

Article original / Original article

Méthoxyisoflavone et dépistage du cannabis dans les urines : mise en évidence d'une réaction croisée peu connue

Methoxyisoflavone and urine cannabinoid screening: evidence of a poorly known cross-reactivity

Yannick Lecompte^{1,*}, Martine Perrin¹, Bernard Daude², Patrick Arpino³

¹ Département Toxicologie, Institut de recherche criminelle de la Gendarmerie nationale, 1 boulevard Théophile Sueur, 93111 Rosny-Sous-Bois, France

² Centre médical interarmées du commandement de la Gendarmerie de la Réunion, Caserne Lambert, Quartier Reydellet, 97709 Saint-Denis, France

³ Laboratoire d'Électrochimie, Chimie des Interfaces et Modélisation pour l'Énergie (LECIME, UMR7575) – Chimie-Paristech, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris Cedex 05, France

Résumé – Objectif : Suite à un cas de dépistage urinaire faux positif de l'usage de cannabis, dans un contexte de consommation de méthoxyisoflavone, et afin d'objectiver une éventuelle réaction croisée, ce principe actif et ses métabolites sont recherchés dans l'échantillon d'urine. Un essai d'administration chez des volontaires sains est également réalisé. **Méthodes :** Après hydrolyse enzymatique, l'échantillon d'urine est préparé par extractions liquide-liquide en milieu acide (pH 4) et basique (pH 9). Les analyses sont effectuées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) en mode d'ionisation par électrospray positif (ESI) et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) après dérivation par acétylation et silylation. Une solution de référence de 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone est analysée dans les mêmes conditions. L'essai d'administration est conduit chez trois volontaires sains recevant 300 mg de méthoxyisoflavone *per os* toutes les douze heures pendant 36 heures. Six heures après la dernière administration, un prélèvement urinaire fait l'objet d'un test de dépistage et d'une analyse par LC/MS et GC/MS. **Résultats :** Dans l'échantillon d'urine objet du dépistage faussement positif pour les cannabinoïdes, la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone n'a pas été détectée. En revanche, la 5-méthyl-7-hydroxyisoflavone, métabolite de la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone, a été identifiée. Les prélèvements d'urine des trois sujets inclus dans l'essai ont tous donné lieu à un test de dépistage positif pour les cannabinoïdes après l'administration de méthoxyisoflavone. La 5-méthyl-7-hydroxyisoflavone a également été mise en évidence dans leurs prélèvements. **Conclusion :** Les analyses mises en œuvre et l'essai d'administration chez des volontaires sains ont permis de confirmer l'implication de la 5-méthyl-7-hydroxyisoflavone, métabolite de la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone, dans une réaction croisée avec un test de dépistage urinaire des cannabinoïdes.

Mots clés : 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone, cannabinoïdes, dépistage de drogues, réactions croisées

Abstract – Objectives: Methoxyisoflavone (5-methyl-7-methoxyisoflavone) is a dietary supplement employed by bodybuilders. Following a false positive result in a urinary cannabinoid screening test in the context of methoxyisoflavone use, this active ingredient and its metabolites are searched for in the urine sample to objectivize a possible cross-reactivity with the antibody screening test. An administration trial in healthy volunteers is also performed. **Methods:** After enzymatic hydrolysis, the urine sample is prepared by liquid-liquid extractions in acidic (pH 4) and basic (pH 9) conditions and then different analytical techniques are used: high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS) operating in positive ionization mode (sampling cone voltage 70 V) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) after derivatization by acetylation and silylation. A reference solution of 5-methyl-7-methoxyisoflavone is analyzed under the same conditions. The administration trial was conducted in three healthy volunteers receiving orally 300 mg of methoxyisoflavone every 12 hours for 36 hours. A

* Correspondance : Yannick Lecompte, lecompte.yann@free.fr

screening test and an analysis by LC/MS and GC/MS are performed on the urine emitted six hours after the last intake. **Results:** 5-methyl-7-methoxyisoflavone reference mass spectra were obtained in each set of analytical conditions. 5-methyl-7-methoxyisoflavone was not detected in the urine samples. Nevertheless, 5-methyl-7-hydroxyisoflavone, a metabolite of 5-methyl-7-methoxyisoflavone, was identified. After administration of methoxyisoflavone, all urine samples of the three subjects included in the trial resulted in a positive screening test for cannabinoids. 5-methyl-7-hydroxyisoflavone was also detected in their samples. **Conclusion:** The analyses carried out and the administration trial with healthy volunteers confirmed the involvement of 5-methyl-7-hydroxyisoflavone, a metabolite of 5-methyl-7-methoxyisoflavone, in a cross-reaction with a urinary cannabinoid screening test.

Key words: 5-methyl-7-methoxyisoflavone, cannabinoids, substance abuse detection, cross-reactions

Reçu le 27 novembre 2011, accepté après modifications le 2 mars 2012

Publication en ligne le 30 mai 2012

1 Introduction

La spécificité des tests de dépistage par immunochromatographie est limitée par l'existence de réactions croisées entre les anticorps des tests, dirigés contre le principe actif dépisté ou ses métabolites, et des molécules présentant des analogies de structure avec ces derniers. Ces réactions croisées sont à l'origine de résultats de dépistage faussement positifs. Dans le cas des tests de dépistage urinaire de l'usage de cannabis, des réactions croisées des anticorps dirigés contre le 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC-COOH) – métabolite urinaire majoritaire du Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC) – sont décrites essentiellement avec les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) : l'acide niflumique est ainsi à l'origine de la plupart des cas de réactions croisées observés avec ces tests [1,2]. Des interactions similaires sont également rapportées dans la littérature pour les inhibiteurs de la pompe à protons et l'efavirenz [3]. Les faux positifs potentiels d'un test de dépistage sont en général étudiés et communiqués par les fabricants pour les principes actifs des spécialités pharmaceutiques les plus courantes. En revanche, de nombreuses substances non médicamenteuses échappent à cette évaluation. Nous exposons dans le présent article un cas de réaction croisée d'un complément alimentaire employé dans le milieu du culturisme avec un test de dépistage urinaire de l'usage cannabis.

2 Observation

Dans le cadre d'un test de dépistage urinaire de l'usage de stupéfiants, pratiqué au cours d'une visite médicale d'aptitude préalable à un renouvellement de contrat d'engagement dans la Gendarmerie nationale [4], un jeune gendarme adjoint volontaire est dépisté positif au cannabis par le test immunochromatographique Multi-drug screen test panel Check 24/317 – Protzek® (Chrimogen, Saint-Louis, France). L'intéressé dément cependant catégoriquement l'usage de cannabis ou d'autres produits stupéfiants. Il ne mentionne l'usage d'aucun médicament mais reconnaît consommer régulièrement, dans le cadre de, sa pratique du culturisme, de la méthoxyisoflavone (5-méthyl-7-méthoxyisoflavone – masse molaire : 266,29 g·mol⁻¹) qu'il se procure par l'intermédiaire d'Internet (figure 1).

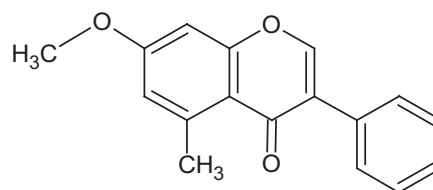


Fig. 1. Structure moléculaire de la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone (masse monoisotopique $M = 266,09$ Da).

Conformément à la procédure, le prélèvement d'urine est aliquoté et deux échantillons sont adressés pour analyse de confirmation au département Toxicologie de l'Institut de recherche criminelle de la Gendarmerie nationale (IRCGN). L'analyse mise en œuvre (décrite dans le paragraphe « matériels et méthodes » ci-dessous) s'est révélée négative : la présence de THC-COOH dans le prélèvement d'urine n'est pas confirmée. Afin d'écarter l'hypothèse d'une erreur de lecture par le personnel médical lors du dépistage, un nouveau test de dépistage est réalisé par nos soins sur une prise d'essai de l'échantillon. Ce test présente une franche réaction positive au cannabis. Face à ces résultats, des analyses complémentaires ont été conduites sur le reliquat d'échantillon à notre disposition. Leur objectif était de mettre en évidence la méthoxyisoflavone et ses éventuels métabolites et de confirmer ainsi leur implication dans le résultat faux positif observé. Afin de confirmer les hypothèses émises à l'issue de ces analyses, un essai d'administration chez des volontaires sains a également été réalisé.

3 Matériels et méthodes

3.1 Réactifs

Les solutions de référence de 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC-COOH) sont de marque Cerilliant® (LGC Standards, Molsheim, France) : THC-COOH à 0,1 g·L⁻¹ dans du méthanol et 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tétrahydrocannabinol tridéutéré (THC-COOH-D₃) à 0,1 g·L⁻¹ dans du méthanol.

La 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone, poudre 98 % (Acros Organics®) est obtenue auprès de la société Thermo Fisher Scientific (Courtabœuf, France).

Les réactifs employés sont de qualité « pour analyse » ou « pour chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse » :

- β -glucuronidase d'*Escherichia coli* 400 UI·mL⁻¹ (APOH Technologies, Villeneuve-Saint-Georges, France) ;
- hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, acide acétique glacial pour analyse (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) ;
- bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide à 1 % de triméthylchlorosilane – BSTFA (Alltech France, Templemars, France) ;
- anhydride acétique, pyridine (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) ;
- acide formique pour spectrométrie de masse, formiate d'ammonium pour spectrométrie de masse (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) ;
- méthanol pour LC/MS Fluka[®], Chromasolv[®] (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France).

3.2 Analyse de confirmation de la présence de THC-COOH dans l'échantillon d'urine

Dès leur arrivée à l'IRCGN, les échantillons sont conservés au congélateur (température de -20 °C environ) jusqu'au moment de l'analyse. Seul l'un des échantillons est analysé, le second est conservé au froid négatif, en vue d'une éventuelle contre-expertise. La gamme d'étalonnage comprend quatre standards d'étalonnage d'une concentration de 40 et 100 ng·mL⁻¹, réalisés en double à partir d'urine exempte de xénobiotiques d'intérêt et surchargés à l'aide de la solution étalon de THC-COOH non deutérée. Après décongélation et hydrolyse enzymatique de l'échantillon, 20 μ L d'une solution méthanolique d'étalonnage interne de 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tétrahydrocannabinol deutéré (THC-COOH-D₃) à 5 μ g·mL⁻¹ sont ajoutés à une prise d'essai de 2 mL. Celle-ci est ensuite acidifiée par 200 μ L d'acide acétique à 10 % puis extraite par 5 mL d'un mélange hexane/acétate d'éthyle (90/10, v/v). Après évaporation à sec, l'extrait est repris par 40 μ L de bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide à 1 % de triméthylchlorosilane (BSTFA) et maintenu à 80 °C durant 20 min. 1 μ L de la solution dérivée ainsi obtenue est analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) sur un appareil Shimadzu[®] GC 17A – QP5000 équipé d'une colonne Agilent technologies[®] J&W HP-Ultra 1 – 12 m \times 0,20 mm \times 0,33 μ m. Les spectres de masses, en ionisation électronique à 70 eV, sont acquis en mode « suivi d'ions sélectionnés » (Selective Ion Monitoring : SIM). Les rapports masse sur charge électrique (m/z) utilisés pour l'identification du THC-COOH et du THC-COOH-D₃ sont respectivement 371, 473, 488 et 374, 476, 491. La méthode d'analyse, validée selon le principe des profils d'exactitude est exacte sur l'intervalle de dosage de 3 à 100 ng·mL⁻¹ de THC-COOH (risque β pour la détermination de l'intervalle de confiance des mesures attendues fixé à 10 % et limites d'acceptation fixées à $\pm \lambda$ à 40 %). La limite de détection est estimée à 1 ng·mL⁻¹ [5].

3.3 Recherche de la méthoxyisoflavone et de ses métabolites dans l'échantillon d'urine

3.3.1 Solution de référence de 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone

Une solution de 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone, diluée à 10 mg·L⁻¹ dans le méthanol, est réalisée à partir de la poudre de référence. Afin de vérifier *a priori* que ce principe actif n'est pas directement en cause, un test de dépistage de l'usage de stupéfiants (Multi-drug screen test panel Check 24/317 – Protzek[®] – Chromogen, Saint-Louis, France) est mis en œuvre à partir d'une prise d'essai de la solution de référence.

3.3.2 Spectres de masse de la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone

Les spectres de masse de la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone ont été acquis à partir d'une prise d'essai de 50 μ L de la solution de référence, évaporée à sec sous courant d'air, et analysée en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) et en GC/MS après remise en solution ou dérivation selon les conditions analytiques définies ci-après.

3.3.3 Préparations de l'échantillon d'urine

Le reliquat d'échantillon d'urine à notre disposition est analysé par LC/MS et GC/MS. Une prise d'essai de 1 mL d'urine est hydrolysée, après ajustement du pH entre 6,5 et 7, par adjonction de 50 μ L de β -glucuronidase et incubation à 37 °C durant 14 heures. Deux extractions sont envisagées. La première est effectuée en milieu acide par ajout de 1 mL de tampon dihydrogénophosphate de potassium 1 M (pH = 4,0) ; la seconde en milieu basique par ajout de 1 mL de tampon hydrogénophosphate de di-potassium 1 M (pH = 9,0). Quel que soit le pH, l'extraction proprement dite est réalisée par 2 mL d'un mélange de dichlorométhane, d'hexane et d'acétate d'éthyle (50/40/10 ; V/V/V). La phase organique est ensuite évaporée à sec sous courant d'air. Afin de faciliter l'identification des pics chromatographiques, des échantillons d'urine exempte de xénobiotiques ou de métabolites d'intérêt sont analysés en parallèle.

3.3.4 Analyses en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)

Pour les analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS), l'extrait sec est repris par 200 μ L d'un mélange de méthanol et de tampon formiate 5 mM à 0,5 % d'acide formique (10/90 ; V/V). Un volume de 20 μ L de la solution ainsi obtenue est analysé par LC/MS.

L'équipement utilisé est un chromatographe en phase liquide haute performance de marque AGILENT[®] Série 1100 couplé à un spectromètre de masse AGILENT[®] MSD (Agilent Technologies, Massy, France). Le logiciel

Tableau I. Paramètres du gradient de méthanol et de tampon formiate de la séparation chromatographique par LC/MS.

Temps (min)	Pourcentage de méthanol	Pourcentage de tampon formiate 5 mM à 0,5 % d'acide formique
5	5 %	95 %
45	95 %	5 %
50	95 %	5 %

d'acquisition et d'exploitation des données est le logiciel ChemStation – Rev. A 10.02 (Agilent Technologies, Massy, France). Les séparations sont effectuées à l'aide d'une colonne NUCLEODUR® C18 3 µm ; 150 mm × 2,0 mm (Macherey Nagel®, Guyancourt, France). La colonne est thermostatée à 40 °C. La phase mobile utilisée est un gradient de méthanol et de tampon formiate 5 mM à 0,5 % d'acide formique selon les conditions chromatographiques définies dans le tableau I. Le débit de la phase mobile est de 0,255 mL·min⁻¹. Le volume d'échantillon injecté dans le chromatographe est de 20 µL.

Les spectres de masse MS par collisions induites dans la source sont obtenus en mode d'ionisation par électrospray positif (ESI) à une tension de cône de fragmentation de 70 V ; ils sont acquis dans un intervalle de rapports *m/z* de 70 à 650. La tension d'ionisation appliquée est de 3,5 kV. L'azote est utilisé comme gaz écran à une température de 350 °C et un débit de 5 L·min⁻¹. La pression de nébulisation est de 20 psig. Les pics chromatographiques sont identifiés, à l'aide du logiciel de déconvolution AMDIS (NIST, version 2.66), par comparaison des spectres de masse avec ceux d'une bibliothèque utilisateur constituée au sein de notre laboratoire, au moyen de standards de xénobiotiques et de métabolites d'intérêt analysés dans les mêmes conditions.

3.3.5 Analyses en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

Pour les analyses par GC/MS, deux techniques de dérivation ont été envisagées. Pour l'acétylation, l'extrait sec est repris par 50 µL d'anhydride acétique et 50 µL de pyridine puis maintenu à 80 °C durant 1 h. Après évaporation à sec, l'extrait dérivé est repris par 50 µL d'acétate d'éthyle. Pour la silylation, l'extrait sec est repris par 40 µL de BSTFA et maintenu à 80 °C pendant 20 min. 1 µL de chacune de ces solutions est analysé par GC/MS.

L'appareil utilisé est un chromatographe en phase gazeuse de marque Thermo Scientific® Trace GC couplé à un spectromètre de masse quadripolaire Thermo Scientific® DSQ II (Thermo Fisher Scientific, Courtabœuf, France). Le logiciel d'acquisition et d'exploitation des données est le logiciel XCalibur – Version 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific, Courtabœuf, France). La colonne chromatographique utilisée est une colonne Restek Rxi® – 5 ms (5 % diphenyl/95 % diméthylpolysiloxane) – 20 m × 0,25 mm × 0,25 µm (Restek France, Lisses, France). L'injection est réalisée en mode splitless à 280 °C, sous un débit constant d'hélium de 1 mL·min⁻¹. La programmation de température du four est la suivante : 40 °C pendant 2 min ; de 40 °C

à 180 °C, à 20 °C·min⁻¹ ; de 180 °C à 280 °C, à 10 °C·min⁻¹ ; de 280 °C à 300 °C, à 2 °C·min⁻¹. Les spectres de masses, en ionisation électronique à 70 eV, sont acquis dans l'intervalle *m/z* de 50 à 650. Ils sont identifiés par comparaison aux spectres de bibliothèques d'origine commerciale (PMW3, WILEY7, NIST05).

3.4 Essai d'administration chez des volontaires sains

Pour confirmer les hypothèses de réaction croisée formulées à la suite des analyses conduites sur l'échantillon d'urine objet de l'observation présentée dans cet article, un essai d'administration chez des volontaires sains a été effectué. Trois sujets ne présentant aucune pathologie particulière, ne suivant aucun traitement médicamenteux et ne consommant aucun produit stupéfiant ni aucun complément alimentaire, sont inclus dans cet essai. Un prélèvement d'urine est effectué chez chacun des sujets au début de l'essai (figure 2). Ce premier prélèvement est soumis à un test de dépistage de l'usage de stupéfiant (Multi-drug screen test panel Check 24/317 – Protzek® – Chrimogen, Saint-Louis, France). Après ce premier prélèvement d'urine, la méthoxyisoflavone est administrée *per os* à la posologie de deux gélules contenant 150 mg de principe actif (Myprotein.co.uk, Manchester, United Kingdom) toutes les douze heures. Afin de vérifier la présence du principe actif, le contenu d'une gélule dilué à 10 mg·L⁻¹ dans le méthanol, a été préalablement analysé en GC/MS. Six heures après la troisième prise de méthoxyisoflavone, un second prélèvement d'urine est réalisé et soumis d'une part à un test de dépistage de l'usage de stupéfiant et d'autre part à une analyse par LC/MS et GC/MS après hydrolyse enzymatique, extraction en milieu basique et dérivation par le BSTFA selon les conditions analytiques définies ci-dessus (figure 2).

4 Résultats

4.1 Analyse de confirmation de la présence de THC-COOH dans l'échantillon d'urine

La présence de THC-COOH dans le prélèvement d'urine du cas clinique présenté dans cet article n'a pas été confirmée.

4.2 Solution de référence de 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone soumise au test de dépistage

Le test de dépistage mis en œuvre à partir d'une prise d'essai de la solution de référence s'est révélé négatif. La 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone ne semble donc pas être directement en cause dans le résultat faussement positif du dépistage urinaire.

4.3 Spectres de masse de la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone

Dans les conditions analytiques appliquées en LC/MS, la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone est éluée à un temps de rétention

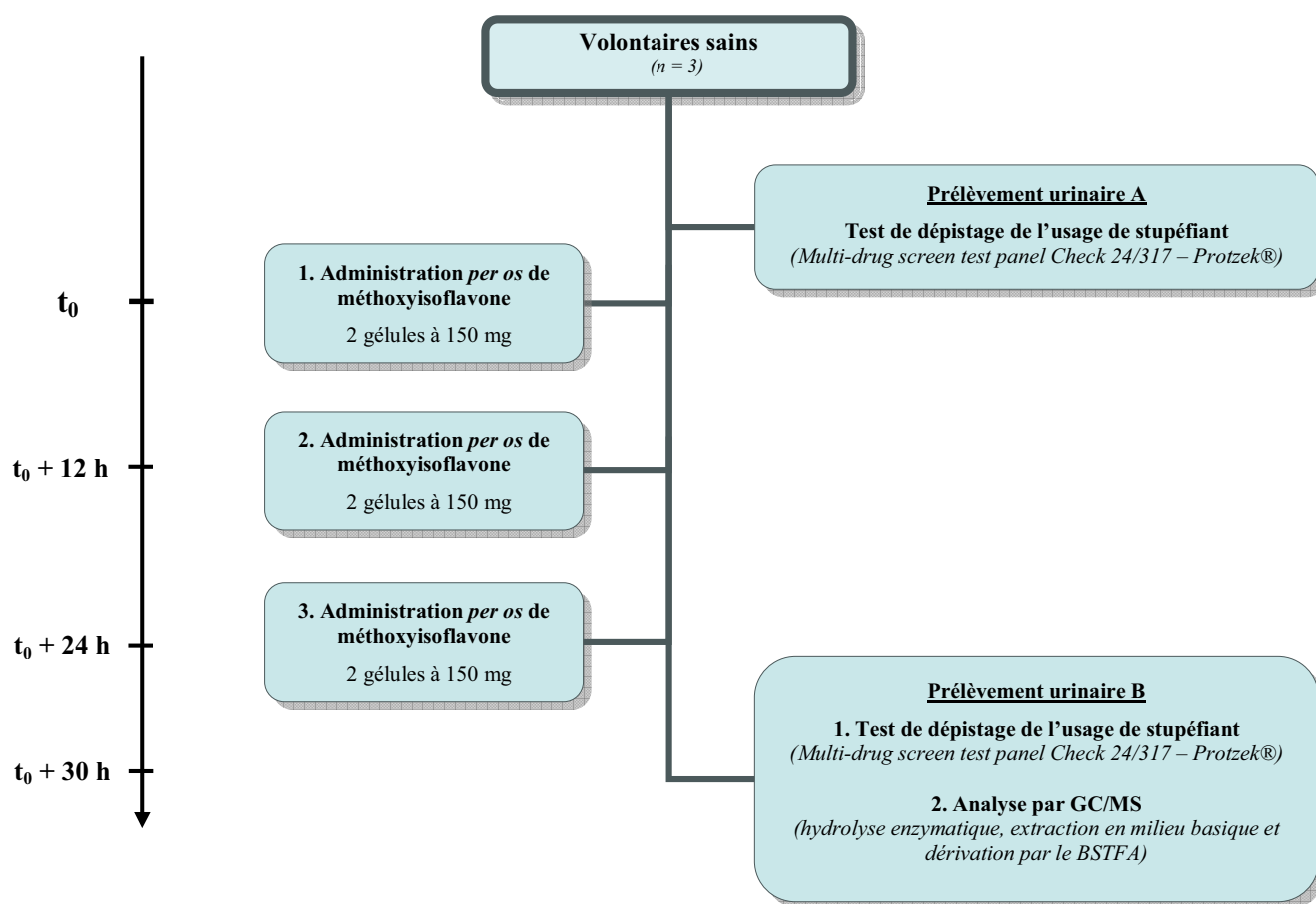


Fig. 2. (Couleur dans la version en ligne) Schéma de l'essai d'administration chez des volontaires sains.

de 42,4 min environ. L'acquisition du spectre de masse avec une tension de cône de fragmentation de 70 V, permet de former l'ion moléculaire protoné $[M + H]^+$ de rapport $m/z = 267$. En GC/MS, la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone est éluée à un temps de rétention de 14,8 min environ. Ne présentant pas de groupe fonctionnel possédant un hydrogène labile, cette molécule ne produit pas de dérivé acétylé ou silylé. Le spectre de masse obtenu en GC/MS est présenté à la figure 3 et le mécanisme de fragmentation proposé est décrit figure 4.

4.4 Recherche de la méthoxyisoflavone et de ses métabolites dans l'échantillon d'urine

Quels que soient le pH de l'extraction et la méthode d'analyse, aucun des xénobiotiques et des métabolites référencés dans les bases de spectre de masse utilisées n'a été mis en évidence par les analyses réalisées sur l'échantillon d'urine ayant donné lieu à un dépistage faussement positif au cannabis. De même, la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone n'a pas été détectée. En revanche, un pic chromatographique non identifié est observé en LC/MS au temps de rétention 38,5 min et, en GC/MS, à 15,5 min et 17,8 min, respectivement pour le dérivé acétylé et silylé.

Le rapport $m/z = 253$ de l'ion moléculaire protoné $[M + H]^+$ obtenu en LC/MS avec une tension de cône de fragmentation de 70 V et les données de la littérature concernant le métabolisme par O-déméthylation des isoflavones de structures proches de la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone [6,7], nous ont conduit à privilégier l'hypothèse de la 5-méthyl-7-hydroxyisoflavone (masse molaire : $252,26 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) pour expliquer l'origine de ces pics chromatographiques (figure 5). La formation d'un dérivé acétylé et d'un dérivé silylé est rendue possible par la présence d'un hydrogène labile sur la fonction hydroxy de cette molécule. Les spectres de masse observés en GC/MS (figures 6 et 7) et les mécanismes de fragmentation correspondants (figure 4) confortent l'identification de la 5-méthyl-7-hydroxyisoflavone. L'ion moléculaire M^+ ($m/z = 324$) est l'ion majoritaire du spectre de masse du dérivé triméthylsilyl. Cette caractéristique, peu commune pour ces dérivés, est retrouvée pour d'autres molécules de structure proche [6].

La 5-méthyl-7-hydroxyisoflavone, métabolite de la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone, est donc présente dans l'échantillon d'urine analysé. Ni la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone, ni aucun autre xénobiotique ou métabolite, n'ayant été détecté par les analyses mises en œuvre, c'est vraisemblablement ce

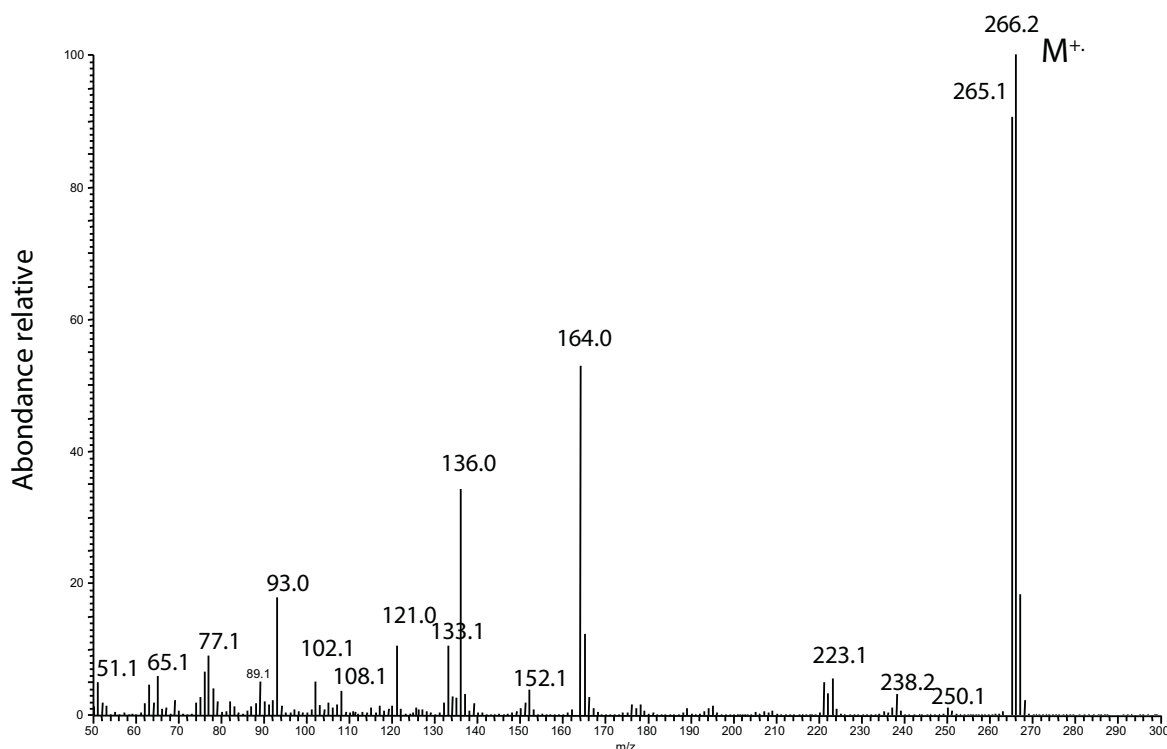


Fig. 3. Spectre de masse de la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone analysée en GC/MS (temps de rétention : 14,8 min).

métabolite qui est à l'origine de la réaction croisée avec les anticorps dirigés contre le THC-COOH et du résultat de dépistage faussement positif qui en découle.

4.5 Essai d'administration chez des volontaires sains

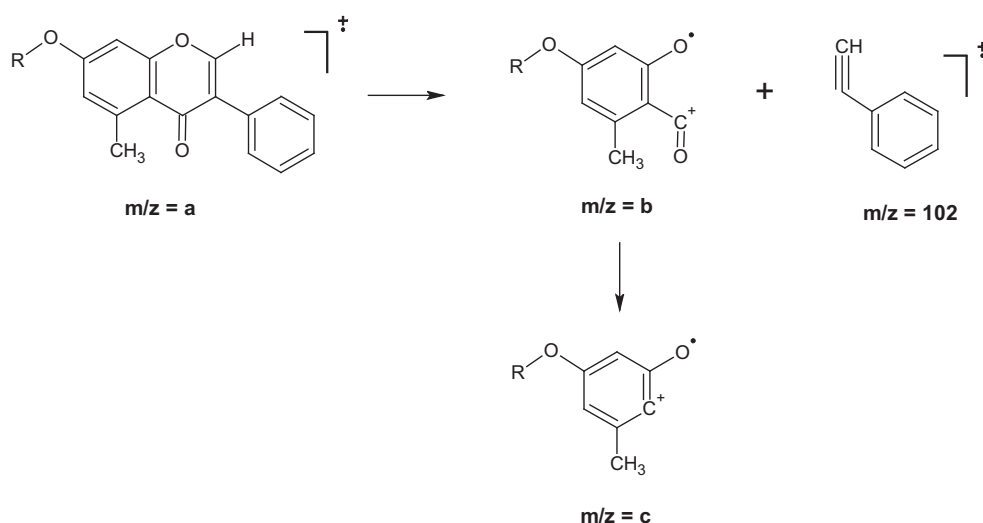
La comparaison du spectre de masse obtenu dans les mêmes conditions analytiques à partir de la substance de référence, a permis de confirmer la présence de méthoxyisoflavone dans les gélules administrées dans l'essai.

Le test de dépistage urinaire de l'usage de stupéfiant réalisé avant le début du protocole d'administration de méthoxyisoflavone chez les trois volontaires inclus dans l'essai était négatif pour les cannabinoïdes et les autres substances stupéfiants. Le test de dépistage effectué six heures après la troisième prise de méthoxyisoflavone s'est révélé positif pour les cannabinoïdes chez les trois volontaires. Les analyses réalisées par LC/MS et GC/MS ont permis d'identifier la 5-méthyl-7-hydroxyisoflavone dans chacun des prélèvements d'urine. Comme pour l'échantillon du cas clinique présenté dans cet article, la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone n'a pas été détectée (tableau II). La présence du métabolite dans les prélèvements d'urine des trois volontaires sains permet d'affirmer son implication dans la réaction croisée avec les anticorps dirigés contre le THC-COOH et les résultats de dépistage de l'usage de cannabis faussement positif obtenus.

5 Discussion

La méthoxyisoflavone (5-méthyl-7-méthoxyisoflavone) est une isoflavone de synthèse. Étudiée pour ses propriétés anabolisantes chez l'animal à la fin des années 1970, cette molécule entraînerait une augmentation de la masse musculaire et de la matrice osseuse, dues à un accroissement de la synthèse protéique et une diminution de la cortisolémie [8,9]. Chez l'Homme, deux études réalisées chez des sujets suivant un programme d'entraînement en résistance de 8 semaines et recevant 800 mg de méthoxyisoflavone par jour n'ont cependant pas permis de confirmer ces allégations en faveur d'un effet ergogène de la méthoxyisoflavone. Aucune modification significative du pic de force isocinétique, de l'indice de masse corporelle, du contenu minéral osseux ou de la cortisolémie n'a pu ainsi être mise en évidence [10,11]. La diminution du pourcentage de graisse corporelle observée dans l'une des études n'a pas été confirmée [10]. À ce jour, la méthoxyisoflavone figure toujours parmi les produits proposés à la vente par de nombreux sites culturistes [12].

Le métabolisme de la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone n'est pas décrit dans la littérature. Parmi les nombreuses voies métaboliques des isoflavones identifiées chez l'Homme, la O-déméthylation et l'hydroxylation sont celles observées le plus fréquemment [7]. L'isoflavone ayant fait l'objet d'études approfondies de métabolisme et dont la structure est la plus



Molécule	R	$m/z = a$	$m/z = b$	$m/z = c$
5-méthyl-7-méthoxyisoflavone	CH ₃	266 ⁽¹⁾ [M] ⁺	164	136
5-méthyl-7-hydroxyisoflavone (dérivé acétylé)		252 ^(1,2) [M-42] ⁺	150	122
5-méthyl-7-hydroxyisoflavone (dérivé silylé)	(CH ₃) ₃ Si	324 ⁽¹⁾ [M] ⁺	222	194
		309 ⁽³⁾ [M-15] ⁺	207	179

(1) La perte d'un hydrogène labile conduit parallèlement à la formation d'un fragment [M-1]⁺. L'autre fragmentation caractéristique est la perte facile d'un fragment neutre de phényléthyne, de masse 102 Da, conduisant à l'ion b. La migration de la charge au cours de cette fragmentation conduit également à un ion faiblement abondant à $m/z = 102$.

(2) Le dérivé acétylé de la 5-méthyl-7-hydroxyisoflavone perd préalablement un fragment cétène CH₂=C=O.

(3) Le dérivé silylé de la 5-méthyl-7-hydroxyisoflavone peut préalablement perdre l'un des radicaux méthyles du groupement triméthylsilyl. L'ion moléculaire est ici notablement présent, contrairement à la majorité des dérivés triméthylsilyls connus.

Fig. 4. Mécanismes de fragmentation, en ionisation électronique à 70 eV, proposés pour la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone et son métabolite la 5-méthyl-7-hydroxyisoflavone.

proche de celle nous concernant est l'ipriflavone (7-isopropoxyisoflavone). Cette molécule a été développée dans le cadre du traitement de l'ostéoporose (figure 8). Chez le rat, la 7-isopropoxyisoflavone subit un métabolisme hépatique intense qui conduit à deux métabolites urinaires principaux, respectivement par élimination et par oxydation du groupe isopropyle : la 7-hydroxyisoflavone et la 7-(1-carboxyethoxy)isoflavone. Des métabolites secondaires par hydroxylation du cycle B en position 3' et 4' sont également formés [6,13]. Chez l'Homme, en plus des deux métabolites majoritaires, un métabolite alcool produit par hydroxylation d'un radical méthyle du groupe isopropyle a également été identifié [6]. La part de 7-isopropoxyisoflavone éliminée dans les urines sous forme inchangée est très faible [13]. Les analyses effectuées dans notre étude

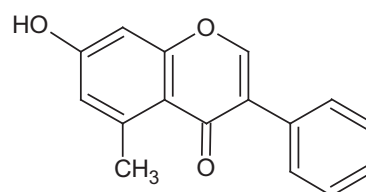


Fig. 5. Structure moléculaire de la 5-méthyl-7-hydroxyisoflavone, métabolite de la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone (masse monoisotopique M = 252,08 Da).

n'ont permis de mettre en évidence qu'un seul métabolite de la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone dans les urines des patients : la 5-méthyl-7-hydroxyisoflavone. Les éventuels produits de l'oxydation métabolique du groupe méthoxy en alcool puis en

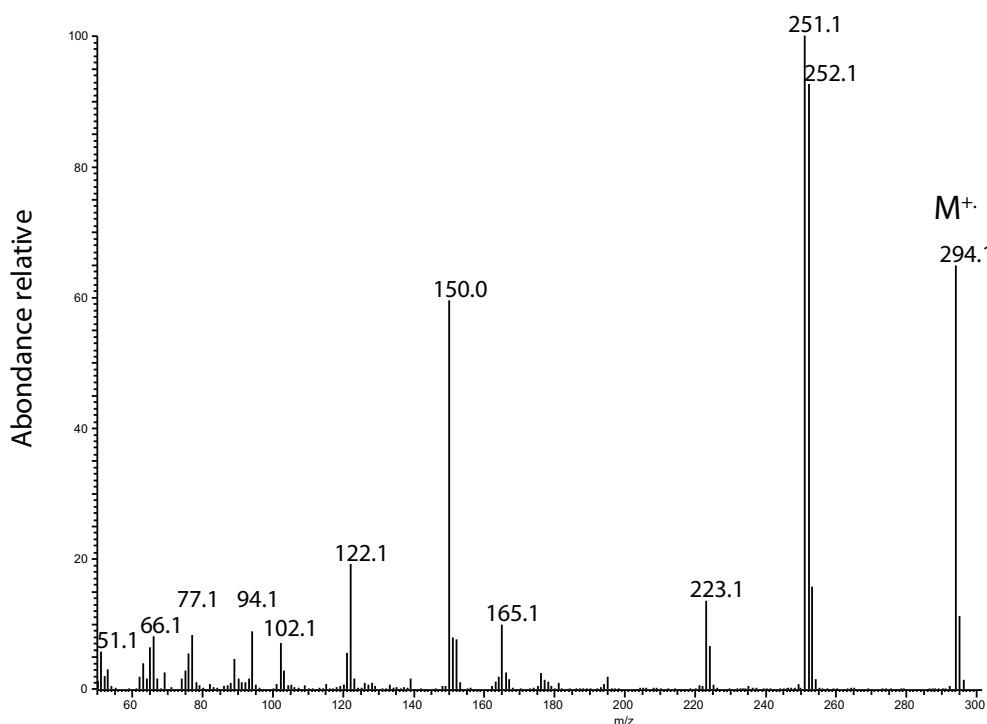


Fig. 6. Spectre de masse du dérivé acétylé du métabolite (élué au temps de rétention 15,5 min).

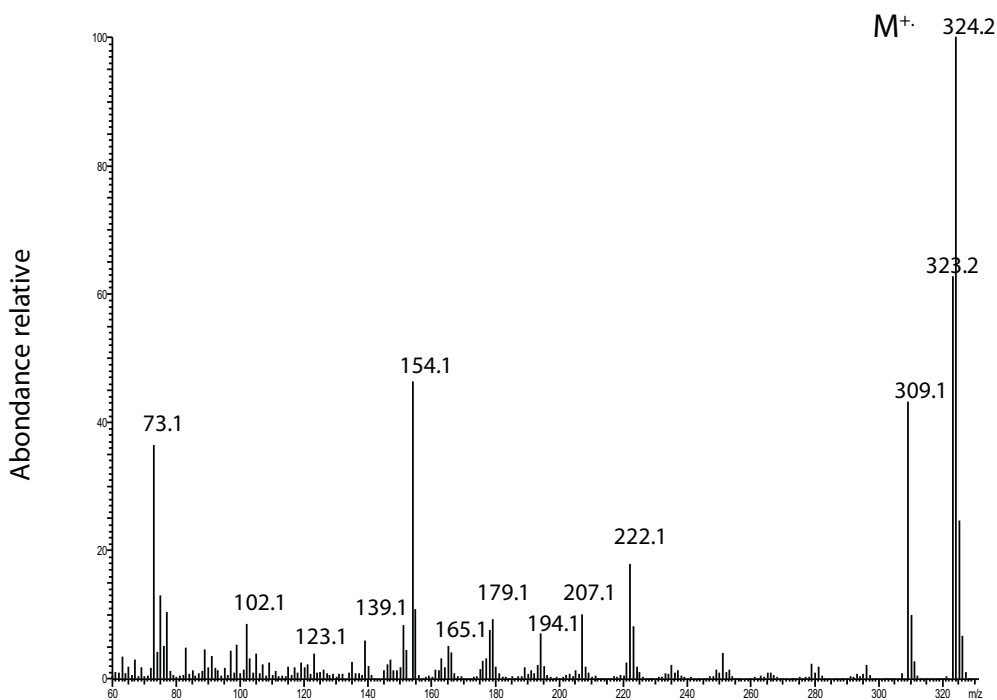


Fig. 7. Spectre de masse du dérivé silylé du métabolite (élué au temps de rétention 17,8 min).

acide carboxylique ou de l'hydroxylation du cycle B n'ont pas été détectés. La 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone ne constitue probablement pas, ou de manière minoritaire, un substrat de ces voies de métabolisation. D'autre part, l'absence de métabolites minoritaires dans les urines, comme celle du principe actif sous forme inchangée, peut également être liée à la fréquence d'uti-

lisation et au temps écoulé depuis la dernière administration de la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone.

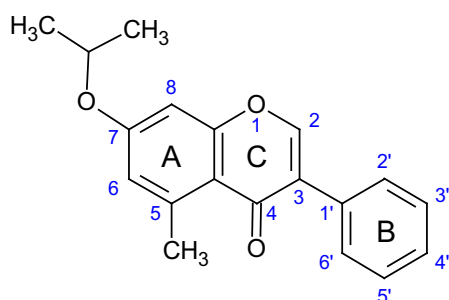
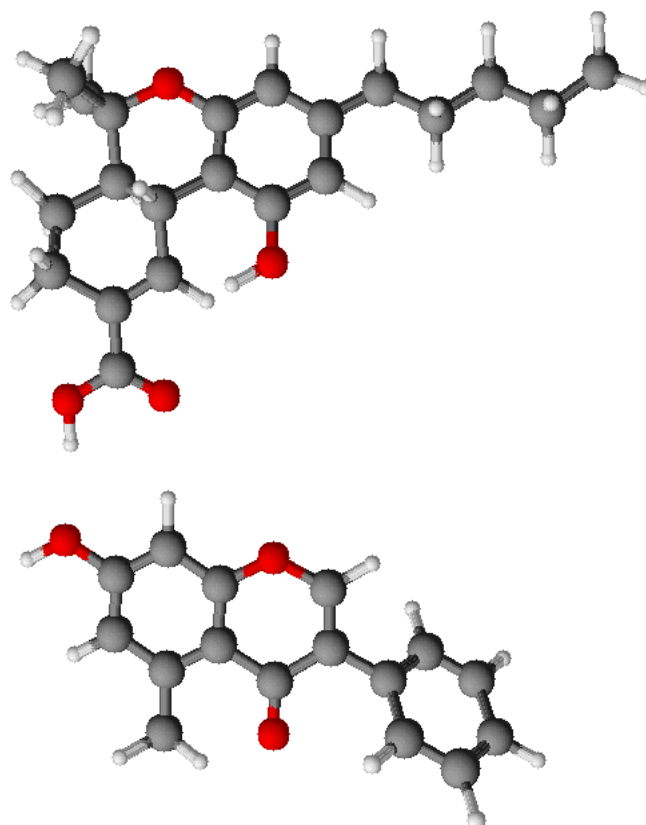
L'origine du manque de spécificité des tests de dépistage par immunochromatographie est aujourd'hui clairement attribuée aux réactions croisées entre les anticorps des tests et des substances présentant des analogies structurales avec la

Tableau II. Résultats de l'essai d'administration chez des volontaires sains.

Individus	Résultats des tests de dépistage urinaires		Résultats des analyses du prélèvement B par LC/MS et GC/MS
	prélèvement A	prélèvement B	
	(avant administration de la méthoxyisoflavone)	(après administration de la méthoxyisoflavone)	
A : femme, 47 ans, 75 kg	Négatif	Positif : cannabinoïdes	5-méthyl-7-méthoxyisoflanone : absence 5-méthyl-7-hydroxyisoflanone : présence
B : homme, 48 ans, 105 kg	Négatif	Positif : cannabinoïdes	5-méthyl-7-méthoxyisoflanone : absence 5-méthyl-7-hydroxyisoflanone : présence
C : homme, 36 ans, 69 kg	Négatif	Positif : cannabinoïdes	5-méthyl-7-méthoxyisoflanone : absence 5-méthyl-7-hydroxyisoflanone : présence

molécule dépistée. Pour le dépistage urinaire de l'usage du cannabis, le pourcentage de résultats faussement positifs attribuables à l'acide niflumique observé en routine peut par exemple atteindre 35 % [14]. La survenue de réactions croisées pour un test dépistage est difficile à prévoir : elle dépend certes de la structure moléculaire des interférents potentiels (et de leur concentration) mais également de la qualité des anticorps utilisés pour la fabrication du test. Même si quelques similitudes peuvent être intuitivement distinguées, les structures moléculaires du THC-COOH et de la 5-méthyl-7-hydroxyisoflavone (figure 9) ne permettent pas de prédire la réaction croisée de ce métabolite avec les anticorps des tests de dépistage urinaire de l'usage du cannabis. Seuls des essais systématiques pour chacun des tests commercialisés permettent de déterminer les molécules interférentes. Les listes de molécules interférentes fournies par les fabricants ne sont toutefois pas exhaustives et sont déterminées pour une concentration fixée. Il s'agit le plus souvent de listes « négatives » des principes actifs (les plus couramment prescrits ou utilisés en automédication) ne donnant pas de réaction positive avec le test. De plus, ces essais systématiques d'interférence concernent généralement les principes actifs et ne prennent pas en compte les réactions croisées potentiellement dues aux métabolites. Dans

notre cas, la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone ou son métabolite ne figurait pas sur la notice d'utilisation du test employé. À notre connaissance, seule la notice de la trousse de dosage immunoenzymatique CEDIA[®] THC (Thermo Fisher Scientific) mentionne un risque de réaction positive, au seuil de

**Fig. 8.** (Couleur dans la version en ligne) Structure moléculaire de l'ipriflavone (7-isopropoxyisoflavone).**Fig. 9.** (Couleur dans la version en ligne) Représentation en trois dimensions de la structure moléculaire du 11-nor-9-carboxy-Δ9-tétrahydrocannabinol (THC-COOH) – en haut – et de la 5-méthyl-7-hydroxyisoflavone – en bas (logiciel ACD/3D Viewer, version 12.01, www.acdlabs.com).

50 ng·mL⁻¹ de THC-COOH, chez les patients ayant consommé de la 5-méthyl-7-méthoxyisoflavone [15].

6 Conclusion

Les analyses mises en œuvre, fondées sur les données de l'anamnèse médicamenteuse et toxicologique, ont permis d'identifier un métabolite de la méthoxyisoflavone impliqué dans une réaction croisée ayant entraîné un résultat faussement positif à un test de dépistage urinaire de l'usage du cannabis. L'essai d'administration réalisé chez des volontaires sains a permis de confirmer cette hypothèse. Ce cas témoigne du caractère indispensable des analyses de confirmation par spectrométrie de masse pour identifier avec certitude les stupéfiants (ou leurs métabolites) dépistés. Il illustre également la grande diversité des substances, parmi lesquels de nombreuses substances non médicamenteuses, susceptibles d'engendrer des réactions croisées avec les tests de dépistage immunochromatographiques et la difficulté de les recenser. Enfin, la réaction croisée d'une isoflavone de synthèse avec un test de dépistage urinaire du cannabis pose également la question d'éventuelles réactions croisées avec les nombreuses isoflavones d'origine alimentaire, plus complexes encore à mettre en évidence.

Remerciements. Les auteurs remercient les volontaires ayant participé à l'essai d'administration.

Conflits d'intérêts. Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts.

Références

- Boucher A, Vilette P, Crassard N, Bernard N, Descotes J. Urinary toxicological screening: analytical interference between niflumic acid and cannabis. *Arch Pediatr.* 2009; 16(11): 1457–1460.
- Delacour H, Servonnet A, Gardet V. Dépistage du cannabis dans les urines, attention à l'acide niflumique. *Ann Toxicol Anal.* 2005; 17(3): 203–206.
- Moeller KE, Lee KC, Kissack JC. Urine drug screening: practical guide for clinicians. *Mayo Clin Proc.* 2008; 83(1): 66–76.
- Instruction n° 22000/DEF/GEND/RH du 13 février 2008 relative aux normes d'aptitude médicale des personnels militaires de la gendarmerie 2008.
- Feinberg M, Boulanger B, Dewe W, Hubert P. New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. *Anal Bioanal Chem.* 2004; 380(3): 502–514.
- Yoshida K, Tsukamoto T, Torii H, Doi T, Naeshiro I, Uemura I, Tanayama S. Metabolism of ipriflavone (TC-80) in rats. *Radioisotopes.* 1985; 34(11): 612–617.
- Heinonen SM, Wähälä K, Adlercreutz H. Metabolism of isoflavones in human subjects. *Phytochemistry Reviews.* 2002; 1(2): 175–182.
- Kreider RB, Wilborn CD, Taylor L, Campbell B, Almada AL, Collins R, Cooke M, Earnest CP, Greenwood M, Kalman DS, Kerksick CM, Kleiner SM, Leutholtz B, Lopez H, Lowery LM, Mendel R, Smith A, Spano M, Wildman R, Willoughby DS, Ziegenfuss TN, Antonio J. ISSN exercise & sport nutrition review: research & recommendations. *J Int Soc Sports Nutr.* 2010; 7: 7–50.
- Feuer L, Farkas L, Nogradi M, Vermes B, Gottsegen A, Wolfner A. Metabolic 5-methyl-isoflavone-derivatives, process for the preparation thereof and compositions containing the same. US patent 4163746. 1979.
- Incedon T, Van Gammeren D, Antonio J. The effects of 5-methyl-7-methoxyisoflavone on body composition and performance in college-aged men. *Med Sci Sports Exer.* 2001; 33(5): S338.
- Wilborn CD, Taylor LW, Campbell BI, Kerksick C, Rasmussen CJ, Greenwood M, Kreider RB. Effects of methoxyisoflavone, ecdysterone, and sulfo-polysaccharide supplementation on training adaptations in resistance-trained males. *J Int Soc Sports Nutr.* 2006; 3: 19–27.
- Dumestre-Toulet V. Se doper *via* Internet ? Un jeu... de souris ! *Ann Toxicol Anal.* 2000; 12(1): 19–25.
- Monostory K, Vereczkey L, Levai F, Szatmari I. Ipriflavone as an inhibitor of human cytochrome P450 enzymes. *Br J Pharmacol.* 1998; 123(4): 605–610.
- Lecompte Y, Salle S, Roussel O, Hervé S, Messines O, Perrin M. Influence du seuil de confirmation lors du dépistage urinaire de l'usage du cannabis : à propos de cinq années de dépistages réalisés au sein de la Gendarmerie nationale. *Médecine et Armées.* 2011; 39(4): 35–46.
- CEDIA® THC Cross-Reactivity Table. Document consulté sur le site <https://fscimage.fishersci.com/images/D15921~.pdf> le 21 novembre 2011.