

**XV<sup>ème</sup> Congrès Annuel  
de la Société Française  
de Toxicologie Analytique  
Paris, 6-8 juin 2007**

*XV<sup>th</sup> Annual Meeting  
of the Société Française  
de Toxicologie Analytique  
Paris, June 6-8, 2007*

**Résumés des communications orales**

- Altérations du comportement
- Toxicologie hospitalière
- Thèmes libres
- Toxicologie professionnelle et environnementale
- Nouvelles approches analytiques
- Recherche des causes de la mort
- Soumission chimique

**Résumés des communications affichées**

## COMMUNICATIONS ORALES

### Conférence plénière

#### Aperçu et actualités analytiques sur les armes chimiques.

##### I. RICORDEL

Laboratoire de Toxicologie de la Préfecture de Police, INPS, Paris

**Introduction :** les armes chimiques constituent encore un risque majeur de destruction massive même si leur emploi fort craint après la première guerre mondiale n'a été, somme toute, que peu fréquent. L'important stock disponible dans de nombreux pays a donné lieu à une convention internationale signée à Paris en janvier 1993, réglant strictement la surveillance et le contrôle de leur destruction. Toutefois, l'usage terroriste potentiel a réactivé la menace.

**Méthode :** les moyens de défense sont, hormis la prévention des effets ou leurs traitements appropriés, la détection fiable de leur présence dans les zones ciblées garantissant également l'efficacité de leur décontamination, mais également dans les matrices diverses concernées par leur usage et leurs conséquences. De nombreux candidats chimiques sont « militarisables » voire potentiellement utiles aux terroristes. En réalité la gamme de produits reste limitée. Il sera évoqué principalement les vésicants et les organophosphorés. La détection (ou dosimétrie biologique pour les militaires) est l'élément princeps de la lutte : elle subordonne la recevabilité d'une allégation d'usage ou de détention ; elle est nécessaire aux études des mécanismes d'action de distribution et de cinétique ; Elle est indispensable à l'optimisation des traitements et pour définir la pertinence des marqueurs. Elle est nécessaire pour contrôler l'efficacité de la décontamination des personnes et de l'environnement. Elle concerne les produits en l'état, les produits dégradés (sulfoxyde et sulfone pour l'ypérite), des adduits covalents sur les protéines (fixation sur la cystéine pour l'ypérite, cholinestérases phosphorylées pour les organophosphorés) ou sur l'ADN. Les matrices concernées sont : les milieux environnementaux, les tissus agressés, les systèmes sanguins, l'urine, la salive, les organes de stockage.

**Résultats :** la méthode conduit à la mise au point de techniques analytiques qui malgré leur contexte d'emploi particulier recourent aux mêmes moyens que ceux utilisés en toxicologie plus conventionnelle. La mise en condition de l'échantillon fait appel, à l'extraction liquide/Liquide, à la SPE, à l'extraction par fluide pressurisé ou en phase supercritique, par désorption thermique. Les outils sont essentiellement la LC-MS et la GC-MS après dérivation, dans leurs divers modes d'approche : Scan, SIM, MRM, MS-MS et MS<sup>n</sup>, selon l'abondance des produits ou métabolites présents. La

RMN est également utile.

**Conclusion et perspectives :** les moyens d'analyses disponibles ont permis de faire un bond considérable dans l'étude de cette menace et de ses conséquences. Les perspectives thérapeutiques sont à la hauteur de ces progrès. La pyridostigmine du traitement préventif pourrait être substituée par un nouvel inhibiteur réversible des cholinestérases, l'huperzine ou mieux par l'usage de butyryl- ou acétyl-cholinestérases ou de paraoxonases humaines ou mutantes. L'amélioration du traitement d'urgence pourrait bénéficier de neuroprotecteurs antagonistes non compétitifs des récepteurs NMDA « antiglutamatergiques » dont la kétamine, à l'étude à plusieurs titres. La thérapie cellulaire *in vivo*, amplifiée par l'administration de cytokines, pourrait constituer une approche prometteuse pour corriger la neuropathologie cérébrale entraînée par les neurotoxiques organophosphorés. Enfin, l'archaïsme des moyens de protection et de décontamination actuels doivent bénéficier à court et moyen terme de concepts nouveaux, impliquant entre autres la greffe cutanée de cellules souches et la dermoabrasion contrôlée.

---

### Altérations du comportement

#### Aspects légaux de la consommation de cannabis et de la conduite sous son influence en Europe et dans le monde.

##### A. VERSTRAETE

Laboratoire de Biologie Clinique, Hôpital Universitaire, Gent, Belgique

**Introduction :** les Conventions des Nations Unies classent les stupéfiants dans quatre tableaux en raison de leur danger pour la santé, du risque d'abus et de leur valeur thérapeutique. Le cannabis est classé dans le tableau I (substance ayant des propriétés entraînant une dépendance et présentant un sérieux risque d'abus) et dans le tableau IV (substances les plus dangereuses, en raison de leurs risques d'abus, de leurs caractéristiques particulièrement nocives et de leur valeur médicale ou thérapeutique extrêmement limitée).

**Aspects légaux de la consommation de cannabis :** en vertu des Conventions des Nations Unies, l'usage de toutes les drogues classées doit être limité à des fins médicales et scientifiques. Donc l'usage récréatif peut être considéré comme une violation des normes internationales. Les Conventions caractérisent comme des infractions punissables la détention, l'achat, la distribution ou la mise en vente, etc. et recommandent qu'une partie soit considérée comme des délits graves passibles de peines privatives de liberté. Mais les Conventions ne mentionnent pas l'usage simple parmi les infractions punissables, bien que chaque pays ait la liberté d'établir l'usage simple de drogue comme un délit spécifique. L'Union européenne se reporte aux

classifications prévues par les Conventions des Nations unies. Le règlement «Lin et chanvre» admet l'exploitation industrielle des variétés de cannabis contenant moins de 0,2 % de THC. Six pays de l'Union Européenne (Chypre, France, Finlande, Grèce, Suède et Norvège), considèrent l'usage simple de cannabis comme une infraction pénale et 4 pays comme une infraction administrative (Estonie, Espagne, Lettonie et Portugal). Les autres États membres interdisent l'usage simple de stupéfiants par le biais de l'interdiction des actes préparatoires à l'usage, et en particulier, la détention. Plus de 50 % des infractions liées à la drogue dans l'UE concernent l'usage ou la détention de stupéfiants pour usage personnel. En 2001, le cannabis restait la substance le plus souvent en cause dans les infractions liées à la drogue - représentant 59 % en Autriche, 67 % en Belgique, 73 % au Royaume Uni, 63 % en Grèce et 86 % en France. La quantité de drogue en possession du contrevenant est déterminante pour la peine. La quantité est un des principaux critères dans la distinction légale entre la détention pour usage personnel et le trafic ou lors de la détermination de la gravité de l'infraction. La définition de la quantité et la façon dont elle est prise en compte dans la classification des infractions varient d'un pays à l'autre dans l'UE. Dans plusieurs pays de l'UE, l'action publique vis-à-vis de l'usage et/ou de la détention pour usage personnel de cannabis semble se fonder sur: a) une volonté affirmée de privilégier le traitement plutôt que les sanctions d'ordre criminel; b) sur un sentiment de disproportion existant entre des condamnations à des peines d'emprisonnement et la consommation de drogues; et c) sur la perception que le cannabis est moins dangereux à la santé, comparé à d'autres drogues. Si certains pays tendent vers la 'légalisation' du cannabis, dans d'autres pays les lois restent fondées sur la prohibition et la criminalisation de l'usage de drogues (France, Suède) et d'autres paraissent évoluer dans cette direction (Italie).

**Aspects légaux de la conduite sous influence de cannabis :** six pays de l'UE ont une législation de type analytique, avec de seuils de positivité variant entre 0,3 et 2 ng/mL dans le sang ou le plasma. L'approche légale et politique de l'usage de drogue, et de l'usage de cannabis en particulier, demeure un sujet extrêmement controversé qui soulève des questions complexes et difficiles.

## Bilan de l'enquête analytique réalisée en 2006 auprès des laboratoires participant au Contrôle Externe de Qualité « Stupéfiants dans le sérum ».

I. MOREL<sup>(1)</sup>, M. MOULSMA<sup>(2)</sup>, A. TURCANT<sup>(3)</sup>, A.L. PELISSIER-ALICOT<sup>(4)</sup>

(1) Laboratoire des Urgences, CHRU Pontchaillou, Rennes ;

(2) UF Pharmacotoxicologie et Analyse des Éléments

Traces, Hôpital Edouard Herriot, Lyon ;

(3) Laboratoire de Pharmacologie, CHU, Angers ;

(4) Service de Médecine Légale, CHU La Timone, Marseille.

**Objectifs :** Décrire les résultats obtenus lors de la campagne du Contrôle Externe de Qualité « Stupéfiants dans le Sérum » 2006 au regard des procédures analytiques utilisées.

**Méthodes :** un questionnaire relatif aux procédures d'extraction et d'analyse a été fourni pour chaque classe de stupéfiants, certaines classes regroupant deux analytes présents dans le contrôle : opiacés (morphine et codéine), cocaïniques (BE), amphétamines (MDMA), cannabinoïdes (THC et THC-COOH). Un tri à plat (logiciels Excel, Analyse-it, Xlstat) a permis la description de la distribution des valeurs rendues pour chacun des analytes dosés (moyenne, écart-type, CV%, médiane, quartile 25, quartile 75, distance interquartile). La normalité de chaque distribution est vérifiée ainsi que ses degrés d'asymétrie et d'aplatissement. La recherche de convergence entre la moyenne et la valeur médiane a conduit à l'exclusion des valeurs aberrantes ou extrêmes, situées en dehors d'un intervalle de confiance de 95% (IC 95%) autour de la moyenne. L'analyse descriptive a été effectuée selon des plans factoriels par analyse de la variance afin de comparer les résultats obtenus au moyen des différentes méthodes d'extraction et des différentes techniques séparatives.

**Résultats :** cinquante six laboratoires ont participé au contrôle qualité. 46 participants ont répondu de manière exploitable, parmi lesquels 29 (51,8%) ont fourni les 6 réponses attendues, 18 (32,1%) en ont fourni 5, 5 en ont fourni 4 (8,9%) et 4 en ont fourni 3 (7,1%). Au total, 296 réponses globales ont été recueillies sur les 336 attendues, soit 88%.

	Amphétamines	Cannabis		Cocaïne	Opiacés	
	MDMA	THC	THC-COOH	BE	Codéine	Morphine
n : Extraction (LLE/SLE)%	53 (83/17)	35 (97/3)	50 (96/4)	53 (62/38)	53 (64/36)	53 (64/36)
n : Séparation (GC/LC)%	(87/13)	(89/11)	(92/8)	(87/13)	(87/13)	(87/13)
Mini - Maxi (g/L) (n)	25-58,3 (55)	0 - 12,3 (38)	0 - 9,4 (51)	0 - 99,8 (49)	2,5 - 63,7 (50)	10,9 - 216 (53)
m ± s (g/L)* CV% (n)	44,4 ± 5,2 (51)	0,57 ± 0,14 (28)	6,08 ± 1,15 (47)	39,4 ± 11,3 (46)	18,3 ± 1,84 (36)	37,5 ± 8,3 (49)

Les procédures d'extraction sont dominées par la LLE pour les cannabinoïdes (96% des laboratoires) et la MDMA (83%). Pour les opiacés et la benzoylecgonine, la répartition est de 60% pour la LLE versus 40% pour la SLE. Pour ces derniers analytes, les tests de comparaison montrent l'absence de différence entre ces 2 méthodes. 85% des analyses sont réalisées en GC-MS, 10,3% en LC-MS/MS. La GC-MS reste la méthode la plus employée et la mieux maîtrisée par les laboratoires participants. Seuls 12 participants ayant fourni leurs LOD et LOQ, ces données ne sont donc pas exploitables.

**Conclusion :** dans la gamme des concentrations en analytes présentes dans les contrôles 2006, la GC-MS

conduit à une large majorité de résultats acceptables. Par ailleurs, le choix de la méthode d'extraction n'a pas d'influence sur la qualité des résultats communiqués. Cependant la qualité de la transmission des informations dans le cadre des futurs contrôles de qualité est primordiale afin de suivre l'évolution des technologies employées d'années en années, d'en faire la synthèse et le lien avec l'acceptabilité des résultats fournis.

## **Implication des psychotropes licites et illicites dans les accidents de travail. Etude de prévalence sur les cas survenus entre 2004 et 2006.**

J. ARDITTI<sup>(1)</sup>, M. GLAIZAL<sup>(1)</sup>, M. DEVEAUX<sup>(2)</sup>, V. DUMESTRE-TOULET<sup>(3)</sup>, H. EYSSERIC<sup>(4)</sup>, C. GANIERE<sup>(5)</sup>, J.M. GAULIER<sup>(6)</sup>, M.H. GHYSEL<sup>(7)</sup>, J.P. GOULLE<sup>(8)</sup>, M.F. KERGUERIS<sup>(5)</sup>, P. KINTZ<sup>(9)</sup>, L. LABAT<sup>(10)</sup>, I. MOREL<sup>(11)</sup>, M. PERRIN<sup>(12)</sup>, I. RICORDEL<sup>(13)</sup>, M.T. THEVENOT<sup>(14)</sup>, A. TURCANT<sup>(15)</sup>, P. VISINONI<sup>(16)</sup>, P. MURA<sup>(17)</sup>

(1) CEIP, Marseille ; (2) Laboratoire TOXLAB, Paris ; (3) Laboratoire TOXGEN, Bordeaux ; (4) CHU, Grenoble ; (5) CHU, Nantes ; (6) CHU, Limoges ; (7) LPS, Lille ; (8) CH, Le Havre ; (9) Laboratoire CHEMTOX, Illkirch ; (10) CHU, Lille ; (11) CHU, Rennes ; (12) IRCGN, Rosny-sous-bois ; (13) INPS, Paris ; (14) LPS, Lyon ; (15) CHU, Angers ; (16) LPS, Toulouse ; (17) CHU, Poitiers ;

**Introduction :** dans le cadre de la commission "Conduites addictives en milieu professionnel" de la SFTA, l'intérêt d'une meilleure connaissance de l'implication des psychotropes licites et illicites dans les accidents de travail a été soulevé. En partenariat avec la commission "Toxicologie judiciaire" il a donc été décidé et mis en oeuvre une étude de prévalence rétrospective sur les années 2004, 2005 et 2006 concernant ce phénomène.

**Méthodes :** le recueil des cas auprès des laboratoires de toxicologie et pharmacologie volontaires s'est fait au moyen d'une fiche anonyme précisant : la date, le département, le type (mortel/corporel) et les circonstances de l'accident ; le sexe, l'âge et la branche professionnelle de la victime ; l'identification et la concentration sanguine des substances psycho-actives retrouvées. Les fiches transmises par les participants ont été saisies et exploitées sous le logiciel Access®.

**Résultats :** dix neuf laboratoires ont répondu à l'étude, dont 2 pour indiquer qu'ils n'avaient pas de cas à déclarer (outil informatique inadapté ou pas de cas correspondant aux critères), transmettant au total 176 fiches incluses dans l'étude. 114 (65%) concernent des accidents mortels et 56 (32%) des accidents corporels (6 non renseignés). Environ 2/3 des circonstances rapportées (60/93) sont des chutes, des écrasements ou des accidents de circulation. Les victimes sont à 97% des

hommes (171 vs 4 femmes, 1 non renseigné), et leur âge moyen est de 38,8 ans (Hommes 38,9 ans, Femmes 27 ans). La branche professionnelle, parfois imprécise, n'est indiquée que dans 41% des cas. Le « Bâtiment et Travaux Publics » en représente près d'un tiers (23/73). La recherche toxicologique est positive dans 32% des cas (41% des accidents corporels et 30% des mortels). Les substances les plus retrouvées sont l'éthanol avec 32 cas (18,2%) dont 23 >0,5g/L et le cannabis avec 20 cas (11,3%) dont 3 associés à l'éthanol (2 >0,5g/L). Dans 7 cas (4%), des médicaments psychotropes ont été retrouvés (2 associés à l'éthanol), et les 4 cas d'opiacés concernaient tous la morphine (1 associé au cannabis). Les victimes positives au cannabis sont plus jeunes (moyenne 26,8 ans vs 38,6 pour l'éthanol, 45,5 pour les médicaments psychotropes et 40,5 ans pour ceux sans substance retrouvée).

**Conclusion :** l'éthanol et le cannabis sont retrouvés dans une part significative des accidents du travail. Les résultats de cette étude nous invitent à poursuivre ce travail, en réalisant une étude cas-témoins afin de pouvoir mieux préciser le sur-risque (odds-ratio) d'accidents du travail lié à un usage récent de psychotropes licites et illicites. Par ailleurs, un tel constat apporte la preuve de la nécessité de légiférer dans ce domaine, afin de combler le vide juridique existant.

## **Prévalence d'usage des stupéfiants, de l'éthanol et de la buprénorphine chez des conducteurs d'automobiles de moins de 30 ans décédés dans un accident de la voie publique en 2005 et 2006 en France.**

P. MURA<sup>(1)</sup>, M. DEVEAUX<sup>(2)</sup>, V. DUMESTRE-TOULET<sup>(3)</sup>, J.M. GAULIER<sup>(4)</sup>, M.H. GHYSEL<sup>(5)</sup>, P. KINTZ<sup>(6)</sup>, E. KUHLMANN<sup>(7)</sup>, C. LACROIX<sup>(8)</sup>, L. HUMBERT<sup>(9)</sup>, I. MOREL<sup>(10)</sup>, M. MOULSMA1<sup>(11)</sup>, G. PEPIN<sup>(2)</sup>, Y. RICORDEL<sup>(12)</sup>, N. SADEG<sup>(13)</sup>, M.T. THEVENOT<sup>(14)</sup>, F. VINCENTI<sup>(15)</sup>, P. VISINONI<sup>(16)</sup>

(1) Laboratoire de toxicologie et pharmacocinétique, CHU, Poitiers ; (2) Laboratoire TOXLAB, Paris ; (3) Laboratoire TOXGEN, Bordeaux ; (4) Laboratoire de pharmacologie et toxicologie, CHU, Limoges ; (5) LPS, Lille ; (6) Laboratoire ChemTox, Illkirch ; (7) LPS, Marseille ; (8) Laboratoire de toxicologie, CH, Le Havre ; (9) Laboratoire de toxicologie, CHU, Lille ; (10) Laboratoire des Urgences, CHU, Rennes ; (11) Laboratoire de biochimie et toxicologie, CHU, Lyon ; (12) INPS, Paris ; (13) Laboratoire, CH Pontoise ; (14) LPS, Ecully ; (15) Laboratoire de toxicologie, CHU, Grenoble ; (16) LPS, Toulouse

**Objectif :** il s'agit de déterminer la prévalence de l'usage de stupéfiants, de l'éthanol et de la buprénorphine chez des conducteurs d'automobiles en France décédés dans un accident de la circulation pendant la période du 1er janvier 2005 au 31 décembre 2006.

**Méthodes :** ont été inclus les conducteurs de moins de 30 ans décédés dans un accident mortel de la circulation. Seize laboratoires ont participé à l'étude, de manière rétrospective pour l'année 2005 et de manière prospective pour 2006 en incluant le dosage de la buprénorphine. Les stupéfiants ont été analysés dans le sang total par GC-MS, l'éthanol par CPG-FID et la buprénorphine par méthode ELISA.

**Résultats :** sur la période concernée, 908 échantillons sanguins ont été inclus dans l'étude. Le nombre d'analyses réalisées par paramètre et les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

	Analyses réalisées	Nombre de positifs	Prévalence
THC-COOH (> 2 ng/mL)	902	316	35,0 %
THC (> 0,5 ng/mL)	902	249	27,6 %
Benzoylcgonine (> 20 ng/mL)	889	24	2,7 %
Morphine (> 20 ng/mL)	889	24	2,7 %
Amphétamines (> 20 ng/mL)	885	10	1,1 %
Alcool (> 0,5 g/L)	453	137	30,2 %
Buprénorphine (> 0,5 ng/mL)	329	3	0,9 %

Le cannabis est le produit le plus fréquemment retrouvé, avec 35% de consommateurs et 27,6% de sujets ayant consommé dans les heures précédentes. Le THC était le seul stupéfiant présent dans 94,3% des cas, l'association la plus fréquente étant observée avec la cocaïne (9 cas). L'association du THC avec l'éthanol a concerné 66 cas soit 26,5% des THC positifs.

**Conclusion :** si la prévalence d'usage de la buprénorphine chez les conducteurs (inconnue jusqu'alors) s'avère être très faible, il n'en est pas de même pour l'éthanol et les stupéfiants et en particulier pour le cannabis qui occupe la première place. Avec 27,6% de conducteurs décédés sous influence de cannabis, ce résultat est très largement supérieur à celui présenté dans une vaste étude publiée récemment dans *British Medical Journal* (8,8%). Cette discordance s'explique par le fait que dans notre étude la population ciblée était celle des moins de 30 ans mais aussi parce que notre protocole (conducteurs décédés) écartait le problème des prélèvements effectués chez le vivant de nombreuses heures après le moment de l'accident.

## Toxicologie hospitalière

### Dermopathie néphrogénique fibrosante sévère et gadolinium, produit de contraste IRM.

E. SAUSSEREAU<sup>(1)</sup>, C. LACROIX<sup>(1)</sup>, A. CATTANEO<sup>(2)</sup>, L. MAHIEU<sup>(1)</sup>, J.P. GOULLÉ<sup>(1)</sup>

(1) Laboratoire de Pharmacocinétique et de Toxicologie Cliniques, Groupe Hospitalier, Le Havre ;  
(2) Service de Néphrologie-Dialyse, Croix Rouge Française, Hôpital et Institut de Soins Infirmiers, Rouen.

**Objectif :** le gadolinium, ion métallique (Gd<sup>3+</sup>) à propriétés paramagnétiques, est utilisé en médecine

comme produit de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM). Les effets toxiques de Gd<sup>3+</sup>, comme la compétition avec les systèmes calcium-dépendants, sont masqués dans les produits de contraste par sa complexation sous forme d'un chélate. Nous décrivons un cas d'intoxication sévère au gadolinium chez une patiente de 62 ans, hémodialysée depuis 1999 suite à une binéphrectomie pour un adénocarcinome bilatéral. Le suivi de cette patiente sur le plan oncologique, s'effectue par IRM du fait d'une réaction allergique à l'iode avec œdème de Quincke ; elle en a passé 13 sur une période de 3 ans (mai 2003-juillet 2006). En janvier 2005, la malade a présenté des signes cliniques, en particulier cutanés (enflure et durcissement de la peau), évoquant une dermopathie néphrogénique fibrosante (DNF). Ce diagnostic a été confirmé par une biopsie cutanée.

**Méthodes :** le dosage du gadolinium (<sup>157</sup>Gd) a été effectué dans deux échantillons sanguins (sang total et plasma) obtenus à 3 mois et demi d'intervalle ; le premier prélèvement ayant été réalisé 3 mois après la dernière IRM. Des dosages ont également été réalisés dans des cheveux prélevés deux mois après la dernière IRM, et dans des ongles obtenus avec le second échantillon sanguin. Pour ces deux matrices biologiques, cheveux et ongles, une décontamination (acétone, eau tiède) et une minéralisation acide (HNO<sub>3</sub> suprapur) ont été réalisées préalablement au dosage. Les mesures ont été pratiquées avec un spectromètre X7CCT Thermo Elemental (ThermoOptek, Courtaboeuf, France), sans cellule dynamique de réaction, équipé d'un passeur d'échantillon et du logiciel PlasmaLab. La quantification du <sup>157</sup>Gd dans les différentes matrices biologiques a été effectuée après leur dilution, au 1/10<sup>ème</sup> pour le sang et au 1/40<sup>ème</sup> pour les phanères (butanol 5 %, acide nitrique 1 %, triton 0,01 % sauf sang total 0,1 % ; étalon interne : Rh 1 ppb). L'étalonnage a été réalisé dans de l'eau purifiée.

**Résultats :** dans le premier prélèvement sanguin, les concentrations plasmatiques et dans le sang total en <sup>157</sup>Gd sont de 11,60 et 36,30 ng/mL. Trois mois et demi plus tard, ces concentrations sont de 2,60 et 1,80 ng/mL. Des dosages réalisés chez des sujets non exposés au gadolinium, ont permis d'observer des concentrations sanguines toujours inférieures à 0,10 ng/mL. Dans la mèche de cheveux de 7 cm prélevée, segmentée en fragments de 1 cm, les teneurs en <sup>157</sup>Gd varient de 0,03 à 1,09 ng/mg. Dans les ongles, la teneur en <sup>157</sup>Gd est de 1,23 ng/mg chez la malade, elle oscille de 0,16 pg/mg à 26,20 pg/mg chez 100 témoins.

**Conclusion :** la dermopathie néphrogénique fibrosante est une pathologie rare, à évolution rapide, pouvant être légère à invalidante, voire mortelle dans de rares cas. Elle est observée chez des sujets insuffisants rénaux et en acidose, ayant été exposés à des produits de contraste à base de gadolinium. Le nombre de cas de DNF décrits a augmenté parallèlement à l'utilisation de plus

en plus fréquente des IRM et des produits de contraste contenant du gadolinium ; les doses injectées en routine ayant également augmenté. Le cas clinique décrit, qui est le premier cas où des dosages sanguins, capillaires et unguéaux ont été réalisés, semble confirmer ce lien de cause à effet entre une exposition au gadolinium et la DNF chez les sujets atteints d'insuffisance rénale chronique. D'autant plus que notre patiente a subi de nombreuses IRM et a donc été exposée à de très fortes doses de gadolinium. Ainsi, cette nouvelle observation de DNF pose le problème de la pratique de l'IRM avec ces produits de contraste à base de gadolinium chez les sujets insuffisants rénaux chroniques.

### **Intoxication volontaire à la spiroxamine : première observation humaine et données toxicologiques par LC-MS/MS.**

C. JAMEY<sup>(1)</sup>, A. TRACQUI<sup>(1)</sup>, F. FLESCHE<sup>(2)</sup>, K. FADY<sup>(3)</sup>, B. LUDES<sup>(1)</sup>

(1) Laboratoire de Toxicologie, Institut de Médecine Légale, Strasbourg ;

(2) Centre Antipoison, CHU, Strasbourg ;

(3) Service de Réanimation Médicale, CHU, Strasbourg.

**Introduction :** nous présentons le cas d'un homme de 37 ans retrouvé à son domicile, dans un état comateux, à côté d'une bouteille de spiroxamine (500 g/L) vidée de son contenu. Ce patient, dépressif, ouvrier dans une exploitation viticole, avait déjà été hospitalisé à 11 reprises pour intoxications volontaires par insecticides organophosphorés. Dans le cadre d'une cinétique d'élimination, des prélèvements sanguins et urinaires ont été pratiqués par le service de réanimation médicale. A l'occasion de cette étude, nous avons développé une méthode de dosage de la spiroxamine par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

**Méthodes :** dans un tube Eppendorf de 1,5 mL, on ajoute 50 µL d'échantillon, 2 ng de prazépam (standard interne), 200 µL de tampon phosphate pH 7,5 et 800 µL de cyclohexane. Après agitation (vortex, 30 s), centrifugation (10500 g, 5 min) et évaporation, l'extrait sec est repris par 50 µL de méthanol et 10 µL sont injectés dans un système HPLC Alliance<sup>TM</sup> (Waters) couplé à un spectromètre de masse Quattro Micro<sup>TM</sup> (Waters). La séparation est réalisée sur une colonne XTerra C18, 3,5 µm (Waters), 100 x 2,1 mm i.d. avec un gradient ACN/NH<sub>4</sub>COOH 2mM ajusté à pH 3,0. L'acquisition se fait en mode MRM en sélectionnant les transitions suivantes : 299,2 > 144,0 et 99,8 (spiroxamine) ; 324,9 > 271,0 (prazépam).

**Résultats :** les temps de rétention respectifs sont de 6,87 min pour la spiroxamine et de 8,24 min pour le prazépam. La validation de la méthode a donné les résultats suivants : les limites de détection et de quan-

tification sont respectivement de 0,02 ng/mL et 0,05 ng/mL. Les rendements d'extraction déterminés sur 3 concentrations (2 ; 50 et 500 ng/mL) sont supérieurs à 76 %. La linéarité ( $r^2 = 0,999$  sur 11 points entre LOQ et 1000 ng/mL), la répétabilité et la reproductibilité (CV < 12 % pour 3 niveaux de contrôle) sont satisfaisantes. L'exactitude est comprise entre 94,5 % et 110,4 %. Aucun effet significatif de la matrice n'a été observé. La spiroxamine a été identifiée et dosée dans les prélèvements sanguins aux concentrations suivantes : sang 10070 ng/mL (J0) ; 1500 ng/mL (J2) ; 430 ng/mL (J5) ; urines 18780 ng/mL (J0) ; 42220 ng/mL (J2) ; 1600 ng/mL (J5).

**Conclusion :** l'analyse par couplage LC-MS/MS a permis la confirmation de la prise aiguë de spiroxamine. Il s'agit à notre connaissance du premier cas d'intoxication aiguë décrit chez l'homme. Le patient, traité par Contrathion®, a eu une évolution favorable après 15 jours de réanimation.

### **Le cocktail artisanal couleur « Blue Lagoon » s'est révélé être fatal.**

D. ROUSSEL<sup>(1)</sup>, L. HUMBERT<sup>(1)</sup>, C. RICHEVAL<sup>(1)</sup>, C. QUEINNEC<sup>(2)</sup>, G. BRUNIN<sup>(3)</sup>, M. LHERMITTE<sup>(1)</sup>, N. HOUDRET<sup>(1)</sup>

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

(2) Laboratoire de Biochimie, CH, Boulogne-sur-Mer ;

(3) Service de Réanimation Médicale Polyvalente, CH, Boulogne-sur-Mer.

**Introduction :** une patiente de 68 ans traitée pour hypothyroïdie, diabète et dépression est découverte inanimée sur la voie publique et prise en charge par le SMU pour un arrêt cardio-respiratoire. Sur place, la réanimation entreprise permet la récupération d'une activité circulatoire. A ses côtés sont retrouvés un pilon et une bouteille d'eau contenant un produit épais bleu vert. A l'hôpital, l'évolution clinique sera marquée par l'absence de réveil malgré l'arrêt de toute sédation, la persistance d'une mydriase aréactive avec une tomodensitométrie cérébrale ne montrant pas de lésions neurologiques pouvant expliquer son état clinique. A son admission, un lavage gastrique a été pratiqué et dans les premières heures, une polyurie avec couleur bleu lagon est notée. Les prélèvements toxicologiques ont été faits 14 heures après son admission. L'évolution de la patiente sera défavorable, elle décèdera à J+13.

**Méthodes :** un prélèvement sanguin sur tube sec, un flacon d'urine et la bouteille retrouvée à ses côtés nous ont été adressés. Un screening immunologique a été réalisé sur le sérum et l'urine. Après extraction liquide-liquide, les trois prélèvements sont analysés par les couplages HPLC-DAD et LC-ESI-MS.

**Résultats :** l'analyse des prélèvements ne révèle aucun des médicaments utilisés dans la thérapeutique de la

patiente, mais la présence des molécules suivantes :

	Screening immunologique	HPLC/DAD	LC/ESI/MS
Sang	Phénobarbital : 31,4 mg/L Benzodiazépines + Alcool : 0 g/L	Phénobarbital	Phénobarbital, Zopiclone : 2 g/L Méprobamate : 57 mg/L Zolpidem : 68 g/L Flunitrazépam : 33 g/L 7-aminoflunitrazépam : 51 g/L
Urine	Barbituriques + Benzodiazépines +	Zopiclone, Aceprométazine et métabolites, Zolpidem, Cétirizine	Phénobarbital, Méprobamate Zopiclone, Zolpidem 7-aminoflunitrazépam Aceprométazine, Cétirizine
Bouteille	Non effectué	Zopiclone, Zolpidem, Phénobarbital, Flunitrazépam	Zopiclone, Zolpidem, Méprobamate, Aceprométazine Flunitrazépam, Phénobarbital

**Conclusion :** le contenu de la bouteille de couleur bleu vert pouvait correspondre soit à des excipients de médicaments tel le flunitrazépam, à un sel comme le sulfate de cuivre ou encore à des produits d'origine diverse. Les résultats ont montré qu'il ne correspondait pas à la thérapeutique de la patiente. Les médicaments ingérés plus de 14 heures avant les prélèvements toxicologiques ont été détectés à des concentrations toxiques voire létales en considérant la demi-vie d'élimination de ces médicaments. Elles expliquent l'insuffisance respiratoire à la découverte de la patiente et les problèmes neurologiques qui ont conduit à une défaillance polyviscérale. Le couplage LC-ESI-MS, une technique de plus en plus abordable, permet en toxicologie hospitalière sur une seule analyse de mettre en évidence les substances qui ne sont pas détectées par HPLC-DAD, faute d'absorbance dans le domaine UV, et d'effectuer le dosage de molécules dont les seuils toxiques sont très faibles.

## Apport de l'analytique dans le diagnostic et le suivi thérapeutique des intoxications sévères par l'arsenic.

P. NISSE<sup>(1)</sup>, J. POUPON<sup>(2)</sup>, C. CEZARD<sup>(1)</sup>, A. VILLA<sup>(4)</sup>, L. LABAT<sup>(3)</sup>

- (1) Centre Antipoison, CHRU, Lille ;
- (2) Centre de Toxicologie, Hôpital Lariboisière, Paris ;
- (3) Laboratoire de Toxicologie & Génopathies, CHRU, Lille ;
- (4) Centre Antipoison, Hôpital Fernand Widal, Paris.

**Introduction :** l'arsenic est un toxique très répandu dans l'environnement et largement utilisé dans l'industrie. Si la littérature relate de nombreux décès à l'arsenic, les intoxications sévères qui évoluent favorablement sont moins fréquentes. Nous rapportons 1 cas d'intoxication qui illustre bien la complémentarité analytique et clinique en particulier pour l'adaptation de la thérapeutique.

**Cas clinique :** un homme de 21 ans ingère la moitié du contenu d'un flacon de 50g de cristaux d'arséniate de sodium, flacon appartenant à ses parents, pharmaciens. Dans l'heure qui suit, il présente des vomissements incoercibles. Sa prise en charge hospitalière comporte une évacuation digestive, l'administration de charbon activé. La radiographie de thorax et l'abdomen sans

préparation ne retrouvent pas d'éléments radio-opaques. Un traitement chélateur par le BAL est instauré, 5 mg/kg toutes les 4 heures en IM pendant 6 jours puis 3,5 mg/kg toutes les 6 heures pendant 48 heures et relayé ensuite par du DMSA, 10 mg/kg toutes les 8 heures pendant 8 jours. L'évolution sera marquée par une rhabdomyolyse (CPK à 7000 UI/L) et une hépatite modérée (ASAT 187 UI/L et ALAT 255 UI/L). Le patient n'a pas présenté de complication cardiaque ni neurologique.

**Analytises :** l'arsenic sérique a été dosé par Spectrométrie d'absorption atomique électrothermique Zeeman (SAAET) (Perkin Elmer 5100). L'arsenic total urinaire a été dosé par spectrométrie d'émission optique en plasma induit (ICP-OES) (Jobin Yvon JY24). Les cheveux ont été lavés par 3 cycles acétone et eau puis découpés en fragments de 1 cm. Après minéralisation par HNO<sub>3</sub> à chaud, l'arsenic a été dosé par SAAET. Avant le lavage gastrique, la concentration en arsenic dans le liquide gastrique est à 5 604 µg/L et à 3,7 µg/L en fin de lavage gastrique; le suivi analytique est résumé dans le tableau suivant :

	J0	J1	J2	J3	J5	J10	J16	J24
As plasma ( g/L )	6 789	344	-	71	92	46	25	12
As U ( g/g créat )	-	12 075	16 330	2 154	1 357	215	77	57

Dist. cheveux/scalpe (période)	5cm : (15/12-15/01)	4cm : (16/01-15/02)	3cm : (6/02-15/03)	2cm : (16/03-15/04)	1cm : (16/04-15/05)
As ( g/g cheveux )	0,517	16,951	16,277	2,7	1,708

**Discussion :** l'intoxication aiguë par l'arsenic se caractérise par des signes gastro-intestinaux intenses et une insuffisance rénale. Secondairement, peuvent apparaître une myocardite une hépatite cytolytique, une polyneuropathie ou une encéphalopathie. L'absorption digestive de l'arséniate de sodium est importante et rapide, du fait de sa grande solubilité, et la distribution dans les différents organes (foie, muscles, os) très rapide, ce qui explique les concentrations sériques initiales élevées et les impacts musculaire et hépatique, malgré la prise en charge très précoce. L'absence de complication grave dans ce cas d'intoxication à dose très élevée, confirmée par les niveaux plasmatiques initiaux, s'explique probablement par l'efficacité du traitement chélateur. La normalisation rapide des taux d'arsenic sérique ne permet pas d'évaluer l'efficacité du traitement chélateur. Les dosages réitérés de l'arsenic sur les urines permettent de suivre l'élimination du toxique et de contrôler l'efficacité du BAL ou du DMSA. Il est ainsi possible de stopper les chélateurs dès que les taux urinaires d'arsenic total passent sous le seuil des 40 µg/L.

**Conclusion :** la recherche de toxique est un outil de diagnostic étiologique pour le clinicien, mais le monitoring analytique permet aussi de suivre l'efficacité des traitements chélateurs au décours d'intoxications sévères par l'arsenic et de suspendre la thérapeutique par le BAL ou le DMSA au moment le plus opportun.

## Évolution de la qualité grâce au management par les processus : cas particulier d'un laboratoire de toxicologie.

C. MEIGNANT, J.E. CAUSSE, G. CASSAGNE

Laboratoire Spectran, Centre Hospitalier de Bigorre, Tarbes

**Introduction :** notre objectif est de présenter un cas concret de mise en œuvre d'une démarche de management par processus dans un laboratoire de toxicologie. Il s'agit d'une méthode continue d'analyse, d'évaluation et d'amélioration de la performance des processus centrée sur les besoins et les attentes des clients. L'analyse de cet exemple permet de dégager les aspects positifs et l'intérêt de cette approche qualité dans ce secteur d'activité.

**Méthodes :** l'étude s'intéresse dans un premier temps aux étapes de déploiement de l'approche processus au sein du laboratoire Spectran. La deuxième partie analyse les répercussions concrètes de cette démarche grâce à des exemples précis.

**Résultats :** la mise en œuvre de cet outil a permis de déterminer 12 processus au niveau du laboratoire Spectran et des interfaces avec le Centre Hospitalier. Trois processus de management : « Pilotage du laboratoire », « Management qualité » et « Management des ressources » ; trois processus de réalisation « Mise au point des méthodes, recherche et développement », « Réalisation des analyses » et « Evaluation de la qualité des analyses » ; et enfin, six processus de support « Achats », « Hygiène, sécurité et environnement », « Matériels et infrastructures », « Système d'information », « Ressources humaines », « Système de facturation ». Chacun de ces processus est subdivisé en sous processus. Après les étapes d'identification, de cartographie et de description précise des processus, un choix est effectué pour déterminer les processus clés. En effet, pour se centrer sur l'amélioration des performances, le laboratoire a choisi de travailler plus particulièrement sur des processus définis comme prioritaires. Ils ont été déterminés selon trois critères principaux : leur contribution au résultat final et à la satisfaction des clients, le constat de dysfonctionnements et enfin les exigences particulières de la réglementation. Chaque processus est piloté et amélioré par un responsable désigné, en collaboration avec le reste de l'équipe et selon une méthodologie prédéfinie. Le processus de réalisation des analyses fait bien sûr parti des éléments clés et de nombreuses améliorations ont été menées sur ses trois sous processus (pré analytique, analytique et post analytique). Nous pouvons citer à titre d'exemple le travail mené sur la description des renseignements cliniques qui a permis notamment, l'amélioration de l'efficacité dans la recherche de toxiques.

Il résulte de l'analyse de cette démarche que le management par processus a des impacts importants sur l'or-

ganisation et la performance globale du laboratoire (fiabilité, délais, coûts, réactivité face à des contraintes extérieures, maîtrise des risques...). Elle permet une évaluation fine et objective de l'ensemble du laboratoire et de ses activités dans le contexte actuel d'Évaluation des Pratiques Professionnelles (EPP). C'est également un outil pour répondre au mieux aux exigences des normes qualité internationales applicables aux laboratoires (ISO 15 189, ISO 17025, ISO 9001).

**Conclusion :** les outils de management de la qualité et particulièrement l'approche processus, pratiquée depuis plusieurs années dans l'industrie, sont facilement applicables au sein des laboratoires de toxicologie. Ils peuvent être un vecteur de performance pour ces laboratoires et leur permettre de rester compétitifs face à l'évolution rapide du marché pointu des analyses toxicologiques.

---

## Thèmes libres

### Bilan suite à l'intervention du Département Toxicologie de l'IRCGN lors de deux rave-parties.

M. PERRIN, D. CHOPINEAUX, O. ROUSSEL

Département Toxicologie, IRCGN, Rosny-sous-Bois

**Introduction :** les manifestations telles que les teknivals ou les rave parties, drainent un public large qui dépasse souvent les 10 000 participants. Ce type de manifestation nécessite la mise en place d'un dispositif important autour du site afin de maintenir l'ordre public. Le propos de cette présentation est d'étudier les statistiques concernant les saisies effectuées en marge de deux de ces manifestations, le teknival de Vannes-Meucon et celui d'Angoulême-Champniers. Ces deux rave parties ont en effet bénéficié à chaque fois, de la présence de deux toxicologues de l'IRCGN, pour l'identification rapide des poudres, comprimés ou autres objets saisis, afin de caractériser l'infraction à la législation sur les stupéfiants et de permettre les procédures en comparution immédiate.

**Méthodes :** le dépistage rapide sur place est effectué au moyen d'un spectromètre à mobilité ionique (Ionscan de la société Barringer - Smiths Heimann), ou à l'aide de tests colorés de la mallette spécialement mise au point par l'IRCGN. Cette mallette est constituée des réactifs nécessaires à la réalisation de 10 tests colorés (Draggendorff, Wagner, Mandelin, Marquis, Scott, Zwikker 2, Ehrlich, Duquenois, Simon et test à l'acide sulfurique) à réaliser selon un test dichotomique. Certains échantillons ont été analysés à notre laboratoire en GC-SM afin de préciser leur composition.

**Résultats :** les dépistages ont porté sur 104 échantillons (36 saisis à Vannes et 68 à Angoulême). Si de la résine ou de l'herbe sont très présents avec respective-

ment 6 et 12 identifications, ainsi que des comprimés d'ecstasy (8 saisies en tout), des poudres d'héroïne (2 et 7 saisies), d'amphétamine (une et trois saisies), de cocaïne ou de LSD (3 et 10), il est surprenant de constater le grand nombre de « contrefaçons ». Nous avons identifié également des cristaux blancs d'encens présentés comme étant de « l'ice », des timbres sans LSD (5 et 7, dont une saisie de 250 timbres en papier Canson imbibés d'huile pour pizza lors de la rave d'Angoulême), 7 poudres blanches sans cocaïne (constituées essentiellement de bicarbonate). Nous avons noté également la présence de spécialités pharmaceutiques vendues de façon fallacieuse pour de l'ecstasy : comprimés de Burinex® (faux logo « Peugeot »), Celestène® et Celestamine® (faux logo « champignon »). La spécialité pharmaceutique la plus fréquemment rencontrée est la Nivaquine® (4 saisies, dont une de 240 comprimés encore dans leur blister d'origine). La chloroquine est susceptible de donner un faux positif au test de Scott, l'apport de l'Ionscan a été déterminant, cette molécule ayant été ajoutée à la liste des alarmes programmées dans l'appareil à l'issue de la rave party de Vannes.

**Conclusion :** les stupéfiants représentent à peine la moitié des substances saisies au cours de deux rave parties.

## Effets respiratoires de la kétamine à forte dose chez le rat. Mise en évidence d'une relation toxicocinétique-toxicodynamique.

T. DUARTE<sup>(1,2)</sup>, L. CHEVILLARD<sup>(2)</sup>, P. HOUZÉ<sup>(1,2)</sup>, F.J. BAUD<sup>(2)</sup>

(1) Laboratoire de Biochimie, Hôpital Saint Louis, Paris ;

(2) INSERM U705 ; CNRS, UMR 7157, Universités de Paris7 et 5, Hôpital Fernand Widal, Paris.

**Introduction :** la kétamine (K) est un anesthésique largement utilisée en médecine vétérinaire. Chez l'homme, la kétamine est employé pour induire ou maintenir des anesthésies de courte durée. Aux doses thérapeutiques elle n'induit pas de dépression respiratoire contrairement aux autres anesthésiques. Cependant détournée dans un but récréatif, la kétamine est à l'origine chez l'homme de décès par arrêt respiratoire rapporté lors de « rave party ». Peu ou pas d'études rapportent les effets respiratoires de la kétamine à forte dose chez l'animal. Après avoir déterminé les cinétiques de la kétamine administrée par voie intrapéritonéale (IP) et intramusculaire (IM), nous en avons étudié les effets respiratoires par pléthysmographie corps entier chez l'animal éveillé. A partir de ces résultats, nous avons recherché l'existence d'une relation toxicocinétique-toxicodynamique (TK-TD) entre les concentrations plasmatiques de kétamine (K) et/ou de son métabolite la norkétamine (NK).

**Méthodes :** les rats mâles Sprague-Dawley ont été traités par de la kétamine (70 mg/kg en kétamine base en solution dans du chlorure de sodium) administrée par voie IM ou IP. Au niveau de la veine fémorale, des prélèvements de sang sont recueillis de façon fractionnée entre 0 et 180 min. Les échantillons de sang sont centrifugés et le plasma est conservé à -20°C jusqu'au moment du dosage. Les concentrations en K et NK ont été déterminées par chromatographie liquide haute performance avec détection UV (215 nm) après extraction de 50 µL de plasma par le chloroforme en milieu alcalin en présence de cycloguanil comme étalon interne. Les paramètres pharmacocinétiques ont été déterminés à l'aide du programme WinNonline®. La fonction respiratoire a été étudiée par pléthysmographie corps entier chez l'animal éveillé en réalisant des enregistrements aux mêmes temps que les prélèvements sanguins. Les paramètres respiratoires ont été déterminés à l'aide du logiciel Acquis1®. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM.

**Résultats :** la cinétique plasmatique de la kétamine est bi-phasique avec une demi vie moyenne d'élimination de 95 +/- 12 et 84 +/- 7 min, respectivement pour la voie IP et IM. Le volume de distribution est 4 fois plus élevé (44 +/- 3.5 L/kg) pour la voie IP que pour la voie IM (11 +/- 2 L/kg), corrélé à une clairance totale 4 fois plus faible par voie IM (0,09 +/- 0.005 L/min/kg). Après administration par voie IP, les concentrations en NK deviennent très rapidement supérieures à celles de la kétamine de la voie IP, correspondant à un important effet de premier passage hépatique. Cet effet n'est pas retrouvé après administration par voie IM. L'étude pléthysmographique montre que l'administration de la kétamine à forte dose induit une hyperventilation avec diminution de moitié des temps expiratoire et inspiratoire, un doublement de la fréquence respiratoire et augmentation du volume courant. Les modifications respiratoires sont d'amplitude similaires pour les deux voies, mais l'effet maximal est retardé de 15 minutes si la kétamine est administrée par voie IM. Pour les deux voies, le retour de la fonction respiratoire à la normale est observé au bout de 180 minutes. La recherche d'une relation TK-TD montre une courbe en U inversé bien corrélée ( $R^2=0,91$ ) entre les concentrations de kétamine et la fréquence respiratoire, mais moins bien corrélée avec les concentrations en NK ( $R^2=0,77$ ).

**Conclusion :** notre étude montre que pour de fortes doses la kétamine induit des effets respiratoires significatifs. Il existe une corrélation étroite entre les concentrations et les effets observés. Ces effets respiratoires pourraient expliquer les décès rapportés chez l'homme lors de l'utilisation illicite de kétamine à forte dose.

## Antagonisme de la toxicité respiratoire du paraoxon par la pralidoxime chez le rat. Mise en évidence d'une discordance entre effets sur les cholinestérases et effets respiratoires.

P. HOUZÉ<sup>(1,2)</sup>, C. MONIER<sup>(2)</sup>, P. RISEDE<sup>(2)</sup>, F.J. BAUD<sup>(2)</sup>

(1) Laboratoire de Biochimie, Hôpital Saint Louis, Paris ;

(2) INSERM U705 ; CNRS, UMR 7157, Universités de Paris7 et 5, Hôpital Fernand Widal, Paris.

**Introduction :** en dépit de nombreux travaux, l'efficacité des oximes dans le traitement de l'intoxication organophosphorée chez l'homme fait encore l'objet de débats contradictoires. L'efficacité thérapeutique serait liée au maintien d'une concentration plasmatique supérieure à 4 mg/L expliquant l'existence de nombreux protocoles d'administration (doses, voies) souvent non standardisés. En utilisant le méthylsulfate de pralidoxime (Contrathion®) chez le rat sain et intoxiqué par le paraoxon (PO), nous avons déterminé les cinétiques après administration du produit par différentes voies et doses. Nous avons sélectionné le meilleur protocole d'administration qui permettant le plus long maintien des concentrations au dessus de 4 mg/L. Avec ce protocole, nous avons étudié l'effet antidotique de la pralidoxime sur deux paramètres : la ventilation au repos chez l'animal éveillé et la réactivation des cholinestérases totales.

**Méthodes :** les rats mâles Sprague-Dawley ont été traités par la pralidoxime (3 doses : 10, 25 et 50 mg/kg en pralidoxime base (PRX)) administrée par 2 voies (IV *bolus*, et IM). Les prélèvements sanguins ont été effectués durant 120 min (IV) et 180 min (IM). Les concentrations plasmatiques de PRX ont été mesurées par chromatographie liquide avec détection électrochimique (cellule de garde : 1V, E1 : +750 mV ; E2 : +970 mV). Les paramètres pharmacocinétiques ont été déterminés à l'aide du programme WinNonline®. Les rats ont été intoxiqués par injection sous cutanée de PO à la dose de 0,215 mg/kg (50 % de la DL<sub>50</sub>). Trente minutes après l'injection de PO, ils ont reçus de la PRX (50 mg/kg, IM). La ventilation au repos a été enregistrée par pléthysmographie corps entier et les paramètres respiratoires déterminés (Acquis1®). L'activité cholinestérase déterminée en spectroscopie (324 nm). Tous les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM.

**Résultats :** la pharmacocinétique de la PRX montre une décroissance bi-phasique avec une demi-vie d'élimination très courte dépendant de la voie d'administration (IV : < 30 min ; IM : < 60 min). Par voie IM, le pic plasmatique est observé en 10 min. Les aires sous la courbe (AUC) sont proportionnelles à la dose. La clairance rénale de la PRX est 5 fois supérieure à celle de la créatinine et le volume de distribution est élevé (4,2 +/- 0,7 L/kg). Chez le rat intoxiqué par le PO, la ciné-

tique de la PRX (50 mg/kg) n'est pas modifiée par voie IV mais par voie IM, nous avons observé un allongement de la demi-vie d'élimination (62 +/- 6 min), un accroissement de l'AUC (450 +/- 95 versus 820 +/- 109 mg.min/L), tandis que la clairance rénale de la PRX est diminué d'un facteur 2. Le volume de distribution n'est pas modifié. La dose de 50 mg/kg IM de PRX représente le meilleur protocole d'administration pour étudier l'effet antidotique. Après injection de PO, l'étude des paramètres respiratoires montre une augmentation du temps total, du temps expiratoire et du volume courant, une diminution de la fréquence respiratoire. Dans le même temps l'activité cholinestérasique ne représente plus que 40 % de la valeur de base. Les effets du PO sont maximaux 30 min après son injection. L'administration de la PRX au pic des effets du PO induit : 1) une correction rapide, complète et prolongée (> 180 min) des cholinestérases ; 2) une réversion rapide (< 5 min), totale mais transitoire (< 30 min) des effets respiratoires du PO.

**Conclusion :** nos données suggèrent que la réactivation des cholinestérases et une condition nécessaire mais pas suffisante pour expliquer l'effet antidotique de la pralidoxime. D'autres mécanismes de toxicité du PO, non liés à l'inhibition des cholinestérases pourrait expliquer les différences observées dans notre étude.

---

## Intoxication à l'oxycyanure de mercure. Suivi de l'imprégnation mercurique dans le sang, l'urine et les cheveux.

F. KLINZIG<sup>(1)</sup>, L. LABAT<sup>(1)</sup>, D. Olichon<sup>(2)</sup>, P. NISSE<sup>(3)</sup>, C. DHORNE<sup>(1)</sup>, B. DEHON<sup>(1)</sup>, M. LHERMITTE<sup>(1)</sup>

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

(2) Laboratoire Pasteur Cerba, Cergy Pontoise ;

(3) Centre Anti-Poison, CHRU, Lille.

**Introduction :** nous rapportons ici le cas d'une intoxication non létale par ingestion volontaire d'oxycyanure de mercure ; ce produit historiquement utilisé pour ses propriétés antiseptiques et antisiphilitiques se présentait sous forme de poudre, comprimé ou lotion, mais n'est plus commercialisé en France depuis 1997. Un pharmacien de 53 ans ingère 3 comprimés d'oxycyanure de mercure. Dans les heures qui suivent, il présente des vomissements sanglants, une épigastralgie et des diarrhées. Il est hospitalisé le lendemain dans le service de réanimation où une atteinte digestive ainsi qu'une insuffisance rénale aiguë sont mises en évidence. Il reçoit une dose de cyanokit® puis une première dose de BAL mais une réaction allergique anaphylactique justifie l'arrêt du traitement. Il bénéficie ensuite de séances de dialyses quotidiennes durant 20 jours. Une chélation par DMSA (200mg 3x/j) ainsi que 4 séances d'hémoperfusion sont ensuite mises en place durant un mois. Le patient rentre à son domicile après

52 jours d'hospitalisation.

**Méthodes :** le diagnostic de l'intoxication au mercure est confirmé par les dosages sanguin et urinaire du mercure. Le suivi est réalisé en spectrométrie d'absorption atomique électrothermique pour le sang et en ICP-MS pour l'urine.

Une mèche de cheveux de 6 cm a été prélevée 50 jours après l'ingestion, puis fractionnée en 6 segments et la recherche de mercure a été réalisée en ICP-MS sur chacun des segments.

**Résultats :** les principaux résultats pour le sang et les urines sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Dosage de mercure	J 1	J 5	J 8	J 12	J 19	J 25	J 32	J 43	J 52	J 57
Sang ( g/L)	3050	1855	1069	1149	972	527	357		72	81
- avant dialyse									(sortie)	
- après dialyse	1592	1690	981	1140	931	185	341			
- après hémoperfusion										
Urine ( g/g de créatinine)	9573					1317		500		174

Pour les cheveux, les cinq premiers segments (0 à 5 cm) révèlent des concentrations comprises entre 29,0 et 41,2 ng/mg. Sur le dernier segment correspondant à la pointe, la concentration est de 4,6 ng/mg.

**Conclusion :** les intoxications au cyanure mercurique sont rares. L'élimination du toxique repose sur l'utilisation de chélateurs, le BAL par voie parentérale ou le DMSA par voie orale associés à des séances d'épuration extra rénale. Le dosage initial de thiocyanate sérique étant normal, les recherches de dérivés de cyanure n'ont pas été poursuivies. En revanche, des dosages réguliers de mercure dans le sang et les urines ont permis de contrôler l'élimination du toxique et l'efficacité des chélateurs. Les concentrations initiales de mercure sanguin sont proches de celles retrouvées dans des cas d'intoxications mortelles, décrites entre 2000 et 3800 µg/L par plusieurs auteurs. L'élimination lente du mercure, mise en évidence par des concentrations sanguines supérieures aux valeurs usuelles durant près de 2 mois, est en relation avec l'imprégnation mercurique dans les cheveux. Les concentrations 20 à 40 fois supérieures aux valeurs établies dans des populations témoins, restent élevées et relativement homogènes sur la grande majorité des segments, pouvant laisser penser à une contamination séborrhéique pendant les 2 mois.

## Interprétation des concentrations en méprobamate dans l'humeur vitrée, la bile et la moelle osseuse : approche statistique.

F. BÉVALOT<sup>(1,3)</sup>, L. DUJOURDY<sup>(2)</sup>, L. MAGNÉ<sup>(1)</sup>, F. BESACIER<sup>(2)</sup>, C. LE MEUR<sup>(1)</sup>, Y. GAILLARD<sup>(3)</sup>, L. FANTON<sup>(4)</sup>, D. MALICIER<sup>(4)</sup>

(1) Laboratoire Lumtox, Lyon ;

(2) Laboratoire de Police Scientifique, Ecully ;

(3) Laboratoire LAT, La Voulte-sur-Rhône ;

(4) Institut de Médecine Légale, Lyon

**Introduction :** dans de nombreux cas de recherche des causes toxiques de la mort l'interprétation des concentrations sanguines en xénobiotiques est difficile ou impossible. L'interprétation des concentrations mesurées dans les autres matrices prélevées à l'autopsie est complexe du fait de l'absence de table permettant de délimiter des zones thérapeutiques, toxiques et létales comme pour le sang. La solution de la comparaison aux concentrations mesurées dans des cas d'intoxications mortelles rapportés dans la littérature peut être la source d'erreur. Le but de cette étude était de proposer une approche statistique fiable pour l'interprétation des concentrations en méprobamate mesurées dans les matrices alternatives.

**Matériel et méthodes :** l'étude a porté sur 116 cas autopsiques pour lesquels des concentrations sanguines thérapeutiques (n=70) ou toxiques (n=46) de méprobamate avait été mesurées et pour lesquels nous disposions d'au moins une des matrices suivantes: bile (n=107), humeur vitrée droite (HVD, n=40), humeur vitrée gauche (HVG, n=43) et moelle osseuse (MO, n=51). Le méprobamate a été dosé par GC-MS. Dans un premier temps, pour chaque matrice, des statistiques descriptives ont été réalisées pour s'assurer que les populations toxiques et thérapeutiques étaient statistiquement différentes; la corrélation avec les concentrations sanguines a été étudiée; une modélisation des populations de concentrations thérapeutiques et toxiques a été entreprise dans le but de déterminer des valeurs seuil de surdosage. Dans un deuxième temps une analyse multivariée (PCA) sur les 4 matrices alternatives simultanément a été utilisée pour déterminer s'il était possible de séparer les échantillons d'origine thérapeutique de ceux d'origine toxique.

**Résultats :** le tableau rapporte, pour chaque matrice, les valeurs des moyennes de concentrations (Moy CC) obtenues pour les populations thérapeutique (Th) et toxique (To), la corrélation avec les concentrations sanguines (r), et les valeurs seuils de concentrations de surdosage renvoyant moins de 5 % de faux positifs (CC Seuil). Les concentrations sont exprimées en µg/mL pour la bile et les humeurs vitrées et en µg/g pour la moelle osseuse.

Matrices	Bile(n=107)		HVG(n=43)		HVD(n=40)		MO(n=51)	
	Th (63)	To(44)	Th(28)	To(15)	Th (26)	To(14)	Th(32)	To(19)
Moy CC	15.4	255.6	7.8	98.5	7.7	108.2	3.4	48.2
r	0.67		0.89		0.93		0.70	
CC Seuil	100		27		27		32	

Un premier modèle PCA a été construit, il comporte 2 composantes principales expliquant 98% de la variance et permet de bien séparer les 2 populations thérapeutiques et toxiques.

**Conclusion :** pour chaque matrice a été définie une valeur seuil de concentration de méprobamate séparant la population thérapeutique de celle associée à un surdosage. L'analyse multivariée (PCA), si elle n'est ici qu'au stade de construction, a permis de séparer les deux populations en tenant compte simultanément des concentrations mesurées dans les 4 matrices alterna-

tives. Ce modèle, si il se confirme avec un plus grand nombre de données actuellement à l'étude, pourra conduire à une classification des cas en thérapeutique ou surdosage en croisant les concentrations mesurées dans au moins deux des quatre matrices alternatives. Ce type d'approche statistique permet de rendre une interprétation des concentrations mesurées dans les matrices alternatives avec une fiabilité accrue et un risque d'erreur évalué statistiquement.

---

## Toxicologie professionnelle et environnementale

### Recherche de traces de composés organiques volatils dans l'air ambiant en poste de travail par couplage désorption thermique - chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse.

V. CIRIMELE, G. SALQUEBRE, M. VILLAIN, P. KINTZ

Laboratoire ChemTox, Illkirch

**Objectif :** évaluation d'une méthode de dosage de composés organiques volatils (COVs) dans l'air ambiant en poste de travail par couplage désorption thermique - chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse (DT-GC-MS).

**Méthodes :** à l'aide d'une pompe, l'air ambiant est aspiré à travers un tube de prélèvement rempli d'une phase hydrophobe de type Carbotrap™ ou Carboxen™ apte à retenir les COVs (débit optimal : 50ml/min). Après acheminement du prélèvement au laboratoire, l'échantillon est analysé par un système Perkin Elmer faisant appel au désorbiteur thermique Turbomatrix 350 et au couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse (Clarus 600). En parallèle, des tubes de contrôle, témoins négatifs (tubes de prélèvement ayant subi les mêmes manipulations à l'exception de l'étape de prélèvement par pompage) et témoins positifs (tubes de prélèvement contenant des quantités connues et croissantes en COVs), ont été analysés par le même procédé. Les COVs sont désorbés des tubes de prélèvement en moins de 15 minutes à l'aide d'une rampe de température atteignant 325°C et d'un débit d'hélium de 30 ml/min pour être refocalisés dans un piège refroidit à -30°C avant la désorption finale (325°C à 40°C/seconde) et transfert des composés vers le couplage GC-MS. La séparation des COVs a été obtenue sur une colonne capillaire (5% phényl-95% méthylsiloxane) de 60m de long (0,25 mm de diamètre interne et 0,25µm d'épaisseur de phase) à l'aide d'une rampe de température allant de 40 à 250°C à 5°C/min. La détection a été réalisée, après ionisation des molécules dans une source fonctionnant en impact électronique à 70eV, simultanément en mode « spectre

complet » et en mode « sélection d'ions ».

**Résultats :** l'analyse d'air ambiant par DT-GC-MS s'est avérée opérationnelle pour les hydrocarbures aliphatiques, cycliques et aromatiques moins légers que l'éthane mais plus légers que les C<sub>20</sub> tels que le 2,3 diméthyl butane, le 2-hexène, le méthylcyclopentane, le benzène, l'isooctane, le l'heptane, le toluène, les xylènes, le styrène, le décane, les méthyl-naphthalènes ou l'acénaphthalène ; pour les hydrocarbures halogénés tels que le dichloroéthane ou le tétrachloroéthylène ; pour les alcools tels que l'isopropanol, l'éthylhexanol ou l'octanol ; pour les esters et éthers de glycols tels que l'acétate d'éthyle, le méthyléthyléther, le méthoxyéthanol ou le diéthylène-glycol ; et finalement pour les aldéhydes et cétones tels que l'acétone, l'hexanal, le benzaldéhyde ou le furfural. Dans la majorité des cas, les teneurs enregistrées étaient comprises entre 50 ppb et 25 ppm, mais l'optimisation des conditions de prélèvement (débit et durée de pompage de l'air ambiant à travers le tube de prélèvement) devrait permettre d'abaisser les seuils de sensibilité de la méthode pour certains polluants.

**Conclusion :** l'analyse d'air ambiant est un paramètre complémentaire au suivi biologique des salariés pour l'évaluation de l'exposition professionnelle. Cette analyse, faisant appel au couplage « désorption thermique - chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse » encore peu répandue dans nos laboratoires de toxicologie, permet le dosage des composés organiques volatils aux chaînes carbonées allant de C3 à C20 et dont le point d'ébullition est compris entre -60 et 300°C.

---

### Exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) : dosages du 1-hydroxypyrene (1-OHP) et du 3-hydroxybenzo [a] pyrene (3-OHBP) urinaires chez les salariés exposés lors de la production d'aluminium ou lors de travaux routiers.

A. NICOLAS

Laboratoire Toxilabo, Nantes

**Introduction :** les HAP constituent une famille complexe de polluants ubiquitaires présents notamment dans les dérivés de la houille ou de pétrole brut. Certaines activités industrielles exposent les salariés aux HAP par voie respiratoire et (ou) par contact cutané direct ou indirect (migration au travers des vêtements souillés). Depuis une vingtaine d'années le suivi biologique de l'exposition s'effectue par le dosage urinaire du 1-OHP, un métabolite du pyrène, HAP non cancérigène. Le 3-OHBP, un métabolite du benzo[a]pyrène (BaP) chef de file des HAP cancérigènes, pourrait constituer un marqueur d'exposition plus pertinent.

**Méthodes :** deux populations de salariés, l'une exposée lors de la production d'aluminium, l'autre lors d'épandage d'enrobés (travaux routiers), ont fait l'objet d'un suivi biologique. Les 1-OHP et 3-OHBP ont été déterminés dans des urines recueillies en flacon et sur un dispositif de piégeage, de transport et de conservation des métabolites: « Uriprel® ».

Dans l'industrie de l'aluminium l'évaluation de l'exposition a été complétée par le dosage des pyrène et BaP dans l'air et les tissus des vêtements de travail selon une technique classique. Les mesurages des métabolites, réalisés par CLHP avec détection fluorimétrique, ne nécessitent pas de traitement préalable de l'urine hormis une hydrolyse enzymatique. Développées par l'INRS puis transférées au laboratoire, les méthodes mettent en oeuvre une purification en ligne des échantillons par le biais d'une technique de commutation de colonnes (2 à 3 colonnes de purification selon le métabolite, avec des greffages de nature différente) suivie d'une étape ultime de séparation sur une colonne analytique greffée octadécyle.

**Résultats :** dans le secteur de production de l'aluminium, les moyennes atmosphériques en Pyrène et BaP étaient de 40000 ng/m<sup>3</sup> (min-max : 100 - 650000) et 2600 ng/m<sup>3</sup> (min-max : 0,2 - 33000) respectivement. Pour le BaP, la valeur atmosphérique de 150 ng/m<sup>3</sup>, recommandée par la CNAM, est dépassée dans 22/38 des mesures. Pour les tissus, la moyenne était de 55 ng/m<sup>2</sup> pour le pyrène (min-max : 0,03 - 2400) et de 36 ng/m<sup>2</sup> pour le BaP (min-max : 0,3 - 3200). Les moyennes en 1-OHP et 3-OHBP étaient de 1,96 µg/g créatinine (min-max : 0,04 - 24) et de 0,64 ng/g créatinine (min-max : < 0,1 - 9) respectivement. Dans le secteur des travaux routiers, les moyennes en 1-OHP et 3-OHBP étaient de 0,46 µg/g créatinine (min-max : 0,03 - 7,3) et de 0,15 ng/g créatinine (min-max : < 0,05 - 1,5) respectivement. Pour un même salarié et pour un même moment de recueil, il n'y a pas de corrélation entre les 2 métabolites ( $r = 0,11$  et  $r = 0,31$ ) quel que soit le secteur. Le domaine d'analyse du 3-OHBP se situe de 0,2 à 21 ng/L avec une limite de quantification à 0,2 ng/L. La répétabilité et la reproductibilité (CV = 5,5 et 15,1 %, n = 10) ont été vérifiées à l'aide d'une urine surchargée à 0,42 ng/L. La corrélation des résultats ( $r = 0,95$ ) a été vérifiée sur une série d'échantillons de terrain (n = 20) analysés par le laboratoire et l'INRS.

**Conclusion :** le dosage du 3-OHBP urinaire met en évidence l'imprégnation biologique par le BaP, HAP cancérigène. Les différences de concentrations entre les 2 métabolites rendent compte de la variabilité des teneurs en BaP et en pyrène ainsi que du rapport pyrène / BaP au sein d'un même secteur industriel et entre les secteurs examinés; cette variabilité dépend de la matrice d'origine, du procédé industriel et des propriétés physico-chimiques des HAP.

## L'acide phénoxyacétique, indicateur d'exposition au phénoxyéthanol en milieu professionnel.

L. LABAT<sup>(1)</sup>, C. NISSE<sup>(2)</sup>, H. FERLIN<sup>(3)</sup>, J. THOMAS<sup>(1)</sup>, F. KLINZIG<sup>(1)</sup>, B. DEHON<sup>(1)</sup>, A. MARMIGNON<sup>(2)</sup>, M. LHERMITTE<sup>(1)</sup>

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

(2) Service de Pathologie Professionnelle et Environnement, CHRU, Lille ;

(3) MSA Nord, Santé Sécurité au Travail, Lille.

**Introduction :** le phénoxyéthanol est un éther de glycol entrant dans la composition de nombreux produits notamment cosmétiques. Il est absorbé essentiellement par voie cutanée et son métabolite principal l'acide phénoxyacétique est éliminé par voie urinaire ce qui en fait un indicateur intéressant pour la surveillance de l'exposition en milieu professionnel. Une méthode de dosage des acides alkoxyacétiques validée en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) a été utilisée pour évaluer l'imprégnation de salariés par cet éther de glycol.

**Méthodes :** le phénoxyéthanol a une application particulière en aquaculture où il est utilisé comme anesthésiant pour poissons, pour faciliter le transfert de poissons entre différents bassins, et rendre leur manipulation moins traumatisante lors de leur pesée et de leur mesurage. Lors de ces différentes opérations, le phénoxyéthanol est régulièrement réintroduit dans l'eau et les salariés peuvent être exposés par voie cutanée au niveau des mains et des bras, en raison de l'absence de port de gants. Une surveillance biologique a donc été mise en place afin d'évaluer le niveau d'imprégnation des opérateurs pendant ces différentes phases. Des échantillons d'urines ont été recueillis dans des flacons en polyéthylène chez onze salariés travaillant régulièrement à ces postes. Pour la majorité d'entre eux, les prélèvements ont été effectués en début de poste début de semaine (échantillon de référence) ainsi qu'en début et fin de poste à la fin de la semaine. Pour la plupart des salariés, les temps de travail diffèrent sur les deux postes (demi-journée ou journée entière). Le dosage de l'acide phénoxyacétique a été réalisé en CPG-SM en mode d'ionisation chimique négative. Après ajout d'un étalon interne (acide 3-chloropropionique), l'échantillon urinaire (100 µL) est dérivé par de l'acide pentafluoropropionique anhydre (PFPAa) dans du dichlorométhane. Après 16 heures d'incubation, l'extrait sec est repris par de l'isooctane (100 µL). L'ion 151 (m/z) est utilisé comme ion de quantification.

**Résultats :** pour les onze salariés, en fin de semaine de travail, les concentrations urinaires d'acide phénoxyacétique sont comprises entre 0,11 et 4,69 mg/g de créatinine en début de poste (moyenne = 1,82 +/- 1,34 mg/g de créatinine, n = 11 salariés) et entre 0,18 et 85,71 mg/g de créatinine en fin de poste (moyenne =

22,70 +/- 27,71 mg/g de créatinine, n = 10 salariés). Les concentrations de référence en début de semaine varient entre 0,12 et 2,72 mg/g de créatinine (moyenne = 0,79 +/- 0,77 mg/g de créatinine, n = 10 salariés).

**Conclusion :** il n'existe pas de valeur de référence en milieu professionnel pour le phénoxyéthanol. Cependant, la surveillance biologique de l'exposition est un outil indispensable pour l'évaluation des risques. Ces premiers résultats confirment l'existence d'une exposition pour des salariés ayant occupé les postes de transfert de bassins, de réalisation d'histogramme ou les deux postes, avec des temps de travail sur les postes assez différents. Ces conditions peuvent expliquer les grandes variations d'excrétion urinaire. Cette première évaluation sera complétée par une nouvelle surveillance dans des conditions d'étude plus strictes et prédéfinies, pour mieux identifier les phases de travail les plus exposantes. Ceci permettra d'adapter les mesures de préventions, équipements individuels de protection ou substitution de produits, en fonction des postes et des niveaux d'exposition.

---

### Validation d'une technique de dosage multiélémentaire des métaux dans les ongles par ICP-MS. Valeurs usuelles chez cent vingt témoins.

J.P. GOULLÉ, L. MAHIEU, E. SAUSSEREAU, D. BOUIGE, C. LACROIX

Groupe Hospitalier, Le Havre

**Introduction :** l'objectif de ce travail est de présenter la validation d'une technique de dosage multiélémentaire des métaux dans les ongles de la main par plasma à couplage inductif relié à un détecteur de masse (ICP-MS), ainsi que l'établissement de valeurs usuelles.

**Méthodes :** spectromètre X7CCT Thermo Elemental (Thermo Optek, Courtaboeuf, France), sans cellule dynamique de réaction, équipé d'un passeur d'échantillon et du logiciel PlasmaLab. L'eau utilisée est purifiée extemporanément sur Milli-Q<sub>PLUS</sub> 185 (Millipore, St Quentin en Yvelines, France). Les réactifs, de qualité suprapur pour analyses de traces et les solutions étalons de métaux proviennent de chez Merck (Darmstadt, Allemagne), et CPI (Amsterdam, Hollande). Des fragments d'ongles sont recueillis lors de la coupe de ceux-ci chez cent vingt volontaires des deux sexes indemnes de toute affection, sans traitement médical. En l'absence de matériel de référence, la validité des résultats obtenus est contrôlée par la participation au programme de comparaisons interlaboratoires (Sainte Foy, Canada) qui a comporté un exercice récent de dosage comprenant vingt trois éléments dans une poudre d'ongles. Après décontamination de 20 mg d'ongles (acétone, eau tiède), puis minéralisation acide (HNO<sub>3</sub> pur), trente deux métaux sont quantifiés simultanément dans cette matrice biologique par dilution de la prépa-

ration obtenue (butanol 0,5%, acide nitrique 1%, triton 0,01%, étalons internes In et Rh 1 ppb). L'étalonnage est réalisé en milieu aqueux. Le protocole de validation utilisé est le même que celui récemment décrit pour le dosage multiélémentaire dans les cheveux.

**Résultats :** validation de la technique : Les dosages dans les ongles sont validés pour les trente deux éléments suivants : Li, Be, B, Al, V, Cr, 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 coefficients de régression sont supérieurs à 0,999 dans la gamme de linéarité (de 0 à 25 ou 250 ng/mL selon les éléments). Les limites de détection s'échelonnent de 0,04 pg/mg (U) à 0,1 ng/mg ou µg/g (B). Les coefficients de variation obtenus lors des essais de répétabilité et de reproductibilité sont respectivement inférieurs à 5 % et à 10 %.

**Valeurs usuelles chez les témoins :** Les valeurs usuelles sont établies et discutées à la lumière des données publiées. Les concentrations médianes obtenues pour les trente deux éléments sont comprises entre 0,0002 ng/mg (Pt) et 105 ng/mg (Zn). Plusieurs cas d'exposition non professionnelle à des métaux lourds sont présentés (Pb, Hg).

**Conclusion :** les progrès récents de l'ICP-MS constituent un apport déterminant en toxicologie clinique et médico-légale. Son application à l'analyse multiélémentaire des métaux dans les ongles, offre des perspectives complémentaires à celles des cheveux pour la recherche d'expositions au long cours ou d'intoxications chroniques. De plus, en raison de la structure particulière de l'ongle, ce phanère pourrait être proposé pour la surveillance professionnelle, environnementale ou domestique aux éléments métalliques.

---

## Nouvelles approches analytiques

### Les polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de composés à l'état de traces dans les matrices complexes.

V. PICHON

Laboratoire Environnement et Chimie Analytique (UMR CNRS 7121), Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles, Paris

**Introduction :** l'analyse de traces de composés organiques (pesticides, composés pharmaceutiques, toxines...) présents dans échantillons complexes (matrices environnementales ou alimentaires, fluides biologiques,...) nécessite des méthodes de séparation et de détection performantes. Il en est de même pour l'étape préalable de traitement de l'échantillon. De faibles limites de détection sont souvent difficiles à atteindre en raison de la co-élution des analytes recherchés avec des composés interférents. En effet, les méthodes d'extraction conventionnelles sont basées sur

l'utilisation de supports hydrophobes adaptés à l'extraction de composés d'échantillons aqueux ou de solvants organiques utilisés pour le traitement des échantillons solides (sols, sédiments, végétaux,...) qui conduisent à la co-extraction de composés de polarité similaire à celle des analytes ciblés.

Un apport en sélectivité conséquent peut être généré par la mise en œuvre de supports à reconnaissance moléculaire synthétiques. Il s'agit de polymères à empreintes moléculaires qui possèdent des cavités spécifiques d'un composé donné et censées mimer les sites de reconnaissance des anticorps pour un antigène donné. Ces polymères possèdent des propriétés comparables à celles des immunoabsorbants en terme de sélectivité avec, en plus, l'avantage d'un coût de développement souvent réduit et d'une plus grande stabilité thermique et chimique.

**Méthodes :** ces supports sont obtenus par voie chimique en procédant à la polymérisation après mise en présence de la molécule cible avec des monomères aptes à créer des interactions non-covalentes avec celle-ci. Après polymérisation et élimination de la molécule cible, le polymère obtenu possède des cavités dont la forme et les fonctionnalisations permettent une rétention sélective de l'analyte et donc son extraction de l'échantillon. Il suffit alors de rompre les interactions pour éluer l'analyte et l'analyser en LC/MS sans que les autres constituants de la matrice (non retenus par le polymère imprimé) puissent interférer.

**Résultats :** cette intervention a pour objectif d'illustrer l'apport en sélectivité obtenu par ces polymères imprimés (MIP) à travers la présentation de nombreuses applications. Des polymères à empreintes moléculaires ont en effet été développés pour l'extraction sélective de nombreuses molécules (produits pharmaceutiques, biomarqueurs, pesticides, produits de dégradation d'armes chimiques,...) recherchés dans des échantillons variés (matrices environnementales, alimentaires et biologiques). Dans certains cas, les résultats ont pu être comparés à ceux pouvant être obtenus via l'utilisation d'anticorps. Ces études ont permis de souligner leurs différences en termes de mécanismes de rétention, de capacité et de compatibilité avec les solvants usuels. Leur couplage aux techniques chromatographiques ainsi que leur intégration dans les systèmes miniaturisés (micro- et nanochromatographie) seront aussi évoqués.

---

## Validations des méthodes analytiques par l'approche de « l'erreur totale ».

O. ROUSSEL, Y. LECOMPTE, M. PERRIN

Département Toxicologie, IRCGN, Rosny-sous-Bois

**Introduction :** la validation des méthodes analytiques est un pré-requis essentiel à l'accréditation d'un laboratoire d'étalonnage et d'essai par le COFRAC, en particulier selon la norme ISO/CEN 17025. La validation

permet d'obtenir des informations sur le domaine de mesure, mais aussi sur les incertitudes de mesure associées et donc sur l'aptitude d'une méthode d'essai à répondre aux besoins exprimés.

**Méthode :** les grands principes de validation, figurant dans le « guide d'aide à la validation », de la commission accréditation de la SFTA, édité sous l'égide du COFRAC restent en vigueur. Cette stratégie ne remet pas en cause les paramètres classiques: justesse, répétabilité et reproductibilité. La différence réside dans le fait que les profils d'exactitude reposent sur la détermination de l'erreur totale, c'est à dire une combinaison entre la justesse et la fidélité intermédiaire. L'intervalle d'exactitude élargi par l'incertitude du biais (avec un risque bêta défini) donne par ailleurs une estimation de l'incertitude de mesure (que la norme 17025 impose de connaître). La règle de décision consiste à comparer le profil d'exactitude obtenu à des limites maximales d'acceptation fixées préalablement en fonction des contraintes propres au laboratoire. Le plan de validation habituellement mis en œuvre nécessite au moins trois opérateurs, chacun réalisant l'analyse selon les conditions de la méthode sur des standards de validation issus d'un même mélange initial (4 niveaux de concentration différents) répétés 4 fois. En revanche, chaque opérateur réalise sa propre courbe de calibration (dont on aura déterminé préalablement le nombre de niveaux et de répétitions).

**Résultats :** cette stratégie de validation a été appliquée avec succès sur de nombreuses analyses pratiquées au département toxicologie, tant en HPLC- spectrofluorimétrie (dosage des cyanures dans le sang total), qu'en ICP-MS (dosage du strontium dans le sang total) ou en GC-MS (analyses de confirmation de la présence de stupéfiants dans le sang total après accident de la route). partir d'exemples concrets, nous discuterons des avantages et inconvénients de cette approche. Ainsi le travail est possible à la fois sur les données calculées (réponses) ou sur les données brutes. Un logiciel commercial (E-noval version 2.0a) permet de tester, lorsque l'on utilise les valeurs brutes, quel modèle mathématique (linéaire, quadratique, avec ou sans forcer le passage par la valeur zéro etc...), s'adapte le mieux à la situation. Plusieurs opérateurs contribuant à une validation, chacun d'entre eux peut être considéré comme qualifié si l'incertitude obtenue par l'un d'entre eux est inférieure à un seuil fixé préalablement. Cette qualification est également imposée par la norme ISO/CEN 17025. Une approche par le biais des profils d'exactitude, permet de plus de comparer plusieurs méthodes de préparation des échantillons entre elles à partir d'un pool initial de validation, voire des appareillages différents entre eux. La plus grande difficulté pour cette approche, réside dans la préparation des standards de validation qui seront utilisés par tous les opérateurs. Si ce standard est fourni avec son propre intervalle de confiance, il est à privilégier, sinon, la concentration réelle de chaque niveau de concentration doit être

déterminé par une méthode la plus juste possible.

**Conclusion :** la validation de méthodes analytiques par l'approche de l'incertitude totale est cohérente par rapport aux principes édictés par la norme ISO/CEN 17025. Elle permet à la fois de décider de l'aptitude d'une méthode analytique.

## Mise en place au sein d'un laboratoire de pharmaco-toxicologie de la préparation en ligne des échantillons couplée à la LC-MS/MS. Considérations générales et application aux dosages des stupéfiants.

C. LACROIX, E. SAUSSEREAU, G. BODIN, J.P. GOULLÉ

Laboratoire de Pharmacocinétique et de Toxicologie, Groupe Hospitalier, Le Havre

**Introduction :** la préparation en ligne des échantillons (PLE) constitue une avancée analytique importante de ces dernières années, autorisée par l'essor de la LC-MS-MS. Les avantages sont multiples : gain de temps, diminution des coûts, suppression de phase analytique polluante (évaporation des solvants).

**Méthode :** différentes solutions ont été présentées pour la PLE et certaines reposent sur l'utilisation de colonnes de copolymères de type HLB ou MCX. Le choix, au vu de la sensibilité souhaitée et d'un montage simple, s'est fait sur une colonne OASIS-HLB. La colonne analytique est une colonne Phénomenex de type phényl-hexyl (50 x 2,1 mm, 5 µm) pour la quantification des médicaments et une colonne Atlantis® C18 (150 x 2,1 mm, 3 µm) pour celle des stupéfiants. Les échantillons plasmatiques, sériques ou sanguins subissent une déprotéinisation acide après une dilution fonction des concentrations attendues. Le cycle comprend une étape de concentration-purification des solutés à l'aide d'une phase mobile aqueuse comprenant 0,2 % d'ammoniaque d'une durée de 30 secondes. Les différents solutés sont élués à contre-courant de l'OASIS sur la colonne analytique par un gradient formé d'ammonium-acétonitrile. La colonne de concentration subit également un cycle de rinçage par une phase méthanol-eau-acide formique (90 - 10 - 0,05 ; V / V / V) afin d'éviter la contamination de l'échantillon suivant. Le cycle entier permet une injection toutes les cinq minutes (médicaments) ou toutes les quinze minutes (stupéfiants).

**Résultat :** cette méthode permet le dosage de nombreuses molécules à fonctionnalité basique qui constituent l'essentiel des médicaments et des stupéfiants en toxicologie. La sensibilité est évidemment fonction de la réponse des molécules en MS-MS mais peut évoluer de façon significative au gré de l'utilisateur puisqu'il est possible de jouer sur la dilution du prélèvement biologique, sur le volume injecté et sur le nombre d'injections avant l'éluion à contre courant. Le système de

montage permet l'adaptation à d'autres molécules plus acides par simple changement des phases de lavage et de rinçage. La linéarité de la méthode a été établie pour toutes les molécules stupéfiantes étudiées de 2,50 à 200 ng/mL ( $r^2 > 0,99$ ). La répétabilité (CV %) et la reproductibilité varient respectivement de 1,07 à 9,70 et de 1,26 à 10,83 %. En ce qui concerne l'exactitude intra-série et inter-série, le pourcentage de biais varie respectivement de - 10,04 à 6,80 % et de - 4,52 à 5,60 %. La corrélation effectuée sur 40 échantillons analysés avec la méthode décrite versus GC-MS est très satisfaisante pour l'ensemble des composés.

**Conclusion :** le système proposé est totalement indépendant de la LC-MS-MS choisie et ne nécessite pas l'acquisition d'un système dédié et coûteux de préparation en ligne. Le coût de fonctionnement de ce système est réduit, car les quantités injectées restent très faibles et permettent une durée de vie importante des colonnes de purification-concentration. De plus, la technique est volontairement très généraliste et permet, sans modification, la quantification de très nombreux médicaments et de réduire considérablement le temps d'analyse des stupéfiants cocaïniques, opiacés et amphétaminiques.

## Apport des monolithes comme supports d'extraction et de séparation : application à l'analyse des benzodiazépines par LC-MS et commutation de colonnes.

A. BUGEY, S. MAHASSEN, Ch. STAUB

Institut Universitaire de Médecine Légale, Université de Genève, Suisse

**Introduction :** depuis leur apparition, la popularité des supports monolithiques à base de silice n'a cessé de croître. Grâce à une double structure mésoporeuse et macroporeuse, assurant rétention et faible résistance au transfert de masse, ces nouveaux matériaux se sont très rapidement imposés en tant que support analytique pour les analyses rapides par chromatographie liquide. Par contre, leur utilisation comme support extractif reste encore rare. En toxicologie médico-judiciaire, la préparation de l'échantillon est une étape importante mais parfois délicate, en particulier lorsqu'il est nécessaire de travailler, soit avec des échantillons biologiques infectieux, soit avec des échantillons en partie putréfié. Le couplage en ligne de l'extraction et de la séparation par LC-MS permet de minimiser ces inconvénients.

**Méthodes :** dans un premier temps, nous avons développé une méthode par commutation de colonnes pour la pré-concentration et l'analyse simultanée de 8 benzodiazépines (clonazépam, diazépam, flunitrazépam, lorazépam, midazolam, N-desalkylflurazépam, nordiazépam et oxazépam) dans le sang total. Notre méthode est basée sur l'utilisation de deux supports monolithiques de différentes longueurs couplés entre eux par

une vanne à six voies. La détection est effectuée avec un spectromètre de masse (MS) de type simple quadripôle équipé d'une source d'ionisation à pression atmosphérique (APCI). Dans un deuxième temps, la même méthode est appliquée à des matrices alternatives comme les cheveux et la salive.

**Résultats :** la méthode a été entièrement validée pour le sang total et les paramètres de précision et de justesse ont été obtenus par une analyse de variances. Ainsi la répétabilité varie de 4% à 15%, la fidélité intermédiaire de 5% à 15% et la justesse de 80% à 100% pour des concentrations allant de 2,5 (ou 5) µg/L à 400 µg/L, selon le composé analysé. Une approche basée sur les profils d'exactitude a été utilisée afin d'estimer l'incertitude de mesure, un paramètre que les laboratoires doivent de plus en plus pouvoir évaluer. La même méthode a été appliquée avec succès pour quatre benzodiazépines (flunitrazépam, 7-amino-flunitrazépam, diazépam et nordiazépam) à des matrices alternatives comme les cheveux et la salive. Des limites de quantification de 10 à 25 pg/mg pour les cheveux et de 1 à 2 µg/L pour la salive ont été obtenues.

**Conclusion :** les excellentes propriétés des supports monolithiques ainsi que leur grande robustesse, en font des supports tout à fait adaptés pour l'extraction et la séparation de benzodiazépines dans des échantillons de sang total. Grâce à ce couplage en ligne, il est possible de déterminer des concentrations thérapeutiques en benzodiazépines à partir d'un volume de sang de seulement 200 µL. De plus, l'application de la même méthode à des matrices alternatives comme les cheveux et la salive permet d'atteindre des limites de quantifications tout à fait intéressantes pour ce type de prélèvements.

### Intérêt d'un logiciel de déconvolution (AMDIS) et d'une détection SIM/SCAN pour le screening en CPG-SM.

N. SIGNORINI-ALLIBE<sup>(1)</sup>, S. BERARD<sup>(1)</sup>, F. INCENT<sup>(2)</sup>, G. BESSARD<sup>(2)</sup>, L. BARRET<sup>(1)</sup>, H. EYSERIC<sup>(1,2)</sup>

(1) Laboratoire de Médecine Légale, UFR de Médecine, Grenoble ;

(2) UF de Pharmacologie-Toxicologie, DBPC, CHU, Grenoble.

**Objectif :** tester la déconvolution et une technique de détection simultanée en mode SIM et SCAN dans le cadre du screening toxicologique sur un CPG-SM Agilent équipé de nouveaux logiciels.

**Méthodes :** l'appareil CPG-SM Agilent est équipé d'un spectromètre de masse (5975 Inert XL MSD). Les logiciels associés sont MSD ChemStation, Retention Time Locking Software (RTL) et Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS). Nous utilisons deux bibliothèques commer-

ciales (PMW et NIST) ainsi que notre propre bibliothèque (GRENOBLE). Les tests en screening ont été réalisés sur un plasma témoin surchargé contenant 16 molécules : pentobarbital, phénobarbital, méprobamate et quinine (10 mg/L) ; loxapine, bromazépam, hydroxyzine, halopéridol, oxazépam, cétirizine, bisoprolol, bétaxolol, paroxétine, rispéridone et tropatépine (100 µg/L) ; buprénorphine (25 µg/L). Les tests en SIM/SCAN ont été réalisés sur un plasma témoin contenant buprénorphine et norbuprénorphine à 1 µg/L. Les ions de qualification en mode SIM sont  $m/z$  450, 482, 506 (buprénorphine monosilylée) et 396, 428, 452, 468, 500, 524 (norbuprénorphine mono-et disilylée). Après une extraction liquide-liquide en Toxitude A® de 1 mL de plasma en présence de 0,5 µg de standard interne (SKF-525A), le résidu sec est divisé en deux et repris par 15 µL d'acétate d'éthyle et 15 µL de BSTFA. Les injections sont réalisées sur une colonne DB5-ms (30 m x 0,25 mm ; 0,25µm d'épaisseur de film). Le programme de température du four est le suivant : 100°C pendant 1 min, puis une programmation à 20°C/min jusqu'à 300°C et un plateau de 11 min. La détection est réalisée en impact électronique à 70 eV, en mode scan avec un balayage des masses de 40 à 600 uma. La recherche en bibliothèque est réalisée selon deux protocoles : d'une part une recherche automatique, dans les 3 bibliothèques, pour tous les pics du chromatogramme (Library Search Report) dont la reconnaissance est basée uniquement sur le spectre de masse, d'autre part une recherche avec AMDIS comportant une première étape de reconnaissance fonction du temps de rétention et du spectre de masse sur la bibliothèque GRENOBLE, suivie d'une confirmation par comparaison avec les spectres de masse de PMW et NIST.

**Résultats :** le temps de rétention étant un paramètre de reconnaissance indispensable pour AMDIS, nous avons dû créer notre propre bibliothèque (GRENOBLE) et travailler en temps de rétention bloqués grâce au système RTL ; cette bibliothèque contient 134 produits à ce jour. Pour le plasma surchargé, 5 molécules ont été identifiées lors du "Library Search Report" : pentobarbital, méprobamate, quinine, loxapine et bromazépam, tandis que 9 molécules ont été identifiées par AMDIS : pentobarbital, phénobarbital, méprobamate, quinine, loxapine, bétaxolol, bromazépam, oxazépam et hydroxyzine. La buprénorphine n'a été mise en évidence que grâce au mode SIM/SCAN. 5 composés n'ont pas été repérés : rispéridone et tropatépine (problème chromatographique ?), bisoprolol, cétirizine et paroxétine (problème de sensibilité en mode full scan).

**Conclusion :** la déconvolution permet de détecter des molécules même lorsqu'aucun pic n'est repéré sur le chromatogramme, ceci se vérifie au quotidien sur des cas réels. Le mode SIM/SCAN permet de diminuer le nombre d'injections, tout en conservant la même sensibilité.

## **Evaluation d'une méthode rapide MS/MS introduction directe en premier intention pour 80 médicaments et toxiques dans le dépistage des intoxications aiguës au Centre Hospitalier de Bigorre, Tarbes : à propos de 300 dossiers.**

G. CASSAGNE, J.E. CAUSSE, C. MEIGNANT

Laboratoire Spectran, Centre Hospitalier de Bigorre, Tarbes

**Introduction :** dans le rendu analytique pour un service d'Urgences, une réponse qualitative et semi quantitative très rapide est fortement souhaitée concernant la ou les molécules en cause dans l'intoxication et un risque éventuel. Dans ce contexte, nous avons évalué une méthode MS/MS rapide sur 300 dossiers, à partir d'échantillons d'urine et de sérum.

**Méthode :** une extraction est faite par 2mL d'acétate d'éthyle après alcalinisation des échantillons par l'ammoniaque (100µL d'ammoniaque à 20%), après double défécation avec 1 mL d'acétonitrile avec 1% d'acide formique pour les sérums, et extraction directe pour les urines. L'extrait (20 µL) est injecté dans la pré colonne. La méthode rapide MS/MS est faite sur une Quattro micro (Waters) associé à un une pompe binaire 2525 et autosampler 2767 (Waters) comprend une migration dans une précolonne Xterra® C18 (5µm, 4.6x20mm, Waters) avec un débit de 0.3 mL/mn d'un gradient 100% d'acétonitrile 0.05% d'acide formique, suivi d'une acquisition en mode MRM pour 10 molécules (une transition par molécule), soit deux introductions pour 20 tranquillisants, et de même pour 20 antidépresseurs, 20 neuroleptiques et 20 stupéfiants. Toutes les molécules présentes sortent en même temps en une minute, l'analyse dure trois minutes. Chaque molécule identifiée fait l'objet d'une nouvelle acquisition avec deux transitions afin d'écarter les interférences. Les interférences entre les transitions ont été évaluées systématiquement pour les tranquillisants, les neuroleptiques et les stupéfiants au moyen de standards dans le méthanol à partir d'une base de donnée comportant 220 xénobiotiques. Avant les passages des sérums, des pools de sérum et d'urines étalons concernant les 60 molécules aux concentrations toxiques déterminées dans la littérature sont analysés ainsi que des pools témoins. L'ensemble des dossiers est analysé également en LC-MS/MS sur 26 minutes au moyen d'une colonne Polaris® 5 C18 250x4.6mm (Varian) avec un gradient tampon formiate 5mM, pH3 - Acétonitrile avec 0,05% d'acide formique à un débit de 1 mL/mn.

**Résultats :** sur les 300 dossiers analysés en méthode rapide, 60% de molécules trouvées sont retrouvées aussi en LC-MS/MS et confirmés alors dans 90% des cas par leur temps de rétention en LC-MS/MS (les 10% non confirmés concernent les amphétamines).

Certains produits comme le tramadol, la cyamémazine et la miansérine donnent systématiquement de larges pics en méthode rapide et en fin de chromatogramme en LC-MS/MS et l'interprétation est délicate. Seulement 55 % des produits trouvés en LC-MS/MS sont retrouvés en MS/MS méthode rapide, les 45% restants étant les composés en dessous de la valeur limite des pools standards. D'autres interférences sont identifiées par comparaison des deux méthodes et confrontation avec les données cliniques concernant le traitement du patient. Par exemple, la transition de l'héroïne interfère avec celle de l'amisulpride et du lansoprazole, la morphine avec le 7 amino-clonazépam, le diazépam. Des contrôles de qualité externes qualitatifs ont mis en évidence 74% de réponses justes en méthode rapide contre 94% en LC-MS/MS.

**Conclusion :** la méthode rapide permet de rendre les premiers résultats qualitatifs par molécule en 45 minutes, au lieu des 30 minutes pour l'immuno analyse, avec des données plus complètes (réponse positive confirmée dans plus d'un cas sur deux contre 33% en immuno analyse). Elle est adaptable à d'autres catégories de molécules à condition d'avoir une orientation clinique. La confirmation est faite ultérieurement avec le même extrait. Son intérêt économique est évident en terme de consommables (colonne et solvant) par rapport à l'immuno-analyse.

---

## **Développement et validation d'une méthode d'identification et/ou dosage de 18 amphétamines dans les cheveux par CL-SM/SM après extraction par SPE.**

M. MERCEROLLE, J.M. GAULIER, M.F. DREYFUSS, G. LACHÂTRE

Service de Pharmacologie et Toxicologie, CHU Dupuytren, Limoges

**Introduction :** le développement analytique régulier et nécessaire de notre activité d'analyses toxicologiques médico-légales se trouve parfois confronté à de nouvelles exigences méthodologiques ou réglementaires. Engagés dans une démarche d'accréditation COFRAC selon la norme ISO 17025, les auteurs se proposent de faire partager leur expérience à travers la validation d'une méthode d'analyse des cheveux par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, après extraction SPE.

**Méthode :** cette méthode de recherche et/ou dosage d'amphétamines (amphétamine\*, BDB, m-CPP, dexfenfluramine, DOB, DOM, éphédrine\*, MBDB, MDA\*, MDEA\*, MDMA\*, méthamphétamine\*, méthylphénidate, 4-MTA, noréphédrine, norfenfluramine, PMA et pseudoéphédrine) récemment développée, est la suivante : après décontamination (eau et dichlorométhane), les échantillons capillaires sont finement coupés et 50 mg de prélèvement sont surchargés

par un mélange d'étalons internes (\*équivalents deutérés des amphétamines). Après hydrolyse (18 heures à 45°C dans un tampon phosphate 0,1 N, pH 5,0), l'extraction est effectuée sur cartouche HLB (Oasis®, Waters). L'extrait (20 µL) est chromatographié sur une colonne Nucléodur C18 Pyramid (10 x 2,1 mm, 5 µm, Macherey Nagel®) à l'aide d'un gradient composé d'acétonitrile et de tampon formiate d'ammonium (2 mM, pH 3,0) en 29 minutes. La détection est réalisée en mode d'ionisation positive à l'aide d'un détecteur de masse triple quadrupolaire (Api 2000, Applied Biosystems®) équipé d'une interface TurboIonSpray et fonctionnant en mode Multiple Reaction Monitoring. Deux transitions sont suivies : une pour la quantification et une pour la confirmation. La méthodologie de validation a été appliquée conformément aux exigences de la norme ISO 17025. Elle s'inspire également du guide rédigé par le groupe de travail « Accréditation » de la SFTA et a conduit à la rédaction d'une procédure interne de validation spécifique à l'activité médico-légale. Le plan expérimental intègre l'étude de la linéarité sur au moins 3 niveaux de concentration, l'étude de la fidélité par le calcul des coefficients de variation et des biais relatifs de répétabilité et de reproductibilité pour 3 niveaux de concentration, la détermination des limites de détection et de quantification et l'estimation des incertitudes de mesure. Des contrôles de qualité externes (GTFCh) ont également été analysés afin de vérifier la justesse des résultats obtenus.

**Résultats :** les 18 amphétamines ainsi recherchées sont parfaitement identifiées en mode MRM en 29 minutes. Deux types de régression ont été appliqués pour la quantification des composés : la régression linéaire sans pondération et la régression quadratique pondérée en 1/X. La méthode est linéaire de 0,05 à 20 ng/mg pour la plupart des molécules (coefficient de corrélation supérieur à 0,99). La fidélité de la méthode est vérifiée avec des CV de répétabilité et de reproductibilité inférieurs à 20 % et des biais inférieurs à 25 %. Les incertitudes de mesure sont inférieures à 50 % pour l'ensemble des amphétamines et des niveaux étudiés. Enfin, l'analyse des résultats de trois contrôles de qualité externes de la GTFCh (cheveux surchargés ou cheveux de toxicomanes) a confirmé la justesse de la méthode et consolide le dossier de validation.

**Conclusion :** cette méthode permet l'identification et/ou le dosage simultané de 18 amphétamines dans les cheveux. Le dossier technique de validation, établi conformément aux exigences de la norme ISO 17025, prouve la fiabilité des résultats de cette analyse dans un cadre de toxicologie médico-légale.

## Dépistage dans le sang total laqué des stupéfiants et benzodiazépines par un analyseur semi-automatique (Investigator® de Randox) avec dosage en GC-MS ou LC-MS/MS.

B. MATHIEU, E. ABE, C. DUVERNEUIL, J.C. ALVAREZ

Laboratoire de Toxicologie, CHU Raymond Poincaré, Garches

**Objectif :** dépister les stupéfiants (amphétamines, cannabis, cocaïne et opiacés) et les benzodiazépines (BZD) dans du sang total décongelé (matrice fréquente en médecine légale) en utilisant une technique ELISA sur automate, l'Investigator® commercialisé par RANDOX. Les échantillons ont tous été dosés par GC-MS (stupéfiants) ou LC-MS/MS (BZD).

**Méthodes :** 128 échantillons de sang total préalablement dosés en GC-MS ou LC-MS/MS puis conservés à -20°C ont été testés. Tous ces échantillons avaient été trouvés positifs à au moins un des paramètres étudiés. Les échantillons sont préalablement dilués au 1/4<sup>ème</sup> dans un tampon phosphate. 60 µl de cette dilution sont introduits dans le puit d'un biochip, dont le fond est recouvert de 10 anticorps (amphétamine, méthamphétamine, benzoylecgonine, méthadone, cannabis, barbituriques, opiacés, BZD 1 et 2 et phencyclidine). Après addition du conjugué enzymatique et incubation 30 minutes à 37°C sur un agitateur programmable, les puits sont lavés 5 fois afin d'éliminer toute substance non liée à l'anticorps. La dernière étape de révélation se fait par ajout d'un tampon signal, incubation de 2 minutes, puis lecture par chimiluminescence après introduction du biochip dans l'Investigator®. Les techniques GC-MS et LC/MS/MS utilisées sont celles validées dans notre laboratoire pour chacune des classes de stupéfiant ou de BZD. Les résultats discordants ont été réanalysés après décongélation en GC-MS ou LC/MS/MS pour écarter toute possible dégradation durant la conservation.

**Résultats :** sur les 128 échantillons, 31 contenaient au moins un opiacé en GC-MS. 29 se sont révélés positifs au dépistage avec un seuil de positivité (SP) à 25 ng/mL. Les 2 "faux-négatifs" contenaient pour l'un de la pholcodine à la concentration de 5 ng/mL, et pour le second de la morphine libre à 7 ng/mL, soit des concentrations inférieures au SP. Aucun faux positif n'a été observé sur les 97 échantillons négatifs. Concernant la cocaïne, 21 étaient positifs en benzoylecgonine en GC-MS. Un seul n'a pas été retrouvé positif au dépistage au SP de 50 ng/mL, le résultat trouvé étant de 27 ng/mL et la concentration réelle étant de 20 ng/mL. Aucun faux positif n'a été observé sur les 107 échantillons négatifs. Sur les 74 échantillons positifs en THC-COOH, 69 ont été retrouvés positifs au dépistage au SP de 10 ng/mL. Les cinq échantillons discordants avaient des concentrations réelles com-

prises entre 1,9 et 8,0 ng/mL, soit inférieures au SP. Sur les 54 échantillons négatifs, 1 seul a donné un résultat positif, à la valeur limite de 10. Pour l'amphétamine (SP = 25 ng/mL) et la métamphétamine (SP = 50 ng/mL), sur les 9 échantillons positifs en GC-MS, seuls 3 ont été trouvés positifs au dépistage. 5 des 6 "faux-négatifs" contenaient de l'éphédrine ou de la pseudoéphédrine et 1 de la MDMA à la concentration de 92 ng/mL. Par contre, sur les 122 échantillons négatifs, 25 faux-positifs ont été observés, probablement dus à des amines putréfactives. Sur les 50 échantillons positifs en BZD, 10 n'ont pas été dépistés positifs avec un SP fixé à 50 ng/mL, 9 contenant du bromazépam et métabolites (concentrations en bromazépam comprises entre 10 et 190 ng/mL) et 1 du tétrazépam (20 ng/mL). Aucun faux-positif n'a été observé sur les 78 échantillons négatifs testés. Avec un SP à 10 ng/mL, aucun faux-positif et 4 "faux-négatifs" auraient été observés, tous contenant de très faible concentration de BZD. Un échantillon contenant du zolpidem (90 ng/mL) et un de la zopiclone (700 ng/mL) ont donné un résultat négatif.

**Conclusion :** cette étude a permis de modifier le protocole opératoire sur sang total laqué puisqu'un cinquième lavage s'est avéré indispensable sur ce type de matrice chargée afin de diminuer le bruit de fond. Les résultats obtenus pour les opiacés, la cocaïne et le cannabis sur des matrices pourtant difficiles sont excellents. Ceux pour les amphétamines et les BZD semblent pouvoir être améliorés en modifiant probablement le seuil de positivité.

## Recherche des causes de la mort

### La thanatopraxie : une technique utile pour conserver les corps mais qui peut gêner l'expertise toxicologique médico-légale.

J.P. ANGER<sup>(1)</sup>, F. PAYSANT<sup>(2)</sup>, A. LITCHMAN<sup>(3)</sup>, C. RAFFAULT<sup>(4)</sup>, V. DUMESTRE-TOULET<sup>(5)</sup>, G. PÉPIN<sup>(6)</sup>, P. KINTZ<sup>(7)</sup>

(1) Laboratoire de Toxicologie Pharmaceutique, Rennes ;

(2) Laboratoire de Médecine Légale, Université de Rennes 1 ;

(3) Pompes Funèbres, Plouaret ;

(4) Raffault S.H.F., Noisy-le-Grand ;

(5) Laboratoire TOXGEN, Bordeaux ;

(6) Laboratoire TOXLAB, Paris ;

(7) Laboratoire ChemTox, Illkirch.

**Introduction :** l'arrêt de la vie est à l'origine d'une altération du corps qui s'accompagne d'une série de modifications physiques ainsi que d'émissions olfactives sans compter les nombreux cas d'accidents infectieux provoqués par des bactéries non pathogènes chez

l'être vivant mais qui le deviennent après le décès. Le cadavre constitue donc un danger potentiel pour l'hygiène et la santé publique. La thanatopraxie ou embaumement artériel est l'ensemble des moyens techniques mis en œuvre pour retarder la dégradation du corps et assurer le traitement et la conservation des cadavres notamment par l'injection dans le système artériel d'un produit antiseptique et conservateur à base de formol. Elle assure également l'évacuation des liquides et des gaz contenus dans les cavités thoracique et abdominale ainsi que dans les organes creux. En cas de mort suspecte, si cette opération se déroule avant l'autopsie, elle risque de poser de sérieux problèmes à l'expert toxicologue chargé par la suite d'analyser les prélèvements.

**Méthodes :** après un bref historique, la place et les conditions légales de cette pratique sont définies puis les auteurs décrivent les différentes étapes d'un soin de conservation ainsi que la composition générale des fluides utilisés. Ils examinent ensuite grâce aux données de la littérature, le devenir de quelques agents thérapeutiques (susceptibles d'être présents au moment du décès en cas d'intoxication médicamenteuse), soumis à la fois aux variations de pH liées à la thanatomorphose mais aussi à l'action du formol présent dans les fluides de conservation ou les tissus embaumés.

**Résultats :** le corps subit de nombreux changements après la mort notamment en ce qui concerne son pH interne qui de légèrement acide au début devient par la suite progressivement alcalin en raison de la dégradation protéique libérant des amines. Ces conditions favorisent la décomposition des agents chimiques par hydrolyse, mais il ne faut pas négliger non plus l'action du formol qui réagit avec les fonctions aminées pour les méthyliser. Le devenir d'un certain nombre de médicaments (antidépresseurs tricycliques, I.S.R.S, anorexigènes, barbituriques, benzodiazépines) ou de stupéfiants placés au contact de solutions formolées est présenté et les analytes à rechercher sont décrits. Des cas d'expertises toxicologiques réalisées après embaumement artériel sont présentés. Ainsi l'un d'entre nous a pu retrouver après autopsie d'un sujet décédé des suites d'une overdose d'héroïne, embaumé puis rapatrié en France de la morphine et de la codéine dans la bile (2,5 ng/mL et 0,3 ng/mL respectivement) et 4,3 mg/kg de morphine dans le foie. La présence de 6-MAM (6,99 ng/mg) dans les cheveux a pu confirmer la cause du décès.

**Conclusion :** le diagnostic d'empoisonnement est pratiquement possible après embaumement artériel d'un corps à l'aide de solutions formolées. Certaines molécules thérapeutiques peuvent être détectées dans les tissus même si leur concentration diminue durant la période post-embaumement par instabilité, transformation, dégradation ou dilution mais le problème majeur reste toutefois l'interprétation des résultats et dans ce cas particulier, la prudence s'impose.

## Huîtres soupçonnées : toxicologie alimentaire ou éco-toxicologie judiciaire ?

P. KINTZ, M. VILLAIN, G. SALQUEBRE, V. CIRIMELE

Laboratoire ChemTox, Illkirch

**Objectif :** suite à 2 décès dans des circonstances mal définies, les pouvoirs publics ont interdit la commercialisation des huîtres d'une région conchylicole française. L'eau des bassins de production et plusieurs bourriches d'huîtres ont été remises au laboratoire dans un cadre judiciaire afin de rechercher tout polluant de l'environnement susceptible d'altérer la santé. En parallèle, un échantillon de sang et d'encéphale de chaque victime a fait l'objet d'investigations ciblées.

**Méthodes :** les solvants, les molécules volatiles (COV), le phénol et les crésols et les cyanures ont été recherchés par headspace GC-MS; les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) ont été caractérisés et dosés par GC-MS/MS; les dioxines et furanes (PCDD/PCDF) ont été criblés et dosés par GC-MS haute résolution; enfin les métaux et métalloïdes ont été analysés par ICP-MS (spéciation après LC). Notre mission excluait la recherche de toxines marines.

**Résultats :** sang victime 1 : présence d'acétone et d'isopropanol, arsenic à 38 ng/mL, étain à 29 ng/mL, cyanures à 52 ng/mL, naphtalène à 17 ng/mL, phénol à 0,07 mg/L, PCDD/PCDF à 1,77 pg/g (encéphale) - sang victime 2 : présence d'acétone et d'isopropanol, arsenic à 18 ng/mL, étain à 135 ng/mL, cyanures inférieurs à 50 ng/mL, naphtalène à 13 ng/mL, phénol à 0,08 mg/L, PCDD/PCDF à 4,68 pg/g (encéphale) - eaux en 4 zones : absence de COV et d'HAPs, cyanures inférieurs à 50 ng/mL, absence de produits agricoles, phénol inférieur à la LOD, enrichissement en strontium, PCDD/PCDF entre 0,02 et 0,93 pg/L - huîtres provenant de 3 zones : aliments riche en strontium, manganèse, argent, cuivre et zinc, arsenic total entre 2720 et 4240 (g/kg (AsIII : 13-17 µg/kg, AsV : 14-26 µg/kg, MMA : ND-2 µg/kg, DMA : 13-100 (g/kg, arsénobétaine : 2660-3460 µg/kg), cyanures inférieurs à 50 ng/kg, absence de COV et d'HAPs, phénol inférieur à la LOD, PCDD/PCDF entre 0,026 et 0,073 pg/g.

**Discussion et conclusion :** une fois établies, toutes ces concentrations devaient être interprétées. Cette étape est bien évidemment la plus critique, en particulier du fait de l'absence de référentiel. A titre d'exemple, il n'existe aucune donnée disponible sur les concentrations physiologiques sanguines chez l'homme des HAPs. Les huîtres sont encore moins bien cartographiées ! La prise de conscience publique de l'importance de préserver notre environnement face aux grandes crises alimentaires devraient aboutir à des travaux de plus en plus complets, d'autant que le passage vers des instructions judiciaires est plus que jamais d'actualité. La recherche des polluants de l'environnement fait appel à des méthodes analytiques classiques en toxicologie.

Haute sensibilité et spécificité absolue semblent être des pré-requis dans ce genre de situations particulières, dont le coût important reste le frein à une démocratisation expertale.

## Décès accidentel d'un enfant : rôle du tramadol ?

H. EYSSERIC<sup>(1,2)</sup>, C.E. BARJHOUX<sup>(3)</sup>, M. PEOC'H<sup>(4)</sup>, V. SCOLAN<sup>(2)</sup>, A. BARRET<sup>(2)</sup>, N. ALLIBE<sup>(2)</sup>, M. MALLARET<sup>(3)</sup>, G. BESSARD<sup>(1)</sup>, L. BARRET<sup>(2)</sup>

(1) UF de Pharmacologie et Toxicologie, DBPC, CHU, Grenoble ;

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

(3) Pharmacovigilance, CHU, Grenoble ;

(4) Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU, Grenoble.

**Introduction :** un jeune garçon (12 ans, 34 kg) sans antécédent particulier ni pathologie en cours, est pris en charge en fin d'après midi par son médecin traitant pour une blessure légère du pied (1 point de suture). Il reçoit une dose unique de tramadol (solution buvable) à la posologie de 2,5 mg/kg. De retour à domicile, l'enfant se plaint de fatigue, de sueurs, se sent fébrile et présente un malaise (sa mère lui administre 500 mg de paracétamol). Au matin, sa mère le découvre somnolent, le teint « gris », se plaignant de sueurs et de malaise. Elle constate une hypothermie à 33,5 °C. Le médecin rappelé, observant une cyanose, initie une oxygénothérapie. L'enfant est hospitalisé pour aggravation de son état en début d'après-midi. Il présente des convulsions (sans hypoglycémie), un état confusionnel avec alternance de troubles de la vigilance, obnubilation, agitation, une acidose respiratoire et une hypothermie persistante. L'administration de naloxone entraîne momentanément une reprise de conscience, une normalisation du diamètre pupillaire et une recoloration rapide. L'enfant décède d'un arrêt cardiaque environ 24 heures après le début de l'épisode.

**Méthode :** des prélèvements à visée toxicologique *ante mortem* et au cours de l'autopsie sont réalisés ainsi qu'un examen anatomo-pathologique et un génotypage du CYP2D6. Le dosage du tramadol est réalisé par chromatographie liquide couplée à une détection par spectromètre de masse. Après extraction liquide/Liquide des différents milieux biologiques par un mélange chlorobutane/terbutylméthylether/méthanol en présence de tramadol-<sup>13</sup>C,<sub>3</sub> comme standard interne, la séparation est assurée sur colonne Nucléodur C18 par une phase mobile se composant d'un mélange de phases A (tampon formiate d'ammonium 5 mM, pH3) et B (méthanol). La détection est réalisée par un spectromètre de masse API 150 EX (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 (tramadol), 250.3 (O-desméthyl tramadol) et 268.3 (standard interne). L'ensemble des résultats et les différentes hypothèses étiologiques du décès sont présentés.

**Résultats :** l'autopsie confirme une plaie suturée sans aspect infectieux, inflammatoire, ni signe de gravité. L'analyse anatomo-pathologique conclut à un aspect sensiblement normal des différents organes examinés, excepté des signes de myocardite subaiguë d'origine indéterminée. Les analyses toxicologiques mettent en évidence des concentrations sanguines anormalement élevées de tramadol et de son métabolite actif, le O-desméthyl tramadol (respectivement à 170 et 145  $\mu\text{g/L}$ ) dans l'hypothèse d'une prise unique de tramadol environ 20 heures avant le prélèvement. Le résultat du génotypage du CYP2D6 permet d'écarter une mutation pouvant être la cause d'un métabolisme anormal du tramadol.

**Conclusion :** les premiers symptômes présentés par l'enfant évoquent des effets indésirables parfois observés pour le tramadol à dose thérapeutique. Les signes de gravité comme l'hypothermie, les convulsions et l'acidose respiratoire se voient lors d'intoxication aux dérivés opiacés. Différentes origines de ce surdosage éventuel sont possibles comme une posologie trop élevée, une imprécision du nombre de gouttes administrées (la conformité de la concentration de la spécialité a été contrôlée), un état physiopathologique méconnu ou un trouble du métabolisme autre qu'une anomalie du CYP2D6. La myocardite subaiguë a pu également intervenir dans la survenue du décès tout au moins comme facteur favorisant (troubles du rythme ?).

### Injection mortelle de sévoflurane.

Y. BARGUIL<sup>(1)</sup>, P. KINTZ<sup>(2)</sup>, S. MERMOND<sup>(1)</sup>, D. DUHET<sup>(1)</sup>, E. CHOBLET<sup>(1)</sup>, J. DARTOIS<sup>(3)</sup>, M. VILLAIN<sup>(2)</sup>, E. DORANGEON<sup>(1)</sup>, V. CIRIMELE<sup>(2)</sup>

(1) Laboratoire, CHT, Nouméa ;

(2) Laboratoire ChemTox, Illkirch ;

(3) D.A.R., CHT, Nouméa.

**Introduction :** nous rapportons un cas de suicide par sévoflurane : femme de 35 ans découverte comateuse dans une chambre d'hôtel. 14 ampoules de 5 mg de midazolam, des seringues vides et une bouteille de Sévorane® étaient retrouvées. Des prélèvements sanguins et urinaires ont été réalisés à l'admission aux Urgences de l'hôpital, un scanner montrait une destruction totale des noyaux gris centraux. La mort cérébrale était ensuite constatée mais la victime était maintenue durant 4 jours sous respiration artificielle. Lors de l'autopsie de nouveaux prélèvements ont été effectués.

**Méthodes :** les analyses étaient effectuées par GC-FID (éthanol), HPLC-DAD (screening toxicologique), HS-GC-MS (pour le sévoflurane : 1 mL ou 1 g d'échan-

tillon dans un flacon serti, séparation réalisée sur colonne HP WAX de 15 m). Devant la négativité des dosages de sévoflurane, son métabolite, l'hexafluoroisopropanol (HFIP) était recherché par HS-GC-MS ( $m/z$  des ions caractéristiques : 99, 129 et 79). Il représente environ 5 % des concentrations de sévoflurane.

**Résultats :** les produits retrouvés sont décrits dans le tableau ci-dessous.

Echantillon	HFIP (mg/L ou mg/kg)	Sévoflurane estimé (mg/L ou mg/kg)	Midazolam (ng/L ou ng/g)	OH-Midazolam (ng/L ou ng/g)	Zolpidem (ng/L ou ng/g)
Sang (admission)	21,01	420	60	12	14
Urine (admission)	597,5	11950	51	9901	11
Urine (autopsie)	2,36	47,2			
Sang cardiaque	1,2	24	0,2	1,1	
Humeur vitré	0,53	10,6	0,4	1,1	
Foie	3,72	74,4	0,6	33,1	
Bile	3,37		4,1	145,5	
Cerveau	1,11		44,4	8,6	
Poumon	3,36				
Graisse	0,86				
Cœur			0,4	1,5	
Cheveux			81	traces	2535

**Conclusion :** à partir de la formule d'Imbriani, selon la loi des gaz parfaits et suivant le volume de la chambre (43  $\text{m}^3$ ), la victime aurait dû inhaler 36 bouteilles de Sévorane® pour obtenir de telles concentrations urinaires d'HFIP. Le mode d'administration probable du sévoflurane serait donc l'injection, et la cause du décès une destruction des noyaux gris centraux. Il n'y a pas eu arrêt cardio-respiratoire et le midazolam ne peut donc pas être une des causes du décès. A l'admission, la majeure partie du midazolam et du sévoflurane était métabolisée. On note une distribution élective du midazolam pour le cerveau, les concentrations cérébrales à J + 4 étant toujours élevées. Son métabolite, l'OH-midazolam, ne se fixe presque pas dans les cheveux. L'analyse capillaire révèle d'ailleurs que la victime avait déjà consommé auparavant du midazolam et de grandes quantités de zolpidem.

### Détection par CPG-SM/SM de plusieurs hallucinogènes atypiques. A propos de décès par l'ibogaïne et la kétamine.

C. MAZOYER<sup>(1)</sup>, Y. LESEC<sup>(2)</sup>, F. ROSATI<sup>(3)</sup>, R. JACQUEMARD<sup>(3)</sup>, M. PEOC'H<sup>(3)</sup>, L. ROMEUF<sup>(1)</sup>, Y. GAILLARD<sup>(1)</sup>, F. BEVALOT<sup>(4)</sup>, C. LEMEUR<sup>(4)</sup>, J.M. PREVOSTO<sup>(5)</sup>

(1) Laboratoire LAT, La Voulte-sur-Rhône ;

(2) Cabinet médical, Privas ;

(3) Service de Médecine Légale, Hôpital Bellevue, Saint-Etienne ;

(4) Laboratoire Lumtox, Lyon ;

(5) Fédération de Biochimie, Hôpital Desgenettes, Lyon.

**Introduction :** la présente étude s'est intéressée à trois molécules hallucinogènes moins populaires que le cannabis, le LSD ou les dérivés amphétaminiques mais d'intérêt médico-légal grandissant : la kétamine, anesthésique détourné de son usage médical à des fins récréatives; l'ibogaïne, extrait de l'iboga, utilisé

notamment pour le traitement des dépendances à l'alcool et aux drogues ; enfin, la salvinorine-A, substance présente dans la plante *Salvia divinorum* connue depuis longtemps au Mexique pour ses vertus enthéogènes.

**Objectif :** la mise en évidence de plusieurs hallucinogènes atypiques dans les fluides biologiques par CPG-SM/SM pour documenter notamment deux décès par overdose.

**Méthodes :** les analyses sont réalisées par CPG-SM/SM en impact électronique après extraction liquide/Liquide sur TOXI-TUBES® A. Pour l'analyse de kétamine et de norkétamine, la kétamine-d4 est utilisée comme étalon interne. La quantification est réalisée sur les ions  $m/z = 115 + 145$ , fils du  $m/z = 184$  pour la kétamine ; sur les ions  $m/z = 130 + 131 + 149$ , fils du  $m/z = 166$  pour la norkétamine (les ions  $m/z = 119 + 149$ , fils du  $m/z = 188$  sont utilisés pour la kétamine-d4). Les facteurs de réponse respectifs sont : 1,1 pour la kétamine et 0,9 pour la norkétamine par rapport à la kétamine-d4. La limite de détection est de 1,0 ng/mL pour la kétamine et la norkétamine. Pour l'analyse d'ibogaïne et d'ibogamine, le prazépam-d5 est utilisé comme étalon interne. La quantification est réalisée sur l'ion  $m/z = 225$ , fils du  $m/z = 310$  pour l'ibogaïne (l'ion  $m/z = 272$ , fils du  $m/z = 300$  est utilisé pour le prazépam-d5). La linéarité est vérifiée pour l'ibogaïne entre 10 ng/mL et 5000 ng/mL (CV < 10 % pour chaque point). La détection est réalisée sur l'ion  $m/z = 195$ , fils du  $m/z = 280$  pour l'ibogamine. La limite de détection est de 1,0 ng/mL pour l'ibogaïne. Enfin, l'ion  $m/z = 446$ , fils du  $m/z = 462$  est utilisé pour la détection de la salvinorine-A après dérivatisation par le MSTFA. La limite de détection est de 2,0 ng/mL pour la salvinorine-A.

**Résultats :** la méthode mise au point a permis de mettre en évidence l'implication d'hallucinogènes dans deux cas de décès par surdose : le premier chez un homme de 27 ans, consommateur de méthadone (concentration en ibogaïne : sang = 1,27 µg/mL ; urines = 1,71 µg/mL) ; le second chez un toxicomane de 31 ans (concentration en kétamine : sang = 10,0 µg/mL).

**Conclusion :** devant le nombre, la diversité et surtout la recrudescence des drogues dites « naturelles » est apparue la nécessité d'une méthode de caractérisation de ces molécules dans les prélèvements biologiques utilisable en routine. Il s'agit de la première méthode en CPG-SM/SM pour la détection et le dosage de ces molécules.

## Recherche d'une contribution pharmacogénétique aux décès observés à la suite de l'administration, licite ou illicite, de buprénorphine haut dosage : résultats d'une étude préliminaire multicentrique

J.M. GAULIER<sup>(1)</sup>, S. BOUANANI<sup>(1)</sup>, I. RICORDEL<sup>(2)</sup>, P. MURA<sup>(3)</sup>, B. BRUNET<sup>(3)</sup>, M. BIDAUD<sup>(4)</sup>,

M. MOULSMA<sup>(5)</sup>, F. PARANT<sup>(5)</sup>, L. NACACHE<sup>(6)</sup>, A.L. PELISSIER<sup>(7)</sup>, G. LACHATRE<sup>(1)</sup>, P. MARQUET<sup>(1)</sup>

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

(2) Laboratoire de Toxicologie, INPS, Paris ;

(3) Laboratoire de Toxicologie et Pharmacologie, CHU, Poitiers ;

(4) CSST, Le Tourniquet, Poitiers ;

(5) Pharmacotoxicologie et Analyse des Eléments Traces, Hôpital E. Herriot, Lyon ;

(6) CSST, Hôpital E. Herriot, Lyon ;

(7) Service de Médecine Légale, Faculté de Médecine, Marseille.

**Introduction :** la buprénorphine haut dosage (BUHD), malgré une faible toxicité théorique, a été à l'origine d'un nombre non négligeable de décès au cours de ces dernières années. Il existe des hypothèses d'ordre pharmacocinétique (injection intraveineuse fréquente) et/ou pharmacodynamique (association quasi-systématique à des benzodiazépines) à ces décès. Ce travail préliminaire propose d'explorer l'hypothèse d'une contribution pharmacogénétique conférant une susceptibilité individuelle particulière à certains individus aux effets dépresseurs respiratoires de la BUHD et/ou de ses métabolites : existence de polymorphismes génétiques pouvant influencer le métabolisme de la buprénorphine et/ou existence de polymorphismes génétiques des récepteurs.

**Méthode :** une sélection de dossiers d'expertises médico-légales a permis de constituer une base de données de 37 cas de décès consécutifs à une prise de buprénorphine et pour lesquels du sang total était disponible pour l'extraction d'ADN génomique. Parallèlement, 52 patients traités par BUHD pour dépendance antérieure majeure aux opiacés, équilibrés par le traitement, ont été recrutés après consentement écrit pour participer à cette étude pharmacogénétique. Les fréquences génotypiques des Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) des gènes *CYP 3A4\*1B* (A-392G), *CYP3A5\*3* (A6986G), *UGT2B7* (G-840A), *CYP2C8\*2* (A805T), *CYP2C8\*3* (G416A), *OPRM1* (A118G) et *MDR1* (C3435T) ont été déterminées dans chacune des deux populations. Les concentrations, les rapports métaboliques, les doses d'entretien, ont été comparées entre les groupes polymorphiques afin d'apprécier l'influence des polymorphismes génétiques des voies métaboliques, ou des récepteurs µ.

**Résultats :** une différence significative de fréquence génotypique a été mise en évidence pour le *CYP 3A4\*1B* (A-392G) : prédominance de métaboliseurs rapides (possédant un ou deux allèles mutés *CYP3A4\*1A/\*1B* ou *CYP3A4\*1B/\*1B*) (n=14) dans la population des sujets décédés, par rapport à la population des sujets vivants (n=7). Ce métabolisme augmenté pourrait éventuellement contribuer à la survenue d'une dépression respiratoire, compte tenu du pouvoir

protecteur de la buprénorphine vis-à-vis des effets dépresseurs centraux de la norbuprénorphine. Toutefois, cette différence génotypique ne s'exprime pas significativement dans les rapports métaboliques. Aucune différence de fréquence génotypique du *SNP* du gène *MDR1*, ni de différence dans les rapports métaboliques entre les groupes polymorphiques, n'a été relevée. L'analyse concernant le *SNP* du récepteur  $\mu$  (fréquences génotypiques, doses d'entretien) n'a révélé aucune tendance.

**Conclusion :** les résultats de cette première étude, si la contribution pharmacogénétique du *CYP3A4* était confirmée, permettrait d'envisager le choix objectif du traitement de substitution (*BUHD* ou méthadone), alors qu'il est actuellement arbitraire ou basé sur des considérations de pathologies associées à la toxicomanie. Ainsi, les sujets métaboliseurs rapides pour le *CYP3A4* pourraient être orientés vers la méthadone, tandis que ceux qui présentent une mutation pour le *CYP2D6* (impliqué dans le métabolisme de la méthadone) plutôt orientés vers la prise de buprénorphine.

## Quelles concentrations potentiellement toxiques ou létales pour la pholcodine ? Etude rétrospective de 127 cas de décès médico-légaux.

H. EYSSERIC<sup>(1)</sup>, P. SAVIUC<sup>(1)</sup>, M. DEVEAUX<sup>(2)</sup>, J.M. GAULIER<sup>(3)</sup>, V. DUMESTRE-TOULET<sup>(4)</sup>, I. RICORDEL<sup>(5)</sup>, F. BEVALOT<sup>(6)</sup>, J.C. ALVAREZ<sup>(7)</sup>, J.P. GOULLÉ<sup>(8)</sup>, M.H. GHYSEL<sup>(9)</sup>, A. TURCANT<sup>(10)</sup>

- (1) CHU Grenoble ;
- (3) Laboratoire TOXLAB Paris ;
- (2) CHU Limoges ;
- (4) Laboratoire TOXGEN Bordeaux ;
- (5) Laboratoire de la Préfecture de Police, Paris ;
- (6) Laboratoire Lumtox, Lyon ;
- (7) CHU, Garches ;
- (8) CH, Le Havre ;
- (9) LPS, Lille ;
- (10) CHU, Angers.

**Introduction :** compte tenu de l'absence de données bibliographiques, une étude de cas médico-légaux a été conduite parmi les membres de la commission « toxicologie judiciaire » de la SFTA pour évaluer les valeurs potentiellement toxiques ou létales des concentrations sanguines *post mortem* de pholcodine (PH).

**Méthodes :** l'étude rétrospective (2000-2006) incluait des décès impliquant la PH pour lesquels un dosage sanguin (cardiaque ou périphérique) avait été réalisé. Ont été pris en compte : âge, sexe, circonstances de décès, constatations autopsiques, alcoolémie, concentration sanguine des autres substances. L'analyse a conduit à définir une classification des causes de la

mort réalisée le plus indépendamment possible de la concentration de PH.

**Résultats :** dix membres ont transmis au total 127 cas exploitables qui concernaient 89 hommes et 37 femmes (1 sexe inconnu) de 2,5 à 94 ans (médiane 46 ans). Le sang est d'origine cardiaque (38,1 %), périphérique (40,5 %) ou inconnue (21,4 %). Le tableau suivant rapporte les concentrations de PH (CPH) selon les causes de la mort.

Rôle de la PH / causes de la mort [classes]	n	CPH médiane (g/L)	CPH min-max (g/L)	CPH>200 (%)
Implication hautement probable de la PH [1] surdosage PH seule ou majoritaire	8	1165	472-8130	100
Implication probable de la PH [2] Surdosage médicamenteux/alcoolique :	40	280	7-12 118	58
- suffisant pour expliquer le décès [2.1]	27	289	7-12118	59
- évoquant une potentialisation par la PH [2.2]	13	258	12-1064	54
Implication possible de la PH + autres causes décès [3]	38	392	20-6270	71
- décès « traumatique » où la PH a pu modifier le comportement ou la vigilance [3.1]	22	392	33-3300	68
- présence d'un terrain ou d'une pathologie [3.2]	16	410	20-6270	75
Lien <i>a priori</i> exclu de la PH + autres causes décès [4]	23	90	5-930	26
Décès de cause inconnue [5]	18	200	2-980	50

Parmi tous les décès, ceux avec la PH seule [1] ont une CPH médiane significativement plus élevée (Kruskall Wallis ;  $p < 0,002$ ). 3 décès de cette classe [1] ont une CPH de moins de 1000  $\mu\text{g/L}$  (472, 832 et 987). Parmi les cas avec une autre cause de décès que la PH [3 et 4], ceux avec une implication possible de la PH [3] ont une CPH médiane significativement plus élevée ( $p < 0,001$ ), et 71 % ont une CPH supérieure à 200  $\mu\text{g/L}$ . Parmi les décès *a priori* sans lien avec la PH [4], 26 % ont une CPH supérieure à 200  $\mu\text{g/L}$ , et 2 CPH atteignent 810 et 930  $\mu\text{g/L}$ . Toutefois, cette étude comporte quelques points faibles : biais de recrutement et de classification, et absence de standardisation de la méthode de dosage.

**Conclusion :** ces résultats permettent d'évoquer une implication possible de la PH dans le décès lorsque la CPH dépasse 200  $\mu\text{g/L}$ . Par ailleurs, les 8 cas de décès avec PH seule [1] montrent qu'*a priori* des CPH supérieures à 470  $\mu\text{g/L}$  sont compatibles avec un décès d'origine toxique dû à la PH. Ces résultats préliminaires incitent à doser systématiquement la PH ; ils nécessitent d'être complétés par une étude prospective multicentrique.

## Soumission chimique

### Conjoint, médecin traitant : des personnes au-dessus de tout soupçon ?

J.C. ALVAREZ<sup>(1)</sup>, E. ABE<sup>(1)</sup>, C. DUVERNEUIL<sup>(1)</sup>, B. MATHIEU<sup>(1)</sup>, N. BOUOKBA<sup>(2)</sup>

- (1) Laboratoire de Toxicologie ;
- (2) Service de Médecine Légale, CHU Raymond Poincaré, Garches.

**Objectif :** nous rapportons 2 cas de soumission chimique impliquant dans un cas le conjoint et dans l'autre le médecin traitant. Cas n°1 : Une infirmière, qui a quitté le domicile conjugal, arrive chez son mari vers 14 h. Elle vient récupérer leur fille de 17 mois que le mari n'a plus présenté à sa mère depuis 6 semaines pour l'obli-

ger à revenir vivre avec eux. Dans l'après-midi, elle fait un malaise. Il la conduit aux urgences de l'hôpital, où aucune pathologie n'est diagnostiquée, puis la ramène chez lui. Elle se réveille nue le lendemain dans son lit, sans aucun souvenir de la soirée. Elle porte plainte à 18 h, soit environ 28 heures après la prise présumée. Un prélèvement urinaire ainsi qu'un certain nombre de bouteilles vides et de verres retrouvés au domicile sont envoyés au laboratoire pour analyse. Un prélèvement de cheveux est réalisé un mois après. **Cas n°2** : vers 13h, après appel téléphonique, un médecin traitant se rend au domicile d'une de ses patiente traitée par Séresta® et Séropram®. Il lui donne à prendre des gouttes, qu'il dira ensuite être du Valium® pour traiter son angoisse, et repasse la voir vers 20h après ses visites. Une amie appelle cette patiente au téléphone dans la soirée, mais n'a aucune réponse. Inquiète, elle décide de venir voir son amie en pleine nuit. Avec l'aide du gardien, elle finit par arriver à la réveiller. La patiente est totalement somnolente, ne se souvient de rien, et son amie lui demande de porter plainte. Des prélèvements de sang, d'urine et de cheveux sont effectués à 3 h du matin, soit environ 14 heures après la prise présumée.

**Méthodes** : les stupéfiants sont recherchés en CPG-SM. 27 benzodiazépines et métabolites et 18 hypnotiques ou sédatifs pouvant être utilisés dans la soumission chimique sont recherchés en CL-SM/SM. Le GHB est dosé par CPG-SM et l'alcool par CPG-FID.

**Résultats** : **Cas n°1** : aucun stupéfiant n'est retrouvé dans les urines. Le GHB est inférieur à 0,25 mg/L. Il n'y a pas d'alcool. Du clonazépam et du 7-amino-clonazépam sont retrouvés à la concentration respective de 115 et 2980 ng/mL ainsi que des traces de clonazépam dans un flacon d'homéopathie retrouvé vide dans la poubelle de la salle de bain. Le prélèvement capillaire effectué 1 mois après les faits montre sur les 4 segments analysés, du zolpidem (70 à 230 pg/mg) et de l'hydroxyzine (230 à 500 pg/mg) en faveur de prises régulières, et la présence de clonazépam et de 7-amino-clonazépam uniquement sur le premier segment à une concentration, respectivement 17 et 35 pg/mg, compatible avec une prise unique. **Cas n° 2** : Il n'y a pas de stupéfiant. Le GHB est à la concentration physiologique de 0,6 mg/L et 0,3 mg/L respectivement dans le sang et l'urine. De l'alcool est retrouvé dans le sang et les urines, respectivement 1,28 et 1,79 g/L. Il est retrouvé du diazépam (27 ng/mL), de l'oxazépam et du témazépam uniquement dans les urines (reflet de la prise de Séresta® et Valium®) sans nordiazépam, du citalopram (86 ng/mL, Séropram®), et du 7-aminoflunitrazépam dans le sang (3 ng/mL) et les urines (43 ng/mL). L'analyse capillaire montre la présence d'oxazépam sur les 4 segments étudiés (96 à 283 pg/mg). Le diazépam et le 7-amino flunitrazépam sont absents. L'analyse d'une ampoule vide étiquetée "Narcozep" retrouvée dans la poche de costume du médecin montre la présence de flunitrazépam, mais

également de diazépam...Le médecin aurait eu une relation sexuelle avec sa patiente. Un préservatif, placé dans le même sac plastique que celui contenant les gants utilisés par le médecin pour sa visite a été retrouvé dans le vide-ordure. Une analyse ADN est en cours. L'absence de nordiazépam après la prise de diazépam sera discutée. Le diazépam et le citalopram sont tous deux métabolisés par le cytochrome 2C19. L'analyse génétique de ce cytochrome chez la patiente n'a montré aucune mutation. Il pourrait donc s'agir d'une interaction entre diazépam et citalopram sur le 2C19.

**Conclusion** : ces 2 cas montrent que la soumission chimique peut également être un moyen utilisé par des personnes à priori au-dessus de tout soupçon.

---

## Soumissions chimiques en série.

M. CHÈZE, A. LENOAN, M. DEVEAUX, G. PÉPIN  
Laboratoire TOXLAB, Paris

**Introduction** : après des débuts difficiles dus aux exigences techniques, la preuve analytique dans les cas de soumission chimique s'est considérablement améliorée. Une technicité de pointe associée à l'expérience des toxicologues analystes et à l'étroite collaboration des experts avec les autorités requérantes et les médecins urgentistes y est pour beaucoup, et permet d'identifier un nombre croissant d'auteurs et surtout de victimes. Nous voulons attirer l'attention ici sur le problème de la récurrence en soumission chimique, que nous illustrerons par 3 cas récents où les mis en cause ont fait respectivement 2, 3 et 6 victimes recensées.

**Méthodes** : pour ces 11 victimes de soumission chimique, les cheveux et/ou le sang et/ou les urines ont été prélevés à des délais très variables, allant de quelques heures à plusieurs jours. Les fluides (1mL) ont été extraits par Toxi-tubeA®. Les cheveux ont été segmentés puis lavés au dichlorométhane, séchés et coupés très finement. Vingt milligrammes ont été incubés une nuit à 56°C dans du tampon Sorensen (pH 7,6) en présence de 2 ng de clonazépam-d4 (standard interne). L'extraction a été effectuée par le mélange dichlorométhane/éther (80/20). Les dosages ont été réalisés en CLHP-ESI-SM/SM sur tous les échantillons biologiques.

**Résultats** : **Cas #1** : deux jeunes femmes (25 et 27 ans) sont abusées sexuellement par le même homme, à un an d'intervalle, selon le même scénario. Après les avoir courtisées à plusieurs reprises, il leur offre des tartes dans lesquelles il a caché un sédatif. Sur la première victime, les analyses ont révélé la présence de lorazépam dans le sang (16 ng/mL), l'urine (1041 ng/mL) et les cheveux (traces < 2 pg/mg). Sur la seconde victime, en l'absence de sang et d'urine, les analyses ont révélé la présence de zolpidem dans les cheveux, uniquement sur le segment des faits (19 pg/mg). **Cas #2** : un homme réussit périodiquement à se faire inviter à domicile par des individus inconnus de lui, et verse un produit dans la nourriture de ses

hôtes. Les victimes s'endorment rapidement après le repas, pour se réveiller dans leur appartement fouillé, clés de voiture et/ou divers objets volés. Les analyses ont révélé chez les trois victimes (hommes de 25, 42 et 47 ans) la présence de clonazépam et 7-aminoclonazépam, dans le sang et l'urine, et/ou la présence de 7-aminoclonazépam dans les cheveux, uniquement sur la période des faits à 8 et 9,5 pg/mg. L'analyse des assiettes saisies révélait la présence de clonazépam uniquement dans celles utilisées par les victimes (n = 2). **Cas #3** : lors de 5 soirées différentes, un même homme très typé, offre des verres de whisky-coca. Il fait six victimes (hommes âgés de 27, 31, 33, 37, 46 et 47 ans). Tous s'endorment rapidement et ont un réveil très difficile. Trois d'entre eux se réveillent aux urgences d'un même CH, deux à leur domicile, et le dernier dans son véhicule. L'analyse des différents prélèvements biologiques (selon les cas sang, urine, et/ou cheveux) a révélé l'utilisation d'un cocktail très particulier de 5 médicaments : flunitrazépam, clonazépam, doxylamine, cyamémazine, zolpidem. La saisie chez le mis en cause d'une petite bouteille d'eau minérale contenant un liquide bleu ainsi qu'un épais dépôt non soluble, et dont l'analyse a montré la présence de flunitrazépam, clonazépam, doxylamine, cyamémazine, zolpidem et lorazépam, a permis de confondre l'agresseur. Tout récemment encore, 17 victimes ont été recensées dans le cadre d'une même affaire contre un tandem utilisant du Rivotril®.

**Conclusion** : ces exemples illustrent concrètement le possible caractère répétitif de ce type de délit et l'apport essentiel de l'analyse capillaire et de la CLHP-ESI-SM/SM dans les cas de soumission chimique, lorsqu'elle est utilisée systématiquement, et en routine.

## Maltraitance chimique sur personne âgée. Pas de limite à l'arme chimique ...

P. KINTZ, M. VILLAIN, G. SALQUEBRE, V. CIRI-MELE,

Laboratoire ChemTox, Illkirch

**Objectif** : dans le cadre d'une expertise judiciaire, il nous a été ordonné de procéder à l'analyse des cheveux d'une femme âgée, logée en maison de retraite et soupçonnée d'être victime de maltraitance, en particulier d'administration répétée de molécules à visée sédatrice. La longue liste de substances actives retrouvées constitue une originalité dans les séries habituelles de soumission chimique.

**Méthode** : les cheveux remis étaient de couleur grise, de longueur d'environ 5 cm. Au laboratoire, nous avons criblé les benzodiazépines et les sédatifs (antihistaminiques, phénothiazines, scopolamine, halopéridol ...) par UPLC-MS/MS et les narcotiques (kétamine, péthidine, tramadol, buprénorphine ...) par LC-MS/MS après incubation des cheveux décontaminés, coupés en segments fins dans un tampon phosphate faiblement

alcalin et extraction soit par un mélange éther diéthylique - dichlorométhane, soit par un mélange dichlorométhane - isopropanol - *n*-heptane. Les limites de quantifications de ces méthodes validées sont de l'ordre de 1 à 5 pg/mg pour les benzodiazépines et les sédatifs et de 1 à 10 pg/mg pour les narcotiques.

**Résultats** : les résultats (pg/mg) obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

	Concentrations
Nordiazépam	213
Diazépam	81
Bromazépam	26
Zopiclone	137
Zolpidem	21
Temazépam	12
Diphenhydramine	40
Doxylamine	65
Péthidine	714
Tramadol	3574
Fentanyl	11

Ces résultats seront discutés sur les plans qualitatif et quantitatif. Des commentaires seront aussi adressés sur l'impact de ces médicaments chez la victime, en particulier l'usage répété d'agents anesthésiques, qui peuvent être considérés comme de véritables armes chimiques.

**Conclusion** : les statistiques de la soumission chimique classent généralement les benzodiazépines et apparentés (zolpidem, bromazépam, clonazépam) comme les substances les plus fréquemment retrouvées. Dans un contexte particulier de séjour au long cours dans une maison de retraite, cette notion apparaît comme dépassée et cette expertise démontre un passage vers un arsenal lourd de molécules classées, dont l'usage peut mettre en jeu le pronostic vital.

## COMMUNICATIONS AFFICHÉES

### Le printemps de Bourges 2006, à propos de 7 cas de conduite sous influence.

M. PERRIN, Y. LECOMPTE, O. ROUSSEL

Département Toxicologie, IRCGN, Rosny-sous-Bois

**Introduction** : la prise de stupéfiants, en particulier celle d'amphétamines et apparentés influence négativement les capacités de conduite automobile. Nous relatons dans cette présentation une série de 7 conducteurs ayant conduit sous l'influence de stupéfiants entre Bourges et le péage d'autoroute de Saint-Arnoult-en-Yvelines.

**Méthode** : nous avons mis en oeuvre les méthodes d'essai du consensus SFTA « sécurité routière ».

**Résultats** : toutes les concentrations sont exprimées en ng/mL de sang.

Conducteur n°1 : THC : 3 ; THC-COOH : 12 ; amphétamine : 15 ; cocaïne 393 ; BZE : 15

Conducteur n°2 : THC : 9 ; THC-COOH : 72 ; BZE : 175

Conducteur n°3 : THC : 5 ; THC-COOH : 30 ; amphétamine : 393 ; BZE : 25

L'OPJ nous a transmis également les résultats obtenus au cours de la même opération, mais analysés par d'autres laboratoires :

Conducteur n°4 : THC : 3,4 ; 11-OH-THC : 1,4 ; THC-COOH : 46

Conducteur n°5 : THC : 1 ; 11-OH-THC : 0,7 ; THC-COOH : 7,5

Conducteur n°6 : THC : 1,6 ; THC-COOH : 17,5 ; BZE 1280 ; EME : 33

Conducteur n°7 : THC : 2,7 ; THC-COOH : 15,6

Les résultats décrits ci-dessus ont été obtenus sur des prélèvements effectués sur des conducteurs non victimes d'un accident de la route. Ils ont été interceptés au niveau du péage en raison d'une infraction au Code de la Route (non port de la ceinture, défaut d'affichage de vignette d'assurance ou usage du téléphone au volant, etc...). Les dépistages urinaires s'étant révélés positifs, les conducteurs ont été dirigés vers le centre hospitalier de rattachement pour effectuer les prélèvements sanguins. Les résultats obtenus permettent de confirmer ce que nous savons sur les habitudes toxicomaniaques des « teuffeurs ».

**Conclusion :** le nombre relativement restreint de conducteurs retenus à l'issue des opérations de bord de route est lié essentiellement aux difficultés de mise en oeuvre du dépistage urinaire. La mise en place de dépistages salivaires, s'ils se révèlent suffisamment sensibles, permettra un meilleur criblage des conducteurs à risque, sans toutefois remettre en cause l'appréciation des forces de l'ordre.

## Évaluation et intérêt du test Multiscreen 10 (BUP/MDT) pour les patients d'un centre de soins pour toxicomanes. Un exemple de toxicologie délocalisée.

P. MURA, Y. PAPET, I. GUIGNARD, B. BRUNET

Service de Toxicologie et Pharmacocinétique, CHU, Poitiers

**Introduction :** lorsque des toxicomanes se présentent dans un centre de soins dans le but de pouvoir bénéficier d'un traitement de substitution ou dans le cadre du suivi de leur traitement, des examens urinaires sont fréquemment entrepris. En plus de la recherche de stupéfiants et de méthadone, la recherche de substances psychoactives licites peut également être utile dans le cadre de leur prise en charge. Compte tenu de l'importance de la consommation de buprénorphine sur prescription mais aussi sur autoprescription, la buprénorphine étant de plus en plus facilement accessible sur le marché parallèle, la recherche concomitante de toutes

ces substances paraît être d'un intérêt certain. Le délai écoulé entre le moment de la consultation et celui du rendu de résultat est dans certains cas un handicap, nécessitant une nouvelle convocation du patient et susceptible d'induire une prise en charge inadaptée. Le but de cette étude a consisté à évaluer les performances du test Multiscreen 10 (BUP/MDT) et à déterminer l'intérêt de réaliser les contrôles urinaires sur le lieu même des consultations.

**Méthodes :** le test Multiscreen 10 (BUP/MDT) commercialisé par BMD (Biomedical diagnostics) permet de rechercher simultanément et avec les seuils de positivité suivants (en ng/mL) la méthadone (300), la buprénorphine (10), la morphine (300), la cocaïne (300), le cannabis (50), l'amphétamine (1000), la méthamphétamine (1000), la MDMA (500), les benzodiazépines (300) et les antidépresseurs tricycliques (1000). Son évaluation, portant essentiellement sur la méthadone, la buprénorphine et les stupéfiants, a été effectuée sur les urines de 30 patients traités par la méthadone et de 30 patients traités par la buprénorphine. Les résultats obtenus pour la méthadone et les stupéfiants étaient comparés à ceux obtenus par méthode CEDIA (Microgenics sur Modular de Roche). Les discordances éventuelles étaient analysées par GC-MS. La confirmation des résultats de buprénorphine était effectuée par LC-MS. Une étude prospective a ensuite été entreprise sur 40 urines de patients du Centre de Soins pour toxicomanes de Poitiers, au cours de leur consultation.

**Résultats :** l'étude de comparaison inter-tests (Multiscreen versus CEDIA) a montré une parfaite corrélation pour le cannabis et les amphétamines. Les résultats de buprénorphine ont tous été confirmés par LC-MS (absence de faux positifs ou faux négatifs). Les seules discordances observées sont regroupées dans le tableau suivant :

	Multiscreen	CEDIA	GC-MS	Conclusion
Benzoylécgonine	Positif	Négatif	443 ng/mL	Vrai positif
Benzoylécgonine	Positif	Négatif	Absence	Faux positif
Morphine	Négatif	Positif	60 ng/mL	Faux négatif
Méthadone	Positif	Négatif	290 ng/mL	Vrai positif

L'étude prospective réalisée au centre de soins a montré toute l'utilité d'effectuer les dépistages urinaires sur le lieu même des consultations. En effet cela a permis de dépister 3 ruptures de traitement au Subutex® dont un patient qui l'avait vendu et pris la méthadone de son amie ainsi qu'une prise de Subutex® hors prescription.

**Conclusion :** avec seulement 1 résultat faussement positif sur l'ensemble des paramètres analysés, le test Multiscreen 10 (BUP/MDT) se révèle être d'une excellente fiabilité. D'autre part, notre étude montre que la délocalisation des dépistages urinaires sur le lieu même des consultations des centres de soins pour toxicomanes, par délégation de responsabilité et sous réserve de contrôle ultérieur éventuel par le laboratoire, permet d'optimiser la prise en charge des patients.

## Évaluation du Triage® TOX Drug Screen pour le dépistage urinaire de stupéfiants et de médicaments.

P. MURA, Y. PAPET, I. GUIGNARD, B. BRUNET

Service de Toxicologie et Pharmacocinétique, CHU, Poitiers

**Introduction :** le nombre de conduites addictives par usage de produits illicites ne cesse d'augmenter, tout comme celui des intoxications médicamenteuses. Parmi ces dernières, la plupart sont polymédicamenteuses. Le paracétamol en fait fréquemment partie. La phencyclidine n'est pas absente du marché clandestin alors qu'elle est très rarement recherchée. La recherche urinaire de toutes ces substances, paramètre par paramètre, est longue à mettre en oeuvre et particulièrement onéreuse. C'est pour toutes ces raisons qu'il nous a paru utile d'étudier les performances du nouveau Triage® TOX Drug Screen associé au lecteur de fluorescence Triage® MeterPro, qui permet la recherche simultanée dans l'urine des principales familles de stupéfiants et de six classes médicamenteuses.

**Méthodes :** le Triage® TOX Drug Screen commercialisé par la Société Biosite permet la recherche simultanée de 11 paramètres : la méthadone, les opiacés, la cocaïne, le cannabis, l'amphétamine, la méthamphétamine (m-AMP), la phencyclidine (PCP), les benzodiazépines (BZD), les barbituriques, les antidépresseurs tricycliques (ADT) et le paracétamol. Son évaluation a été effectuée à partir de 100 échantillons urinaires provenant de patients suivis au centre de soins pour toxicomanes de Poitiers. Les résultats obtenus étaient comparés à ceux obtenus par méthode CEDIA (Microgenics sur Modular de Roche). Les discordances éventuelles étaient analysées par méthodes séparatives (GC-MS, HPLC-BD).

**Résultats :** les résultats des 100 échantillons sont présentés dans le tableau suivant :

	Positifs concordants	Négatifs concordants	Faux négatifs avec Triage®
Cannabis	64	36	0
Amphétamine	2	98	0
m-AMP	3	97	0
Cocaïne	33	66	1 (benzoylécgonine, 443 ng/mL)
Opiacés	70	28	2 (morphine, 383 et 576 ng/mL)
Méthadone	94	6	0
PCP	0	0	N.D.
ADT	2	98	0
Barbituriques	2	98	0
BZD	14	86	0
Paracétamol	46	54	0

Par comparaison avec les méthodes traditionnelles utilisées dans les laboratoires, cette technologie présente de très bonnes performances, avec une absence de résultats faussement positifs et un très petit nombre de faux négatifs. La lecture en fluorescence et le rapport d'impression pour le patient augmentent considérablement la sécurité des résultats par rapport à une lecture visuelle pouvant être une source d'erreurs sur les autres tests rapides. Le nombre de cas positifs au paracétamol confirme bien tout l'intérêt de rechercher plus systéma-

tiquement ce paramètre et tout particulièrement en toxicologie hospitalière.

**Conclusion :** les bonnes performances observées dans cette étude montrent que le Triage® TOX Drug Screen est un système de dépistage urinaire pouvant être très utile dans bon nombre d'applications telles que la prise en charge des patients dans les services d'urgence hospitaliers, la recherche de conduites addictives en milieu professionnel, ainsi que dans le cadre du suivi des patients bénéficiant d'un traitement de substitution.

## Dépistage urinaire de trois classes de substances donnant lieu à abus sur Evidence Investigator™ (Drug of abuse array I, Randox®).

A. SERVONNET<sup>(1)</sup>, V. BLANCHET<sup>(1)</sup>, H. DELACOUR<sup>(1)</sup>, S. PICARD<sup>(2)</sup>, C. DEHAN<sup>(1)</sup>, I. COMBOURIEU<sup>(2)</sup>, V. GARDET<sup>(1)</sup>

(1) Laboratoire de Biochimie et Toxicologie Cliniques, HIA Robert Picqué, Bordeaux ;

(2) Laboratoire de Biologie, CH Charles Perrens, Bordeaux.

**Introduction :** Evidence Investigator™ est un système analytique conçu autour de la technologie des biopuces capable de doser simultanément par immunoanalyse plusieurs paramètres regroupés en panel. Le panel toxicologie permet le dépistage urinaire et sanguin de la consommation de 8 classes de substances donnant lieu à abus (technique d'immunochemiluminescence par compétition). L'objectif de notre travail est d'effectuer une évaluation préliminaire de ses performances analytiques pour le dépistage urinaire des 3 classes de molécules les plus fréquemment rencontrés dans notre pratique quotidienne : la cocaïne, les opiacés et les dérivés cannabinoïdes.

**Méthode :** trente échantillons positifs pour la cocaïne, 34 positifs pour les opiacés, 37 positifs pour les dérivés cannabinoïdes et 20 échantillons négatifs pour les trois classes d'intérêt ont été sélectionnés après confirmation par CPG-SM et analysés avec le système Evidence investigator™. Les seuils de positivité retenus sur Evidence investigator™ sont : 300 ng.mL<sup>-1</sup> pour la cocaïne et les opiacés et 50 ng.mL<sup>-1</sup> pour les dérivés cannabinoïdes. Les limites de quantification de la CPG-SM sont 20 ng.mL<sup>-1</sup> pour la cocaïne, 25 ng.mL<sup>-1</sup> pour les opiacés et 5 ng.mL<sup>-1</sup> pour les dérivés cannabinoïdes. Pour les opiacés, la comparaison a porté sur la morphine totale.

**Résultats :** pour la cocaïne, aucune discordance n'est observée entre la CPG-SM et la technique Evidence. Pour les opiacés, aucun faux positif n'est observé, mais trois échantillons positifs en CPG-SM sont rendus négatifs. Ces échantillons présentent des concentrations en opiacés (pholcodine ou morphine) inférieures au seuil de positivité retenu. Pour les dérivés cannabi-

noïdes, aucun faux positif n'est observé. Neuf échantillons positifs en CPG-SM sont rendus négatifs, la concentration estimée en THC-COOH étant inférieure à 50 ng.mL<sup>-1</sup> pour 8 d'entre eux. Un échantillon est rendu positif bien que sa concentration en THC-COOH soit estimée à 46 ng.mL<sup>-1</sup>.

**Conclusions :** pour les trois paramètres testés, les performances analytiques sont très satisfaisantes par rapport à la CPG-SM. Le système Evidence investigator™ et la trousse Evidence™ toxicologie s'avèrent être une bonne innovation dans le domaine de la toxicologie pour le dépistage des substances donnant lieu à abus. Des études complémentaires seraient nécessaires pour évaluer les performances analytiques de l'ensemble du panel.

### Concentrations tissulaires post-mortem du méprobamate.

G. HOIZEY, F. CANAS, L. BINET, M.H. BERNARD, D. LAMIABLE

Fédération Médico-Judiciaire, CHU, Reims

**Introduction :** bien que le méprobamate, produit ancien d'utilisation répandue, fasse l'objet de nombreux cas d'intoxications parfois mortelles, force est de constater la quasi-absence de données relatives à sa distribution tissulaire post-mortem. Un homme de 24 ans était retrouvé sans vie à son domicile. L'examen du corps et l'autopsie, pratiqués sur un cadavre en état de putréfaction débutante, ne révélaient aucune trace de traumatisme ou de lésion macroscopiquement visible pouvant expliquer la mort. La constatation d'une congestion polyviscérale et les circonstances entourant le décès laissaient suspecter une mort d'origine toxique. Le contenu gastrique ainsi que les fluides biologiques, les tissus et une mèche de cheveux prélevés lors de l'examen post-mortem, ont été adressés au laboratoire pour analyses.

**Méthodes :** les échantillons prélevés sur la victime ont été analysés selon les procédures habituelles du laboratoire : les alcools par CG-DIF ; les stupéfiants et les principaux toxiques médicamenteux par CG-SM, CLBD et CLHP-SM/SM. Le méprobamate a été identifié et quantifié dans les différents prélèvements autopsiques, par CG-DIF et CLHP-SM/SM à trappe ionique, après extraction par un solvant organique en milieu basique, en présence d'un étalon interne, le carisoprodol. Les organes ont été pesés puis broyés en solution saline. Les cheveux ont été décontaminés, segmentés (2 + 3 cm), pulvérisés, puis incubés (30 mg par segment, 12h à 60°C) dans 1 mL d'HCl 1N en présence de carisoprodol. Le dosage a été réalisé dans les mêmes conditions analytiques que celles appliquées aux autres prélèvements.

**Résultats :** L'éthanolémie était de 0,83 g/L. Les recherches à larges spectres ont permis d'identifier dans le sang, les urines et le contenu gastrique, le dia-

zépam et ses métabolites (*desméthyl diazépam*, *oxazépam*, *témazépam*), dont les concentrations mesurées dans le sang périphérique sont dans une zone de concentrations considérée comme thérapeutique. Le méprobamate a été identifié dans l'ensemble des tissus et fluides biologiques analysés :

Contenu gastrique	Sang périphérique	Sang cardiaque	Urine	Bile	Foie	Rein	Cerveau	Cœur
476 mg	133 mg/L	121 mg/L	162 mg/L	181mg/L	480 g/g	210 g/g	160 g/g	170 g/g

L'analyse des cheveux a révélé une concentration de méprobamate de 9,3 ng/mg dans le premier segment (côté racine) et de 23 ng/mg dans le second (côté pointe).

**Conclusion :** la concentration de méprobamate mesurée dans le sang périphérique objective une consommation massive de ce composé. Elle est compatible avec le décès, des cas similaires ayant été rapportés pour des concentrations variant de 40 à près de 400 mg/L. Le rapport des concentrations sang cardiaque/sang périphérique est de 0,9, corroborant ainsi l'absence de phénomène de redistribution post-mortem déjà établi. La faible quantité estimée (< 500mg) de méprobamate retrouvée dans le contenu gastrique suggère qu'au moment du décès, l'absorption digestive du méprobamate était pratiquement achevée. Parallèlement, le processus de distribution était avancé, comme en témoigne les concentrations tissulaires observées, confirmant ainsi le tropisme important du méprobamate pour ces organes. Les concentrations de méprobamate mesurées dans les cheveux objectivent l'usage initial de ce composé vraisemblablement à des fins thérapeutiques, des concentrations du même ordre de grandeur ayant été rapportées chez des patients traités par cette molécule.

### Dosage de la colchicine par UPLC-MS/MS avec étalon interne deutéré.

C. JAMEY, A. TRACQUI, B. LUDES

Laboratoire de Toxicologie, Institut de Médecine Légale, Strasbourg

**Introduction :** la colchicine est un alcaloïde naturel extrait du bulbe et des graines de *Colchicum autumnale*. Elle est prescrite à faible dose (1 mg/jour) dans le traitement de la goutte. Les intoxications sont rares mais toujours potentiellement graves nécessitant des techniques de détection très sensibles (concentrations thérapeutiques de 0,3 à 2,5 ng/mL). Dans ce contexte nous avons développé une méthode originale de dosage de la colchicine dans les fluides biologiques par chromatographie liquide ultra haute performance/spectrométrie de masse en tandem (UPLC/MS-MS) avec étalon interne deutéré.

**Méthodes :** une extraction liquide/Liquide est réalisée sur 1 mL d'échantillon en présence de 2 ng de colchicine-*d6* (étalon interne, Toronto Research Chemicals), de 1 mL de tampon phosphate à pH 8,0 et de 5 mL de

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. L'analyse est faite à l'aide d'un système UPLC™ (Waters) couplé à un spectromètre de masse en tandem Quattro Premier™ (Waters). L'élution est réalisée sur une colonne Acquity C18, 1,7 µm (Waters), 100 x 2,1 mm, i.d. avec un gradient ACN/HCOOH 0,1%. Le débit est de 0,5 mL/min et la durée d'analyse est de 5,5 min. L'acquisition se fait en mode MRM sur les transitions suivantes : 399,8 > 358,1 et 310,1 (colchicine) ; 405,9 > 362,1 (colchicine-*d6*).

**Résultats :** le temps de rétention moyen pour colchicine et colchicine-*d6* est de 1,73 min. Les limites de détection et de quantification sont respectivement de 0,1 et 0,2 ng/mL. Les rendements d'extraction sont supérieurs à 85 % (concentrations testées : 0,5 ; 2 et 10 ng/mL). La linéarité ( $r^2 = 0,999$  sur 8 points entre 0,2 et 50 ng/mL), la répétabilité (CV < 9 %) et la reproductibilité (CV < 14 %) sont satisfaisantes. Aucun effet matrice n'a été constaté. A titre d'exemple, nous avons analysé les prélèvements biologiques d'une femme de 32 ans, admise en réanimation médicale après une ingestion massive de colchicine : sang 21,6 à 2,9 ng/mL ; urines 1617 à 82 ng/mL ; lavage gastrique 362 ng/mL ; selles 5647 à 1159 ng/mL.

**Conclusion :** au vu des résultats observés (sensibilité, reproductibilité et spécificité) le couplage UPLC-MS/MS apparaît approprié pour la détection aisée de la colchicine notamment dans le cadre de l'urgence toxicologique. De plus l'utilisation d'un étalon interne deutéré, décrite ici pour la première fois dans la littérature, permet la quantification de la colchicine de façon efficace sur une large gamme de concentrations.

## Décès toxiques impliquant la cyamémazine : bilan du laboratoire de toxicologie de la préfecture de police de Paris (1999-2006).

P. SIBILLE, N. MILAN, B. DEVOS, J. TOURNEAU, I. RICORDEL

Laboratoire de Toxicologie de la Préfecture de Police, INPS, Paris

**Introduction :** la cyamémazine, largement prescrite notamment dans le traitement de la schizophrénie est l'un des neuroleptiques les plus rencontrés lors d'intoxications médicamenteuses en France. Néanmoins peu de concentrations post-mortem ont été publiées ces dernières années. Cette étude rétrospective porte sur les décès impliquant la cyamémazine recensés au laboratoire de 1999 à 2006. Sur les 83 dossiers répertoriés, ont été exclus de l'étude, 27 cas pour lesquels aucun prélèvement sanguin n'était disponible ou lorsque la cyamémazine n'était pas détectable dans le sang de la victime.

**Méthodes :** la cyamémazine est mise en évidence par CPG-SM et par CLHP/BD après extraction du sang total sur colonne Extrelut®. Cette procédure nous per-

met un criblage toxicologique complet afin d'identifier tout autre xénobiotique éventuellement présent. Les concentrations sanguines de cyamémazine ont été déterminées par CLHP/BD à 212 nm, par rapport à une gamme d'étalonnage de 0 à 100 µg/mL. Une colonne Symmetry C8 250 mm (4,6 mm (Waters®)) est utilisée. Les autres molécules identifiées ont été dosées en CLHP/BD, en CPG-SM mode SIM voire en CL/SM<sup>n</sup>.

**Résultats :** au total 56 décès médico-légaux ont été analysés, principalement des suicides. Les concentrations mesurées se situent entre 0,01 et 20,5 µg/mL. 20 sont inférieures à 0,20 µg/mL (concentration thérapeutique) et 36 dépassent 0,20 µg/mL dont 24 supérieures à 0,50 µg/mL (concentrations potentiellement létales). Les hommes (n=33) sont plus représentés que les femmes (n=23). Après un maximum observé en 2001 (n=15), le nombre d'intoxications mortelles impliquant la cyamémazine est en diminution constante. La cyamémazine est associée dans 55 cas à d'autres substances psycho-actives, parmi lesquelles benzodiazépines (n=37) et éthanol (n=31) sont les plus fréquemment retrouvés. Parmi les cas pour lesquels l'éthanol a été identifié, la moitié d'entre eux ont une teneur inférieure à 0,5 g/L. Pour les benzodiazépines, la cyamémazine est le plus souvent associée au nordazépam (n=25), diazépam (n=13) et bromazépam (n=12). De nombreux autres psychotropes ont été détectés, le plus fréquent étant le méprobamate (n=14). On peut noter plusieurs fois la présence d'opiacés et opioïdes (n=18), plus rarement celle de cannabis (n=5); amphétamines et cocaïniques n'ont jamais été détectés. Il peut être établi la vraisemblance d'une implication directe de la cyamémazine dans 36 cas de décès. Dans l'un d'eux, la cyamémazine est retrouvée seule. Pour 13 autres, on détecte soit de l'éthanol, soit une ou plusieurs substances à des concentrations non toxiques ; pour les 22 derniers au moins une autre substance à concentration toxique est présente. Pour les 20 dossiers restants, la concentration en cyamémazine est infra-toxique, 17 morts peuvent être corrélées à la présence d'autres substances à concentration toxique, et les 3 derniers ne peuvent relever d'une intoxication aiguë, les substances détectées ayant toutes des teneurs thérapeutiques voire infra-thérapeutiques.

**Conclusions :** les cas de décès toxiques impliquant la cyamémazine recensés dans notre laboratoire sont relativement nombreux : 83 dossiers sur 2160 expertises réalisées entre 1999 et 2006 soit 3,8 % en contenaient. Cette étude complète les rares travaux publiés concernant les intoxications mortelles à la cyamémazine et confirme que cette dernière est souvent associée à d'autres médicaments. Les concentrations létales mesurées sont en accord avec les données bibliographiques. Cependant, pour commenter de manière pertinente les teneurs post mortem de cyamémazine, il est indispensable de tenir compte des importantes variations interindividuelles ainsi que du caractère chronique ou non de l'administration du médicament.

## Un cas de suicide par injection intraveineuse de paraquat.

F. GROSSENBACHER<sup>(1)</sup>, D. LAMIABLE<sup>(2)</sup>, G. HOIZEY<sup>(2)</sup>, J.S. PETIT<sup>(3)</sup>, A. LEON<sup>(3)</sup>

(1) Toxicovigilance, Reims ;

(2) Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, CHU, Reims ;

(3) SAMU; CHU, Reims.

**Introduction :** les intoxications volontaires par ingestion de paraquat ont fait l'objet de nombreuses publications depuis 1990 et restent grevées d'une lourde mortalité, en dépit de lourds protocoles thérapeutiques. Nous rapportons un cas rare mortel par injection intraveineuse.

**Cas clinique :** un homme de 42 ans s'injecte par voie intraveineuse, dans le bras gauche, 5 ml d'une solution d'un herbicide contenant du paraquat (100 g/L) et diquat (50 g/L). A la 3<sup>ème</sup> heure, il vomit abondamment et se plaint de douleurs abdominales. Sa tension artérielle est chiffrée à 140 / 80 mmhg, pouls à 80/mn. L'analyse des gaz du sang (sans O<sub>2</sub>) montre un pH 7,40, PO<sub>2</sub>: 120mmHg, PCO<sub>2</sub>: 26,2 mmHg, HCO<sub>3</sub>: 15,7, lactate : 8,25 mmol/L, une SPO<sub>2</sub> de 97 %. Le premier bilan sang retrouve des globules blancs à 21,2 giga/L, créatinine à 101mg/L, urée à 6,5mmol/L, les ASAT à 31 UI, ALAT à 25 UI, GGT à 115 UI. A la 26<sup>ème</sup> heure, le patient se dégrade avec tachypnée, défaillance hépatique et rénale. Un nouveau bilan est réalisé avec GdZ (sans O<sub>2</sub>) : pH 7,44, PO<sub>2</sub>: 65mmHg, PCO<sub>2</sub> : 33mmHg, HCO<sub>3</sub> : 23, lactate 2,64mmol/L, créatinine 281 mg/L, les ASAT sont à 262 U.I, ALAT: 111 U.I, GGT à 347, phosphatases alcalines à 49, globules blancs à 23,2 giga/L, LDH à 1255, CPK à 1119, CRP à 91. Le patient décède au quatrième jour d'une défaillance poly viscérale avec une hypoxémie réfractaire. Le premier dosage sanguin de paraquat, réalisé par CLHP après déprotéinisation du sérum par l'acide trichloroacétique, à la 4<sup>ème</sup> heure montre une concentration sérique de 20 mg/L, à H10 de 1,88 mg/L et de 5,2 mg/L à H15. Le diquat a été chiffré à 13 mg/L à H4, à H10 de 0,67 mg/L et de 0,86mg/L à H15. Le score SIPP (Severity Index of Paraquat Poisoning) était à 80 (décès et fibrose pulmonaire pour un SIPP supérieur à 50). Une lymphangite du bras gauche est apparue à H24, signant la réalité de l'injection IV.

**Discussion :** il s'agit d'un cas rare de suicide par injection de paraquat (enquête CAPTV français 2003). Les conséquences cliniques d'intoxication sont les mêmes, hormis l'atteinte du tractus digestif, que lors d'une ingestion. Le paraquat (1,1 diméthyl 4,4 bipyridylum) a un pic plasmatique entre 2 et 4h avec un volume de distribution de 1,4 L/kg et une décroissance bi-exponentielle (1/2 vie de 5 h et de 84 h). L'élimination urinaire est rapide permettant de faire une recherche colorimétrique à la dithionite (LOD de 1mg/L). Le dosage sanguin du paraquat est possible par spectrométrie

(379 nm) avec LOD de 0,2 mg/L ou par CLHP (LOD de 0,1 mg/L). Pour le cas présenté, le test urinaire à la dithionite n'a pas été réalisé ; les concentrations élevées de paraquat de 20 mg/L à H4, 1,88 mg/L à H10 et 5,2mg/L à H15 se situent d'emblée dans la Life-threatening zone du diagramme de Proudfoot ceci malgré une faible quantité injectée de paraquat (0,5g). Des taux de paraquat inférieurs à 2,0 mg/L, 0,3 et 0,16 mg/L à respectivement H4, H10 et H16 sont généralement associés à une évolution favorable. En théorie, car moins de 10 % du paraquat est résorbé par voie gastrique à estomac vide; le patient aurait du ingérer au minimum 50 mL de cette préparation dosée à 100g/L de paraquat (soit 5 grammes), cela pour obtenir l'équivalent de ces 0,5 g injectés. Par ailleurs, cette même dose de 5 g ingérée par ce patient pesant 72 kg aurait produit une dose-ratio de 69,4 mg/kg, supérieure à la dose toxique admise de 35 mg/kg. La dose létale admise est supérieure à 50 mg/kg

**Conclusion :** l'utilisation rare et suicidaire de paraquat par voie intraveineuse entraîne pour des doses moindres du fait d'une plus grande biodisponibilité, les mêmes conséquences toxiques que lors des ingestions volontaires.

---

## LSD et soumission chimique.

C. DUPUIS-ROUSSEL<sup>(1)</sup>, P. COLLON-FABIE<sup>(1)</sup>, G. PÉPIN<sup>(2)</sup>, M. DEVEAUX<sup>(2)</sup>, S. FARNO<sup>(1)</sup>, P. VISNONI<sup>(1)</sup>

(1) Laboratoire de Police Scientifique, Toulouse ;

(2) Laboratoire TOXLAB, Paris.

**Introduction :** les substances utilisées à des fins de soumission chimique mettent souvent en jeu des mécanismes inhibiteurs responsables des troubles de la vigilance et de la mémoire. Les produits les plus fréquemment utilisés dans le cadre de la soumission chimique sont les benzodiazépines, l'éthanol et le cannabis... Ces substances sont utilisées pour leurs propriétés amnésiantes et sédatives, seules ou en association. Cependant, la soumission chimique reste un phénomène très complexe pouvant faire intervenir des substances très diverses telles que les hallucinogènes, comme l'illustre ce cas.

**Description du cas :** au cours d'une soirée, après avoir bu quelques bières, une jeune femme se jette du premier étage pour échapper à son petit ami qui vient de la violer. Des prélèvements d'urine sont effectués rapidement sur la jeune femme et des canettes de bières contenant un peu de liquide, sont saisies au domicile.

**Méthodes :** un dépistage immunochimique a été effectué sur l'échantillon d'urine à l'hôpital. Une recherche de xénobiotiques a été réalisée par GC-MS et HPLC-DAD sur les prélèvements de bière. Puis une recherche spécifique du LSD dans la bière a été réalisée en LC-MS, après une extraction liquide/Liquide en milieu alcalin par un mélange diéthyléther/toluène et en pré-

sence de l'étalon deutéré. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne C18, 5 µm (150 mm x 2 mm d.i.) à l'aide d'un gradient d'acétonitrile/tampon formiate d'ammonium 2 mM, pH 3. La détection a été réalisée en mode SIM en mode d'ionisation positif sur les ions suivants : LSD (m/z 324 et 223), LSD-D3 (m/z 327), NorLSD (m/z 310,237). La méthode est linéaire de 1 à 20 ng/mL, la limite de détection est de 0,5 ng/mL.

**Résultats :** les tests immunochimiques menés sur les prélèvements urinaires, étaient positifs au LSD et cannabis. L'analyse du contenu des canettes de bières a démontré la présence de LSD, mais aucun buvard n'a été retrouvé dans les contenants. De plus, le jeune homme a reconnu l'avoir agressé sexuellement. Les résultats de l'enquête nationale 2003/2005 sur la soumission chimique diligentée par l'AFSSAPS rapportaient un cas de soumission chimique par LSD.

**Conclusion :** les effets hallucinogènes du LSD peuvent conduire à un état confusionnel, avec modification de la perception et de la pensée, et faciliter alors l'emprise d'un agresseur sur sa victime. De plus, les boissons alcoolisées constituent un excellent véhicule d'administration de substances psychotropes. L'association éthanol et cannabis représente un facteur important de vulnérabilité, de part son action sur la vigilance et la mémoire, qui va potentialiser les effets recherchés par l'agresseur.

## Extraction en phase solide de 22 médicaments d'intérêt en toxicologie médico-légale.

M. MANCEBO, M. PERRIN

Département Toxicologie, IRCGN, Rosny-sous-Bois

**Introduction :** de nombreuses colonnes d'extraction en phase solide dédiées à la recherche de xenobiotiques en toxicologie clinique ou médico-légale sont proposées à l'analyste. Onze de ces cartouches d'extraction ont été testées puis optimisées pour extraire 22 principes actifs de médicaments, choisis pour couvrir un large éventail de caractéristiques physico-chimiques, à partir de sang total et en une seule étape.

Les onze cartouches étudiées proviennent de 4 fournisseurs : Argonaut (SPE Evolute ABN 25 mg/1mL, SPE ATOLL XTrem Capacity 100mg/1mL, SPE Upticlean MM1 100mg/1mL) ; Varian (Bond Elute Certify I, 6mL 500 mg, Bond Elute Certify II, 6mL 500 mg, Bond Elute Certify, 3 mL 130 mg, Focus 6 mL) ; Waters (Oasis HLB 1cc 30mg 30 µm, Oasis MCX 1cc 30mg 30 µm, Oasis MAX 1cc 30mg 30 µm) ; Phenomenex (Strata XC 60 mg/ 3mL).

Les 22 substances appartiennent à différentes classes pharmacologiques : benzodiazépines, benzodiazépines-like, anti-dépresseurs, neuroleptique, cardiotropes, antalgiques, traitements de substitution opioïdes.

**Méthodes :** chaque étape du protocole (préparation de l'échantillon, conditionnement, lavage et élution) a été optimisée de manière à obtenir les meilleurs rendements d'extraction. L'analyse des extraits (en identification et quantification) a été effectuée par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes. Enfin, nous avons vérifié l'aptitude de ce protocole à détecter les concentrations thérapeutiques et toxiques habituellement retrouvées en toxicologie clinique et médico-légale.

**Résultats :** la colonne SPE Evolute ABN® (Acid Base Neutral) fournie par Argonaut® est celle qui extrait le mieux les différents composés analysés parmi toutes les cartouches testées. Tous les médicaments pouvant être mis en évidence par le protocole optimisé ont été extraits avec des rendements d'extraction compris entre 13 % pour l'aspirine et 75 % pour l'atracurium. Trois substances parmi la liste fixée initialement (flunitrazépam, le triazolam et buprénorphine) ne pourront pas être détectées par la méthode analytique mise en oeuvre aux concentrations les plus faibles citées dans la bibliographie pour les intoxications. La colonne Oasis HLB® (Hydrophilic Lipophilic Balance) proposée par Waters permet également l'extraction de la totalité des molécules mais avec des rendements inférieurs.

Extraction	
Conditionnement	1 mL de méthanol
Équilibrage de la colonne	1 mL de mélange eau : acide formique (1 000:1 ; v/v)
Chargement	dépôt de l'échantillon en plusieurs fois
Lavage	1 mL d'eau : méthanol (95:5 ; v/v)
Élution	2 x 500 L de méthanol

**Conclusion :** la mise au point de cette nouvelle procédure a permis d'optimiser une méthode de dépistage large (criblage) de médicaments fréquemment rencontrés dans les matrices biologiques en toxicologie clinique et médico-légale. En ce qui concerne les trois molécules non mises en évidence aux plus faibles concentrations, l'injection en chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse pourrait constituer une alternative afin de diminuer leur limite de détection.

## Absence d'éthyl-glucuronide dans le foie et « tests de fermentation » comme indications d'une formation post-mortem d'alcool dans le corps.

B.M.R. APPENZELLER, M. SCHUMAN, R. WENNIG

Laboratoire de Toxicologie, CRP-Santé/LNS, Luxembourg

**Introduction :** des examens toxicologiques réalisés sur des prélèvements biologiques provenant d'une fillette âgée de 14 mois, décédée à la suite d'un coma inexplicable, ont mis en évidence une concentration importante d'éthanol dans le sang (2,00 g/L) ainsi que dans les viscères. Dès lors, la consommation d'alcool a pu être

soupçonnée comme pouvant être liée au décès. Parallèlement, une concentration anormalement élevée en glucose dans le sang (4,02 g/L) prélevé ante-mortem incite à considérer la possibilité d'une formation d'éthanol post-mortem ayant eu lieu entre le décès et l'autopsie réalisée 3 jours plus tard. Afin de clarifier ce point, un dosage d'ethyl glucuronide (EtG), métabolite minoritaire de l'éthanol, est envisagé. Le volume d'urine et de sang étant insuffisants et trop dégradés pour permettre un dosage correct, celui-ci est réalisé sur un prélèvement de foie. En parallèle, des « tests de fermentation » ont été réalisés afin de vérifier la présence de microorganismes fermentatifs dans le sang de la victime.

**Méthodes :** après broyage d'un prélèvement de foie d'environ 2g, extraction à l'eau sous ultra-sons, purification sur SPE, puis dérivation, l'EtG a été dosé en GC-MS-NCI. L'étalon interne utilisé était de l'EtG-D<sub>5</sub>. Un échantillon de foie provenant d'un témoin positif en EtG a été traité à l'identique pour comparaison.

Pour les tests de fermentation, 9 tubes en verre stériles ont été remplis avec 2mL de sang exempt d'alcool provenant d'un témoin vivant. Parmi ces tubes, 3 ont été laissés tels quels, 3 ont été dopés en glucose jusqu'à une concentration finale de 4 g/L, 3 ont été dopés en glucose et inoculés avec 0,1 µL de sang provenant de la victime. Deux jeux de 9 tubes ont ainsi été préparés et mis en incubation respectivement à 4°C et 25°C. Après 7 jours, l'alcool formé dans ces tubes a été dosé par GC-MS/FID.

**Résultats :** dans l'échantillon de foie provenant de la victime, la concentration en EtG était en dessous de la limite de détection (LOD : 7,2 ng/g). En comparaison, le dosage réalisé sur le témoin positif a mis en évidence une concentration de 19.56µg d'EtG par g de foie.

Dans les tests de fermentation, la concentration en éthanol formée après 7 jours était de 1,21±0.05 g/L dans les tubes placés à 25°C dopés en glucose et inoculés avec le sang de la victime. Dans tous les autres tubes, la concentration en éthanol était restée en dessous de la limite de détection de la méthode (LOD : 0,01g/L).

**Conclusion :** l'absence d'EtG dans le foie de la victime suggère fortement que l'éthanol dosé dans les échantillons biologiques prélevés lors de l'autopsie a été formé post-mortem, par fermentation du glucose initialement présent dans l'organisme. Ceci permet d'écarter la consommation d'alcool comme cause responsable du décès. Les résultats observés lors des tests de fermentation viennent renforcer cette position en mettant en évidence la présence de microorganismes fermentatifs dans le corps de la victime.

## **Intoxication massive à la trimébutine, la métoclopramide et l'hydroxyzine.**

F. DESCAMPS, M.H. GHYSEL, O. SALVADORE, V. DUPONT, G. DEFFONTAINE, S. BOUDJADA, C. CLEMENCEAU, A. COUVREUR

Institut National de Police Scientifique, Laboratoire de Police Scientifique, Lille

**Introduction :** nous rapportons ici le cas d'une poly-intoxication massive à la trimébutine, au métoclopramide, à l'hydroxyzine et à l'alcool. Une jeune fille de 18 ans est découverte sans vie, dans sa chambre, par ses parents. A l'examen de corps, le médecin légiste constate un syndrome asphyxique avec oedème moussueux au niveau des lèvres. A l'autopsie, du sang cardiaque, de l'urine et du contenu gastrique sont prélevés. Des flacons, présents dans la chambre, et contenant divers liquides sont mis sous scellés.

**Méthodes :** l'analyse est réalisée sur le sang cardiaque, les urines, le contenu gastrique et des bouteilles saisies sur les lieux. La recherche d'éthanol est réalisée dans le sang, les urines et les liquides placés sous scellés, par HS-GC-FID. Une confirmation des pics obtenus est réalisée par HS-GC-MS. L'immunoanalyse urinaire est négative pour les stupéfiants, benzodiazépines, barbituriques, antidépresseurs tricycliques, méthadone, phencyclidine. Les recherches générales de toxiques d'origine organique sont réalisées après extraction en milieu liquide/Liquide à pH 9,4, en présence d'un étalon interne, le méthyl-clonazépam. L'analyse est réalisée par CPG-SM, et CL-BdD.

**Résultats :** de l'hydroxyzine, de la trimébutine, de la nortrimébutine et une substance pouvant être son métabolite (l'acide triméthoxybenzoïque), de la métoclopramide et son métabolite ainsi que de la caféine sont retrouvés dans le sang et l'urine. Les mêmes produits sans les métabolites sont retrouvés dans le contenu gastrique. Le dosage sanguin est réalisé par CL-BdD en présence de méthylclonazépam utilisé comme étalon interne. Les concentrations sanguines obtenues sont les suivantes : éthanol : 0,97 g/L ; hydroxyzine : 3300 ng/mL ; trimébutine : 4472 ng/mL ; nortrimébutine : 4781 ng/mL ; métoclopramide 9673 ng/mL. Les divers flacons (eau, lait) ne contiennent pas de produits suspects.

**Discussion :** la concentration en hydroxyzine (Atarax®) de 3300 ng/mL, est environ 40 fois supérieure aux concentrations thérapeutiques(50-90) et entre dans la fourchette des concentrations létales mentionnées dans la littérature scientifique (de 1110 ng/mL à 39000 ng/mL). La concentration sanguine en métoclopramide (Pimpéram®), de 9673 ng/mL, est environ 65 fois supérieure aux concentrations thérapeutiques (40-150) et plus de 2 fois la concentration citée dans la littérature scientifique concernant un cas mortel d'absorption de métoclopramide (4400 ng/mL) en association avec un hypertenseur. La trimébutine (Débridat®) est dosée à 4472 ng/mL. Ce taux est largement supé-

rieur aux concentrations post-mortem retrouvées, qui s'échelonnent de 990 ng/mL à 3030 ng/mL. Aucune référence n'a été trouvée pour le métabolite de la trimébutine. La présence d'alcool majore l'effet sédatif de l'hydroxyzine et du métoclopramide. Il n'y a pas eu de dosage dans les autres prélèvements.

**Conclusions :** à notre connaissance, c'est la première fois que des concentrations post-mortem aussi importantes sont retrouvées pour la trimébutine et le métoclopramide dans le sang, bien que l'hydroxyzine soit lui seul en concentration toxique. Le dosage a été réalisé dans le sang cardiaque, le sang périphérique n'ayant pas été prélevé. Il faut tenir compte dans l'interprétation des résultats d'un possible effet de redistribution post-mortem.

### Utilisation de la LC-MS /MS pour le dépistage et la quantification simultanée de drogues dans les milieux biologiques.

T. A. SASAKI<sup>(1)</sup>, B.DURETZ<sup>(2)</sup>

(1) Applied Biosystems, Foster City, CA, USA ;

(2) Applied Biosystems, Courtaboeuf, France.

**Introduction :** la technologie LC-MS/MS est devenue un outil incontournable dans le domaine médico-légal et ce afin de détecter et identifier la présence de molécules illicites dans des échantillons biologiques. L'urine est la matrice la plus fréquemment employée. Cependant, les fluides oraux sont également de plus en plus utilisés pour détecter la présence de ces composés.

**Méthode :** la méthode présentée dans ce poster a été développée pour les composés suivants : THC, cocaïne, amphétamine, méthamphétamine et MDMA. Leurs analogues deutérés ont été utilisés comme étalon interne et utilisés à une concentration de 5 ng/mL dans l'échantillon réel. Le THC a été analysé par une première méthode différente de celle utilisée pour les 4 autres composés. L'instrument utilisé est un 3200 Q TRAP® Applied Biosystems interfacé à un passeur CTC/Leap autosampler et une pompe HPLC Shimadzu 10ADvp. Les phases mobiles employées sont : H<sub>2</sub>O avec 0.1% d'acide formique pour la phase A et de l'acétonitrile avec 0.1% d'acide formique pour la phase B. La séparation a été réalisée avec un gradient rapide sur une colonne de type Aquasil C18 (2.1 mm x 50 mm). Le débit utilisé est de 0.650 mL/min. Le volume d'injection est de 20 µL pour le THC et 10 µL pour les autres composés. Pour chacune des molécules, deux transitions MRM ont été sélectionnées. La transition générant le signal le plus intense est utilisée pour la quantification de la molécule alors que la seconde transition est utilisée pour la confirmation des résultats.

**Résultats :** les limites de quantification obtenues sont en dessous des seuils imposés par la législation américaine. La précision et la robustesse de la méthode ont également été évaluées. Les concentrations étudiés

s'étalent de 0,5 ng/mL à 100 ng/mL pour l'amphétamine, de 0,05 ng/mL à 50 ng/mL pour la cocaïne, de 0,5 ng/L à 100 ng/mL pour le THC et de 0,05 ng/mL à 10 ng/mL pour les 3 autres amphétamines. Six niveaux de concentration ont été sélectionnés pour l'ensemble des molécules considérées.

**Conclusion :** il a donc été possible de mettre en place une méthode rapide d'analyse de composés illicites par LC-MS /MS. Les limites de détection obtenues sont inférieures d'un facteur 10 au seuil imposé par la législation. Les résultats ont été obtenus en tenant compte du ratio entre les deux transitions MRM utilisées.

### Utilisation de la LC-MS pour l'analyse d'opiacés dans le sang.

T. DAHN<sup>(1)</sup>, K. SHANKS<sup>(1)</sup>, T. A. SASAKI<sup>(2)</sup>, B. DURETZ<sup>(3)</sup>

(1) AIT Laboratories, Indianapolis, IN, USA ;

(2) Applied Biosystems, Foster City, CA, USA ;

(3) Applied Biosystems, Courtaboeuf, France.

**Introduction :** ce travail a eu pour objectif de mettre en place une méthode LCMSMS destinée à l'analyse d'opiacés dans le sang.

**Méthode :** la méthode concerne l'analyse des molécules suivantes : hydromorphe, morphine, oxymorphe, 6-MAM, oxycodone, et codéine. Les analogues deutérés ont été utilisés comme étalon interne à la concentration de 500ng/mL. Pour chacun des analytes, deux transitions MRM ont été sélectionnées. La préparation d'échantillons est issu d'un protocole utilisé pour l'analyse par GCMS mais a été cependant grandement simplifiée. La préparation s'effectue en deux étapes : une étape d'hydrolyse suivie d'une dilution pour atteindre un volume finale de 2mL. 10µL ont été injectés pour l'analyse réalisée sur un 3200 Q TRAP équipée d'une chaîne Agilent 1100. La méthode utilisée en spectrométrie de masse a été scindée en 2 périodes : la première comprenant 3 analytes et leurs étalons internes, la seconde comprenant les 4 autres analytes. La séparation a été mise en place sur une colonne Aquasil C18 (2 mm x 50 mm). L'analyse a été réalisée en 6,4 min. Les solvants employés sont respectivement : H<sub>2</sub>O + 0,1 % d'acide formique pour la phase A et de l'acétonitrile contenant 0.1 % d'acide formique pour la phase B.

**Résultats :** les 7 opiacés ont ainsi pu être analysés par une méthode unique. La préparation a été simplifiée et il n'a pas été nécessaire de dériver les molécules comme cela était le cas pour la GCMS. Le temps d'analyse a également été réduit : de 10 min en GCMS à 6.4 min pour la LCMS. Plusieurs séries d'échantillons ont été analysées en parallèle par les deux techniques : GC-MS et LC-MS ceci afin de comparer les résultats. La gamme dynamique évaluée varie de 5 ng/mL à 20 000 ng/mL (10 000 ng/mL pour l'oxycodone).

done, la codéine et l'hydrocodone). La limite de quantification est de 5 ng/mL.

**Conclusion :** nous avons donc validé une méthode LC-MS/MS pour l'analyse des opiacés. Le temps de préparation des échantillons ainsi que la durée de l'analyse ont été amplement réduits par rapport à la GC-MS. La limite de détection atteinte est d'au moins 1 ng/mL pour chacun des opiacés et les résultats obtenus en LC-MS/MS par rapport à la GC-MS/MS sont cohérents.

### ***Itai-itai* ou la chronique d'une intoxication professionnelle au cadmium.**

F. LAMOUREUX<sup>(1)</sup>, C. MOESCH<sup>(1)</sup>, D. BENEVENT<sup>(2)</sup>, L. LARCHER<sup>(1)</sup>, G. LACHÂTRE<sup>(1)</sup>

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

(2) Service de Néphrologie-Hémodialyse, CHU Dupuytren, Limoges.

**Introduction :** l'intoxication chronique par les sels de cadmium peut être à l'origine de troubles osseux et rénaux. En cas d'intoxication avérée apparaît une ostéomalacie avec douleurs violentes dans le bassin et les membres inférieurs, correspondant aux symptômes de la maladie itai-itai, décrite pour la première fois au Japon (itai-itai : « j'ai mal - j'ai mal »). Nous rapportons un cas relativement rare d'intoxication chronique au cadmium, d'origine professionnelle, pour lequel nous avons développé une technique de dosage sanguin et urinaire de cet élément par spectrométrie de masse couplée à un plasma induit par haute fréquence (ICP-MS).

**Description du cas :** un homme de 41 ans, non fumeur, ayant travaillé dans une usine d'accumulateurs alcalins a été exposé professionnellement à divers métaux, en particulier au cadmium, au nickel et au mercure. Au cours de son exposition qui a duré environ 5 ans, ce patient a développé un syndrome algique diffus mal expliqué, d'aggravation progressive, de plus en plus invalidant et réfractaire aux traitements prescrits (AINS, paracétamol).

**Méthode :** ce patient suivi en néphrologie a bénéficié d'une surveillance biologique régulière dès la première année et pendant 6 ans, reposant notamment sur le dosage des éléments (nickel, mercure et cadmium). Les dosages successifs de cadmium sanguin et urinaire ont été réalisés par spectrophotométrie d'absorption atomique électrothermique, puis par ICP-MS. Pour la technique ICP-MS, les échantillons de sang ont été dilués au 1/51<sup>ème</sup> dans une solution aqueuse contenant 0,1 g/L NH<sub>3</sub>, 0,1 g/L EDTA, 4,5 % n-butanol et 1 % Triton X 100, ceux d'urine au 1/21<sup>ème</sup> dans l'eau purifiée. Les limites de détection et de quantification sont respectivement de 0,2 µg/L et de 0,5 µg/L, avec un domaine de linéarité qui s'étend jusqu'à 100 µg/L. L'exactitude et la précision de la méthode de dosage ont été vérifiées en satisfaisant au programme de

contrôles de qualité externes du Centre de Toxicologie du Québec.

**Résultats :** au cours des 6 années de suivi, les résultats des dosages de nickel et de mercure ont toujours été de l'ordre des valeurs usuelles. Par contre, les concentrations sanguines de cadmium étaient régulièrement élevées (moyenne de 10 ± 5,1 µg/L) avec un maximum de 21,7 µg/L à t + 2 ans après le début de l'exposition. Ces résultats ont permis de poser le diagnostic biologique d'intoxication chronique par le cadmium, les concentrations sanguines de cadmium tolérées chez un sujet professionnellement exposé étant généralement inférieures à 10 µg/L. A l'arrêt de l'exposition, les concentrations sanguines se sont normalisées dans l'année qui a suivi (valeur actuelle à 3,4 µg/L). Par contre, le patient a développé une atteinte rénale liée au cadmium (diabète calcique spontanément résolutif sans insuffisance rénale - créatinine sérique à 76 µmol/L). L'élimination urinaire de cadmium demeure aujourd'hui, soit près de 2 ans après l'arrêt de l'exposition, anormalement élevée : de l'ordre de 3 µg/g de créatinine (valeur usuelle < 2µg/g de créatinine). Ces concentrations, chez un sujet non fumeur, sont le reflet d'un relargage continu de cadmium issu d'un stockage hépatique et rénal.

**Conclusion :** nous avons mis au point les dosages sanguins et urinaires du cadmium par ICP-MS. La technique s'est avérée adaptée au diagnostic d'une intoxication comme au suivi biologique de sujets professionnellement exposés. Elle nous a permis de porter le diagnostic biologique d'une intoxication rare et invalidante.

### **A propos d'une intoxication aiguë associant du valsartan.**

T. DULAC<sup>(2)</sup>, J.E.CAUSSE<sup>(1)</sup>, G. CASSAGNE<sup>(1)</sup>

(1) Laboratoire Spectran, Centre Hospitalier de Bigorre, Tarbes ;

(2) Service de réanimation polyvalente, Centre Hospitalier de Bigorre, Tarbes.

**Introduction :** description du cas : Un homme âgé de 69 ans est admis en réanimation pour intoxication poly médicamenteuse volontaire grave. Le patient est initialement pris en charge à domicile par le SMUR après qu'il ait absorbé un « cocktail médicamenteux indéterminé » (recherche d'emballage infructueuse mais présence d'une lettre authentifiant une autolyse « préparée »). A la prise en charge, il est constaté essentiellement une altération encore modérée de la vigilance (score de Glasgow à 11/15) et une tendance hypotensive corrigée par une épreuve de remplissage. Le patient est évacué en réanimation. A son admission, il reste somnolent (score de Glasgow 9). On note un myosis bilatéral serré réactif. La ventilation spontanée sous O<sub>2</sub> à 2l/mn est bien tolérée et efficace avec une PaO<sub>2</sub> à 126 mmHg et une normocapnie à 44 mmHg. On note quelques extrasystoles supraventriculaires isolées. Le reste de l'examen clinique est normal.

**Méthode :** pour les analyses toxicologiques deux techniques sont utilisées 1/ l'immuno analyse et 2/ la LC-MS/MS et la LC-MS avec le logiciel de dépistage et bibliothèque de spectres Chromalynx. Le dosage du Stilnox, méprobamate et valsartan est effectué après double défécation des sérum (acétonitrile, acide formique 1%), alcalinisation à l'ammoniaque 25% et extraction à l'acétate d'éthyle. Les transitions MRM sont utilisées: stilnox 308>235.2 et 92, meprobamate 219.2>158.2 et 54.9, valsartan 436.2>235.2 et 207.2. Les rapports entre les transitions sont respectivement : 2.7, 3.3 et 1. La flavopéirine est utilisée comme étalon interne avec les transitions suivantes : 247.2>232.2 et 204.4. Les transitions donnant le meilleur signal sont utilisées.

**Résultats :** le dépistage toxicologique semi quantitatif standard n'est positif que pour les benzodiazépines (négatif pour les antidépresseurs et les barbituriques). Des investigations complémentaires par LC-MS/MS sont demandées en raison du décalage entre l'évolution clinique et le caractère peu contributif du dépistage initial. Deux sérums seront exploités, le premier prélevé à l'admission, le second 4 h plus tard. Les résultats permettront de confirmer une intoxication associant méprobamate et valsartan. Initialement, on retrouvait, en effet, principalement un taux de zolpidem > 1µg/mL, de méprobamate à 20 µg/mL et de valsartan à 801 ng/mL. Le second prélèvement retrouve un taux de zolpidem divisé par quatre, des taux à peine diminués de méprobamate (15µg/mL) mais surtout un taux de valsartan très significativement augmenté à 3477 ng/mL. Malgré une présentation clinique initiale rassurante, l'évolution sera défavorable. Très rapidement l'état du patient va se dégrader avec la réapparition d'une instabilité hémodynamique majeure incontrôlable. Est alors évoquée une possible intoxication au valsartan, et un « test » à la terlipressine apportera une franche amélioration des chiffres tensionnels. Après quelques heures de stabilisation, surviendra une nouvelle détérioration circulatoire. La survenue d'une ischémie myocardique est éliminée. L'installation d'un syndrome de dysfonction multi viscérale devient irréversible. Le patient décèdera une soixantaine d'heures après son admission.

**Conclusion :** sur le plan clinique, les données de la littérature concernant l'intoxication aiguë par les sartans sont rares. Leur toxicité est souvent comparée empiriquement à celles des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC). La prise en charge des intoxications aux sartans est encore mal codifiée. Les mécanismes physiopathologiques du choc qu'ils induisent restent encore peu décrits dans la littérature. Leur attribuer subjectivement une toxicité proche de celle des IEC paraît donc prématuré en regard du caractère récent de cette nouvelle classe thérapeutique, mais le patient n'est pas décédé à cause d'un surdosage de méprobamate. La gravité de ces intoxications ne doit donc pas être sous estimée.

## Décès impliquant la méthadone : analyse d'une série de huit cas.

M.F. KERGUERIS, P. JOLLIET

Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, CHU, Nantes

**Objectif :** l'implication d'un produit de substitution, tel que la méthadone, dans l'analyse des causes de la mort est fréquemment difficile à évaluer. Nous référant aux données de la littérature notre objectif est d'étudier, sur la base des concentrations post-mortem, huit cas d'intoxications fatales où cette molécule est impliquée, associée ou non à d'autres toxiques.

**Méthodes :** la recherche chromatographique large, par notre méthode générale sur le sang et les urines post-mortem (extraction liquide/liquide, chromatographie CLHP-BD et CG-SM) réalisée dans le cadre des enquêtes de décès de ces trois dernières années a révélé la présence de méthadone, associée ou non à d'autres substances, chez huit sujets. Il s'agit de quatre hommes de 20 à 34 ans (médiane : 22,5) et quatre femmes de 21 à 44 ans (médiane : 33). La méthadone et son métabolite principal l'EDDP (1,5-diméthyl-3,3-diphényl-2-éthylidène-pyrrolidine) ainsi que les autres médicaments identifiés ont été dosés, dans le sang et dans les urines, par CLHP. Les stupéfiants ont été recherchés dans les urines par méthode immunologique (FPIA) et dosés par CG-SM. L'éthanol est mesuré en CG-FID.

**Résultats :** les concentrations sanguines de méthadone obtenues varient de 198 à 1110 µg/L (moyenne 598 µg/L). La valeur la plus faible, 198 µg/L, a été mesurée chez un sujet décédé environ 24h après la prise. L'EDDP a pu être mesuré dans 5 cas, nous obtenons 10 à 95 µg/L (moyenne 56 µg/L), un sujet ne présente que des traces, les deux autres n'ont pu être mesurés précisément en raison d'une interférence de produits de putréfaction. Nous disposions des urines pour 4 sujets, les concentrations mesurées se situent respectivement de 4200 à 13800 µg/L (moyenne 8498 µg/L) et 680 à 9100 µg/L (moyenne 5808 µg/L) pour la méthadone et l'EDDP. Sept des huit sujets présentent une polyintoxication, la méthadone est associée à des benzodiazépines dans 5 cas, à de la morphine dans un cas (sang : 149 ng/mL) et à des traces de cannabis pour un autre. Un des sujets était connu comme étant en traitement de substitution par de la buprénorphine (Sg 2 ng/mL) il présentait également des benzodiazépines et du citalopram. Au moment du décès les alcoémiées étaient faibles ou à zéro.

**Discussion et conclusion :** la concentration sanguine maximale de méthadone est atteinte environ 4h après la prise orale. Elle a une demi-vie longue conduisant à un effet prolongé par rapport à l'héroïne. La durée d'action pourrait être de 36 à 48h expliquant des décès retardés par rapport à la prise. Les variations métaboliques importantes conduisent à des écarts de concentrations sanguines interindividuelles influant l'effet cli-

nique des surdosages, mais le rapport concentration/effet dépend principalement du niveau de tolérance se traduisant par un chevauchement des zones de concentrations sanguines entre les victimes d'overdose fatale et les sujets contrôlés en traitement de maintenance (Worm et coll. relatent des concentrations de 60 à 3100 µg/L dans les décès et 30 à 560 µg/L chez les patients traités). Les concentrations de méthadone mesurées dans notre série sont élevées, elles sont compatibles avec les taux publiés lors de décès impliquant la méthadone. En conclusion nous notons que ces huit cas analysés sont des sujets jeunes dont la moitié sont des femmes et qu'il s'agit principalement de poly-intoxications associant à la méthadone, des benzodiazépines et de la morphine, substances conduisant à un risque majoré de dépression respiratoire pouvant être fatale en cas de surdosage. Différents facteurs influent le rapport concentration/risque dont principalement la tolérance et l'association à d'autres substances toxiques, son évaluation peut également se compliquer par les effets d'une redistribution post-mortem décrite pour la méthadone. Les résultats de l'analyse toxicologique associés aux conclusions des légistes ont conduit à conclure, dans ces huit cas, à un décès d'origine toxique impliquant la méthadone.

---

### **Prise en charge d'investigations toxicologiques dans le domaine de la soumission chimique : bilan du Service de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges entre 2003 et 2006.**

J.M. GAULIER, F. LAMOUREUX, A.C. DANTON, G. ROLLAND, J. FLATRES, G. LACHATRE

Service de Pharmacologie et Toxicologie, CHU Dupuytren, Limoges

**Introduction :** après 4 années de mise en place de dispositions permettant des investigations toxicologiques dédiées à la détection de cas de soumission chimique, il nous est apparu important de faire un bilan des problèmes rencontrés au cours des différentes étapes de la prise en charge des victimes. Ce travail repose sur l'étude rétrospective des demandes d'analyses toxicologiques adressées dans ce contexte au Service de Pharmacologie et de Toxicologie du CHU de Limoges, sur une période de 2 ans 1/2.

**Méthode :** il a été analysé rétrospectivement 168 demandes d'analyses toxicologiques dans un cadre de soumission chimique supposée, traitées entre janvier 2003 et juillet 2006.

**Résultats :** l'absence récurrente d'un certain nombre de renseignements a limité l'exploitation de ces dossiers. Toutefois et malgré ces biais, l'analyse des dossiers permet de dresser le panorama suivant : les femmes sont les principales victimes (79%), et de nombreux mineurs sont concernés (29%). Un traitement

médicamenteux et une consommation antérieure avouée de substances illicites sont retrouvés respectivement dans 17% et 6% de l'ensemble des dossiers. Les demandes d'analyses ont trait le plus souvent à des agressions sexuelles (48% chez les femmes et 23% chez les hommes) qui ont lieu, majoritairement, lors d'une soirée festive. Il n'a pas été relevé de fluctuation significative du nombre des demandes selon la saison. Enfin, l'absence ou l'insuffisance de données disponibles sur le ou les agresseur(s) (élément non renseigné dans 86% des dossiers) est probablement en partie due à l'amnésie des victimes, symptôme très régulièrement rapporté (45% des dossiers). Les demandes d'analyses sur prescription médicale (59%) ou sur réquisition (41%) étaient accompagnées de prélèvements réalisés majoritairement moins de 24 heures après les faits avérés ou supposés. Des cheveux étaient prélevés dans 32% des cas, mais l'ensemble des prélèvements biologiques (sang, urine et cheveux) n'étaient présents que dans 14% des cas. Sur 168 dossiers, 31 cas (soit 26%) peuvent être considérés comme des cas de soumission chimique avérés. Les benzodiazépines et substances apparentées sont les molécules les plus souvent rencontrées (dans 27 dossiers, soit 87 % des cas avérés) avec principalement le clonazépam (7 dossiers, soit 23 % des cas avérés) et le bromazépam (6 dossiers, soit 19 % des cas avérés). En dehors des benzodiazépines, les autres principes actifs retrouvés dans ces cas avérés sont l'acépromazine, l'alimémazine, l'atropine, la lévomépromazine, et la propériciazine. Il n'existe pas de différence entre les cas négatifs et les cas positifs en ce qui concerne le délai moyen séparant les faits du moment des prélèvements. Par contre, la fréquence de prélèvements biologiques complets (sang, urine et cheveux) est significativement plus élevée dans les cas positifs (23%), que dans les cas négatifs (13%).

**Conclusion :** ce bilan souligne l'importance de prendre toutes les précautions nécessaires lorsqu'il y a une suspicion de soumission chimique, en particulier : recueil exhaustif des symptômes et des antécédents de la victime, connaissance exacte de la date et heure des faits avérés ou supposés, prélèvements (sang, urine et cheveux) réalisés en double le plus tôt possible après les faits. Or, ces impératifs sont rarement intégralement respectés ce qui laisse penser qu'il existe encore un manque d'information auprès des forces de l'ordre et des professionnels de santé. Si l'impunité des agresseurs n'est aujourd'hui plus garantie, elle demeure assujettie à des modalités de prise en charge rigoureuses des victimes, qui font parfois encore défaut.

## Application de la spectroscopie RMN <sup>1</sup>H à l'étude comparée de sérum et d'urine dans des cas d'intoxication par carbamates.

M. IMBENOTTE<sup>(1)</sup>, B. CARTIGNY<sup>(2)</sup>, N. AZAROUAL<sup>(3)</sup>, G. VERMEERSCH<sup>(3)</sup>, M. LHERMITTE<sup>(1,2)</sup>

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

(2) Laboratoire de Toxicologie & Génopathies, CHRU, Lille ;

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

**Introduction :** l'objectif de ce travail est de tester l'applicabilité de la spectroscopie RMN <sup>1</sup>H à plusieurs cas d'intoxication par composés à structure carbamate, qu'il s'agisse de pesticides (aldicarb) ou de médicaments (méprobamate). Trois cas d'intoxication avérée par aldicarb sont rapportés, ainsi que deux cas par méprobamate. Pour deux autres cas, l'origine n'est pas établie mais l'activité cholinestérasique est fortement diminuée.

**Méthodes :** les échantillons d'urine et de sérum ont été analysés par spectroscopie RMN à 500 MHz sans pré-traitement et par CLHP-SM avec impact électronique. En RMN, une séquence de présaturation est utilisée pour atténuer le signal de l'eau.

**Résultats :** pour un premier cas d'intoxication lors d'une tentative d'autolyse, les granules supposés ingérés ont été analysés. Les caractéristiques obtenues par RMN et CLHP-SM correspondent à celles d'un standard d'aldicarb : ions à m/e = 144, 100, 86, et par RMN <sup>1</sup>H, trois pics à 1,45 (CH<sub>3</sub>), 2,81 (CH<sub>3</sub>S) et 7,62 ppm (CH=N). Dans les trois cas avérés, l'aldicarb et ses métabolites n'ont pu être retrouvés dans l'urine, mais d'autres pics ont été mis en évidence : un signal centré sur 1,15 ppm et deux groupes de signaux à 3,19 et 3,50 ppm attribuables à la choline. Les carbamates présentent des propriétés inhibitrices des cholinestérases ; de plus, des articles récents montrent que la choline urinaire est un marqueur d'atteinte musculaire. La détection pour la première fois de ce composé dans l'urine de patients intoxiqués illustre un nouvel apport de la spectroscopie RMN. L'analyse RMN des échantillons de sérum a révélé une acido cétose relativement importante, par les pics à 1,30 ppm (CH<sub>3</sub> du lactate), à 1,11 ppm (CH<sub>3</sub> du 3-hydroxybutyrate) et à 2,20 ppm ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> de l'acétone). Dans le but de rechercher des éléments communs en cas d'intoxication par carbamate médicamenteux, nous avons analysé les sérums de deux personnes intoxiquées par le méprobamate. Pour l'une d'elles, il a été possible d'identifier dans l'urine le méprobamate par ses pics à 0,86, 0,96 et 1,24 ppm, correspondant aux groupements méthyle et méthylène du principe actif. De plus, nous retrouvons les signaux attribuables à la choline, identifiables malgré la glycosurie relativement importante. Pour les deux cas d'in-

toxication par agent inconnu, une pré analyse par RMN <sup>31</sup>P n'a pas révélé la présence de composé organophosphoré. Par contre, sont bien retrouvés au niveau sérique les marqueurs d'acidocétose (3-hydroxybutyrate : 1,71 mmol/L), et pour les échantillons d'urine les signaux communs précédents, en particulier ceux dus à la choline.

**Conclusion :** en complément des autres techniques analytiques, la spectrométrie RMN permet donc l'analyse de produits supposés ingérés et de chercher dans les milieux biologiques (urine, sérum) le xénobiotique incriminé ainsi que des éléments de réponse biologique. Les intoxications par composés à structure chimique de carbamate présentent une similitude dans leur toxicité, qu'il s'agisse de pesticides ou de médicaments. Le point commun au niveau sérique est essentiellement l'acidocétose. En effet, l'inhibition des cholinestérases peut être rapprochée des difficultés respiratoires et de l'acidose métabolique.

---

## Cyclistes entre deux étapes : addiction aux hypnotiques ?

M. VILLAIN, V. CIRIMELE, P. KINTZ

Laboratoire ChemTox, Illkirch

**Introduction :** suite à la demande du médecin de l'équipe, 29 coureurs cyclistes ont été testés au travers d'analyse de cheveux pour mettre en évidence une hypothétique conduite addictive et/ou dopante. Pour cela, plusieurs mèches de cheveux ont été prélevées par nos soins sur chaque coureur (longueur et quantité dépendant de la coupe de cheveux de chacun). La recherche a porté prioritairement sur les 4 familles de stupéfiants, les anabolisants, les corticoïdes et les adr-énergiques. Compte tenu de la quantité de matrice restante, il a été possible d'étendre la recherche aux benzodiazépines et hypnotiques pour 12 coureurs de l'équipe. En effet, il était connu que certains d'entre eux ingéraient des hypnotiques avec de l'alcool, lors de fête entre deux étapes, pour ressentir de forts sentiments d'ébriété (L'Express du 31/05/2004).

**Méthodes :** pour la recherche des benzodiazépines et hypnotiques, 20 mg de cheveux sont coupés finement après décontamination au dichlorométhane, puis incubés une nuit dans 1 ml de tampon phosphate pH 8,4, en présence de 1 ng de diazépam-d<sub>5</sub>, utilisé comme étalon interne. L'extraction est réalisée par 5 ml d'un mélange éther/dichlorométhane (80/20), et après évaporation à sec de la phase organique, l'extrait est repris dans 50 µl d'acétonitrile/ tampon formiate pH 3 (50/50). La séparation a été réalisée sur une colonne XTerra MS C18 par un gradient d'acétonitrile et de tampon formiate pH 3. Chaque composé est identifié par 2 transitions.

**Résultats :** sur les 12 coureurs testés pour les hypnotiques, 10 étaient positifs pour le zolpidem (0,3 à 1918 pg/mg), 6 pour le bromazépam (3,6 à 58 pg/mg), 5 pour la zopiclone (5,3 à 142 pg/mg), 3 pour le tétra-

zépam (7,0 à 139 pg/mg), 2 pour le diazépam (1,0 et 1,9 pg/mg) et 1 pour le 7-aminoflunitrazépam (79 pg/mg). 1 seul coureur était négatif pour ces molécules. Par ailleurs, il n'a pas été retrouvé de stupéfiants ni d'agents dopants dans les cheveux des 29 coureurs analysés.

**Conclusion :** le zolpidem est la molécule la plus souvent retrouvée dans les cheveux de ces sportifs et l'on observe des profils de consommation très différents, allant d'une consommation ponctuelle à une consommation importante et répétée. Même s'il peut sembler surprenant de retrouver de telles molécules (sans effet stimulant) dans les cheveux de coureurs cyclistes professionnels, cette étude confirme les rumeurs circulant sur les équipes. Aujourd'hui, certains sportifs de haut niveau, souvent en souffrance, développent une relation pathologique au médicament qui peut être assimilée à une forme de toxicomanie.

### Screening toxicologique et estimation semi quantitative par GC-MS. Réalisation 24h sur 24, dans un contexte hospitalier.

S. COHEN<sup>(1)</sup>, C. BERNY<sup>(1)</sup>, F. BEVALOT<sup>(2)</sup>, C. DARNAUD<sup>(1)</sup>, M. MANCHON<sup>(1)</sup>, M. GUILLAUMONT<sup>(1)</sup>, J. GUITTON<sup>(1)</sup>

(1) Laboratoire des Urgences Biochimiques et Toxicologiques, CHLS, Pierre-Bénite ;

(2) Laboratoire Lumtox, Lyon.

**But :** le système Remedi® (HPLC-DAD, Bio Rad) est utilisé en routine au laboratoire de l'Hôpital Lyon Sud depuis 1993 pour répondre aux urgences toxicologiques (1700 analyses par an) par une équipe de vingt techniciens polyvalents en biochimie et toxicologie. Cet équipement permet d'apporter un résultat avec identification et estimation semi quantitative dans l'heure suivant l'arrivée du prélèvement, 24 h sur 24, 7 jours sur 7. Ce système est aujourd'hui en arrêt de commercialisation. Le but était de développer une méthode répondant de la même façon que le Remedi à nos exigences de praticabilité et de robustesse. Le choix de la technique s'est porté sur la GCMS.

**Méthodes :** l'appareillage est constitué d'un GC-MS Agilent 5975 équipé d'une colonne DB5-MS (20 m x 0,18 mm, 0,18µm). Le gaz vecteur est l'hélium au débit de 1,1 ml/mn. Les températures appliquées sont : Injecteur 260°, Source 230°, Quad 150°, et pour le four la rampe est la suivante :

Temps (min)	Températures (°C)
0	90
0,53	90
3,46	200
7	300
12,4	300

Le balayage est réalisé de 30 à 420 uma à la vitesse de 6,83 scan/sec. Les prélèvements (serum et urine) sont extraits en Toxitube A, en présence de deux étalons interne (flurazépam 1 mg/L, et phénazine 0,75 mg/L) puis analysés sans dérivation. Les chromatogrammes obtenus sont exploités par un système de macro commandes informatiques développées spécifiquement (logiciel « Caribou »). La semi quantification est réalisée par une calibration en 3 points. Pour évaluer la performance de cette méthode par rapport à celle en place au laboratoire (Remedi), nous avons comparé les résultats obtenus sur 100 analyses.

**Résultats et discussion :** La durée de la manipulation : extraction : 20 min, séparation : 13 min et exploitation : 10 min et sa simplicité répondent à nos exigences et ont permis de former nos 20 techniciens. La base de données comporte à ce jour 374 molécules dont 160 molécules mères et 214 métabolites. La comparaison des résultats montre une concordance avec le Remedi dans 2/3 des cas et une discordance dans 1/3 des cas. Deux causes fréquentes de discordance : plusieurs bêta bloquants non retrouvés par la technique GC et des identifications des benzodiazépines parfois différentes selon les systèmes. A noter que lorsqu'il y a concordance la GC-MS est plus performante que le Remedi dans 90% des cas car elle met en évidence méprobamate, acide valproïque, paracétamol et AINS. Nous quantifions à ce jour 85 molécules de la base de données. La reproductibilité de la quantification évaluée sur un mélange de 10 molécules à 0,5 mg/L donne les résultats suivants :

Molécules	Diazépam	Buflomédil	Citalopram	Amitriptyline	Cyamémazine
CV %	8,6	17	17,6	22,3	25,4
Molécules	Amisulpride	Midazolam	Clomipramine	Pipamperone	Métoprolol
CV %	29,2	12,3	22,6	22,5	38,9

**Conclusion :** Au vu de ces premiers résultats la technique développée en GC-MS répond en partie à nos exigences de dépistage et de semi quantification. Néanmoins une technique complémentaire devra combler les lacunes mises en évidence : bêta bloquants essentiellement.

### Peut-on se passer de la LC-MS/MS en 2007 dans les structures d'urgence ?

J. KHAZAKA<sup>(1)</sup>, C. MEIGNANT<sup>(2)</sup>, G. CASSAGNE<sup>(2)</sup>, J.E. CAUSSE<sup>(2)</sup>

(1) Département de l'Urgence, Centre Hospitalier de Bigorre, Tarbes ;

(2) Laboratoire Spectran Centre Hospitalier de Bigorre, Tarbes.

**Introduction :** l'utilisation de la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) inhabituelle dans un Centre Hospitalier Général, mais peut-on s'en passer en 2007 ? Afin de répondre à notre mission de structure d'Urgence référente au niveau de notre territoire de santé, nos attentes en matière de dépistage toxicologique sont les suivantes : diagnostiquer une intoxication

tion, identifier le(s) produit(s), adapter notre prise en charge à la gravité de l'état de santé du patient, être efficace par la connaissance de l'origine de l'état de santé du patient, notamment vis-à-vis de leur famille. Les réponses à nos attentes doivent contribuer à améliorer le service médical rendu aux patients avec une question : les examens demandés sont-ils utiles ou non ? La question est-elle différente s'il s'agit de demander une radiologie, un scanner ou une analyse toxicologique ?

**Méthode :** la structure d'Urgence du Centre Hospitalier de Tarbes est la 2<sup>ème</sup> en Midi Pyrénées avec 36 000 passages. Elle dispose de deux technologies de dépistage : 1/ immuno enzymologique, accessible jour et nuit et 2/ une LC-MS/MS ouverte 11 heures par jour du lundi au vendredi. Dans un cas sur deux, il n'existe aucune information sur la nature des toxiques absorbés ni sur leur quantité.

**Résultats :** pour un certain nombre de dossiers, nous avons constaté une divergence entre ces deux techniques en faveur de la LC-MS/MS. 353 dépistages LC-MS/MS (8 % aucun toxique retrouvé, 33 % un toxique, 55 % plusieurs toxiques) et immuno analyses (33% de recherches positives dont 99% de benzodiazépines, 1% d'antidépresseurs tricycliques et 0% de phénobarbital), ont été sollicités en 2006. Nous avons retrouvé en LC-MS/MS 40,9 % de tranquillisants, 18,8 % de neuroleptiques, 18,3 % de stupéfiants et 17,2 % d'antidépresseurs dont 2% de tricycliques. Dans 5% des cas, les intoxications ont nécessité un transfert en réanimation. Dans 10 % des cas La LC-MS/MS a mis en évidence des produits inattendus, par exemple, chez deux patients différents des taux toxiques de TRAMADOL et de FLUINDIONE, non suspectés en première intention. Le traitement n'a pas été retardé. Dans un cas, d'intoxication mortelle, l'attention a été dans un premier temps détournée sur une intoxication aux benzodiazépines, une relation entre l'évolution des symptômes et une intoxication au VALSARTAN a été, par la suite, identifiée grâce à une quantification du produit sur deux prélèvements. Des cas particuliers imposent la technologie LC-MS/MS. Elle a permis de faire le diagnostic d'intoxication rapide aux bêtabloquants, au MEPROBAMATE, ZOPICLONE, ZOLPIDEM (un cas sur cinq d'intoxication aux tranquillisants), et VALSARTAN. Dans un cas de suspicion de soumission chimique la poudre consommée contenait du CITALOPRAM, du cannabis, du METRONIDAZOLE et du PARACETAMOL. Dans tous ces cas, la LC-MS/MS a permis au clinicien de mettre en place des traitements adaptés, dans un environnement adapté et de façon efficace, évitant de surcharger le Service de Réanimation.

**Conclusion :** la LC-MS/MS apporte des données primordiales pour un urgentiste à savoir s'il est en présence d'une association benzodiazépines et antidépresseur tricyclique, associations à risque type mepronizine et bromokryptine, etc. Elle nous permet de communiquer

de façon précise avec les familles des patients, augmentant notre et dont les urgentistes de Tarbes ne peuvent maintenant plus se passer.

---

## **Théâtres d'opérations extérieures et analyses toxicologiques (à propos d'un an d'activité à l'IRCGN).**

Y. LECOMPTE, S. HERVE, O. ROUSSEL, M. PERRIN

Département Toxicologie, IRCGN, Rosny-sous-Bois

**Introduction :** les forces armées françaises sont susceptibles d'être projetées sur des théâtres d'opérations extérieures (OPEX) tels le Kosovo, la Côte d'Ivoire, le Pakistan, le Tchad ou le Liban. Sur ces théâtres d'opérations, ces forces sont accompagnées par des gendarmes exerçant les fonctions de prévôts et menant leurs enquêtes de la même manière que sur le territoire métropolitain, à condition que ces enquêtes concernent des militaires français dans l'exercice de leurs fonctions. Il peut donc s'agir d'accidents de la route, d'accidents du travail (maniement des armes, chute d'une échelle), d'autolyses, d'accidents de santé (dont les infarctus), de crimes et délits identiques à ceux rencontrés en France. Dans cette présentation nous décrirons les résultats obtenus à propos des quarante prélèvements reçus au cours de l'année 2006.

**Méthode :** les méthodes d'essais mises en oeuvre sont celles figurant dans notre plan assurance qualité, il s'agit de méthodes validées selon les principes détaillés précédemment.

**Résultats :** la principale difficulté consiste à faire acheminer les prélèvements effectués par les médecins militaires français vers le laboratoire. Ainsi, en particulier pendant les phases de combat, certains prélèvements ont été acheminés par le biais de la valise diplomatique, soit un délai de 6 semaines entre le prélèvement et la transmission à notre laboratoire. Le plus souvent, les échantillons sont transmis par voie postale, sans précaution particulière concernant les températures d'entreposage. Ceci impose de formuler des réserves quant à l'interprétation des valeurs quantitatives obtenues, en particulier lorsqu'il s'agit d'éthanolémies (10 cas traités en 2006, valeurs comprises entre 0,8 et 2,16 grammes par litre, prélevés entre 1h et 24h après les faits). Les particularités de la pratique toxicologique seront explicitées à partir de quelques exemples : principe actif retiré du marché français, mais encore disponible dans certains pays d'Afrique, prise en charge médicale débutée avant les prélèvements à visée médico-légale. Les molécules les plus souvent représentées sont celles en dotation dans les unités élémentaires (« sirettes » de morphine présentes dans les trousseaux des pilotes et dans les postes de secours régimentaires), médicaments d'urgence disponibles dans les postes médicaux avancés (midazolam et lidocaïne dans deux cas, thiopental dans un cas), traitements prophylac-

tiques contre le paludisme (dont la GAPSSA : gélule antipaludique du service de santé des armées, contenant chloroquine et proguanil).

Dans ce dernier cas, il s'agissait d'un militaire, détaché dans un territoire pour lequel la chimioprophylaxie n'est pas obligatoire, mais pour lequel la présence de métabolites de la chloroquine pouvait être expliquée par leur longue demi-vie d'élimination. Enfin, le métabolite principal du THC n'a été mis en évidence que dans un cas, le prélèvement étant intervenu près de 24 heures après l'accident de la route. L'influence du Cannabis n'a pas pu être précisée de façon formelle dans ce dossier.

**Conclusion :** Si les analyses de toxicologie médico-légale ne présentent pas de difficulté majeure, l'interprétation des résultats obtenus, concernant ces dossiers en provenance des théâtres d'opérations extérieures, nécessite une connaissance approfondie des pratiques médico-militaires et du code de justice militaire.

---

## Le point sur des drogues de synthèse émergentes : les pipérazines.

Y. LECOMPTE, O. ROUSSEL, M PERRIN

Département Toxicologie, IRCGN, Rosny-sous-Bois

**Introduction :** les pipérazines sont des molécules ayant fait l'objet de recherches et d'études cliniques, pour leur action sur les récepteurs des principaux neurotransmetteurs. Ces molécules sont actuellement détournées de cet usage par les trafiquants afin de contourner les mesures de contrôle interdisant les drogues de synthèse « traditionnelles » (dérivés amphétaminiques). Ces molécules ont fait leur apparition dans le milieu festif, et certaines d'entre elles ont déjà été mises en évidence, seules ou en association, dans plusieurs dossiers judiciaires soumis à notre laboratoire. La toxicité de ces substances n'étant que partiellement explorée, l'apparition de cas de toxicologie médico-légale ne peut pas être exclue. Après un rappel sur les propriétés pharmacologiques de ces molécules, nous décrivons la mise au point puis la validation d'une technique analytique qui permet, le cas échéant, de les identifier et quantifier dans le sang total, dans le cadre de la toxicologie médico-légale.

**Méthode :** la mise au point et la validation ont porté sur cinq substances susceptibles d'être retrouvées dans les milieux festifs : les benzylpipérazines, 1-benzylpipérazine (BZP) et 1-(3,4-méthylènedioxybenzyl)pipérazine (MDBP) et les phénylpipérazines : 1-(3-chlorophényl)pipérazine (mCPP), 1-[3-trifluorométhylphényl]pipérazine (TFMPP) et 1-[4-méthoxyphényl]pipérazine (MeOPP). La pTP ou 1-(4-méthylphényl)piperazine a été choisie comme étalon interne.

Les échantillons sont préparés de la façon suivante : extraction à pH 9 (hydrogénophosphate de di potassium), par un solvant ternaire (chlorométhane, hexane,

acétate d'éthyle; 5/4/1). évaporation à sec puis reprise par 200 µl de phase mobile. 20 µL sont injectés sur un chromatographe liquide haute performance couplé à un spectromètre de masse avec une source électrospray (Agilent 1100) avec une colonne X-Terra (3,5 µm, 3 mm di x 150 mm). Un gradient d'acétonitrile et de tampon formiate (formiate d'ammonium 5 mM dans l'eau acidifié par 0,2% d'acide formique/méthanol; 95/5) est employé, la durée de l'injection y compris la stabilisation est de 55 mn. Aucune dérivation n'est nécessaire. L'acquisition des ions en SIM (un ion pour la quantification et deux ions de qualification) en mode positif avec une tension de cône de 230 V.

**Résultats :** les données obtenues lors des analyses de validation ont été traitées par un logiciel en ligne qui préconise une approche par l'erreur totale de la mesure (les principales caractéristiques de cette approche seront détaillées lors d'une présentation orale). Les calculs permettent d'établir des profils d'exactitude. Les limites de quantification obtenues pour quatre de ces cinq molécules correspondent aux valeurs susceptibles d'être rencontrées en cas d'intoxication par ces molécules : limite de détection estimée de 1 ng.mL<sup>-1</sup>, limite inférieure de quantification : 2 ou 3 ng.mL<sup>-1</sup> et limite supérieure de quantification de 95 à 110 ng.mL<sup>-1</sup>. Seule la MeOPP n'a pas été validée selon cette procédure, les résultats obtenus montrant un manque de fidélité, résultant en une incertitude élargie supérieure à nos seuils (les limites maximales d'acceptation choisies sont de +/- 40% avec un risque beta de 10%).

**Conclusion :** l'augmentation du nombre de produits saisis, contenant des benzyl- et phénylpipérazines, nous a conduit à mettre au point et valider une méthode d'analyse susceptible de mettre en évidence et de quantifier ces molécules dans le sang total. Elle répond à notre attente.

---

## Un cas d'empoisonnement au chloralose.

M. AUGSBURGER, F. SPORKERT, C. BRANDT, P. MANGIN

Laboratoire de Toxicologie et de Chimie Forensiques, IUML, Lausanne, Suisse

**Introduction :** une autopsie est demandée pour un homme de 36 ans trouvé sans vie à son domicile par sa femme. Lors des six mois précédant son décès, cet homme avait été hospitalisé à six reprises suite à des symptômes évocateurs de crises épileptiques. Toutefois, aucun examen neurologique n'avait permis de poser le diagnostic d'épilepsie. Aucune cause de décès n'est mise en évidence lors de l'autopsie. L'examen neuropathologique ne permet pas de mettre en évidence de substrat morphologique pour les crises d'épilepsie décrites cliniquement. Des analyses toxicologiques sont alors demandées.

**Méthodes :** une recherche urinaire est réalisée par immunoanalyse (amphétamines, barbituriques, benzo-

diazépines, buprénorphine, cannabinoïdes, cocaïne, LSD, méthadone, opiacés) (DadeBehring®) et complétée par un dépistage en CPG-SM après hydrolyse, extraction liquide/Liquide en milieu basique et acétylation. Un dépistage en CPG-SM est également effectué sur un échantillon de sang, qui est complété par un dépistage de la présence de volatils, dont l'éthanol, par HS-CPG/DIF et un dépistage de la présence de cyanure (Cyantesmo, Macherey-Nagel®). Une analyse quantitative du chloralose est effectuée par CPG-SM en mode SIM après extraction liquide/Liquide dans plusieurs prélèvements obtenus lors de l'autopsie (sang périphérique, urine et contenu gastrique).

Ultérieurement, des analyses quantitatives ont été réalisées dans les cheveux de la victime prélevés lors de l'autopsie par CPG-SM en ionisation chimique mode négatif après extraction eau/méthanol et dérivatisation avec de l'anhydride trifluoroacétique, ainsi que dans un échantillon de liquide céphalo-rachidien et deux échantillons de sérum qui avaient été prélevés lors des séjours en hôpital, par CPG-SM en mode SIM.

**Résultats :** les analyses toxicologiques ont montré la présence dans le sang périphérique de chloralose (20 mg/L), de flunarizine (248 µg/L), d'amitriptyline (< 50 µg/L) et de nortriptyline (50 µg/L). Les concentrations de flunarizine, d'amitriptyline et de nortriptyline, mesurées dans le sang, se situent dans les fourchettes des valeurs thérapeutiques. Le chloralose est également mis en évidence dans l'urine (412 mg/L), dans le contenu gastrique (0,5 g), dans trois segments de cheveux (env. 400 ng/mg) (segment proximal 0-1 cm, segment médian 1-2 cm et segment distal 2-6 cm), ainsi que dans un échantillon de sérum (26 µg/L) et dans un échantillon de liquide céphalo-rachidien (627 µg/L) prélevés quelques heures après l'admission lors de l'une des hospitalisations de la victime. En revanche, le chloralose n'a pas été mis en évidence dans l'échantillon de sérum prélevé après quelques jours d'hospitalisation.

**Discussion et conclusion :** sur la base de ces résultats, et en l'absence de toute autre cause décelable, la cause du décès a été établie comme étant la conséquence d'une intoxication au chloralose. D'autre part, les résultats des analyses effectuées sur les cheveux et sur les échantillons prélevés lors des séjours hospitaliers de la victime parlent en faveur d'une exposition répétée au chloralose lors des mois qui ont précédé le décès. Cette exposition a certainement été à l'origine des différents symptômes de type épileptique observés dans les six mois précédant le décès. Dernièrement, la femme du défunt, qui avait entre autre acheté du chloralose (Topex®) et consulté des sites internet décrivant les effets de cette substance, a été reconnue coupable et condamnée à 18 ans de prison.