

GHB dans le sang post-mortem. Critères d'interprétation

Interpretation of postmortem GHB concentrations

Pascal KINTZ*, Marion VILLAIN, Carole JAMEY, Vincent CIRIMELE,
Antoine TRACQUI, Bertrand LUDES

Institut de Médecine Légale, 11, rue Humann - F-67000 Strasbourg - France

*Auteur à qui adresser la correspondance : Dr Pascal KINTZ, Institut de Médecine Légale,
11, rue Humann - F-67000 Strasbourg - France
Tél : +33 3 90 24 33 49 - Fax : +33 3 90 24 33 62 - E-mail : pascal.kintz@wanadoo.fr

(Reçu le 8 mars 2004 ; accepté le 15 juin 2004)

RÉSUMÉ

Il est désormais admis par la communauté scientifique que du GHB peut être retrouvé dans le sang post-mortem en absence de toute exposition à ce stupéfiant. Dans ces conditions, un seuil analytique de positivité a été proposé à 50 mg/l dans le sang. Afin de valider ce seuil, 73 échantillons de sang cardiaque post-mortem, obtenus lors d'autopsies où le médecin légiste a pu exclure tout lien avec le GHB, ont été analysés par GC/MS après précipitation. Le délai entre le décès et l'autopsie a varié entre 12 et 72 heures. En parallèle, lorsque cela était possible, du sang périphérique, de la bile et de l'humeur vitrée ont été également analysés.

Il a été retrouvé du GHB dans tous les échantillons de sang cardiaque, avec des concentrations variant de 0,4 à 409 mg/l.

Une concentration supérieure à 50 mg/l a été observée dans 16 cas. Les examens complémentaires, avec les autres prélèvements correspondants, ont donné les résultats suivants :

- sang cardiaque (51 à 409 mg/l) versus sang périphérique (1,6 à 44 mg/l) dans 6 cas
- sang cardiaque (55 à 409 mg/l) versus bile (6 à 238 mg/l)

SUMMARY

Since GHB is present in both blood and urine of the general population as an endogenous compound, toxicologists must be able to discriminate between these endogenous levels and a concentration resulting from exogenous exposure.

To verify the accuracy of a proposed 50 mg/L postmortem blood cut-off, we tested 73 autopsy cases of subjects where the cause of death could exclude GHB exposure. The delay between death and autopsy ranged from 12 to 72 hours. GHB was tested by GC/MS after precipitation. Briefly, 20 µL blood, bile, or vitreous humor were pipetted in a glass tube, followed by 20 µL GHB-d₆ and 45 µL acetonitrile. After vortexing and centrifugation, the supernatant was collected and evaporated to dryness. The residue was derivatized with BSTFA with 1% TMCS for 20 min at 70 °C. GHB (m/z 233, 204 and 147) and GHB-d₆ (m/z 239) were identified by MS. GHB tested positive in all the 73 whole blood (cardiac) specimens, with concentrations in the range 0.4 to 409 mg/l, with a major distribution in the range 10-40 mg/l. A concentration > 50 mg/l was observed in 16 cases. As there was no data to support GHB exposure, this was considered as post-

dans 9 cas

- sang cardiaque (51 à 409 mg/l) versus humeur vitrée (4 à 21 mg/l) dans 7 cas

Il apparaît que l'application stricte d'un seuil de positivité dans le sang à 50 mg/l ne permet pas d'interpréter correctement les données analytiques. La bile ne semble pas d'un intérêt discriminant et seuls le sang périphérique, mais surtout l'humeur vitrée permettent de documenter au mieux les résultats.

Il est essentiel de confirmer toute concentration de GHB supérieure à 50 mg/l dans le sang cardiaque par une détermination concomitante dans le sang périphérique et l'humeur vitrée. L'urine pouvant également contenir des concentrations importantes de GHB, n'apporte pas d'information complémentaire. Des travaux sont en cours pour confirmer l'intérêt de la détermination du rapport isotopique $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ (comme pour la testostérone) pour différencier un usage exogène d'une formation endogène.

MOTS-CLÉS

GHB, post-mortem, sang, humeur vitrée, interprétation.

Introduction

Le GHB est un produit naturellement présent chez l'homme à des concentrations nanomolaires.

Son sel de sodium, classé comme stupéfiant depuis le 5 mai 1999 est une poudre blanche, micro-cristalline, fortement hygroscopique, soluble dans l'eau et de saveur salée. On le rencontre sur le marché noir sous forme de liquide translucide, pouvant être parfois coloré, dont les concentrations sont très variables.

L'administration de GHB entraîne une importante augmentation des concentrations en dopamine au niveau central. Il protège le SNC des effets délétères d'une demande métabolique excessive ou d'une hypoxie, ce qui en fait son intérêt en anesthésiologie.

Son usage thérapeutique est ancien, l'AMM initial datant de 1961. Celle-ci a été renouvelée le 14 janvier 1998, avec comme indications thérapeutiques la sédation en neuro-traumatologie et la propriété d'adjuvant anesthésique en chirurgie et obstétrique.

Sur le plan pharmacologique, le GHB fait partie de la classe des hypnotiques et anesthésiques, avec des indications comme inducteur de sommeil ou comme adjuvant des analgésiques et autres anesthésiques en chirurgie. La posologie usuelle est de 60 mg/kg chez l'adulte et 100 mg/kg chez l'enfant. Il produit hypnose et hypotonie, mais n'a pas d'effet analgésique ou myorelaxant, les myoclonies ou les convulsions sont donc possibles. L'administration IV provoque une augmentation modérée et transitoire de la tension artérielle, associée à une bradycardie et à une diminution de la fréquence respiratoire. Le GHB est également un hypothermisant, un hypokaliémiant et un ocytocique (1).

mortem formation. In order to discriminate this contamination, when available, femoral blood, bile or/and vitreous humor were tested. The following results were obtained :

- cardiac blood (55 to 409 mg/l) versus bile (6 to 238 mg/l) in 9 cases ;

- cardiac blood (51 to 409 mg/l) versus femoral blood (2 to 44) in 6 cases, and

- cardiac blood (51 to 409 mg/l) versus vitreous humor (4 to 21) in 7 cases.

It is obvious that bile does not fit the requirements for discrimination and that femoral blood and mostly vitreous humor can be of particular interest. These results demonstrate that a positive (> 50 mg/l) postmortem blood GHB concentration cannot support alone drug exposure and that it is essential to document the case with other specimens, including peripheral blood and vitreous humor.

KEY-WORDS

GHB, postmortem, blood, vitreous humor, interpretation.

La demi-vie du GHB est proportionnelle à la dose administrée, probablement due à une limitation de sa dégradation enzymatique. Par voie IV, elle est de 40 min pour une dose à 60 mg/kg, *per os* elle est de 20 à 25 min pour des doses de 12,5 à 50 mg/kg, avec un pic plasmatique atteint en 20 à 45 min (2).

Dès 1998, et la banalisation de l'usage du GHB aux Etats-Unis dans les affaires de soumission chimique ou de conduite automobile sous influence, la presse scientifique mettait en garde les toxicologues sur une possible formation *in vitro* (3). Ces auteurs observaient dans 15 autopsies sur 20 des concentrations sanguines de GHB de 3,2 à 168 mg/l (moyenne à 25 mg/l), alors que les sujets n'étaient pas *a priori* exposés au GHB. Dans tous les cas, les urines étaient restées négatives. Ces résultats étaient confirmés par d'autres travaux, dont par exemple ceux de Stephens et coll. (4). L'interprétation se compliquait en 2001, avec une publication (5) mentionnant une formation post-mortem également dans les urines. En 2002, Kintz (6) proposait un seuil de positivité à 50 mg/l dans le sang post-mortem, associé à la détection du GHB dans les urines.

Afin de documenter la présence de GHB dans le sang post-mortem et son interprétation, nous avons analysé ce produit dans 73 expertises médico-légales consécutives, dont les prélèvements ont été effectués à l'IML de Strasbourg.

Matériel et méthodes

Échantillons biologiques

Du sang cardiaque, du sang fémoral, de la bile et de l'humeur vitrée ont été recueillis lors d'autopsies sur réquisition du Parquet de Strasbourg. Compte tenu des données de la littérature, les urines ont été considérées comme sans intérêt. Aucun conservateur n'a été ajouté aux échantillons. Le délai entre le décès et l'autopsie était généralement compris entre 12 et 72 heures. Dans tous les 73 cas, la cause de la mort n'avait aucun lien avec le GHB, comme ont pu l'estimer les médecins légistes. Avant analyse, faite sous 48 heures, les échantillons ont été conservés à + 4° C.

Le GHB a été analysé dans tous les 73 échantillons de sang cardiaque. Lorsque la concentration excédait 50 mg/l, le GHB a été dosé dans les autres échantillons biologiques, lorsqu'ils étaient disponibles.

Réactifs

L'acétonitrile est de qualité HPLC (Merck, Darmstadt, Allemagne). Le BSTFA + 1 % TMCS (N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide + 1 % triméthylchlorosilane) est acheté chez Fluka (Saint-Quentin Fallavier, France). Le GHB et le GHB-d₆ proviennent de Promochem (Molsheim, France).

Analyse du GHB

La procédure est identique, quel que soit le fluide biologique analysé et découle des travaux de Villain *et al* (7).

Brièvement, à 20 µl de sang total, de bile ou d'humeur vitrée, on ajoute 5 µl de GHB-d₆ (standard interne) à 100 mg/l et 45 µl d'acétonitrile pour précipiter les protéines. Après agitation au vortex et centrifugation, la phase surnageante est prélevée puis évaporée à sec. Le résidu est repris par 35 µl de BSTFA + 1 % TMCS pour former des dérivés silylés qui sont injectés sur une colonne HP5-MS (5 % phenyl-95 % méthylsiloxane, 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 m) d'un système de GC/MS. Le GHB est identifié par ses ions (m/z 233, 204 et 159) et quantifié par rapport au GHB-d₆ (m/z 239). La limite de détection de la méthode est de l'ordre de 0,5 mg/l, largement suffisante pour les besoins toxicologiques.

Les dérivés sont stables au moins 24 heures.

Résultats

Dans un cas de décès, Marinetti *et coll.* (8) ont retrouvé du GHB dans le sang cardiaque à la concentration de 66 mg/l. Après une exposition unique et létale, Kalasinsky *et coll.* (9) ont dosé le GHB à 330 mg/l dans

le sang fémoral. Une concentration post-mortem de 538 mg/l de GHB a été mise en évidence après ingestion de gamma-hydroxybutyrolactone (10). De ces concentrations post-mortem, il apparaît que l'intervalle des valeurs potentiellement létales est important, probablement lié à la rapide élimination du produit du compartiment sanguin.

Les concentrations de GHB dans le sang cardiaque sont données dans le Tableau I. La distribution de ces concentrations est représentée Fig 1. Dans tous les cas, une exposition au GHB a pu être exclue par les médecins légistes expérimentés et les données de la Police. Le GHB a été retrouvé dans tous les 73 échantillons de sang cardiaque avec des concentrations comprises entre 0,4 et 409 mg/l, et une distribution majeure entre 10 et 40 mg/l. Tout comme l'avait observé Elliott (11), il n'y a pas de corrélation apparente entre la concentration sanguine en GHB et la cause du décès.

Une concentration supérieure à 50 mg/l (seuil de positivité usuel) a été observée dans 16 cas (51 à 409 mg/l). Lorsqu'ils étaient disponibles, le sang fémoral, la bile et l'humeur vitrée ont alors été analysés. Les résultats des analyses sont donnés dans les Tableaux II, III et IV. Marinetti *et coll.* (8) ont retrouvé, dans un cas d'intoxication mortelle, du GHB dans le sang cardiaque (66 mg/l), fémoral (77 mg/l) et l'humeur vitrée (85 mg/l). Dans un cas de décès d'un héroïnomanie ayant également abusé du GHB (12), les concentrations suivantes étaient retrouvées : sang (12 mg/l), bile (57 mg/l) et humeur vitrée (84 mg/l). Il semble donc que l'humeur vitrée soit un milieu d'accumulation en cas d'exposition au GHB.

Au contraire, dans notre cohorte de sujets non-exposés au GHB, même en cas de concentrations élevées dans le sang cardiaque, les concentrations dans le sang fémoral (2 à 44 mg/l) et l'humeur vitrée (4 à 21 mg/l) sont restées modestes.

C'est pourquoi, les auteurs recommandent, afin de pouvoir attribuer au GHB une responsabilité dans le processus légal, de faire simultanément le dosage dans le sang fémoral et l'humeur vitrée, en utilisant un seuil de positivité à 50 mg/l. Par contre, le dosage dans la bile (6 à 238 mg/l) n'apporte pas de possibilité de discrimination.

Une étude récente (13) a montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre la concentration sanguine de GHB et la concentration des marqueurs de putréfaction comme la tryptamine ou la phényl-2-éthylamine, les auteurs concluant à une production microbienne du GHB dans le temps.

Selon notre expérience, la formation post-mortem du GHB serait fonction du délai entre le décès et le

Tableau I : Concentrations de GHB dans le sang cardiaque et cause de la mort dans 73 cas.

Cas	GHB (mg/l)	Cause de la mort
1	0,9	Viol + homicide
2*	223,6	Intoxication au CO
3	1,0	Décès naturel
4	11,6	Suicide par arme à feu
5	0,4	Homicide
6	7,0	Décès naturel
7*	95,0	Noyade
8	28,6	Pendaison
9	3,7	Suicide
10	48,4	Homicide
11	44,1	Intoxication médicamenteuse
12	17,9	Intoxication médicamenteuse
13	30,0	Asphyxie
14	10,5	Noyade
15	11,6	Décès naturel
16	22,1	Décès naturel
17	29,7	Intoxication médicamenteuse
18	27,8	Noyade
19	7,7	Asphyxie
20	22,2	Tué par un train
21	4,1	Décès naturel
22	0,7	Décès naturel
23	12,8	Homicide
24	3,2	Intoxication au CO
25	8,0	Homicide
26*	409	Alcoolisme chronique
27	14,2	Décès naturel
28	6,7	Overdose par cocaïne
29	7,2	Overdose par cocaïne
30	11,9	Asphyxie
31*	55,5	Accident de la voie publique
32	34,5	Décès naturel
33*	85,4	Intoxication par carbamazépine
34	42,9	Saut dans le vide
35	2,0	Noyade
36	1,2	Homicide
37	1,0	Overdose par héroïne
38*	55,3	Homicide
39*	75,4	Chute
40	17,8	Homicide
41	13,5	Incendie
42*	67,5	Epilepsie
43*	89,6	Noyade
44	5,8	Décès naturel
45	3,8	Homicide
46	38,4	Décès naturel
47	13,9	Noyade
48	24,1	Accident de la voie publique
49	31,6	Pendaison
50	4,9	Décès naturel
51	48,5	Décès naturel
52	6,5	Décès naturel
53*	54,6	Intoxication médicamenteuse
54*	93,6	Intoxication médicamenteuse
55	15,2	Overdose par héroïne
56*	50,8	Décès naturel
57	18,5	Homicide
58	5,9	Accident de la voie publique
59	10,5	Accident de la voie publique
60	10,2	Intoxication médicamenteuse
61	9,6	Overdose par héroïne
62	135	Noyade
63*	262	Noyade
64	16,7	Homicide
65	19,3	Décès naturel
66	46,9	Intoxication par méthadone
67	9,8	Overdose par héroïne
68*	56,3	Incendie
69	4,4	Noyade
70	22,3	Accident de la voie publique
71	42,6	Intoxication médicamenteuse
72*	173,9	Overdose par héroïne
73*	149,8	Décès naturel

* : cas où des analyses complémentaires ont été effectuées sur d'autres échantillons

moment du recueil de l'échantillon sanguin (moment de la levée de corps ou de l'autopsie) et non pas du délai entre le moment du prélèvement et l'analyse, comme le démontrent les résultats du Tableau V. En effet, dans un cas d'accident de la voie publique, le corps d'un homme de 37 ans a été déposé à la morgue de l'IML, dans les 2 heures qui ont suivi son décès. Nous avons prélevé 0,5 ml de sang périphérique à des temps variables pendant 72 heures, directement sur le cadavre et la concentration de GHB a régulièrement augmenté dans le temps. Au contraire, 2 échantillons prélevés et congelés immédiatement, puis analysés 2 et 8 semaines plus tard n'ont pas montré d'élévation significative des concentrations.

Enfin, des investigations complémentaires sont en cours pour évaluer l'intérêt du rapport isotopique du carbone $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$, tout comme cela est utilisé dans le dopage pour discriminer un usage exogène de testostérone. Les premiers résultats semblent indiquer un $\delta^{13}\text{C}$ de l'ordre de -50 ‰ à -40 ‰ pour le GHB retrouvé dans la rue (comme stupéfiant), qui devrait être suffisant face à un $\delta^{13}\text{C}$ attendu d'environ -20 ‰ pour le GHB endogène.

Conclusion

Ces résultats démontrent que la mesure isolée d'une concentration sanguine post-mortem de GHB supérieure à 50 mg/l ne permet pas à elle seule de conclure à une exposition. Il convient de doser simultanément le GHB dans le sang fémoral et l'humeur vitrée, tout en conservant pour ces prélèvements un seuil de positivité à 50 mg/l. Il semble que le délai entre le décès et le moment du recueil du prélèvement soit déterminant. Il convient donc que cette période soit la plus courte possible.

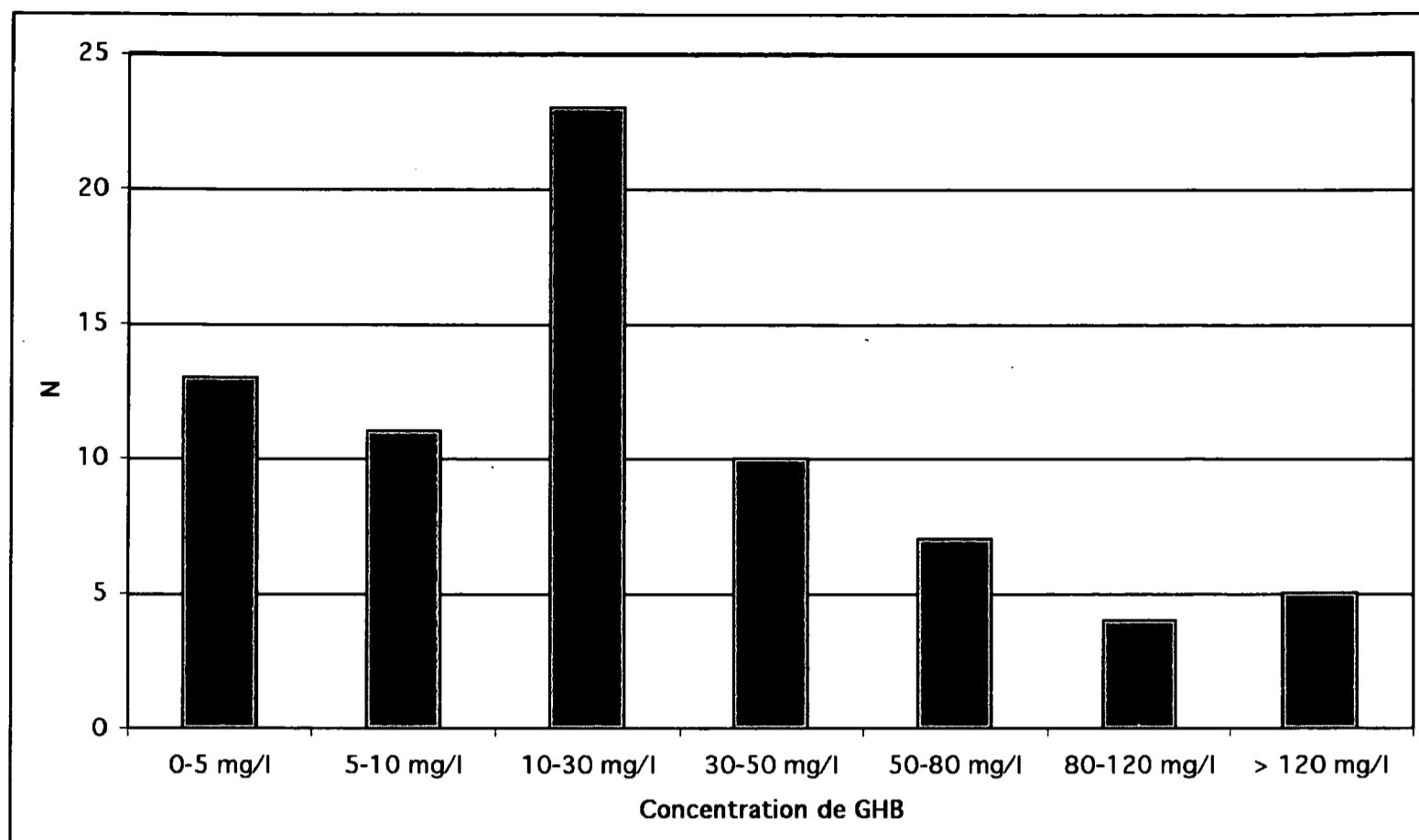


Figure 1 : Distribution du GHB dans le sang cardiaque.

Tableau II : Concordances des concentrations de GHB dans le sang cardiaque et la sang fémoral.

Cas	Sang cardiaque (mg/l)	Sang fémoral (mg/l)
1	409	16,8
2	54,6	44,1
3	96,6	17,1
4	50,8	39,7
5	56,3	34,3
6	149,8	1,6
Moyenne	136,2	25,6

Tableau III : Concordances des concentrations de GHB dans le sang cardiaque et la bile.

Cas	Sang cardiaque (mg/l)	Bile (mg/l)
1	409,0	238
2	223,6	35,5
3	95,0	104,9
4	85,4	43,3
5	55,3	6,1
6	93,6	25,7
7	262,0	152,0
8	173,9	12,0
9	149,8	10,8
Moyenne	172,0	69,8

Tableau IV : Concordances des concentrations de GHB dans le sang cardiaque et l'humeur vitrée.

Cas	Sang cardiaque (mg/l)	Humeur vitrée (mg/l)
1	409,0	3,9
2	54,6	11,6
3	55,5	11,5
4	50,8	10,8
5	75,4	21,4
6	93,6	14,5
7	149,8	5,1
Moyenne	126,8	11,3

Tableau V : Évolution des concentrations dans le sang de GHB en fonction du temps.

Moment du prélèvement	Concentration en GHB
T + 3 heures	3,5 mg/l
T + 24 heures	9,2 mg/l
T + 48 heures	17,8 mg/l
T + 72 heures	22,9 mg/l
Congélation*, T + 2 semaines	3,8 mg/l
Congélation*, T + 8 semaines	4,1 mg/l

Cas d'un homme de 37 ans, décédé lors d'un accident de la voie publique et dont le corps a été déposé à l'IML 2 heures après son décès (T + 2 heures). Prélèvement *in corpore* de sang périphérique à des temps variables.

* congélation à T + 3 heures de 2 aliquotes pour analyse ultérieure à T + 2 semaines et à T + 8 semaines.

Références

1. Deveaux M. L'acide γ -hydroxybutyrique (GHB) : un vieux produit, de nouveaux problèmes. *J. Anal. Toxicol.* 2002 ; 14 : 417-23.
2. Baselt R.C. Gamma-hydroxybutyrate. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 6th edition. Foster City, CA, Chemical Toxicology Institute, 2002 : 472-5.
3. Fieler E.L., Coleman D.E., Baselt R.C. Gamma-hydroxybutyrate concentrations in pre- and postmortem blood and urine. *Clin. Chem.* 1998 ; 44 : 692.
4. Stephens B.G., Coleman D.E., Baselt R.C. In vitro stability of endogenous gamma-hydroxybutyrate in postmortem blood. *J. Forensic Sci.* 1999 ; 44 : 231.
5. Elliott S. The presence of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in postmortem biological fluids. *J. Anal. Toxicol.* 2001 ; 25 : 152.
6. Kintz P. Difficultés analytiques et d'interprétation dans les expertises toxicologiques liées à la présence de GHB. *J. Med. Legal Droit Med.* 2002 ; 45 : 293-7.
7. Villain M., Cirimele V., Ludes B., Kintz P. Ultra-rapid procedure to test for gamma-hydroxybutyric acid in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2003 ; 792 : 83-7.
8. Marinetti L.J., Isenschmid D.S., Hepler B.R., Schmidt C.J., Somerset S., Kanlun S. Two gamma-hydroxybutyric acid (GHB) fatalities. Proceedings of the Annual Meeting of the American Academy of Forensic Science, Reno, 2000, résumé K16.
9. Kalasinsky K.S., Dixon M.M., Schmunk G.A., Kish S.J. Blood, brain, and hair GHB concentrations following fatal ingestion. *J. Forensic Sci.* 2001 ; 46 : 728-730.
10. Win B.H., Baselt R.C. Apparent suicide with Renewtrient. *Clin. Tox.* 2000 ; 38 : 809.
11. Elliott S.P. Further evidence for the presence of GHB in postmortem biological fluid: implications for the interpretation of findings. *J. Anal. Toxicol.* 2004 ; 28 : 20-6.
12. Ferrara S.D., Tedeschi L., Frison G., Rossi A. Fatality due to gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and heroin intoxication. *J. Forensic Sci.* 1995 ; 40 : 501-4.
13. Elliott S., Lowe P., Symonds A. The possible influence of micro-organisms and putrefaction in the production of GHB in post-mortem biological fluid. *Forensic Sci. Int.* 2004 ; 139 : 183-90.