

Revue générale

Cotinine en pédiatrie et en santé au travail

Cotinine in pediatry and at the workplace

Guillaume Hoizey^{1*}, Laurence Labat²

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

² Laboratoire de Toxicologie et Génopathies, CHRU de Lille, Av. du Pr. J. Leclercq, 59037 Lille Cedex, France

Résumé – L'intérêt du suivi d'une exposition au tabac par la mesure de la concentration de la cotinine dans les milieux biologiques est connu depuis longtemps. Métabolite principal de la nicotine, avec une demi-vie d'élimination longue, le suivi de la cotinine permet l'évaluation de l'imprégnation tabagique dans les cas particuliers du tabagisme passif chez l'enfant et chez l'adulte, dans les lieux publics ou le milieu professionnel. Le suivi de ce marqueur s'avère également particulièrement intéressant en santé au travail pour la surveillance d'expositions à certains solvants organiques (benzène, toluène, éthylbenzène, xylène, hydrocarbures aromatiques polycycliques...) dont les concentrations ou celles de leurs métabolites sont influencées par la consommation de tabac. L'urine demeure la matrice biologique de choix pour évaluer le degré d'exposition. Un seuil de positivité mesuré à 6 ng/mL dans l'urine permet de distinguer une population pédiatrique exposée ou non. D'autres matrices comme les cheveux ou la salive apparaissent depuis plusieurs années comme utiles dans le cadre du dépistage de l'exposition au tabagisme environnemental. Le dosage de la cotinine dans les cheveux montre une nouvelle fois l'intérêt rétrospectif de l'utilisation de ce type de matrice. La salive, avec un intérêt moindre chez le nouveau né, a été utilisée dans plusieurs études pour distinguer des populations exposées et non exposées avec un seuil de positivité fixé à 1 ng/mL. Deux types de méthodes sont principalement utilisées pour le dosage de la cotinine : les méthodes chromatographiques HPLC-DAD, HPLC-MS, GC-MS et les méthodes immunologiques (RIA ou immunoenzymatiques par ELISA). Des études récentes montrent l'évolution des techniques ELISA. Elles peuvent par exemple être utilisées dans la salive avec un seuil de positivité de la cotinine à 1 ng/mL permettant de définir une population imprégnée. Actuellement, nombreuses sont les études qui utilisent avec succès les techniques immunologiques en pédiatrie et en santé au travail. Les avantages apparaissent alors multiples notamment en termes de coût et de rapidité. Elles sont suffisamment sensibles et peuvent être utilisées pour différents types de matrices biologiques.

Mots clés : Cotinine, pédiatrie, toxicologie professionnelle

Abstract – It is well known today that tobacco exposure can be assessed by the measurement of several markers in biological fluids. Cotinine, a nicotine metabolite with a longer biological half-life than nicotine, is probably the most reliable index that can be used to measure exposure to environmental tobacco smoke in adults in the context of an exposure at workplace, and also in children. Additionally, cotinine appears to be a very useful marker to investigate the exposure of workers to organic solvents (benzene, toluene, ethylbenzene, xylene, polycyclic aromatic hydrocarbons...) given that their concentrations and/or those of their metabolites can be influenced by tobacco smoke. Urine remains an accurate biological specimen to assess the level of tobacco exposure of individuals. A urinary cotinine level of 6 ng/mL (cut-off) is a precise and sensitive test in discerning exposed children to tobacco smoke from non-exposed children. Other alternative biological specimens such as hair or saliva can also be used for this purpose. Hair cotinine has proved to be a reliable tool for evaluating the level of environmental tobacco smoke in a pediatric population. Saliva has been successfully applied in several studies amongst primary school children or in workers with a cut-off value for cotinine of 1 ng/mL. Various assays are presently available for the measurement of cotinine in biological specimens. Most of them are based on chromatographic (HPLC-UV, HPLC-MS, GC-MS) or immunoassay methods (RIA, EIA). Recent studies showed that ELISA can be used to measure cotinine in saliva at a level as low as 1 ng/mL, this concentration being the cut-off allowing to distinguish individuals exposed to environmental tobacco smoke from individuals not

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

exposed. Currently, many studies dealing with tobacco smoke exposure in children or in adults in the workplace use immunoassays with success to measure cotinine in various biological specimens. Advantages are mainly the short working time and the cost.

Key words: Cotinine, pediatry, workplace toxicology

Reçu le 16 janvier 2009, accepté après modifications le 30 mars 2009

Publication en ligne le 5 mai 2009

1 Introduction

Bien que les conséquences du tabagisme actif soient connues depuis longtemps chez l'adulte, il faut attendre le début des années 1970 pour voir apparaître la notion de tabagisme passif chez l'enfant et de risques encourus par l'entourage de fumeurs en milieu professionnel [1]. L'intoxication tabagique, quel qu'en soit l'origine, peut être évaluée par la mesure d'un certain nombre de marqueurs dans les milieux biologiques. Parmi ceux-ci, on peut distinguer des marqueurs spécifiques de la consommation de tabac (nicotine, cotinine) et des marqueurs non spécifiques pouvant avoir d'autres origines que la fumée de cigarette (thiocyanates, monoxyde de carbone) [2]. En milieu professionnel ou en pédiatrie, la cotinine est aujourd'hui très largement utilisée comme marqueur biologique permettant de diagnostiquer et/ou de suivre les sujets confrontés à une exposition tabagique.

À cet effet, plusieurs matrices biologiques peuvent être employées, comme le sang, les cheveux ou la salive, l'urine demeurant le milieu de choix dans le cadre du dépistage de l'exposition au tabagisme. Les méthodes analytiques utiles au dosage de ce marqueur sont variées et font appel pour l'essentiel à des méthodes séparatives et à des méthodes immunologiques.

Cet article a pour objectif de préciser la place de la cotinine et des méthodes permettant son dosage dans les matrices biologiques, pour évaluer le degré d'imprégnation tabagique chez les individus. Le cas particulier du tabagisme passif chez l'enfant et celui de l'exposition au tabac en milieu professionnel font l'objet des paragraphes suivants.

2 Tabagisme passif chez l'enfant

Le tabagisme passif est défini comme l'exposition involontaire d'un sujet non fumeur à la fumée de tabac dégagée dans son voisinage par un ou plusieurs fumeurs [3]. Il est clairement reconnu aujourd'hui que le fœtus, le nourrisson et le jeune enfant sont particulièrement exposés à ce risque, lorsque l'un des parents ou les deux sont fumeurs. Les conséquences d'une telle exposition chez les individus jeunes et *a fortiori* sur le fœtus pendant la grossesse sont nombreuses et souvent à l'origine de graves perturbations et complications. Nous ne résumerons dans ce chapitre, que les éléments essentiels.

2.1 Tabagisme passif pendant la grossesse et à la naissance : quelles conséquences ?

Le tabagisme passif augmente la mortalité fœtale et néonatale de près de 10 %, principalement par la survenue plus

fréquente d'hémorragies placentaires et par rupture prématurée des membranes [4]. Chez les fumeuses, les avortements spontanés seraient augmentés de 80 % [5], et l'accroissement du taux de prématurité serait de l'ordre de 10 %, ce dernier étant relié au nombre de cigarettes fumées [6]. De même, le tabagisme passif est responsable d'un retard de croissance utérine ; la diminution du poids à la naissance serait en moyenne de 200 g et proportionnelle à l'importance de la consommation de tabac [3].

L'existence de malformations spécifiquement reliées au tabagisme pendant la grossesse demeure aujourd'hui encore largement controversée. Toutefois, il ressort d'une méta-analyse portant sur plus de 2 millions de naissances (11 études), que la survenue de fentes palatines serait augmentée de 30 % chez les enfants de mères fumeuses [7].

À la naissance, chez les nourrissons exposés *in utero* au tabagisme passif, il existe une altération précoce des paramètres respiratoires [8], caractérisée notamment par une réduction du calibre des voies aériennes et une altération des propriétés mécaniques du système respiratoire. Or, on sait aujourd'hui que les nourrissons qui développent des bronchiolites durant la première année de vie sont ceux qui ont, à la naissance, des voies aériennes de petit calibre [3].

2.2 Tabagisme chez le nourrisson et l'enfant : quelles conséquences ?

Il est clairement démontré aujourd'hui (méta-analyse retenant au total 32 publications) que l'exposition au tabagisme passif multiplie par deux le risque de mort subite inexplicée du nourrisson [9]. C'est ainsi que l'augmentation du risque chez le nourrisson exposé pendant et après la grossesse a été évalué à 108 % (IC95 % : 83 à 138 %) et si le nourrisson n'est exposé au tabac qu'après la naissance à 94 % (IC95 % : 55 à 143 %).

De la même façon, toutes les études épidémiologiques s'accordent pour montrer que le tabagisme facilite la survenue d'infections des voies aériennes supérieures et inférieures. Cette relation est dose-dépendante, et l'influence du tabagisme passif maternel est toujours prépondérante. Une méta-analyse portant sur 50 articles fait ressortir, pour l'enfant exposé au tabagisme maternel, une augmentation du risque de développer des épisodes de bronchites, de bronchiolites, et de pneumopathies de 72 % (IC95 % : 55 à 91 %) [10].

Au niveau de la sphère ORL, il est également établi que les otites moyennes aiguës sont plus fréquentes et d'une durée plus longue chez les enfants exposés. L'ablation des végétations adénoïdes serait par ailleurs quatre fois plus fréquente chez ces enfants [3].

En ce qui concerne l'asthme, toutes les études (études épidémiologiques et études prospectives) démontrent le lien fort de causalité entre l'apparition d'un asthme et l'exposition des enfants au tabagisme passif. Une méta-analyse (60 articles), portant sur des enfants d'âge scolaire exposés au tabagisme d'au moins l'un des parents, révèle que l'augmentation de la prévalence de l'asthme est de l'ordre de 21 % (IC95 % : 10 à 34 %). Cet effet est dose-dépendant, l'effet du tabagisme maternel est plus fort et l'effet est d'autant plus marqué que l'enfant est petit [11].

Concernant le risque de cancer, les études relatives aux relations entre exposition passive au tabagisme et survenue d'un cancer, montrent des résultats contradictoires. Ces études chez l'enfant sont toutefois peu nombreuses et soulignent le problème du délai écoulé entre l'exposition et le début de la pathologie [3]. Néanmoins, une étude a montré que 18 % environ des cancers du poumon chez les non-fumeurs seraient en lien avec une exposition passive durant l'enfance [12]. Une autre étude canadienne (étude cas/contrôle portant sur 114 femmes) montre que le risque de cancer du poumon est maximal pour une exposition avant l'âge de 7 ans [13]. À l'inverse, les résultats d'une méta-analyse n'objectivent pas de relation entre l'exposition au tabagisme passif pendant l'enfance et le cancer du poumon, mais montrent, en revanche, une relation entre cette exposition et l'ensemble des cancers de l'enfant, tumeurs du cerveau et lymphomes notamment [3].

Enfin, il est établi aujourd'hui que le tabagisme passif chez l'enfant peut aggraver certaines maladies respiratoires chroniques telles que la mucoviscidose [14].

Un dernier point concerne l'impact potentiel de l'exposition tabagique sur le comportement des enfants. À cet effet, une étude américaine portant sur une cohorte de 2256 enfant âgés de 4 à 11 ans, a montré une augmentation significative des troubles graves du comportement dans le groupe d'enfants exposés *in utero* [15].

En conséquence, du fait de ses nombreux effets délétères, dont certains sont gravissimes pour le nourrisson exposé *in utero* ou pour le jeune enfant, le tabagisme passif pendant l'enfance constitue un problème majeur et toujours actuel de santé publique.

3 Tabac en santé au travail et en environnement

Depuis les années 80, les conséquences de l'exposition environnementale au tabac sur l'augmentation du risque de cancer du poumon chez les non fumeurs ont été largement décrites. En 1994 aux États-Unis, l'Occupational Safety and Health Administration (OSHA) s'étant fixé comme objectif d'assurer à chaque travailleur un travail dans de bonnes conditions pour la santé, révèle que pour certains toxiques, l'exposition sur le lieu de travail est supérieure à celle observée au domicile. Cette constatation est faite notamment pour l'exposition à la fumée de tabac mise en évidence par des différences de concentrations en nicotine observées sur le lieu professionnel et au domicile [16]. Ainsi, des concentrations en nicotine inférieures à $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ sont mesurées dans des lieux professionnels où l'interdiction de fumer est établie alors que des concentrations plus élevées de 2 à $6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ dans certains bureaux,

et entre 3 et $8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ dans certains restaurants sont observées alors qu'il n'existe pas d'interdiction [16]. À côté de ces mesures sont opposées des concentrations de l'ordre de $3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ dans différents domiciles de fumeurs. D'une façon plus générale, les auteurs constatent que 30 % des personnes sont exposées au tabac sur leur lieu de travail et non à leur domicile.

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses études sont favorables à la restriction d'utilisation du tabac en milieu professionnel [17–20]. Larsson et coll. en 2008 décrivent les changements d'exposition de différents salariés travaillant dans des bars, restaurants et casinos en Suède depuis les interdictions de fumer mises en place sur les lieux de travail. Avant l'interdiction, 87 % des salariés étaient exposés à des concentrations supérieures à $0,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (seuil fixé d'apparition d'un risque). Actuellement, ce chiffre a baissé et 22 % des salariés sont encore exposés au tabac en milieu professionnel. Les auteurs constatent une diminution de la consommation de tabac sur le lieu de travail et une nette amélioration des symptômes respiratoires [19]. En Irlande, la mise en place de l'interdiction de fumer dans les lieux publics a exactement le même impact sur les salariés d'hôtels et de bars. Une étude comparative sur 35 salariés travaillant dans 15 hôtels et bars différents a été réalisée par mesure de la cotinine dans la salive et de la nicotine dans l'air avant et après l'interdiction. Elle montre une diminution de l'ordre de 70 % de la concentration de cotinine dans la salive avec des concentrations variant de 1,6 ng/mL à 0,5 ng/mL et une réduction de 83 % de la concentration de nicotine dans l'air [17]. Les publications sur les conséquences des interdictions dans les différents pays européens sont nombreuses et les conclusions de celles-ci sont toutes similaires.

Dans une toute autre application, l'intérêt du suivi du marqueur de la cotinine en santé au travail est reconnue dans le cadre de la surveillance d'expositions à certains solvants organiques dont les concentrations ou celles de leurs métabolites sont influencées par la consommation de tabac. Lin et coll. dans une étude récente étudient les relations entre les concentrations de composés organiques volatils comme le benzène, le chloroforme ou l'éthylbenzène dans l'air et dans le sang de 89 fumeurs et 265 non fumeurs dans le cadre de l'étude américaine NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey). Le statut tabagique des participants est évalué par la concentration urinaire en cotinine. Les auteurs montrent que les relations sang/air pour le benzène, le toluène, le xylène et l'éthylbenzène sont influencées par la consommation de tabac ou le tabagisme passif, différemment d'autres composés comme le chloroforme, le 1,4-dichlorobenzène ou le méthyl-terbutyl-éther [21]. Il apparaît donc intéressant de confondre les résultats de cotinine avec les concentrations sanguines en composés organiques volatils.

L'exposition au benzène reste un cas très intéressant. L'étude de Manini et coll. en 2006 montre que des salariés d'une société de taxis en Italie sont beaucoup plus exposés au benzène que ce que veulent bien révéler les stations indicatrices de la qualité de l'air en terme de concentrations en benzène atmosphérique à l'intérieur des taxis [22]. La fumée de cigarettes, bien connue comme facteur confondant de la surveillance biologique au benzène, est la principale source d'exposition environnementale dans cette étude. Ainsi, après exclusion de ce facteur, aucun des marqueurs biologiques (acide

transmuconique et acide S-phénylmercapturique) ne varie de façon significative entre les débuts et fins de poste chez ces salariés. Les concentrations alors observées se retrouvent dans les fourchettes décrites en population générale pour les fumeurs et les non fumeurs et excluent toute exposition professionnelle significative au benzène. Ce dernier exemple nous montre l'intérêt d'une surveillance concomitante avec par exemple le suivi dans les urines de la cotinine et des métabolites du benzène dans le cadre d'expositions professionnelles.

4 Les marqueurs biologiques

L'intoxication tabagique peut être évaluée par la mesure d'un certain nombre de marqueurs dans les milieux biologiques. De façon idéale, un marqueur doit être spécifique de la consommation de tabac et suffisamment sensible pour permettre une analyse au laboratoire, avoir une demi-vie assez longue, reposer sur des prélèvements facilement réalisables et des méthodes de dosage simples et peu coûteuses [2]. Dans le contexte particulier de l'exposition tabagique en pédiatrie, ce marqueur doit pouvoir être aisément utilisé chez le jeune enfant et le nourrisson.

Parmi les principaux marqueurs biologiques permettant d'évaluer une exposition au tabac sont décrits le monoxyde de carbone, les thiocyanates, la nicotine et la cotinine. Ce dernier est aujourd'hui reconnu de manière consensuelle comme étant le meilleur indicateur de l'exposition au tabagisme, en particulier pour le dépistage du tabagisme passif [2, 23, 24]. Son application fait l'objet des paragraphes suivants.

5 Dosage de la cotinine : quelles matrices biologiques ?

En pédiatrie comme en santé au travail, l'urine demeure à ce jour la matrice biologique de choix pour évaluer le degré d'exposition au tabagisme passif. La facilité de recueil d'un prélèvement urinaire rend compatible son usage dans les populations d'enfants et d'adultes soumis à un environnement tabagique même si d'autres matrices font depuis quelques années l'objet de nombreux travaux.

5.1 Urine

Nombreuses sont les études réalisant la surveillance biologique de l'exposition au tabac par les dosages de la cotinine dans les urines [18, 22, 25, 26]. Elligsen et coll. décrivent une surveillance biologique chez 93 salariés non fumeurs de bars et restaurants en Norvège avec une cotinine urinaire qui diminue de 9,5 µg/g de créatinine à 1,4 µg/g de créatinine après l'interdiction de fumer dans les lieux publics. Ces concentrations sont corrélées aux diminutions des concentrations atmosphériques en nicotine [18].

Chez l'enfant, la majorité des études traitant des moyens biologiques utiles au dépistage d'une exposition au tabagisme passif a été conduite à partir d'un dosage de cotinine dans les urines. Nous résumons ci-après les principaux résultats de 4 études réalisées chez le jeune enfant ou le nouveau-né.

Schneider et coll. [27] ont dosé la cotinine dans les urines de 67 enfants hospitalisés pour des affections variées. Les résultats étaient corrélés avec les habitudes des parents en matière de consommation de tabac. La réalité d'une exposition au tabagisme passif était définie par une cotinurie égale ou supérieure à 6 ng/mL. Les auteurs ont montré l'existence d'une forte corrélation entre le tabagisme parental et la concentration urinaire en cotinine ($p < 0,0001$). Chez les enfants dont un seul parent était fumeur, la concentration urinaire en cotinine était plus élevée lorsqu'il s'agissait de la mère. Enfin, il faut relever que seuls 5 % des enfants de l'étude présentaient des concentrations urinaires supérieures à 50 ng/mL.

L'étude de Barbier et coll. [1] avait pour objectif de déterminer les circonstances d'exposition au tabagisme passif de l'enfant, d'en apprécier l'importance par le dosage de la cotinurie et d'étudier les relations entre tabagisme passif et les maladies associées de l'enfant. Le seuil de positivité était fixé à 6 ng/mL. 201 enfants étaient inclus dans l'étude (âge : 1 à 77 mois). Une relation significative était établie entre le tabagisme passif (objectivé par l'exposition d'un sujet non fumeur à la fumée d'au moins trois cigarettes par jour en atmosphère confinée) et la cotinurie positive, notamment en ce qui concerne le tabagisme maternel. Une autre relation était mise en évidence entre une cotinurie positive et les antécédents d'infection ORL (rhinopharyngite, otites moyennes aiguës) chez l'enfant.

Dans l'étude de Willers et coll. [28] réalisée chez 23 enfants asthmatiques (âge moyen : $8,4 \pm 3,7$ ans), les auteurs ont montré l'existence d'une association forte entre la cotinine urinaire, l'exposition au tabagisme passif objectivée au moyen d'une enquête, et la présence de nicotine dans la poussière de la maison familiale.

Enfin, plus récemment Mansi et coll. [29] ont démontré de façon tout à fait claire, dans une étude incluant 50 nouveaux-nés, que la cotinurie mesurée à la naissance était prédictive des modifications de comportement à type d'irritabilité, de troubles de l'attention ou de difficultés de réponses à un stimulus, observées plus tard chez ces nourrissons.

De nombreuses autres études montrent l'intérêt de l'urine en tant que matrice de choix dans l'évaluation du degré d'exposition de populations pédiatriques au tabagisme passif [30-32].

5.2 Sang

Les études fondées sur le dosage de la cotinine dans le sang, le sérum ou le plasma sont peu nombreuses, notamment en pédiatrie. Il est vraisemblable que la moindre praticabilité d'un dosage sanguin chez l'enfant, en particulier chez le nourrisson, rend plus difficile l'accès à ce marqueur dans cette matrice. Nous retiendrons toutefois deux publications originales.

Le travail de Aligne et coll. [33] s'intéressait à la recherche de relations entre la survenue de caries dentaires et l'existence d'un tabagisme passif chez l'enfant. Ce critère était défini par des concentrations sériques de cotinine allant de 0,2 à 10 ng/mL. Cette vaste étude portait sur 3531 enfants âgés de 4 à 11 ans (suivi entre 1988 et 1994) ayant bénéficié à la fois d'un dosage sérique de cotinine et d'un examen dentaire. Les auteurs démontrent l'existence d'une association entre le tabagisme passif et le risque de survenue de carie chez les enfants.

La concentration de cotinine dans le sérum était significativement associée au dents cariées présentant des cavités avec un *odds ratio* de 2,1 (IC95 % : 1,5-2,9).

La récente étude de De Chazeron et coll. [34] avait, pour un de ses objectifs, de caractériser chez des nouveau-nés l'exposition anténatale au tabagisme de la mère. 1007 femmes enceintes ont été recrutées et ont fait l'objet d'une enquête pour appréhender le plus précisément possible leur statut vis-à-vis de la consommation de tabac. À la naissance, du sang maternel et du sang de cordon étaient systématiquement prélevés et analysés pour y rechercher la présence de cotinine. Les résultats montrent une forte corrélation entre les concentrations de cotinine mesurées chez la mère et celles mesurées dans le sang de cordon.

Il est utile de préciser que dans ce contexte particulier visant à définir si un nouveau-né a été exposé au tabagisme passif avant la naissance, l'examen dans le sang de cordon présente l'avantage d'être non invasif.

5.3 Méconium

Bien que peu décrit dans la littérature, le dosage de la cotinine dans le méconium peut présenter un intérêt pour évaluer l'exposition anténatale d'un nouveau-né au tabagisme passif. L'analyse dans le méconium a l'avantage, comparativement au dosage dans l'urine ou le sang, d'être une technique non invasive et de permettre une évaluation « historique » du niveau d'exposition du nouveau-né pendant sa vie fœtale, pouvant remonter jusqu'à 20 semaines avant la naissance [35]. Dans une étude réalisée sur des méconiums provenant de 55 nouveau-nés de mère non fumeuses, de mères exposées au tabagisme environnemental ou de mères fumeuses (légères ou sévères), les concentrations de cotinine dans cette matrice étaient corrélées aux habitudes maternelles [36]. Ces concentrations étaient respectivement de 10,9 ng/mL, 31,6 ng/mL, 34,7 ng/mL et 54,6 ng/mL chez les nouveau-nés de mères non fumeuses, de mères exposées passivement, de mères fumeuses légères et de fumeuses sévères.

5.4 Cheveux

À l'instar de nombreux autres xénobiotiques, la cotinine s'accumule dans les cheveux, ce qui permet, grâce à l'analyse capillaire, d'estimer le degré d'exposition anténatale systémique à long terme du nouveau-né ou du jeune enfant. Nous ne reviendrons pas dans cet article sur l'intérêt de l'analyse du cheveu dans la mise en évidence d'une exposition ancienne à la cotinine, ce sujet ayant fait l'objet de différents articles dont les plus anciens ont été publiés il y a plus d'une quinzaine d'années [37-40]. Chez l'enfant et le nouveau-né, outre l'avantage de permettre une analyse rétrospective de leur exposition au tabac, l'analyse des cheveux présente un atout supplémentaire : le caractère non-invasif du prélèvement.

La meilleure illustration de l'utilisation de la cotinine contenue dans les cheveux comme marqueur de l'exposition à la fumée de tabac en pédiatrie, nous est donnée par le récent article de Florescu et coll. [41]. Il s'agit d'une méta-analyse reprenant six études internationales concernant au

total 1746 individus dont 580 enfants (âges compris entre 6 mois et 4 ans) et 202 nouveau-nés. Le reste de la population de l'étude était constituée de femmes enceintes ou non. Chez les jeunes enfants, les auteurs montrent que la concentration de cotinine dans les cheveux était en moyenne de 0,96 ng/mg (IC95 % : 0,86-1,07) chez les enfants exposés *versus* 0,33 ng/mg (IC95 % : 0,25-0,40) chez les enfants non exposés ($p < 0,05$). Chez les nouveau-nés exposés au tabac *in utero*, la concentration de cotinine était en moyenne de 1,42 ng/mg (IC95 % : 1,18-1,65). Une analyse complémentaire a permis de définir chez les enfants, une valeur seuil (*cutoff*) de 0,2 ng/mg distinguant les individus exposés des individus non exposés.

5.5 Salive

À côté de l'urine, la salive apparaît comme une matrice intéressante pour le suivi d'expositions en santé au travail et en environnement [17, 42, 43]. Elle présente de nombreux avantages : demi vie proche de la demi vie plasmatique, valeurs de distribution dans la salive proportionnelles aux concentrations plasmatiques, stabilité de la cotinine dans la salive (à 22 °C pendant 2 semaines), concentrations plus élevées que dans le plasma. On restera cependant prudent dans l'interprétation des résultats salivaires sachant que les concentrations de cotinine dans la salive dépendent de la production de salive [42].

Depuis les années 90, un seuil de 0,1 ng/mL est fixé pour les non fumeurs non victimes de tabagisme passif alors que des concentrations entre 0,1 et 30 ng/mL sont observées dans des cas de tabagismes passifs et des concentrations supérieures à 100 ng/mL chez des fumeurs [42].

Ainsi, dans l'étude de Mulcahy et coll. citée précédemment sur l'exposition au tabac chez des salariés employés dans des bars en Irlande, une diminution de 83 % de la nicotine dans l'atmosphère est corrélée à une diminution de 69 % de la cotinine salivaire (de 1,6 ng/mL à 0,5 ng/mL) [17].

Chez l'enfant, la salive apparaît depuis plusieurs années comme une matrice également utile au dépistage de l'exposition au tabagisme environnemental. À en juger par la littérature, il apparaît que les anglo-saxons, dans le contexte d'études épidémiologiques, dosent la cotinine plus volontiers dans la salive que dans l'urine. Si chez le nouveau-né, cette matrice n'est pas d'une grande praticabilité, elle le devient chez l'enfant plus âgé. C'est ainsi que dans le cadre d'une importante étude visant à évaluer l'exposition au tabac chez 245 enfants (âge : 5-11 ans) scolarisés dans plusieurs classes primaires de Liverpool (UK), Delpisheh et coll. ont utilisé la cotinine salivaire comme marqueur de l'imprégnation tabagique. Un seuil de positivité était alors fixé à 1 ng/mL pour distinguer les enfants exposés des enfants non exposés. Les auteurs ont pu identifier de manière significative plusieurs facteurs de risques associés à une exposition au tabagisme passif, parmi lesquels le tabagisme maternel, un âge inférieur à 7 ans, être un garçon, ou encore vivre dans un contexte socio-économique défavorisé [44]. Une récente étude montra qu'un seuil de positivité de 12 ng/mL de cotinine salivaire serait mieux adapté, en particulier pour un usage chez l'enfant [45].

Au plan analytique, les études précitées, quelque soit la matrice biologique utilisée, montrent la nécessité de disposer

de méthodes analytiques capables de détecter et de quantifier de faibles concentrations de cotinine, de l'ordre de quelques ng/mL, voire inférieure au ng/mL dans le cas de la salive. Le paragraphe suivant a pour objet de préciser quelles sont ces méthodes et en particulier de définir la place de l'immunochimie dans le contexte de l'exposition au tabagisme passif.

6 Dosage de la cotinine : quelles méthodes analytiques ? Place de l'immunochimie

De nombreuses méthodes analytiques ont été décrites pour doser la cotinine dans les matrices biologiques. Elle peuvent être classées en trois catégories : les méthodes colorimétriques, séparatives et immunologiques. Du fait des faibles concentrations de cotinine attendues chez les sujets exposés passivement à la fumée de tabac comparativement aux sujets fumeurs actifs (concentrations de cotinine de 50 à 100 fois plus importantes) [46], le choix d'une technique bien adaptée à cette contrainte doit se faire sur deux critères principaux : une bonne spécificité et l'obtention de limites de détection et de quantification basses, de l'ordre de quelques ng/mL. La praticabilité de la méthode est aussi un argument à prendre en considération en vue d'analyses à grande échelle.

6.1 Colorimétrie

Les méthodes colorimétriques sont des techniques mettant en évidence les métabolites de la nicotine par révélation des molécules à noyau pyridine. Cette méthode est fondée sur la réaction de König (KCN – chloramine T – acide barbiturique) [2]. Bien que cette technique soit simple, rapide, peu coûteuse et facilement automatisable, elle souffre d'un inconvénient essentiel : sa limite de détection. Parant et coll. [47], rapportent une limite de détection dans l'urine de l'ordre de 900 µg/L, seuil qui à l'évidence est totalement inadapté à l'évaluation de l'exposition d'individus au tabagisme passif, particulièrement chez l'enfant.

6.2 Techniques séparatives

Les méthodes séparatives sont constituées pour l'essentiel de méthodes chromatographiques telles que la chromatographie liquide haute performance (HPLC) associée à un détecteur UV ou à barrettes de diodes (DAD), voire à un détecteur de masse (MS et MS/MS) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). D'une manière générale, ces méthodes bénéficient d'une limite de quantification basse et sont caractérisées par une grande spécificité.

En reprenant certaines des études présentées dans les chapitres précédents, il apparaît clairement que les techniques séparatives sont capables de répondre efficacement à la problématique du tabagisme passif, notamment en pédiatrie. Dans leur étude, Schneider et coll. [27] utilisait une technique de dosage de la cotinine dans l'urine par HPLC-UV dont la limite de quantification était de 1 ng/mL; le seuil de positivité

permettant de distinguer les sujets exposés, des sujets non exposés était, rappelons le, de 6 ng/mL. Dans l'étude de Barbier et coll. [1], la limite de quantification dans l'urine était de 5 ng/mL. Pour compléter sur ce point, nous pouvons également citer les travaux de De Chazeron et coll. [34] rapportant une limite de quantification par GC-MS de 1,5 ng/mL dans le plasma, et les travaux de Willers et coll. [28] basée sur le dosage de la cotinine urinaire par LC-MS/MS et dont la limite de quantification était de 0,1 ng/mL.

6.3 Immunochimie

6.3.1 Test RIA (radio immuno assay)

Cette technique utilise un principe de compétition vis-à-vis de son anticorps spécifique entre la cotinine présente dans une matrice biologique et une quantité donnée de cotinine marquée par un radio-isotope. Dans la technique originale de Langone et Van Vunakis [48] l'étendue des gammes d'étalonnages pour le dosage de la cotinine allait de 0,2 ng/mL à 20 ng/mL. Cette méthode a été adaptée avec succès dans l'étude de Leong et coll. [30] où la cotinine était dosée dans des urines collectées chez des enfants. De même, la méta-analyse de Florescu et coll. [41] a été réalisée à partir de l'analyse de la cotinine dans les cheveux par RIA avec une limite de quantification de 0,02 ng/mg (pour 5 mg de cheveux), soit une concentration 10 fois inférieure à celle retenue comme seuil de positivité pour distinguer les enfants soumis au tabagisme passif de ceux non exposés au tabac.

Il ressort de ces données que la RIA, avec des limites de quantification basses, est une technique performante pour le dosage de la cotinine pour contrôler l'exposition au tabagisme passif. Elle souffre toutefois de plusieurs inconvénients liés principalement au temps d'analyse élevé (parfois supérieure à 48 h), à l'équipement spécifique ainsi qu'aux agréments nécessaires à sa mise en œuvre.

6.3.2 Méthodes immunoenzymatiques

De façon générale, les méthodes immunochimiques destinées au dosage de la cotinine dans les matrices biologiques utilisent des techniques sur microplaques ELISA ou utilisent des réactifs liquides prêts à l'emploi et facilement adaptables sur automate.

En 2005, les travaux sur la cotinine du groupe de travail mixte SFBC et SFTA [49], concluaient après une évaluation des tests d'immunodosages suivants : trousse Cotinine[®] (KoneLab[®] SA) et trousse Cotinine Enzyme Immunoassay[®] (Diagnostic Reagent Inc[®]), que ces méthodes présentaient une imprécision importante pour des concentrations dans l'urine inférieures à 200 ng/mL, rendant inappropriée leur utilisation pour le dépistage du tabagisme passif chez l'adulte, et *a fortiori* chez l'enfant. Du fait notamment de leur facilité de mise en œuvre, ces tests demeurent néanmoins très utiles dans le suivi de patients suite à l'arrêt de la consommation de tabac. Parant et coll. [47] ont des conclusions similaires après un essai pratiqué dans l'urine avec le réactif « Cotinine » commercialisé par Microgenics[®] et adapté sur

un automate de biochimie dit ouvert (analyseur Dimension[®] RXL). Suite à l'évaluation des performances de cette méthode, les auteurs rapportent une limite de détection analytique estimée de l'ordre de 45 ng/mL, seuil insuffisant en regard des données de concentrations exposées précédemment.

Toutefois, plusieurs études ont utilisé l'immunochimie comme méthode d'évaluation de l'imprégnation tabagique. C'est ainsi que dans leur étude visant à définir l'intérêt du dépistage à grande échelle de l'exposition environnementale au tabac chez l'enfant, Ino et coll. [32] utilisent une méthode de dosage de la cotinine par technique ELISA (Cosmic Corporation, Japan) dont la limite de quantification est de 5 ng/mL pour un seuil de positivité de la cotinine dans l'urine défini à 10 ng/mL.

Les travaux de Delpisheh et coll. cités plus haut [44], réalisés à partir d'un prélèvement de salive, emploient une technique sur microplaques ELISA (trousse Cozart[®] EIA cotinine oral fluid kit) pour le dosage salivaire de la cotinine. La limite de quantification n'est pas indiquée par les auteurs, mais la méthode permet de distinguer les enfants exposés des enfants non exposés avec un seuil de positivité de la cotinine de 1 ng/mL dans la salive.

Sur la base d'un dosage de cotinine dans le méconium, Dempsey et coll. [35] utilisent une méthode immunochimique par microplaques ELISA (STC technologies) destinée initialement à l'analyse de la cotinine dans le sérum pour un dosage dans le méconium. Les auteurs indiquent que ce test est capable de caractériser une exposition anténatale par la mesure de la cotinine dans le méconium de nouveau-nés avec un seuil de positivité de 10 ng/mL.

Nous pouvons citer la trousse cotinine (IDS One-step ELISA distribué par CHEMTOX) dont le seuil de quantification dans l'urine est évalué à 5 ng/mL, ou encore le test destiné au sérum « Métabolites de la nicotine » (DPC[®]) adapté sur l'analyseur Immulite2000[®] validé par Parant et coll. [47] chez l'adulte, et présentant une limite de détection analytique de 10,8 ng/mL. Ces seuils relativement bas devraient permettre d'envisager l'usage de ces deux tests aux fins d'évaluation de l'exposition au tabagisme passif tant chez l'enfant que chez l'adulte en milieu professionnel.

En résumé, les méthodes immunologiques dites « froides » ont été utilisées avec succès dans plusieurs études réalisées chez l'enfant et l'adulte pour le dépistage d'un éventuel tabagisme passif. Les contraintes liées aux faibles concentrations attendues et aux différentes matrices utilisées, apparaissent comme pouvant être résolues au moyen de plusieurs de ces techniques. Ces méthodes présentent en outre une praticabilité excellente du fait notamment de l'automatisation possible, conduisant par suite à un rendu rapide des résultats. Il reste que les problèmes de spécificité inhérents aux technologies employées doivent impérativement être évalués par les utilisateurs.

7 Conclusion

Les conséquences de l'exposition environnementale au tabac chez l'enfant, le nouveau-né, suite à une exposition anténatale, ou encore chez l'adulte sur son lieu de travail sont nombreuses et potentiellement gravissimes. L'évaluation du degré

d'exposition à la fumée de tabac dans ces populations passe par l'analyse de biomarqueurs dans les matrices biologiques. Depuis longtemps reconnu comme marqueur de choix, le dosage de la cotinine, notamment dans l'urine, permet de caractériser avec précision une éventuelle imprégnation tabagique. D'autres matrices biologiques ont également montré un intérêt. En particulier, la salive ou le cheveu, matrice alternative permettant un « regard historique » sur le passé d'une exposition environnementale au tabac.

Sur le plan analytique, la contrainte principale est due aux faibles concentrations de cotinine attendues chez les sujets exposés, en particulier chez l'enfant (de quelques ng/mL dans l'urine, rarement supérieures à 150 ng/mL). Au vu des études rapportées précédemment, il apparaît clairement que l'analyste a un choix important de méthodes séparatives ou immunochimiques bien adaptées à cette problématique. Faut-il s'orienter vers une méthode chromatographique caractérisée par sa spécificité et une bonne voire très bonne sensibilité, ou vers une méthode immunologique, notamment immunochimique, dont la mise en œuvre aisée la rend plus accessible ? Pour ce choix, l'essentiel demeure dans l'évaluation systématique de la ou des méthode(s) choisie(s), en fonction notamment du contexte d'analyse (ex. étude clinique, suivi thérapeutique), de la population étudiée (pédiatrique, adulte), des habitudes du laboratoire, de la praticabilité, et du coût. Une détermination précise du seuil de quantification de la méthode choisie est un préalable primordial dont il ne faudrait pas faire l'économie.

En 2009, malgré les progrès réalisés, le tabagisme passif chez l'enfant et l'exposition environnementale au tabac chez l'adulte en milieu professionnel demeurent des problèmes majeurs de santé publique. Dans ce contexte, le biologiste et/ou le toxicologue analyste ont un rôle tout à fait essentiel vis-à-vis des pouvoirs publics, des cliniciens et des entreprises pour faire connaître les possibilités analytiques permettant le dépistage et le suivi des populations concernées par cette exposition au tabac, que plusieurs spécialistes décrivent encore aujourd'hui comme une « catastrophe sanitaire annoncée ».

Références

1. Barbier C, Houdret N, Vittrant C, Deschildre A, Turck D. Étude du tabagisme passif par la mesure de la cotinurie en consultation de protection maternelle et infantile dans le Nord-Pas-de-Calais. *Arch Pediatr.* 2000; 7: 719-724.
2. Larramendy C, Divine C, Asnafu-Farhang S, Lagrue G. Intérêt des différents marqueurs biologiques dans l'évaluation du tabagisme. *Path Biol.* 2004; 52: 164-172.
3. Juchet A, Piot M, Dutau G. Tabagisme passif chez l'enfant. *Encycl Méd Chir, Pédiatrie*, 2002; 4-062-A-10: 1-6.
4. Kleinman JC, Pierre MB, Madans JH, Land GH, Schramm WF. The effects of maternal smoking in fetal and infant mortality. *Am J Epidemiol.* 1988; 127: 274-282.
5. Kline J, Stein ZA, Susser M, Warburton D. Smoking: A risk factor for spontaneous abortion. *N Engl J Med.* 1977; 297: 793-796.
6. Heffner IJ, Sherman CB, Speiser FE, Weiss ST. Clinical and environmental predictors of preterm labor. *Obstet Gynecol.* 1993; 81: 750-757.

7. Wiszynski DF, Duffy DL, Beaty TH. Maternal cigarette smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Cleft Palate Craniofac J.* 1997; 34: 206-210.
8. Brown RW, Hanrahan JP, Castile RG, Tager IB. Effect of maternal smoking during pregnancy on passive respiratory mechanics in early infancy. *Pediatr Pulmonol.* 1995; 19: 23-28.
9. Anderson HR, Cook DG. Passive smoking and sudden infant death syndrome: review of the epidemiological evidence. *Thorax.* 1997; 52: 1003-1009.
10. Strachan DP, Cook DG. Parental smoking and lower respiratory illness in infancy and early childhood. *Thorax.* 1997; 52: 905-914.
11. Cook DG, Strachan DP. Parental smoking and prevalence of respiratory symptoms and asthma in school age children. *Thorax.* 1997; 52: 1081-1094.
12. Janerich DT, Thomson D, Varella LR. Lung cancer and exposure to tobacco smoke in the household. *N Engl J Med.* 1990; 323: 632-636.
13. Wang FL, Love EJ, Liu N. Childhood and adolescent passive smoking and the risk of female lung cancer. *Int J Epidemiol.* 1994; 23: 223-230.
14. Smyth A, O'Hea U, Williams G. Passive smoking and impaired lung function in cystic fibrosis. *Arch Dis Child.* 1994; 71: 353-354.
15. Diguët A, Sentilhes L, Marret S, Verspyck E, Marpeau L. Quelle est la prise en charge optimale à la naissance de l'enfant exposé au tabac *in utero* et quelles en sont les biomarqueurs post-natals. *J Gynecol Obstet Biol Reprod.* 2005; 34: 458-459.
16. Hammond SK. Exposure of US workers to environmental tobacco smoke. *Environ Health Perspect.* 1999; 107(2): 329-340.
17. Mulcahy M, Evans DS, Hammond SK, Repace JL, Byrne M. Secondhand smoke exposure and risk following the Irish smoking ban: an assessment of salivary cotinine concentrations in hotel workers and air nicotine levels in bars. *Tob Control.* 2005; 14(6): 384-388.
18. Ellingsen DG, Fladseth G, Daae HL, Gjolstad M, Kjaerheim K, Skogstad M, Olsen R, Thorud S, Molander P. Airborne exposure and biological monitoring of bar and restaurant workers before and after the introduction of a smoking ban. *J Environ Monit.* 2006; 8(3): 362-368.
19. Larsson M, Boethius G, Axelsson S, Montgomery SM. Exposure to environmental tobacco smoke and health effects among hospitality workers in Sweden before and after the implementation of a smoke free law. *Scand. J Work Environ Health.* 2008; 34(4): 367-377.
20. Mullally BJ, Greiner BA, Allwright S, Paul G, Perry IJ. Prevalence of smoking among bar workers prior to the republic of Ireland smokefree workplace legislation. *Irish J Med.* 2008; 177(4): 309-316.
21. Lin YS, Egeghy PP, Rappaport SM. Relationships between levels of volatile organic compounds in air and blood from the general population. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2008; 18(4): 421-429.
22. Manini P, De Palma G, Andreoli R, Poli D, Mozzoni P, Folesani G, Mutti A, Apostoli P. Environmental and biological monitoring of benzene exposure in a cohort of Italian taxi drivers. *Toxicol Lett.* 2006; 167: 142-151.
23. Dhar P. Measuring tobacco smoke exposure : quantifying nicotine/cotinine concentration in biological samples by colorimetry, chromatography and immunoassay methods. *J Pharm Biomed Anal.* 2004; 35: 155-168.
24. Jacob N, Berny C, Boyer JC, Capolaghi B, De l'Homme G, Desch G, Garelik D, Houdret N, Le Moel G, Moulisma M, Plantin-Carrenard E. Dosage urinaire de la cotinine et des métabolites de la nicotine (Seconde partie). *Ann Biol Clin.* 2005; 63(5): 389-409.
25. Akiyama Y, Arashidani K, Kawano W, Kunugita N. Urinary nicotine and its metabolites as a biomarker of exposure to environmental tobacco smoke. *J UOEH.* 2006; 28(3): 245-252.
26. Kim H, Lim Y, Lee S, Park S, Kim C, Hong C, Shin D. Relationship between environmental tobacco smoke and urinary cotinine levels in passive smokers at their residence. *J Expo Anal Environ Epidemiol.* 2004; 14(1): 565-570.
27. Schneider JM, Capolaghi B, Briançon S, Covi G, Merlin JP, Leveau PH. Le tabagisme passif chez l'enfant. Son dépistage par le dosage de la cotinine urinaire. *Arch Fr Pédiatr.* 1993; 50: 567-571.
28. Willers S, Gerhardsson L, Lundh T. Environmental tobacco smoke (ETS) exposure in children with asthma-relation between lead and cadmium, and cotinine concentrations in urine. *Resp Med.* 2005; 99: 1521-1527.
29. Mansi G, Raimondi F, Pichini S, Capasso L, Sarno M, Zuccaro P, Pacifi R, Garcia-Algar O, Romano A, Paludetto R. Neonatal urinary cotinine correlates with behavioural alterations in newborns prenatally exposed to tobacco smoke. *Pediatr Res.* 2007; 61(2): 257-261.
30. Leong JW, Dore ND, Shelley K, Holt EJ, Laing A, Palmert LJ, LeSouef PN. The elimination half-life of urinary cotinine in children of tobacco-smoking mother. *Pulm Pharmacol Ther.* 1998; 11: 287-290.
31. Peterson EL, Johnson CC, Ownbry DR. Use of urinary cotinine and questionnaires in the evaluation of infant exposure to tobacco smoke in epidemiologic studies. *J Clin Epidemiol.* 1997; 50(8): 917-923.
32. Ino T, Shibuya T, Saito K, Ohshima J, Okada R. A passive smoking screening program for children. *Prevent Med.* 2006; 42: 427-429.
33. Aligne CA, Moss ME, Auinger P, Weitzman M. Association of pediatric dental caries with passive smoking. *JAMA.* 2003; 289: 1258-1264.
34. De Chazeron I, Daval S, Ughetto S, Richard D, Nicolay A, Lemery D, Llorca PM, Coudoré F. GC-MS determined cotinine in an epidemiological study on smoking status at delivery. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008; 21: 485-488.
35. Dempsey D, Moore C, Deitermann D, Lewis D, Feeley B, Niedbala RS. The detection of cotinine in hydrolyzed meconium samples. *Forensic Sci Int.* 1999; 102: 167-171.
36. Ostrea EM, Knapp DK, Romero A, Montes M, Ostrea AR. Meconium analysis to assess fetal exposure to nicotine by active and passive maternal smoking. *J Pediatr.* 1994; 124: 471-476.
37. Haley NJ, Hoffman D. Analysis for nicotine and cotinine in hair to determine cigarette smoker status. *Clin Chem.* 1985; 31(10): 1598-1600.
38. Kintz P, Ludes B, Mangin P. Evaluation of nicotine and cotinine in human hair. *J Forensic Sci.* 1992; 37(1): 72-76.

39. Klein J, Chitayat D, Koren G. Hair analysis as a marker for fetal exposure to maternal smoking. *N Engl J Med.* 1993; 328(1): 66-67.
40. Eliopoulos C, Klein J, Phan MK, Greewald M, Chitayat D, Koren G. Hair concentrations of nicotine and cotinine in women and their newborn infants. *JAMA.* 1994; 271(8): 621-623.
41. Florescu A, Koren G, Klein J, Gareri J. Utilisation de la cotinine continue dans les cheveux comme marqueur d'une exposition à la fumée de tabac. Méta-analyse d'études internationales. *Ann Toxicol Anal.* 2005; 17(4): 253-261.
42. Soo Quee Koh D, Choon Huat Koh G. The use of salivary biomarkers in occupational and environmental medicine. *Occup Environ Med.* 2007; 64: 202-210.
43. Wakefield M, Cameron M, Inglis G, Letcher T, Durkin S. Secondhand smoke exposure and respiratory symptoms among casino, club, and office workers in Victoria, Australia. *J Occup Environ Med.* 2005; 47(7): 698-703.
44. Deslispheh A, Kelly Y, Brabin BJ. Passive cigarette smoke exposure in primary school children in Liverpool. *Public Health.* 2006; 120: 65-69.
45. Jarvis MJ, Fidler J, Mindell J, Feyerabend C, West R. Assessing smoking status in children, adolescents and adults: cotinine cut-points revisited. *Addiction.* 2008; 103(9): 1553-1561.
46. Berny C, Boyer JC, Capolaghi B, De l'Homme G, Desch G, Garelik D, Hayder R, Houdret N, Jacob N, Koskas T, Lainé G, Le Moel G, Moulisma M, Plantin-Carrenard E, Venembre Ph. Les marqueurs spécifiques du tabagisme. *Ann Biol Clin.* 2002; 60: 263-272.
47. Parant F, Moulisma M, Lardet G, Flouirié F, Pénès MC. Métabolites urinaires de la nicotine : évaluation des immunodosages EIA "Cotinine" Microgenics et Immulite 2000 "Métabolites de la nicotine" DPC en comparaison à la colorimétrie. *Immunoanal Biol Spéc.* 2003; 18: 218-224.
48. Langone JJ, Van Vunakis H. Radioimmunoassay of nicotine and cotinine, and gamma-(3-pyridyl)-gamma-oxo-N-methylbutyramide. *Methods Enzymol.* 1982; 84: 628-640.
49. Jacob N, Berny C, Boyer JC, Capolaghi B, De l'Homme G, Desch G, Garelik D, Houdret N, Le Moel G, Moulisma M, Plantin-Carrenard E. Dosage urinaire de la cotinine et des métabolites de la nicotine (première partie). *Ann Biol Clin.* 2005; 63(4): 397-409.