressants and 16 neuroleptics in whole blood

**Gaëlle DUFFORT⁽¹⁾, Hélène EYSSERIC⁽²⁾, Marc DEVEAUX⁽¹⁾,
Véronique DUMESTRE-TOULET⁽³⁾, Marie-Hélène GHYSEL⁽⁴⁾,
Jean-Pierre GOULLÉ⁽⁵⁾, Alain GRUSON⁽⁶⁾, Pascal KINTZ⁽⁷⁾, Gérard LACHÂTRE⁽⁸⁾,
Michel LHERMITTE⁽⁹⁾, Patrick MURA⁽¹⁰⁾, Anne-Laure PELISSIER-ALICOT⁽¹¹⁾,
Martine PERRIN⁽¹²⁾, Ivan RICORDEL⁽¹³⁾, Alain TURCANT⁽¹⁴⁾, Gilbert PÉPIN^{(1)*}**
(Groupe de travail "toxicologie judiciaire" de la Société Française de Toxicologie Analytique)

- (1) Laboratoire Toxlab, Paris
(2) Laboratoire de Médecine Légale, UFR de Médecine, Grenoble
(3) Laboratoire Toxgen, Bordeaux
(4) Laboratoire de Police Scientifique, Section Toxicologie, Lille
(5) Laboratoire de Toxicologie, GH, Le Havre
(6) Laboratoire de Biochimie, CH, Arras
(7) Laboratoire Chem Tox, Illkirch
(8) Service de Pharmacologie et Toxicologie, CHRU, Limoges
(9) Laboratoire de Biochimie, CHU, Lille
(10) Laboratoire de Biochimie et de Toxicologie, CHU, Poitiers
(11) Service de Médecine Légale, Faculté de Médecine, Marseille
(12) Département de Toxicologie IRCGN, Rosny sous Bois
(13) Laboratoire de Toxicologie de la Préfecture de Police, Paris
(14) Service de Pharmacologie et Toxicologie, CHU, Angers

*Auteur à qui adresser la correspondance : Gilbert PÉPIN, Laboratoire Toxlab, 7, rue Jacques Cartier
75018 PARIS - FRANCE - Tél : +33 1 58 59 28 00 - Fax : +33 1 58 59 28 01 - E-mail : toxlab@wanadoo.fr

Ce travail a été présenté, partiellement, au 12^{ème} congrès annuel de la SFTA, Porticcio, 4-7 mai 2004

(Reçu le 9 septembre 2005 ; accepté après modifications le 31 octobre 2005)

RÉSUMÉ

L'interprétation des concentrations sanguines postmortem des xénobiotiques est une étape essentielle de l'expertise toxicologique. La stabilité *in vitro* des molécules est un paramètre à prendre en compte dans l'interprétation des résultats. Devant le manque de données concernant une éventuelle dégradation *in vitro* des antidépresseurs et neuroleptiques, le groupe de travail « toxicologie médico-légale » de la Société Française de Toxicologie Analytique (SFTA) a réalisé une étude à partir de cas réels, suivie d'une étude multicentrique sur sangs surchargés. Les résultats obtenus sont très disparates d'une molécule à l'autre, et il apparaît très difficile d'établir une loi générale sur la stabilité *in vitro* des antidépresseurs et neuroleptiques dans le sang. Ces résultats permettent en revanche de souligner qu'il est primordial, dans le domaine de la toxicologie postmortem, de prendre en compte l'effet matrice à toutes les étapes de l'analyse, d'œuvrer pour obtenir un ajout systématique d'adjuvant de conservation à concentration efficace dès la réalisation des prélèvements autopsiques, et de conserver si possible les échantillons à -20°C dans les phases pré- et post-analytiques.

MOTS-CLÉS

Antidépresseurs, neuroleptiques, dégradation, stabilité, sang, postmortem, conservateur, température, toxicologie médico-légale.

Introduction

La recherche des causes toxiques de mort est l'une des missions prépondérantes en toxicologie médico-légale. L'interprétation des concentrations sanguines *post-mortem* est une étape essentielle et souvent délicate de l'expertise. Outre les phénomènes de redistribution se produisant dans l'organisme après le décès et susceptibles de modifier les concentrations des différentes molécules (1), il faut également tenir compte d'éventuelles variations de concentration dans le sang *in vitro* (2-4).

Très peu de données scientifiques sont disponibles sur la stabilité *in vitro* des antidépresseurs et des neuroleptiques, les molécules les plus étudiées étant les produits stupéfiants (5-10) et les benzodiazépines (11-13). Concernant les antidépresseurs, une étude démontre la stabilité de la fluoxétine à -20 °C dans le sang mais présente des résultats divergents sur sa stabilité à + 4°C (14). Concernant les neuroleptiques, Elliot (15) a comparé la stabilité de l'acépromazine *in vitro* dans le sang total frais, le sang total *post-mortem* et le plasma et décrit un phénomène de métabolisation *in vitro* qu'il attribue à une activité réductase des hématies présentes dans l'échantillon. D'autres articles évoquent le problème de la stabilité *in vitro* de la clozapine (16), de l'olanzapine (17), de la chlorpromazine (4,18) et de dérivés imipraminiques tels que l'amitriptyline, l'imipramine et la doxépine (18). Une autre équipe s'est intéressée à la stabilité des antidépresseurs tricycliques ajoutés dans des solutions aqueuses formolées (19). Plus récemment, Holmgren et coll. (20) ont réalisé une étude de stabilité à partir de cas réels portant sur 46 molécules de classes chimiques variées, parmi lesquelles figuraient 12 médicaments antidépresseurs ou neuroleptiques.

SUMMARY

The interpretation of drugs levels in postmortem blood is a main step in forensic toxicology. Since days or weeks may pass between sampling and drug analysis, the drug stability must be established for proper interpretation of results. Considering the lack of data about degradation *in vitro* of antidepressant and neuroleptics, the Forensic Toxicology Committee of the French Society of Analytical Toxicology (SFTA) carried out a study from real cases followed by a multicentric study with supplemented blood. The results are badly matched, so it seems difficult to establish a general rule concerning the stability *in vitro* of the antidepressants and neuroleptics. On the other hand, these results emphasize the necessity to take into account the matrix effect, to add a preservative with an effective concentration and to store the samples at -20°C until analyzed.

KEY-WORDS

Antidepressants, neuroleptics, stability, blood, postmortem, preservative, temperature, forensic toxicology.

pramine et la doxépine (18). Une autre équipe s'est intéressée à la stabilité des antidépresseurs tricycliques ajoutés dans des solutions aqueuses formolées (19). Plus récemment, Holmgren et coll. (20) ont réalisé une étude de stabilité à partir de cas réels portant sur 46 molécules de classes chimiques variées, parmi lesquelles figuraient 12 médicaments antidépresseurs ou neuroleptiques.

D'un point de vue méthodologique, les études de stabilité peuvent être classées en deux groupes. Certaines sont basées sur des échantillons biologiques provenant de cas réels (7,20) et d'autres sur des prélèvements biologiques témoins « surchargés » à des concentrations connues des substances dont on souhaite étudier la stabilité (6, 11, 15). Dans tous les cas, les prélèvements sont aliquotés, conservés à température variable et de nouveau dosés après différents délais de stockage.

Parmi les nombreux facteurs susceptibles de modifier la stabilité des molécules dans le sang *in vitro*, figurent principalement le type de contenant, l'ajout d'adjuvant de conservation, la température et la durée de stockage. Le type de contenant (plastique ou verre) peut avoir une influence sur des phénomènes d'évaporation (4,21) ou d'adsorption des molécules. La trimipramine et ses métabolites déméthylés et hydroxylés peuvent ainsi s'adsorber sur le verre (22). L'ajout d'un adjuvant de conservation tel que le fluorure de sodium (NaF) a

montré son intérêt dans la stabilisation de nombreuses molécules telles que l'éthanol, la cocaïne, les cyanures ou les benzodiazépines. L'EDTA est recommandé pour la conservation sanguine du GHB (23). L'ajout d'acide ascorbique pourrait réduire la dégradation de l'olanzapine (17) ; cependant, l'utilisation d'un anti-oxydant semble avoir un effet inverse sur d'autres molécules comme la chlorpromazine dont les métabolites N-oxyde pourraient être réduits *in vitro*, et entraîner une augmentation de la concentration du produit parent (4).

Enfin, la température de stockage et la durée de conservation sont des paramètres essentiels à prendre en compte dans la stabilité des molécules *in vitro*. En effet, le délai séparant le prélèvement autopsique de l'analyse peut-être très long pour de multiples raisons (mise au point ou modifications de la technique de dosage, demandes tardives de contre-expertises, etc...). Il est donc impératif d'étudier la stabilité des molécules *in vitro* sur de longues périodes.

Malgré toutes les précautions prises, l'altération des substances est parfois inévitable. Un résultat négatif n'indique pas toujours que la molécule recherchée n'était pas impliquée au moment du décès. C'est pourquoi la connaissance des mécanismes de dégradation est également tout à fait essentielle dans le domaine de la toxicologie *post-mortem*.

Le groupe de travail « toxicologie médico-légale » de la SFTA a donc retenu comme sujet d'étude le problème de la stabilité *in vitro* des antidépresseurs et neuroleptiques dans le sang total. Une étude préliminaire sur cas réels ayant comme objectif de distinguer les molécules « stables au moins 6 mois », des molécules « instables dès le 1^{er} mois » a été entreprise. Cette étude, d'une durée d'un an (décembre 2001 à décembre 2002), a consisté à sélectionner des expertises achevées pour lesquelles il restait suffisamment d'échantillons sanguins permettant des dosages de contrôle *a posteriori*. Les effets de l'ajout d'un conservateur et de la température de conservation ont été testés sur ces cas. Parmi les 14 laboratoires représentés dans le groupe de travail, 6 ont pu regrouper leurs résultats concernant 42 cas d'antidépresseurs et 31 cas de neuroleptiques. Ces résultats ont été difficiles à exploiter et n'ont pas permis de répondre à l'objectif initial. Citons l'exemple de 3 cas réels d'autopsie impliquant la fluoxétine et pour lesquels un dosage de contrôle avait été réalisé après 1 mois de conservation à +4°C ou -20°C sur un aliquot de sang fluoré. Les concentrations initiales respectives des 3 cas étaient de 144, 408 et 1390 µg/L et les pourcentages de la concentration initiale restant de 80, 56 et 35 % à +4°C et de 0, 78 et 50 % à -20°C. Ainsi, aucune conclusion n'avait pu être formulée quant à la stabilité ou non de la fluoxétine après 1 mois de conserva-

tion. Cependant, cette étude préliminaire avait eu le mérite de révéler des disparités directement liées aux cas réels, telles que l'état de putréfaction variable des échantillons et l'échelle des concentrations (les concentrations sanguines d'un même antidépresseur variant selon les cas d'une concentration thérapeutique à une concentration létale). Ces biais méthodologiques ont donc amené la commission à mettre au point une étude multicentrique, à partir d'échantillons surchargés, que nous présentons dans cet article.

Matériel et méthode

L'étude a été réalisée de décembre 2002 à décembre 2003 au sein de 13 laboratoires réalisant des expertises médico-légales. Les 21 antidépresseurs et les 16 neuroleptiques disponibles sur le marché français (24) ont été répartis entre les différents laboratoires, chaque centre étudiant la stabilité de 1 à 3 molécules. Aucune molécule n'a été étudiée par plusieurs centres à la fois. Le protocole adopté préconisait l'utilisation de sang total humain *post-mortem* (ou éventuellement de sang provenant d'un établissement de transfusion sanguine et conservé plusieurs jours avant son utilisation), additionné ou non de NaF à 1‰ et surchargé en antidépresseur ou neuroleptique à des concentrations fixées à 0,5 ou 2 mg/L selon les caractéristiques toxico-dynamiques des molécules (environ 5 fois la concentration thérapeutique). Les surcharges réalisées avec des solutions dans le méthanol ou l'acétonitrile ne devaient pas excéder 5% du volume final de l'échantillon. Un premier dosage après un temps d'homogénéisation de 2 heures était réalisé pour contrôler la concentration initiale (T0). Ces sangs surchargés étaient ensuite conservés dans des tubes en verre à différentes températures : ambiante, +4°C et -20°C. Après des délais fixés à 7, 15 et 30 jours pour les prélèvements conservés à température ambiante, et des délais fixés à 1, 3 et 6 mois pour les prélèvements conservés à +4°C et -20°C, des dosages de contrôle étaient effectués. Chaque laboratoire utilisait sa propre technique de dosage validée. Les préparations d'échantillons ont toujours été basées sur une extraction liquide-liquide à pH alcalin avec des mélanges de solvants variables selon les laboratoires. Les séparations ont fait appel à la chromatographie en phase gazeuse, couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM, 1 laboratoire), à une détection therm-ionique (CPG/NPD, 1 laboratoire) ou à la chromatographie en phase liquide, couplée, à une détection par barrette de diodes (CLHP/BD, 10 laboratoires), à un spectromètre de masse (CHLP/SM, 1 laboratoire), ou à un spectromètre de masse tandem (CHLP/SM/SM, 1 laboratoire).

Résultats

Les résultats sont présentés dans les tableaux I (conservation avec NaF) et II (sans conservateur). Ils indiquent le pourcentage restant de chaque molécule aux différents temps et selon la température de stockage (la concentration initiale étant de 100 %). Les molécules ont été classées selon les familles chimiques proposées par Bismuth et coll. (25-27).

Nous avons défini deux catégories de molécules : stables (pour lesquelles il reste encore au moins 60 % de la concentration initiale au bout de 6 mois) et instables (pour lesquelles il reste moins de 60 % de la concentration initiale au bout de 6 mois).

Les neuroleptiques

Benzamides substitués

Les molécules de ce groupe (amisulpride, sulpiride, sultopride, tiapride) ont un comportement hétérogène : 100 % de la concentration initiale en sulpiride, conservé 6 mois avec NaF, quelle que soit la température, sont retrouvées et 81,5 % de la concentration initiale en sultopride sont retrouvées après 6 mois de conservation à -20° C avec ou sans NaF, alors que les concentrations en amisulpride présentent des variations importantes quelles que soient les conditions de température et les durées de stockage.

Butyrophénones

Une relative instabilité a été mise en évidence pour l'halopéridol et le dropéridol. La concentration d'halopéridol a nettement diminué entre le 15^{ème} et le 30^{ème} jour, puis s'est maintenue les 5 mois suivants autour de 50 % de la concentration initiale, avec ou sans conservateur. Entre le 3^{ème} et le 6^{ème} mois, la concentration de dropéridol a augmenté (de 47 % avec NaF et de 15 % sans NaF) dans les échantillons conservés à -20° C.

Dibenzodiazépines et dibenzoxazépines

La clozapine et la loxapine se sont avérées très stables après un stockage de 6 mois, quelle que soit la température, avec ou sans conservateur. En effet, 95 à 99 % de la concentration initiale a été retrouvée dans les échantillons sanguins surchargés.

Contrairement à la clozapine et la loxapine, l'olanzapine s'est révélée très instable à température ambiante, puisque après 1 mois de conservation persistait seulement 5 % de la concentration initiale sans NaF et 0,5 % avec NaF.

Phénothiazines

Au sein de ce groupe de molécules au noyau comptant trois cycles aromatiques, on distingue trois catégories :

- molécules stables : la cyamémazine est très stable

pendant 6 mois lorsqu'elle est conservée avec NaF, et stable sans conservateur (sa concentration augmente même parfois). La prométhazine est stable avec conservateur pendant 6 mois (plus stable à -20° C qu'à +4° C) et instable sans conservateur (seule 27 à 39 % de la concentration initiale est présente dans l'échantillon après 6 mois de stockage).

- molécules instables : l'alimémazine et la lévomépromazine présentent une élévation de la concentration au 3^{ème} mois, puis une diminution. La chlorpromazine (mieux conservée à -20° C qu'à +4° C), et la thioridazine (dont il ne reste que 16 à 33,5 % de la concentration initiale) sont également instables après 6 mois de stockage, avec ou sans conservateur.

- molécule très instable : la fluphénazine est très instable (au bout de 3 mois le pourcentage restant n'est plus que de 4 à 20 % de la concentration initiale, selon la température de conservation).

Les antidépresseurs

Imipraminiques

9 molécules ont été étudiées. Elles peuvent être classées en trois catégories selon leur stabilité :

- molécules très stables : c'est le cas de la doxépine, la maprotiline et la clomipramine (au minimum 72 % de la concentration initiale est encore présente au bout de 6 mois, quelles que soient les conditions de stockage).

- molécules instables : l'amitriptyline, la trimipramine et l'imipramine sont instables avec ou sans NaF. Elles voient leurs concentrations augmenter considérablement jusqu'au 3^{ème} mois puis diminuer à nouveau.

- molécules très instables : l'amoxapine, la dosulépine et la désipramine sont très instables (les pourcentages des concentrations initiales après 6 mois ne sont pas supérieurs à 19 % quelles que soient les conditions de conservation).

Inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO)

Le moclobémide, est relativement stable pendant 3 mois avec ou sans ajout de NaF, mais sa concentration diminue jusqu'au 6^{ème} mois pour atteindre des valeurs comprises entre 37 et 52 % de la concentration initiale.

Antidépresseurs non imipraminiques, non IMAO

11 molécules de ce type ont été étudiées. Celles-ci ont été réparties en 2 catégories de molécules :

- molécules stables : le milnacipran et la viloxazine sont très stables, avec ou sans NaF, après 6 mois de stockage. La sertraline est très stable pendant 6 mois, avec NaF, à +4 et -20° C, très stable sans conservateur à -20° C, mais instable sans NaF à température ambiante et +4° C. Le citalopram (mieux conservé avec NaF),

la fluoxétine, la venlafaxine et la mirtazapine sont stables après 6 mois avec ou sans conservateur.

- molécules instables : la miansérine, la tianeptine (très stable pendant 1 mois puis sa concentration diminue de moitié jusqu'au 6^{ème} mois) et la paroxétine (assez stable avec NaF) sont instables après 6 mois de stockage.

La fluvoxamine est très instable : après 6 mois de stockage avec ou sans NaF, il ne reste que 7 à 14 % de la concentration initiale dans le flacon de sang ; de plus, la concentration en fluvoxamine augmente rapidement pendant le 1^{er} mois de conservation puis diminue fortement jusqu'au 6^{ème} mois.

Tableau I : Pourcentage de la concentration initiale restant au cours du temps (conservation avec fluorure de sodium).

			Durée de conservation									
			7 jours	15 jours	1 mois		3 mois		6 mois			
Familles	Classe chimique	Dénomination commune internationale (DCI)	Temp. ambiante	Temp. ambiante	Temp. ambiante	+4°C	-20°C	+4°C	-20°C	+4°C	-20°C	
neuroleptiques	benzamides substituées	amisulpride	78	160	-	184	102	25	81	85	129	
		sulpiride	-	-	-	100	100	100	100	100	100	
		sultopride	100	64	60	85	60	65	60	59	81	
		tiapride	85	86	85	70	80	69	65	72	73	
	butyrophénones	dropéridol	89	75	69	80	80	64	40	41	59	
		halopéridol	100	77	44	53	74	47	52	40	38	
	dibenzodiazépines	clozapine	100	100	100	100	100	96	98	98	97	
		olanzapine	25	16	<1	37	-	40	72	11	17	
	dibenzoxazépine	loxapine	78	84	74	96	102	103	100	105	99	
	phénothiazines	alimémazine	56	49	47	47	43	65	49	44	45	
		chlorpromazine	79	63	58	77	80	38	50	38	54	
		cyamémazine	73	84	93	91	107	94	99	120	96	
		fluphénazine	53	44	31	33	27	5	15	17	26	
		lévopromazine	65	34	34	68	67	51	80	31	41	
		prométhazine	99	83	76	81	84	77	84	61	81	
		thioridazine	68	65	56	66	43	47	33	33	24	
antidépresseurs	imipraminiques	amitriptyline	54	75	76	62	103	66	100	57	64	
		amoxapine	41	14	6	14	33	6	11	0	7	
		clomipramine	82	80	77	81	82	65	66	86	86	
		desipramine	44	8	6	9	16	-	15	9	10	
		dosulépine	89	40	21	31	48	-	22	7	19	
		doxépine	97	80	102	128	110	102	90	106	96	
		imipramine	57	84	79	61	100	70	106	47	50	
		maprotiline	108	101	89	105	109	95	112	86	94	
	IMAO	trimipramine	60	82	61	62	108	64	109	84	87	
	non imipraminiques	moclobémide	95	94	87	86	81	85	82	42	51	
		non IMAO	citalopram	-	-	85	95	94	96	90	93	90
			fluoxétine	101	96	84	121	128	105	95	83	74
			fluvoxamine	98	78	80	128	120	101	78	14	10
			miansérine	89	79	63	80	88	56	62	52	54
			milnacipran	87	98	92	100	96	100	100	108	106
			mirtazapine	99	90	78	92	94	89	85	66	82
			paroxétine	-	-	73	86	84	39	71	42	72
sertraline			100	54	60	100	100	100	100	98	100	
tianeptine			100	100	100	100	100	63	53	50	47	
venlafaxine		-	-	73	75	80	64	73	64	70		
viloxazine	100	114	83	105	104	106	97	109	106			

Tableau II : Pourcentage de la concentration initiale restant au cours du temps (sans conservateur).

			Durée de conservation								
			7 jours	15 jours	1 mois		3 mois		6 mois		
Familles	Classe chimique	Dénomination commune internationale (DCI)	Temp. ambiante	Temp. ambiante	Temp. ambiante	+4°C	-20°C	+4°C	-20°C	+4°C	-20°C
neuroleptiques	benzamides substituées	amisulpride	-	131	182	-	137	-	79	186	117
		sulpiride	-	-	-	88	92	86	89	85	89
		sultopride	78	76	79	91	59	81	76	89	81
		tiapride	100	86	81	79	80	76	78	81	80
	butyrophénones	dropéridol	72	62	44	52	52	67	53	55	61
		halopéridol	100	76	31	35	59	33	52	35	41
	dibenzodiazépines	clozapine	100	100	100	100	100	98	98	99	98
		olanzapine	42	13	5	58	49	42	46	12	36
	dibenzoxazépines	loxapine	86	95	83	93	94	93	87	98	95
	phénothiazines	alimémazine	89	58	53	59	51	77	48	46	37
		chlorpromazine	77	74	57	75	81	36	61	33	58
		cyamémazine	74	70	65	74	87	76	87	107	112
		fluphénazine	50	41	22	56	29	20	4	14	18
		lévopromazine	73	102	-	81	65	99	91	55	45
		prométhazine	53	48	49	69	67	67	66	39	27
		thioridazine	70	42	36	66	44	53	31	31	16
antidépresseurs	imipraminiques	amitriptyline	35	45	32	54	66	44	103	53	44
		amoxapine	66	30	24	21	23	9	11	0	12
		clomipramine	85	83	77	81	81	63	78	72	88
		desipramine	50	10	9	15	19	-	9	9	9
		dosulépine	70	30	17	22	25	-	15	8	13
		doxépine	98	99	101	119	109	111	82	111	98
		imipramine	42	52	39	58	63	58	102	39	37
		maprotiline	104	97	83	92	95	89	93	94	90
		trimipramine	31	38	26	52	61	42	106	48	42
	IMAO	moclobémide	100	100	87	92	81	82	49	52	37
	non imipraminiques	citalopram	-	-	63	74	65	76	74	75	73
		fluoxétine	101	118	75	97	120	109	91	86	67
		fluvoxamine	95	85	81	114	116	108	62	14	7
		miansérine	85	80	71	80	83	56	76	52	60
		milnacipran	85	101	92	95	95	98	99	107	107
		mirtazapine	100	93	79	79	82	78	80	63	61
		paroxétine	-	-	55	66	64	28	40	22	37
sertraline		45	36	33	100	100	67	100	30	93	
tianeptine		100	100	100	100	100	46	53	47	51	
venlafaxine		-	-	65	73	69	70	71	69	66	
viloxazine	103	129	97	99	86	96	95	108	113		

Discussion

Il existe une grande variabilité de stabilité pour ces 37 molécules, selon leur classe chimique et même au sein d'une classe. Il est donc difficile d'établir une loi générale sur la stabilité d'une famille chimique de neuroleptiques ou d'antidépresseurs. Nous avons recensé 15

molécules stables (le sulpiride, le sultopride, le tiapride, la clozapine, la loxapine, la cyamémazine, la clomipramine, la doxépine, la maprotiline, le citalopram, la fluoxétine, le milnacipran, la mirtazapine, la venlafaxine, la viloxazine), 22 molécules instables (l'amisulpride, le dropéridol, l'halopéridol, l'olanzapine, l'alimémazine, la chlorpromazine, la fluphénazine, la

lévopromazine, la prométhazine, la thioridazine, l'amitriptyline, l'amoxapine, la désipramine, la dosulépine, l'imipramine, la trimipramine, le moclobémide, la fluvoxamine, la miansérine, la paroxétine, la sertraline, la tianeptine). Parmi ces 22 molécules, 5 d'entre elles présentaient une apparente augmentation de leur concentration initiale (amisulpride, amitriptyline, imipramine, trimipramine et fluvoxamine).

L'ajout de NaF n'a pas permis de mettre en évidence d'amélioration notable de la stabilité des molécules étudiées. En effet, pour la moitié des molécules, aucune différence importante de stabilité n'a été mise en évidence avec NaF ; dans 1/3 des cas, la stabilité était meilleure avec NaF et dans 1 cas sur 6 la stabilité était meilleure sans le NaF.

L'étude en fonction de la température de conservation (+4° C et -20° C) a montré que la stabilité des molécules était meilleure à +4° C (1 cas sur 4) et à -20° C (4 cas sur 10). Aucune différence notable n'était observée pour 4 molécules sur 10.

Malgré tout le soin apporté à l'élaboration de cette étude, en particulier en tenant compte des observations émanant de l'étude préliminaire réalisée à partir de cas réels, la grande hétérogénéité des résultats obtenus pose le problème primordial des biais méthodologiques non maîtrisés.

Le premier biais concerne la disparité de l'origine du sang témoin ayant servi à réaliser les surcharges. Parmi les laboratoires participants, certains n'ont pas pu obtenir du sang *post-mortem* non putréfié en quantité suffisante, comme cela était préconisé, et ont été contraints de travailler sur du sang provenant de sujets vivants. Deux conséquences importantes en découlent : le statut bactériologique ainsi que les activités enzymatiques plasmatique (estérases) et érythrocytaire (réductases...) des sangs surchargés étaient probablement très différents d'un centre à l'autre. Considérant le phénomène de colonisation par des micro-organismes survenant quelques heures après le décès, ce biais est primordial dans l'étude de la stabilité des substances *in vitro*, puisque la dégradation enzymatique d'origine bactérienne est un des mécanismes responsables de l'instabilité (4,28). Ce processus peut également expliquer les résultats discordants parfois observés pour une même molécule mais provenant de cas réels différents. Comme cela a déjà été démontré pour la production *in vitro* d'éthanol (2) ou de cyanures (29), ou inversement pour la dégradation des nitro-benzodiazépines (13) ou du dérivé glucuronide de la morphine (8), le statut bactériologique initial de l'échantillon sanguin, c'est-à-dire au moment du prélèvement, est également à prendre en compte pour la stabilité d'autres substances toxiques. Parallèlement, il convient de considérer des

phénomènes de dégradation enzymatique tels que l'activité réductase érythrocytaire qui est directement liée à « l'état de fraîcheur » des globules rouges présents (15). L'origine des sangs testés est donc doublement importante lorsque l'on étudie les phénomènes de dégradation *in vitro*.

En corollaire à ce premier biais, le second concerne l'importance de l'ajout d'un conservateur en quantité efficace. Là aussi, selon les laboratoires participants, la concentration en fluorure a été variable. Soit le conservateur était déjà présent dans les flacons prêts à l'emploi du kit autopsique préconisés par la SFTA (30), soit celui-ci était rajouté, dans un délai plus ou moins long, après la réalisation du prélèvement. La concentration de fluorure de sodium a ainsi varié selon les laboratoires entre 0,1 et 2 %. Pour mieux cerner ce problème, il serait nécessaire de savoir exactement à partir de quelle concentration le fluorure de sodium est réellement efficace.

Le 3^{ème} biais ouvre un débat très large, et concerne la validation pour application en toxicologie *post-mortem* des techniques mises en œuvre dans chaque laboratoire. Nous avons en effet mis en évidence, avec cette étude, que 5 molécules présentaient une augmentation apparente de leur concentration et que par ailleurs des molécules d'une même famille chimique présentaient des stabilités très différentes. L'augmentation apparente ne peut pas s'expliquer par un processus de réduction *in vitro* de métabolites oxydés comme cela est décrit parfois pour des cas réels comme la clozapine (16) puisque les échantillons dans le cas présent n'étaient pas surchargés en métabolites.

D'autres hypothèses peuvent être émises. Il peut s'agir d'un phénomène de fixation plus ou moins rapide de la molécule par adsorption sur la surface du contenant ou encore par liaison aux substances endogènes présentes (protéines, amines de putréfaction, ...) suivi d'une phase de défixation. La succession de ces processus soumis également aux différentes conditions de traitement des échantillons (temps d'homogénéisation lors des surcharges, sonication, extraction ...) pourrait être la cause de nombreuses disparités. Les échantillons *post-mortem* ayant des propriétés physico-chimiques particulières, il est primordial de prendre en compte l'effet matrice au moment du dosage, et une démarche de validation adaptée au domaine de la toxicologie *post-mortem* doit être proposée. Lorsque l'effet matrice est trop important, une quantification par ajouts dosés sur l'échantillon à doser pourrait être une solution (4).

Conclusion

Les études sur échantillons surchargés sont complémentaires de celles réalisées à partir de cas réels. Les biais difficilement maîtrisables de cette étude ne sont que le reflet de notre pratique quotidienne. Nous sommes contraints de traiter régulièrement des prélèvements putréfiés et nous réceptionnons malheureusement encore des prélèvements sanguins réalisés sans adjonction de conservateur.

Enfin, ces travaux doivent nous inciter à poursuivre des études de stabilité à +4° C ou -20° C à partir de cas réels ; à œuvrer pour obtenir des prélèvements de la meilleure qualité possible avec un ajout systématique d'adjuvant de conservation (à concentration efficace) dès le moment des prélèvements d'autopsie et de conserver si possible les échantillons à -20° C, dans les phases pré et post analytiques.

Références

1. Pelissier-Alicot A.L., Gaulier J.M., Champsaur P., Marquet P. Mécanismes de la redistribution post-mortem des xénobiotiques : le point sur l'état actuel des connaissances. *Ann. Toxicol. Anal.* 2001 ; 13(1) : 1-17.
2. Jones G. Postmortem Toxicology. In : Moffat A.C., Osselton M.D. Widdop B. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. Third edition, Pharmaceutical Press. 2004 ; 94-108.
3. Drummer O.H., Gerostamoulos J. Postmortem drug analysis : analytical and toxicological aspects. *Ther. Drug Monit.* 2002 ; 24 : 199-209.
4. Skopp G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. *Forensic Sci. Int.* 2004 ; 142 : 75-100.
5. Toennes S.W., Kauert G.F. Importance of vacutainer selection in forensic toxicological analysis of drugs of abuse. *J. Anal. Toxicol.* 2001 ; 25 : 339-343.
6. Clauwaert K.M., Van Bocxlaer J.F., De Leenheer A.P. Stability study of the designer drugs "MDA, MDMA, and MDEA" in water, serum, whole blood and urine under various storage temperatures. *Forensic Sci. Int.* 2001 ; 124 : 36-42.
7. Al-Hadidi K.A., Oliver J.S. Stability of morphine and buprenorphine in whole blood. *Int. J. Legal Med.* 1998 ; 111 : 165-7.
8. Carroll F.T., Marraccini J.V., Lewis S., Wright W. Morphine-3-D glucuronide stability in postmortem specimens exposed to bacterial enzymatic hydrolysis. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2000 ; 21 : 323-9.
9. Skopp G., Potsch L., Klingmann A., Mattern R. Stability of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in fresh blood and plasma and post mortem blood samples. *J. Anal. Toxicol.* 2001 ; 25 : 2-7.
10. Isenschmid D.S., Levine B.S., Caplan Y.H. A comprehensive study of the stability of cocaine and its metabolites. *J. Anal. Toxicol.* 1989 ; 13 : 250-6.
11. Pépin G., Dubourvieux N., Gaillard Y. Difficulté d'interprétation des taux des benzodiazépines et molécules apparentées dans le sang de cadavre prélevé à l'autopsie : étude in vitro après conservation pendant 6 mois à différentes températures. *J. Med. Leg. Droit Med.* 1998 ; 41, 5 : 341-53.
12. Levine B., Blanke R.V., Valentour J.C. Postmortem stability of benzodiazepines in blood and tissues. *J. Forensic Sci.* 1983 ; 28 : 102-15.
13. Robertson D., Drummer O.H. Stability of nitrobenzodiazepines in postmortem blood. *J. Forensic Sci.* 1998 ; 43 : 5-8.
14. Binsumait I.A., Hadidi K.A., Raghid S.A. Stability of fluoxetine in stored plasma, aqueous, and methanolic solutions determined by HPLC with UV detection. *Pharmazie.* 2001 ; 56 (4), 311-313.
15. Elliott S.P., Hale K.A. A previously unidentified acepromazine metabolite in humans : implications for the measurement of acepromazine in blood. *J. Anal. Toxicol.* 1999 ; 23 : 367-371.
16. Patrick K.S., Markowitz J.S. Potential for overestimation of clozapine concentrations. *J. Anal. Toxicol.* 1997 ; 21 : 73-4.
17. Olesen O.V., Linnet K. Determination of olanzapine in serum by high-performance liquid chromatography using ultraviolet detection considering the easy oxidability of the compound and the presence of other psychotropic drugs. *J. Chromatogr.* 1998 ; 714 : 309-315.
18. Stevens H.M. The stability of some drugs and poisons in putrefying human liver tissues. *J. Forensic Sci. Soc.* 1984 ; 24 : 577-89.
19. Takayasu T., Holterman K., Ohshima T., Pounder D.J. Stability of tricyclic antidepressants in formalin solutions. *J. Forensic Sci.* 1998 ; 43 : 1213-19.
20. Holmgren P., Druid H., Holmgren A., Ahlner J. Stability of drugs in stored postmortem femoral blood and vitreous humor. *J. Forensic Sci.* 2004 ; 49 (4), 820.
21. Berthault F., Tracqui A., Kintz P., Mangin P. Intoxication au trichloréthylène et conservation des prélèvements. *Toxicorama.* 1995 ; 7 : 27-33.
22. Jourdil N., Pinteaur B., Vincent F., Marka C., Bessard G. Simultaneous determination of trimipramine and desmethyl- and hydroxy-trimipramine in plasma and red blood cells by capillary gas chromatography with nitrogen-selective detection. *J. Chromatogr.* 1993 ; 613 : 59-65.
23. Kintz P. Difficultés analytiques et d'interprétation dans les expertises toxicologiques liées à la présence de GHB. *J. Med. Leg. Droit Med.* 2002 ; 45 (6) : 293-297.
24. Dictionnaire Vidal 2005 : www.vidal.fr
25. Danel V., Pulse C., Castot A. Phénothiazines. In : Bismuth C., ed. *Toxicologie clinique.* Paris : Médecine-Sciences Flammarion. 2000 ; 144-7.
26. Danel V., Baud F., Castot A. Butyrophénones et benzamides substituées et autres neuroleptiques. In : Bismuth C., ed. *Toxicologie clinique.* Paris : Médecine-Sciences Flammarion. 2000 ; 148-55.
27. Danel V., Leborgne C., Castot A. Antidépresseurs. In : Bismuth C., ed. *Toxicologie clinique.* Paris : Médecine-Sciences Flammarion. 2000 ; 148-55.
28. Robertson D., Drummer O.H. Postmortem drug metabolism by bacteria. *J. Forensic Sci.* 1995 ; 40 : 382-386.
29. Askeland R.A., Morrison S.M. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 1983 Jun ; 45 (6) : 1802-7.
30. Pépin G., Deveaux M., Goullé J.P., Kintz P., Marquet P. Les prélèvements d'autopsie nécessaires à la bonne exécution des expertises toxicologiques. *Toxicorama.* 1998 ; 10 : 110-19.