

Article court

Distribution tissulaire *post-mortem* du méprobamate : à propos de 8 cas

Guillaume Hoizey^{1,2,*}, Claire Gozalo¹, Frédéric Canas², Paul Fornes², Laurent Binet¹, Aurélie Thomas¹, Olivier Oget¹, Hervé Millart¹, Denis Lamiable^{1,2}

¹ Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire de Reims, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 Reims Cedex, France

² Fédération Médico-Judiciaire du Centre Hospitalier Universitaire de Reims, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 Reims Cedex, France

Résumé – Objectif : Décrire la distribution du méprobamate dans différents tissus et fluides biologiques collectés lors de l'autopsie concernant huit cas de décès pour lesquels le méprobamate a été identifié dans le sang périphérique.

Méthodes : Les prélèvements autopsiques disponibles étaient le plus souvent le sang périphérique, le sang cardiaque, l'humeur vitrée, la bile, le foie, le rein, le poumon, le coeur et le cerveau. Les échantillons (fluides et homogénats tissulaires) étaient analysés par LC-MSⁿ à trappe d'ions, après extraction liquide-liquide en présence de carisoprodol (étalon interne). **Résultats :** Les concentrations de méprobamate dans le sang périphérique variaient de 9 à 160 mg/L. Les coefficients de distribution *post-mortem* du méprobamate, exprimés par le rapport [concentration dans le tissu (mg/kg) ou fluide d'intérêt (mg/L)]/[concentration dans le sang périphérique (mg/L)], étaient de 0,97 pour le sang cardiaque ($n = 8$), 0,83 pour l'humeur vitrée ($n = 6$), 1,16 pour la bile ($n = 8$), 2,63 pour le foie ($n = 6$), 1,82 pour le rein ($n = 8$), 1,81 pour le coeur ($n = 8$), 1,83 pour le cerveau ($n = 8$) et 1,74 pour le poumon ($n = 8$). Les coefficients de variation associés à ces moyennes étaient tous inférieurs à 25 %, excepté pour le foie (31 %). **Conclusion :** Avec des coefficients de distribution moyens proches de 1, le méprobamate ne semble pas s'accumuler dans l'humeur vitrée et la bile. Dans les autres tissus, ces coefficients varient de 1,7 à 2,6, objectivant ainsi une distribution tissulaire modérée, en accord avec le volume apparent de distribution peu élevé du méprobamate (0,7 L/kg). En dépit du nombre limité de cas étudiés, la variabilité inter-individuelle relativement peu importante de la distribution tissulaire de méprobamate pourrait théoriquement suggérer l'utilisation des concentrations tissulaires *post-mortem* en vue d'une estimation des concentrations dans le sang périphérique, lorsque cette matrice n'est pas disponible à l'autopsie. Pour être confirmés, ces résultats nécessitent d'être complétés dans une plus large étude.

Mots clés : Méprobamate, distribution tissulaire *post-mortem*

Abstract – Post-mortem distribution of meprobamate: study of 8 cases. Aim: To describe the distribution of meprobamate in various *post-mortem* fluids and tissues collected during autopsy from 8 fatalities that were reported positive for meprobamate in peripheral blood. **Methods:** When available, 9 specimen types collected during autopsy were analyzed for each case, including peripheral and cardiac blood, vitreous humor, bile, liver, kidney, lung, heart and brain. Meprobamate was extracted from all samples investigated (fluids and tissue homogenates) by a liquid-liquid extraction method, in presence of carisoprodol (internal standard). Analysis was then performed on all fluids and tissues by ion-trap LC-MSⁿ. **Results:** Peripheral blood concentrations of meprobamate ranged from 9 to 160 mg/L. The *post-mortem* distribution coefficients for meprobamate, expressed as [specimen (mg/L) or (mg/kg)]/[peripheral blood (mg/L)] ratio were 0.97 for cardiac blood ($n = 8$), 0.83 for vitreous humor ($n = 6$), 1.16 for bile ($n = 8$), 2.63 for liver ($n = 6$), 1.82 for kidney ($n = 8$), 1.81 for heart ($n = 8$), 1.83 for brain ($n = 8$) and 1.74 for lung ($n = 8$). Coefficient of variation values associated with those means were less than 25%, except for the liver (31%). **Conclusion:** The distribution coefficients determined in bile and vitreous humor suggest that meprobamate does not accumulate in those biological fluids. Other tissues concentrations were found higher than peripheral blood concentrations as showed by distribution coefficients ranging from 1.7 to 2.6, and are consistent with the known moderate volume of distribution of this compound (*i.e.* 0.7 L/kg). Despite our limited number of cases, the relatively small coefficient of variation values associated with these distribution coefficients suggest that these specimens may be used with extreme caution to obtain an approximate peripheral blood meprobamate concentration ranging from therapeutic to toxic levels. Admittedly, a study involving a greater number of samples from a larger pool of cases needs to be completed in order to more definitely verify these results.

Key words: Meprobamate, *post-mortem* toxicology, tissue distribution

Reçu le 14 février 2008, accepté après modifications le 29 février 2008

Publication en ligne le 6 juin 2008

* Correspondance : Guillaume Hoizey, Tél. (33) 3 26 78 75 30, Fax (33) 3 26 78 84 56, ghoizey@chu-reims.fr

1 Introduction

Le méprobamate, commercialisé en France dans les années 1960, est aujourd'hui encore présent dans plusieurs spécialités pharmaceutiques telles que l'Equanil® ou la Mépronizine® (en association avec l'acéprométazine). Prescrite pour ses propriétés anxiolytiques et sédatives, ses indications thérapeutiques sont principalement l'aide au sevrage chez le sujet alcoolodépendant ou la prise en charge des insomnies. Bien que ce composé d'utilisation répandue fasse l'objet de nombreux cas d'intoxications, volontaires ou non, parfois mortelles [1], force est de constater la quasi-absence de données relatives à sa distribution tissulaire *post-mortem*. La littérature scientifique rapporte pour l'essentiel : (1) une étude de Gaillard et coll. [2] concernant la détermination de concentrations sanguines *post-mortem* de méprobamate dans 19 cas d'intoxications mortelles ; (2) une étude rapportée par Felby et coll. [3] avec détermination des concentrations dans le sang et le foie dans 12 cas de décès imputés à une consommation massive de méprobamate ; (3) quelques cas d'overdoses intentionnelles avec étude des concentrations *post-mortem* dans plusieurs tissus autopsiques dont le cerveau et le cœur [4-6].

Dans ce contexte, et du fait que dans notre expérience cette molécule est encore régulièrement rencontrée lors d'expertises toxicologiques réalisées aux fins de recherche des causes de la mort, il nous a paru intéressant de déterminer les concentrations et d'évaluer la distribution du méprobamate dans plusieurs tissus et fluides biologiques collectés lors de l'autopsie concernant plusieurs cas de décès. Les matrices analysées dans cette étude sont le sang périphérique, le sang cardiaque, l'humeur vitrée, la bile, le foie, le rein, le cœur, le cerveau et le poumon.

2 Matériels et méthodes

2.1 Échantillons autopsiques étudiés

Sur 98 autopsies médico-légales pratiquées sur une période de 24 mois (années 2005 à 2007) au Centre Hospitalier Universitaire de Reims, les expertises toxicologiques réalisées aux fins de recherche des causes de décès se sont révélées « positives » pour le méprobamate dans 8 cas. Pour chacun de ces cas, plusieurs prélèvements autopsiques étaient disponibles : sang périphérique, sang cardiaque, urine, contenu gastrique, humeur vitrée ($n = 6$), bile ($n = 6$), foie ($n = 6$), rein ($n = 6$), poumon ($n = 6$), cœur ($n = 6$), cerveau ($n = 6$). L'ensemble de ces échantillons était congelé immédiatement après l'autopsie, et ce jusqu'au moment de l'analyse.

2.2 Analyses toxicologiques

Chacun des 8 cas précités a fait l'objet d'une expertise toxicologique réalisée selon les procédures habituelles du laboratoire. Brièvement, la recherche des alcools (*éthanol, méthanol et isopropanol*) a été effectuée dans le sang périphérique par GC-FID. La recherche des stupéfiants (*opiacés, cannabinoïdes, cocaïne et amphétamines*) a été réalisée par méthode

immunoenzymatique dans les urines, suivie par une recherche dans le sang périphérique par GC-MS.

Une recherche élargie a été effectuée sur le sang périphérique, les urines et le contenu gastrique par GC-MS et LC-DAD, complétée par une recherche à large spectre au moyen de la LC-MSⁿ à trappe d'ions utilisée dans un mode adapté au dépistage large de xénobiotiques : l'exclusion dynamique d'ions. Les échantillons biologiques ont été analysés après extraction liquide-liquide en milieu alcalin et acide. En cas de recherche positive, la quantification des molécules identifiées était réalisée par LC-MSⁿ à trappe d'ions.

2.3 Dosage spécifique du méprobamate par LC-MS

2.3.1 Réactifs

Le méprobamate et le carisoprodol ont été achetés chez SIGMA (France). L'ensemble des solvants organiques et réactifs utilisés sont de qualité analytique. L'acétonitrile et l'éther proviennent de la société SDS (Peypin, France) ; le méthanol et l'acide formique ont été obtenus chez Merck (ADarmstadt, Allemagne). L'eau purifiée est produite par un système Waters-MilliQ® purification system (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France).

2.3.2 Extraction des échantillons

Les échantillons sanguins (100 μ L), d'urine (100 μ L), d'humeur vitrée (100 μ L), de bile (100 μ L) et les extraits tissulaires (100 μ L d'un homogénat obtenu à partir du broyage au Potter d'environ 100 mg de tissu frais exactement pesé, placé dans 1 mL de solution saline) étaient extraits en milieu basique par 1 mL d'éther après ajout de 10 μ L d'une solution de carisoprodol (200 mg/L dans le méthanol), utilisé comme étalon interne, et 100 μ L de carbonate de sodium à 20 %. Après agitation au vortex durant 1 min et centrifugation à 3000 g pendant 5 min., la phase organique était transférée dans un tube conique puis évaporée à sec sous un courant d'azote à 40 °C. L'extrait sec était repris par 100 μ L du mélange acide formique 0,1 % / acétonitrile (40/60 v/v), et 20 μ L d'échantillon étaient injectés dans le système chromatographique.

2.3.3 Instrumentation et conditions d'analyse

Le système utilisé est constitué d'un chromatographe en phase liquide Surveyor® LC system couplé à un détecteur de masse à trappe d'ions LCQ Advantage® (ThermoElectron, Les Ulis, France). L'ensemble est piloté par le logiciel dédié Xcalibur®. La séparation chromatographique des analytes est effectuée au moyen d'une colonne Hypurity® C18 (150 \times 2,1 mm d.i. ; 5- μ m ; ThermoHypersil-Keystone, Les Ulis, France) maintenue à une température de 30 °C. La phase mobile, constituée du mélange acide formique 0,1 % / acétonitrile (40/60 v/v), est délivrée à un débit de 0,3 mL/min en mode isocratique. L'interface d'ionisation est de type électrospray (ESI) utilisée en mode positif. Les principaux paramètres du détecteur sont : tension entre l'aiguille de nébulisation et le corps

Tableau I. Temps de rétention (Tr) et fragments ioniques (ions parents et fils) du méprobamate et du carisoprodol, utilisé comme étalon interne. L'ion fils souligné est employé pour la quantification.

Molécule	Tr (min)	Ion parent (m/z)	Ions fils (m/z)* (Spectre complet MS/MS)
Méprobamate	1,75	219 (M+H) ⁺	<u>158</u> (100)
Carisoprodol	1,65	261 (M+H) ⁺	<u>176</u> (100), 158(22), 200(11)

*Les valeurs entre parenthèses correspondent aux intensités relatives.

de la source : 4 kV ; température de source et de désolvation de l'azote : respectivement 200 °C et 300 °C ; tension de l'électromultiplicateur : 400 V. L'hélium ultrapur (99,995 %) est introduit dans la trappe en tant que gaz de collision (pression : $5 \cdot 10^{-3}$ Torr). Les données sont enregistrées en mode MS² et acquisition de spectres complets (Mode *Full scan MS/MS*) avec un balayage de m/z 120 à m/z 600. Les spectres MS/MS sont obtenus après collision de l'ion parent (ion pseudomoléculaire protoné [M+H]⁺) par l'hélium [énergie de collision : 50 % (unité arbitraire)]. Les ions parents et fils (correspondant au spectre « complet » MS/MS), et les temps de rétention sont présentés dans le tableau I.

Dans ces conditions, la limite de quantification pour le méprobamate a pu être déterminée à 0,5 mg/L dans le sang total. Les courbes de calibrations (5 points de gamme) étaient linéaires jusqu'à la concentration de 300 mg/L. Bien que la validation complète de la méthode de dosage du méprobamate par LC-MSⁿ n'ait pas été réalisée selon les critères habituels, une simple mesure de la fidélité à partir d'échantillons sanguins ($n = 6$) surchargés aux concentrations de 1, 10 et 100 mg/L de méprobamate révélait des coefficients de variations inférieurs à 10 %. De plus, il convient de noter que le laboratoire participe au contrôle externe de qualité « méprobamate » organisé par la Société Française de Toxicologie Analytique, et que les contrôles de qualité internes (3 niveaux : 50, 100 et 150 mg/L) utilisés en routine au laboratoire pour le dosage du méprobamate dans le sang par GC-FID [7] montraient des résultats tout à fait comparables à ceux obtenus par LC-MSⁿ dans cette même matrice. Ce dosage n'étant pas systématiquement appliqué en « routine » aux tissus autopsiques, sa validation dans les matrices d'intérêt était délicate à mener pour les seuls cas présentés ici, et n'a donc pas été réalisée. Sur ce point, Peters et coll. soulignait dans un article récent qu'une validation complète des méthodes employées n'était pas nécessairement indispensable pour la publication d'observations de cas médico-légaux [8]. De façon préliminaire, une simple détermination de la fidélité réalisée à partir d'homogénats de foie ($n = 5$) dopés par le méprobamate (concentration finale : 50 mg par kg de tissu) montrait une répétabilité inférieure à 15 %.

2.3.4 Évaluation de la distribution tissulaire

Pour chaque fluide ou tissu analysé, un coefficient de distribution a été calculé selon la relation suivante :

$$\text{Coefficient de distribution dans le tissu ou fluide X} = \frac{\text{concentration [mg/kg ou mg/L] mesurée dans le tissu ou fluide X}}{\text{concentration mesurée dans le sang périphérique [mg/L]}}$$

Afin d'apprécier la variabilité interindividuelle du coefficient suscité, un coefficient de variation (CV exprimé en pourcentage) y était associé.

3 Résultats et discussion

Les recherches à larges spectres pratiquées initialement dans le sang périphérique, l'urine et le contenu gastrique ont révélées la présence de méprobamate, dont les concentrations mesurées dans le sang périphérique variaient, selon les cas, de concentrations compatibles avec un usage thérapeutique (10–30 mg/L) [9] à des concentrations décrites comme potentiellement toxiques (> 50 mg/L) voire mortelles (tableau II) [1,2]. Parmi les 8 cas identifiés sur les 98 analysés, 3 présentaient des concentrations importantes de méprobamate dans le sang périphérique, renforçant ainsi l'hypothèse de mort toxique émise lors de l'enquête judiciaire et de l'autopsie. Ces concentrations variaient de 98 à 160 mg/L.

Les résultats des dosages de méprobamate dans les différents fluides et tissus autopsiques sont présentés dans le tableau II. Afin de mieux caractériser le devenir *post-mortem* de cette molécule, il nous a paru intéressant d'employer, pour chaque fluide ou tissu, un coefficient de distribution, calculé selon la formule décrite ci-dessus. Les résultats sont présentés dans le tableau III. Il convient de noter que les données relatives au contenu gastrique et à l'urine ont été volontairement supprimées, car non informatives.

Le délai séparant le décès de la réalisation des prélèvements autopsiques était compris, selon les cas, entre 3 et 6 jours. Dans ce contexte, avec un coefficient de distribution moyen de 0,97 entre le sang cardiaque et le sang périphérique, le méprobamate ne semble pas faire l'objet de manière significative, de phénomènes de redistribution *post-mortem*. Ce résultat est en accord avec la littérature, Prouty et Anderson ayant montré un rapport moyen des concentrations cardiaques sur les concentrations périphériques de l'ordre de 1,1 [10].

Dans cette série, il apparaît que le méprobamate ne semble pas s'accumuler dans l'humeur vitrée ou la bile, comme en témoigne des coefficients de distribution moyens proches de l'unité pour ces deux matrices. Dans les autres tissus étudiés, les concentrations de méprobamate étaient systématiquement retrouvées supérieures à celles mesurées dans le sang périphérique, avec des coefficients de distribution moyens variant de 1,7 à 2,6 selon le tissu considéré. Ce résultat, indicatif d'une distribution tissulaire modérée du méprobamate, est en accord avec son volume apparent de distribution peu élevé de 0,7 L/kg, et un coefficient de partage octanol/eau, objectivé par un Log P 0,7 [11].

Tableau II. Concentrations de méprobamate mesurées dans les fluides et tissus autopsiques concernant 8 décès.

Cas n°	Sang périphérique [mg/L]	Sang cardiaque [mg/L]	Urine [mg/L]	Contenu gastrique [mg/L]	Humeur vitrée [mg/L]	Bile [mg/L]	Foie [mg/kg]	Rein [mg/kg]	Cœur [mg/kg]	Cerveau [mg/kg]	Poumon [mg/kg]
1	134	121	162	1190	93	181	480	210	170	160	302
2	98	126	140	660	68	126	ND	ND	ND	ND	ND
3	160	165	90	15523	136	242	383	268	383	282	306
4	51,6	40,7	41	82,6	ND	36,4	88	77	72	94	82
5	32,3	34	70	128	28,3	36,2	56	55,8	62	54,6	48,4
6	8,8	8,6	21,8	8,2	10	12,1	26,5	21	18,6	20	16,9
7	26,4	24,1	122	26	19,8	25	87,8	54,8	46,2	58,8	33,8
8	53,3	42,8	268	1100	ND	53,8	ND	ND	ND	ND	ND

ND : Non disponible.

Tableau III. Coefficients de distribution tissulaire *post-mortem* du méprobamate estimés dans 8 cas de décès.

°	Sang cardiaque SP	Humeur vitrée SP	Bile SP	Foie SP	Rein SP	Cœur SP	Cerveau SP	Poumon SP
<i>n</i>	8	6	8	6	6	6	6	6
Moyenne	0,97	0,83	1,16	2,63	1,82	1,81	1,83	1,74
± écart-type	± 0,16	± 0,17	± 0,27	± 0,81	± 0,34	± 0,43	± 0,40	± 0,35
CV (%)	16	20	23	31	19	24	22	20

SP : Sang périphérique.

CV : coefficient de variation.

En ne prenant en compte que les cas pour lesquels une ingestion massive de méprobamate est très probablement à l'origine du décès (cas n°1 à 3 du tableau II), les concentrations mesurées dans les tissus prélevés à l'autopsie (principalement : foie, rein et cerveau) sont du même ordre de grandeur que celles rapportées dans les rares études de cas de décès imputés à une surdose par cette molécule [3–5].

Le résultat le plus intéressant est très certainement la variabilité interindividuelle relativement faible de la distribution tissulaire du méprobamate déterminée dans cette étude (tableau III). En effet, excepté pour le foie avec un CV de l'ordre de 30 %, les autres tissus et fluides analysés présentaient des CV inférieurs à 25 %. Ce résultat est surprenant du fait ; (1) de l'effectif réduit de cette étude ; (2) des concentrations de méprobamate mesurées dans le sang périphérique très disparates, variant selon le cas considéré, de concentrations décrites comme thérapeutiques à des concentrations compatibles avec un décès.

Malgré un nombre limité de cas présentés, ces données préliminaires pourraient théoriquement suggérer l'utilisation possible, mais prudente – en cas de non disponibilité de prélèvement sanguin à l'autopsie – des concentrations tissulaires *post-mortem* de méprobamate en vue d'une estimation des concentrations dans le sang périphérique. Une étude à plus grande échelle est à l'évidence nécessaire pour compléter ces données.

4 Conclusion

Dans cette étude, nous avons évalué la distribution *post-mortem* du méprobamate dans plusieurs tissus et fluides biolo-

giques collectés lors de l'autopsie concernant 8 cas de décès, pour lesquels des concentrations de méprobamate mesurées dans le sang périphérique variaient de concentrations compatibles avec un usage thérapeutique à des concentrations potentiellement mortelles. Les résultats obtenus sont en accord avec les données, plutôt rares, de la littérature et objectivent une accumulation faible à modérée de ce composé dans les tissus et fluides étudiés. L'absence de phénomène significatif de redistribution *post-mortem* déjà établie par le passé, est corroborée. Une estimation de la distribution tissulaire révèle de manière inattendue une variabilité interindividuelle relativement peu importante de la diffusion du méprobamate à partir du sang périphérique vers les tissus et fluides analysés. Si le nombre de cas étudiés ne permet raisonnablement pas d'envisager une approximation des concentrations dans le sang périphérique à partir des concentrations tissulaires (*par exemple, en cas de non disponibilité de prélèvement sanguin*), la poursuite de cette étude sur une population plus importante demeure essentielle. Ce travail souligne à nouveau toute l'importance de l'acquisition de ces données de concentrations *post-mortem* pour une meilleure compréhension du devenir des xénobiotiques après la mort.

Références

- Blanc I, Tichadou L, Bourdon JH, De Haro L, HaYek M, Arditti J. Intoxications volontaires par le méprobamate. Suivi clinique et analytique des observations colligées au centre antipoison de Marseille au cours du 1^{er} semestre 2006. *Ann Toxicol Anal*. 2007; 19(2): 151-152.

2. Gaillard Y, Billault F, Pépin G. Meprobamate overdosage: a continuing problem. Sensitive GC-MS quantitation after solid phase extraction in 19 fatal cases. *Forensic Sci Int.* 1997; 86: 173-180.
3. Felby S. Concentrations of meprobamate in the blood and liver following fatal meprobamate poisoning. *Acta Pharmacol Toxicol.* 1970; 28: 334-337.
4. Jenis EH, Payne RJ, Goldbaum LR. Acute meprobamate poisoning. *JAMA.* 1969; 207: 361-362.
5. Kintz P, Tracqui A, Mangin P, Lugnier AAJ. Fatal meprobamate self-poisoning. *Am J Med Path.* 1988; 9: 139-140.
6. Kintz P, Godelar B, Mangin P. A fatality involving meprobamate. Case note archive from bulletin of The International Association of Forensic Toxicologists. 1993; 23(3). Document consulté sur le site <http://www.tiaft.org> le 05 février 2008.
7. Trenque T, Lamiable D, Millart H, Vistelle R, Choisy H. Gas chromatographic determination of meprobamate in human plasma. *J Chromatogr.* 1993; 615: 343-346.
8. Peters FT, Drummer OF, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int.* 2007; 165: 216-224.
9. Reference blood level list of therapeutic and toxic substances. Document consulté sur le site http://www.tiaft.org/tmembers/ttv/ttv_mo.php le 15 février 2007.
10. Prouty RW, Anderson WH. The forensic science implications of site and temporal influences on post-mortem blood-drug concentrations. *J Forensic Sci.* 1990; 35: 243-270.
11. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. *Clarkes's Analysis of Drugs and Poisons. Third Edition* : Pharmaceutical Press, 2004.