

Compte-rendu du VIIe Congrès de la SFTA

Marseille, 2-3 juin 1999

Vincent CIRIMELE (STRASBOURG)

Cette année, le congrès de la SFTA faisait le point sur deux grands thèmes:

- Les intoxications et innovations chimiques ou pharmaceutiques
- Les nouvelles technologies et la toxicologie analytique à l'aube de l'an 2000

Thème 1: Intoxications et innovations pharmaceutiques

Le **Dr C. Paumond** a présenté un cas d'**intoxication volontaire mortelle à la cibenzoline (Cipralan®)**. La cibenzoline est un antiarythmique de classe Ic décrit dans la littérature comme responsable lors d'intoxications volontaires de plusieurs décès avec échec des thérapeutiques conventionnelles. Les dosages de cibenzoline ont été pratiqués par CLHP-DAD. Un homme de 73 ans aux antécédents multiples (dont cardiomyopathie hypertensive avec troubles du rythme) ingère une quantité inconnue de Cipralan® et 2 à 5 comprimés d'Aldomet®. Les secours arrivent à H3 et constatent un score de Glasgow à 3, une TA à 8/5, un pouls à 55 bat/min et une fréquence respiratoire à 5/min. Lors du transport vers l'hôpital du patient ventilé, le tracé ECG montre des troubles de la conduction résistant à l'emploi de lactate de sodium molaire. A l'hôpital (H4), le patient reçoit de l'adrénaline. A partir de H6, le malade semble s'améliorer: stabilisation de la TA et présence de phases de réveil. Mais les troubles de la conduction persistent. A H12, le tableau clinique se complique avec aggravation de l'hypoTA et des troubles de la conduction, mais l'adrénaline reste efficace quelques heures. Entre H24 et H30, le patient présente 8 arrêts cardiaques et il décède à H33 lors du 9ème arrêt. En plus de la toxicité cardiaque attendue, le patient a présenté une hypokaliémie et une bradypnée. Ce dernier symptôme a été décrit dans la littérature lors d'intoxications accidentelles à la cibenzoline (insuffisance rénale) sous le nom de syndrome myasthéniforme. Ces difficultés respiratoires seraient dues à une toxicité directe de la molécule sur les muscles thoraciques. On retrouve dans la littérature d'autres symptômes que le patient n'a pas présentés, telle une hypoglycémie. Il a été noté qu'il existe peu de publications de prise volontaire de quantités massives de cibenzoline: 4 observations avec un seul patient jeune et sans antécédent cardiaque ayant survécu. Les taux sanguins de cibenzoline pour les prélèvements effectués à H4, H12, H24, H30 et H33 sont respectivement de 5.3mg/l, 4.7mg/l, 4.1mg/l, 3.6mg/l et 2.8mg/l. Ces résultats sont compatibles avec les taux retrouvés chez des patients décédés après une prise volontaire de cibenzoline: 3.4 à 12 mg/l lors de la prise en charge médicale pour les 3 observations publiées (taux thérapeutiques de 0.3 à 1 mg/l). Il a été conclu que les intoxications volontaires à la cibenzoline sont de mauvais pronostic, cette nouvelle observation venant conforter les cas de la littérature.

Le **sildénafil (Viagra®, Laboratoire Pfizer, Orsay)**, inhibiteur de la phosphodiesterase de type 5, est très efficace dans le traitement des troubles de l'érection qu'ils soient d'étiologie organique, physique ou mixte. Son métabolite principal (UK-103,320) est également actif. Le succès mondial des ventes de sildénafil fait évoquer l'éventualité d'un usage récréatif et donc de la survenue de situations médicolégaux (surdosage, associations médicamenteuses dangereuses, vertiges, dyschromatopsie). La seule méthode de dosage publiée (Cooper, J. Chromatogr. B, 701 (1997) 87-95) comportait une étape de dialyse avec un équipement spécifique. Le **Dr M. Deveaux** a mis au point et

validé une méthode plus simple d'extraction et de dosage du sildénafile et de ses métabolites dans le sang et les urines. Deux sujets traités pour dysfonctionnement érectile (68 et 75 ans) ont ingéré respectivement une dose de 25 et 50 mg de sildénafile. Les prélèvements de sang et d'urines recueillis à intervalles réguliers ont été extraits à pH 9,5 par le mélange chloroforme/isopropanol/n-heptane (60/14/26) après addition de 1 mg de trazodone. L'extrait sec a été repris par le mélange acétonitrile/eau (50/50) et injecté dans un système HPLC/DAD de chez Waters. La séparation a été effectuée sur colonne C8 Waters Symmetry® (5 m, 250 x 4,6 mm) à l'aide d'un gradient tampon phosphate pH 4,5/acétonitrile à débit variable. Le sildénafile, son métabolite actif, deux autres métabolites et l'étalon interne sont bien séparés et identifiables par leurs spectres UV caractéristiques. Le rendement d'extraction est de 96%, la limite de détection de 5 ng/ml et la limite de quantification de 10 ng/ml. La linéarité de la méthode a été vérifiée de 10 à 2000 ng/ml. La méthode est reproductible (coefficient de variation de 0,8% à 500 ng/ml). Les taux sanguins de sildénafile retrouvés étaient dans la fourchette thérapeutique (70 à 315 ng/ml). Les taux urinaires variaient de 180 à 1600 ng/ml. La méthode décrite est applicable en toxicologie médico-légale sur le contenu gastrique et le sang total.

Le **Dr A. Tracqui** a présenté une méthode de dosage par HPLC/MS du sildénafile (Viagra®) dans les fluides biologiques. Pour cela, 3 ml de fluide biologique (sang, urine, salive) et 30 ml de buprénorphine-d4 (bup-d4, 10 mg/l, standard interne) sont extraits à l'aide de 2 ml de tampon NH4Cl saturé, pH 9,5, et 5 ml de CHCl3/2-propanol/n-heptane (25 : 10 : 65, v/v). La phase organique est évaporée et l'extrait sec repris avec 25 ml de méthanol. 2 ml sont injectés dans la colonne HPLC (NovaPak C18, 4 mm, 150 x 2,0 mm). La phase mobile est constituée d'acétonitrile (ACN)/tampon 2 mM NH4COOH, pH 3,0 et le gradient ACN (35-70 %) s'effectue en 9 min à un débit de 200 ml/min (split post-colonne 1:3). La détection est assurée par un spectromètre de masse Perkin-Elmer Sciex API-100 avec une interface ionspray. La tension d'ionisation (capillaire) est de + 4500 V, la tension d'orifice de 0 V. L'acquisition est réalisée en TIC ou en SIM sur les masses m/z 475,2 et 534,2 (sildénafile), et 472,2 (bup-d4).

Cette méthode de dosage du sildénafile par HPLC/MS apparaît fiable, spécifique et hautement sensible (Fig. 1) ; les limites de détection et de quantification sont de 0,2 et 0,5 ng/ml quelle que soit la matrice étudiée (sang, urine, salive). Le rendement d'extraction (plasma surchargé à 20 et 100 ng/ml) est > 91 %. A titre d'illustration, il a été présenté une cinétique d'excrétion salivaire du sildénafile après ingestion d'un cp de Viagra® 25 mg par un volontaire sain. Le sildénafile est détectable dans la salive dès 30 min (1,2 ng/ml) et le pic est atteint à 90 min (8,3 ng/ml) ; le taux plasmatique au même moment est de 72,4 ng/ml. Par ses performances, cette méthode se révèle apte à fournir une réponse analytique de choix aux problèmes médico-légaux (mésusage, décès) déjà observés aux USA et qui ne manqueront pas de se faire jour suite à la récente introduction du Viagra® sur le marché français.

Les intoxications par le méprobamate représentent environ 5% des intoxications par les psychotropes. Cette molécule fait donc partie de celles qu'il faut doser en urgence car la prise en charge thérapeutique est directement fonction de la concentration plasmatique. dans une étude brève, la Commission Toxicologie Hospitalière de la SFTA a montré qu'il était possible de réaliser rapidement un dosage de méprobamate par chromatographie en phase gazeuse alors que le dosage avait la réputation d'être fastidieux. En liaison avec la commission Assurance Qualité, un contrôle externe de qualité du dosage sanguin du méprobamate a donc été proposé aux adhérents et le **Dr M.**

Deveaux a présenté les résultats de cette première évaluation. Les échantillons de plasma contenaient environ 50, 100 et 150 mg/l de méprobamate et étaient conditionnés dans du tube Tigon®. Les échantillons ont été envoyés à 100 laboratoires, 43 ont rendus des résultats. 4 types de dosage ont été réalisés: CPG/SM (n=13), CPG/FID (n=23), HPLC/UV (n=3) et chimie (n=4). Malgré la grande dispersion des résultats, ce premier exercice est un succès. L'application d'une méthode recommandée par les Commissions devrait permettre d'améliorer les performances des laboratoires.

Au cours des dix dernières années, plusieurs équipes françaises ont attiré l'attention des autorités sanitaires sur la toxicité du buflomédil. Il est admis qu'une ingestion de 3 g (soit 10 comprimés de 300 mg), c'est à dire seulement 5 fois la posologie maximale recommandée, peut engager le pronostic vital dans un délai d'une heure. Dans les 15 cas d'intoxications mortelles décrites, les concentrations sanguines post-mortem étaient toujours supérieures à 30 mg/l. Le **Dr J.P. Goullé** a rapporté deux nouveaux cas, potentiellement mortels, admis aux urgences du groupe hospitalier du Havre à quelques semaines d'intervalle montrant des concentrations plus faibles (16,8 et 27 mg/l). Dans le premier cas, il s'agissait d'un alcoolique chronique de 43 ans ayant absorbé 9 g de buflomédil et plusieurs litres de vin. A la prise en charge par le SAMU, le patient était cyanosé, en apnée et présentait un arrêt cardiaque nécessitant un massage cardiaque externe, une ventilation au masque et une intubation. L'examen montre une pneumopathie d'inhalation rapidement régressive. A l'admission, l'éthanolémie était de 2,98 g/l, la concentration en buflomédil était à 16,8 mg/l, puis 6,9 mg/l à la dixième heure et 0,2 mg/l à la trente-sixième heure. Dans le deuxième cas, il s'agissait d'une jeune fille de 15 ans retrouvée inconsciente par le SAMU après intoxication massive au buflomédil. A l'arrivée des secours, elle présente des convulsions puis un arrêt cardiaque récupéré par massage cardiaque externe et deux chocs électriques. A l'entrée, le dosage sanguin de buflomédil était de 27 mg/l, puis 17,6 mg/l à la troisième heure, 10,6 mg/l à la douzième, 2,8 mg/l à la trente-sixième et 0,2 mg/l à la soixantaine heure. Ces deux observations alimentent la liste déjà longue des intoxications décrites, en particulier en France. Elles mettent en lumière que l'une des complications la plus redoutée, l'arrêt cardiaque, peut survenir pour des concentrations sanguines plus faibles que celles déjà publiées. Il convient donc d'attirer l'attention des toxicologues sur la possibilité de survenue d'un arrêt cardiaque pour des concentrations inférieures à celles habituellement admises.

La Société Française de Toxicologie Analytique a créé une **commission "Accréditation"** (responsable **Dr A. Gruson**). Celle-ci travaille au niveau d'un programme spécifique "Toxicologie et Suivi Thérapeutique" en liaison avec d'autres sociétés savantes, et au sein du Comité Français d'Accréditation. Le fonctionnement des laboratoires d'analyses de biologie médicale découle d'une longue et imposante évolution en matière de réglementation. Le G.B.E.A., régi par l'arrêté du 2 Novembre 94, s'inscrit dans ce contexte et constitue une étape vers l'accréditation. Le G.B.E.A. est un guide Français, réglementaire, obligatoire et opposable. Une commission au sein du Comité Français d'Accréditation a travaillé et termine l'élaboration d'un document tenant compte de l'ISO G.25/EAL, de l'EN 45001, de l'EC4, du GBEA. Un référentiel unique existe donc, s'inscrivant dans le contexte européen et tenant compte de la réglementation de notre pays. Les différents organismes d'accréditation s'inscrivant dans le contexte européen, dépendent de "L'European co-operation for Accreditation" (E.A.). En France, le Comité Français d'Accréditation bénéficie d'un accord de reconnaissance multilatéral, signé avec les autres partenaires européens dans le cadre de l'E.A. Il a, en 1996, créé sa commission sectorielle d'accréditation en biologie médicale, mise en place avec des professionnels de santé. Celle-ci travaille, comme indiqué précédemment, sur l'établissement d'un référentiel adapté à la biologie médicale, et de programmes dont celui de "Toxicologie et suivi

thérapeutique". Ceci en liaison avec les sociétés savantes et les collègues, et selon un processus d'accréditation tenant compte de l'audit initial, de l'audit de contrôle et de celui de surveillance. Pour ce faire, elle dispose d'auditeurs qualitatifs et d'auditeurs techniques. Ces derniers sont exclusivement des biologistes experts et référents de la profession. Il faut insister sur le fait que l'accréditation évoquée à ce niveau se fait dans le contexte européen, en utilisant un référentiel résultant de l'harmonisation de documents européens et internationaux. Ce type d'accréditation est non obligatoire, et basée sur le volontariat. Elle peut être sollicitée par des laboratoires privés et publics.

Initialement vendus en Sex-shop, les poppers à base de nitrites d'alkyle ont dès 1980, donné lieu à des intoxications parfois sévères. Le premier cas rapporté par le Centre Anti-Poison de Marseille a conduit à la présentation d'un rapport au Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. Différentes stratégies ont été adoptées par la France en vue de limiter leur utilisation, interdiction de la vente de "poppers" en tant que tel et le classement en tant que toxiques des différentes molécules utilisées telles le nitrite de pentyle (amyle), de butyle, d'isobutyle. C'est alors que la vente de poppers s'est effectuée sous une autre dénomination : désodorisant d'ambiance, nettoyeur de tête de lecture VHS, et que sont apparues de nouvelles molécules non classées par simple substitution de l'alcool estérifiant. Les poppers sont actuellement utilisés à des fins sexuelles ou bien à titre récréatif chez les adolescents ou jeunes adultes pour leurs effets "euphorisants". L'acquisition se faisant en Sex-shop, par le biais de la vente sauvage dans la rue ou les discothèques, mais aussi par celui d'Internet qui présente des services divers et variés. Ainsi, Internet apparaît comme un nouveau mode d'approvisionnement qui allie simplicité (télépaiement ou envoi d'une commande via la Poste), anonymat et économie. Internet semble jouir d'une apparente immunité qui lui permet de proposer, par exemple la vente de poppers sous cette même appellation, ou bien des nitrites d'amyle ou de butyle. De plus ce réseau représente un nouveau moyen de communication rapide, quelle que soit la distance, permettant de trouver des lieux de ventes, de nouvelles utilisations, des récits de "trip", des messages de mise en garde émis par des particuliers d'après leurs expériences passées ou bien auprès de sites de certains organismes. Ce réseau permet de se procurer également d'autres produits ce qui risque d'entraîner des associations dangereuses comme poppers et Viagra®. Les poppers sont utilisés pour leur effet relaxant sur le sphincter anal, retardateur de l'éjaculation, prolongateur de l'orgasme, mais aussi pour leurs effets "euphorisants". Le **Dr J. Arditti** a rappelé qu'ils possèdent une toxicité liée à leurs propriétés vasodilatatrices, et à leur pouvoir oxydant en particulier sur l'hémoglobine. Bien que peu de cas mortels aient été rapportés, leur toxicité est établie comme le démontre le bilan des cas collectés au CAP de Marseille. Les poppers apparaissent comme des produits toxiques utilisés par différentes populations d'individus et dont l'acquisition est facilitée et non contrôlée avec l'utilisation d'Internet. D'après le Dr J. Arditti, il serait nécessaire d'établir une législation en classant tous les nitrites volatils en tant que substances dangereuses.

Un jeune homme de 25 ans, cycliste de haut niveau, consulte son médecin pour un épisode aigu de tachycardie avec oppression thoracique, des sueurs profuses et des troubles neurologiques. L'échantillon qu'il avoue s'injecter (0,5 ml avant et 0,5 ml pendant la course), appelé "pot belge" dans le milieu sportif, a été analysé par CPG/SM, HPLC/DAD et HPLC/MS. Les résultats présentés par le **Dr P. Mura** étaient les suivants: Amphétamine 40,8 g/l, héroïne 12,5 mg/l, cocaïne 2,3 mg/l, éthanol 0,75 g/l, ainsi que de la caféine, de l'acétylcodeine, de la papavérine, de l'éphédrine, de l'acide acétylsalicylique, de l'éthénamide, de la phénacétine et du glucose. L'investigation judiciaire à grande échelle a permis de saisir plus de 700 flacons dont les présentations sont diverses. Leur

analyse a permis de distinguer deux lots de composition différente. Le premier lot, d'origine polonaise, contenait de l'amphétamine (43,4 à 47,9 g/l), de la cocaïne (8,8 à 9 mg/l), de la caféine (788 à 928 mg/l), de l'acide acétylsalicylique (6,4 à 10,6 g/l), de l'éthenzamide, de la phénacétine (0,6 mg/l) et du carbasalate calcique (288 à 296 mg/l). Le deuxième lot, d'origine belge, contenait uniquement de l'amphétamine (51,3 g/l). L'héroïne n'a été retrouvée dans aucun des deux lots. Il a été conclu que le "pot belge", à l'origine de l'affaire, était en réalité du "pot polonais". Il semblerait donc que, tout comme l'ecstasy, le "pot belge" soit en réalité une appellation.

Les dérivés b-adrénergiques font parfois l'objet d'une utilisation frauduleuse par les sportifs qui désirent améliorer leurs performances : Les b-agonistes comme le salbutamol pour ses effets psychostimulants ou le clenbutérol pour accroître la masse musculaire et les b-bloquants pour favoriser la coordination psychomotrice. Les urines sont le prélèvement de référence imposé par le Comité International Olympique pour la détection de ces abus. Elles ne permettent la détection que sur une courte période, ne permettant pas de faire la distinction entre prise chronique et prise ponctuelle à visée thérapeutique. L'analyse dans les cheveux offre une solution à ces inconvénients. Une procédure originale de dosage dans les cheveux de 14 b-adrénergiques par GC/MS a donc été développée par le **Dr V. Dumestre** en collaboration avec l'Institut de Médecine Légale de Strasbourg. Après décontamination dans du dichlorométhane, 100 mg de cheveux sont pulvérisés dans un broyeur à boulet puis hydrolysés dans 1 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N (18h à 56°C) en présence d'un étalon interne. La phase acide est neutralisée par 1ml de NaOH 0,1 N, additionnée de 2 ml de KHCO₃ (pH 8,6) puis purifiée par une extraction solide liquide sur des colonnes C18 Isolute. L'éluat évaporé est dérivé par un mélange acétate d'éthyle/triméthylboroxine. Les dérivés méthaneboronate ainsi formés sont analysés sur un système Hewlett Packard GC 6890/MS 5973. 4 ml de l'extrait dérivé sont injectés en mode pulsé sur une colonne capillaire 5% phenyl 95% méthylsiloxane. La détection est réalisée après impact électronique, en mode scan entre 100 et 350 uma. La technique est linéaire entre 25 pg/mg et 10 ng/mg. Les limites de détection vont de 2 à 10 pg/mg et le taux de récupération varie de 37 à 100 %, selon les molécules. La reproductibilité de la technique est satisfaisante. Plusieurs applications de la technique ont été rapportées. Elles concernaient la confirmation de la prise de salbutamol, décelée précédemment dans les urines, chez un nageur de 24 ans, la mise en évidence de cas de dopage par du sotalol chez un archer et par du métoprolol chez un spécialiste du tir, ainsi que l'identification de clenbutérol dans les poils de veaux, utilisé pour augmenter le poids de l'animal avant l'abattage.

Suite aux différentes contestations, concernant les interprétations des résultats de contrôle anti-dopage, se rapportant à la nandrolone, une **étude multicentrique a été réalisée sur les concentrations physiologiques des métabolites de la nandrolone** dans les urines humaines, dont les résultats nous sont présentés par le **Dr Luc HUMBERT**. Les échantillons ont été obtenus auprès d'hommes sportifs ou non, issus de la population normale. Des urines de femmes enceintes ou non ont aussi été analysées. Après extraction, hydrolyse par la b-glucuronidase, purification, les analytes ont été silylés afin de permettre l'identification et la quantification des métabolites de la nandrolone, la 19-norandrostérone et la 19-norétiocholanolone, par CPG/SM. Les résultats de 153 échantillons urinaires provenant de sportifs et de la population normale ont démontré une sécrétion physiologique des métabolites de la nandrolone chez certains individus. En général, les concentrations obtenues étaient inférieures à 0,5 ng/ml. Par contre, la sécrétion naturelle de nandrolone est plus importante chez les femmes enceintes. Il a été conclu que la sécrétion urinaire

des métabolites de la nandrolone est faible, mais pas inexistante. La limite de positivité proposée par le CIO semble donc donner des garanties suffisantes pour une population normale.

Le Laboratoire National de dépistage du CIO en France a détecté dans les urines de plusieurs sportifs, de la norandrostérone (NA) et de la norétiocholanolone (NE). Ces deux substances sont connues comme étant les métabolites urinaires observés après prise de nandrolone. Dans ce cas, les taux de NA sont toujours supérieurs aux taux de NE. Dans les urines des joueurs trouvés positifs au contrôle antidopage, il s'avère que le taux de NE est systématiquement supérieur à celui de NA. C'est pourquoi, le **Dr G. Pépin** a tenté de démontrer si la prise de précurseurs stéroïdiens pouvait également entraîner l'apparition des mêmes métabolites dans les urines avec éventuellement, comme observé dans les urines des sportifs qui contestent la prise de nandrolone, un taux de NE supérieur au taux de NA. Il a été démontré que l'administration de comprimés de DHEA, de gélules de 4-androstènedione, de substance pure de 5-androstènediol ne provoque pas d'excrétion de NA et de NE. La nandrolone au contraire y conduit toujours. Les comprimés de 19-norandrostènediol et 19-norandrostènedione produisent l'excrétion massive de NA et de NE dans des ratios variables au cours du temps entre les deux produits. Les gélules de 4 et de 5-androstènediol commercialisées aux USA induisent une faible excrétion de NA et de NE dans des rapports souvent inversés et à des concentrations proches de celles qui ont été observées chez les sportifs contrôlés positivement. Il a été conclu que la présence de NA et de NE peut être le fait d'une administration de nandrolone ou de 19-norstéroïdes (norandrostènediol et norandrostènedione). Ces mêmes métabolites ont été détectés après la prise de gélules commerciales de 4 et de 5-androstènediol, certainement du à la présence d'impuretés de type 19-norandrostène.

En cette fin de millénaire, la **recherche de résultats commerciaux ou sportifs est souvent associée à la consommation de produits augmentant la performance.** Même s'ils ne sont pas toujours autorisés sur le territoire français, leur approvisionnement est aisé par l'étranger ou par l'Internet. Afin de répondre à certaines questions de magistrats ou de fédérations sportives, le **Dr P. Kintz** a lancé depuis 18 mois plusieurs études sur ces composés, parfois classés comme simples nutriments ou, au contraire, sur la liste des agents dopants du Comité International Olympique. Dans un premier temps, l'influence de l'apport exogène de créatine sur la créatinine urinaire a été évaluée. Un sujet mâle de 75 kg a reçu pendant 14 jours un supplément de créatine, sous forme de gélule (Creatine Fuel, 700 mg/gélule, 3 fois par jour). Une très discrète variation de l'excrétion urinaire de la créatinine a pu être observée, mais sans signification statistique. La dehydroépiandrostérone (DHEA), présentée parfois comme la pilule de jouvence, est proposée comme précurseur de la testostérone. En absence de référence dans la littérature internationale, les concentrations physiologiques de DHEA dans les cheveux ont été déterminées. A partir d'un échantillon de 100 mg, les cheveux sont hydrolysés dans la soude, et la DHEA analysée par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse après double purification SPE (Isolute C18) et liquide-liquide (pentane), suivie d'une silylation. Les résultats suivants ont été obtenus : hommes (n=15, 1,2 à 6,7 pg/mg, moyenne à 4,3 pg/mg) et femmes (n=12, 0,5 à 10,6 pg/mg, moyenne à 5,3 pg/mg). Après administration orale de 25 mg de DHEA pendant 1 mois à 3 sujets mâles, l'analyse segmentaire a révélée les taux suivants : [12,6 à 76,3 pg/mg], [7,5 à 13,0 pg/mg] et [32,7 à 48,9 pg/mg], avec paradoxalement une absence de variation des taux de testostérone. Enfin, 2 hommes ont reçu par voie orale, à 15 jours d'intervalle, une première dose de 82 mg de 4-androstène-3,17-dione, puis 100 mg de 4-androstène-3,17-diol. Ces 2 composés se métabolisent dans l'organisme en testostérone, via une 17-β-hydroxysterode deshydrogénase et une 3-β-hydroxysterode deshydrogénase. Les rapports

initiaux testostérone/épitestostérone (T/E), entre 1 et 2, ont dépassé le seuil fixé par le CIO (6:1) à la 5ème heure pour l'androstenedione chez les 2 sujets (9,46 et 10,06) et chez 1 sujet (6,62) pour l'androstenediol. Ces observations illustrent de manière flagrante l'impact que peuvent avoir des produits présentés comme nutriments sur les profils stéroïdiens urinaires. Le risque majeur est la banalisation des anabolisants dans la population générale du fait de leur toxicité cardiaque et hépatique. Déjà, plus d'un million d'étudiants américains abuse de ces composés, selon la NIDA américaine en 1997.

Le **GHB**, substance endogène à des concentrations nanomolaires, est utilisé en anesthésie et en thérapeutique mais également à des fins criminelles dans des cas de viols ou de vols. Dans une revue de la littérature récemment parue, il est fait mention que le GHB mis en évidence dans le sang d'autopsie peut provenir d'une décomposition post-mortem. Cette incertitude méritait d'être vérifiée. Pour cela, le **Dr M.H. Ghysel** procéda à l'analyse de sangs, d'urines et d'humeurs vitrées prélevés après autopsie ou de sangs de sujets vivants. Les deux méthodes classiquement utilisées pour ce type de dosage ont été réalisées, à savoir soit la précipitation des protéines et une dérivation par le Bistriméthylsilyltrifluoroacétamide, soit la transformation, en milieu acide, du GHB en gammabutyrolactone. Sur du sang de sujets décédés de causes diverses, analysé 8 jours après l'autopsie, les taux sanguins de GHB étaient compris entre 11,5 et 21,6 mg/l alors que le GHB était, dans les urines et l'humeur vitrée, inférieur à la limite de détection. Sur du sang de sujets vivants, laissé 10 jours à température ambiante, dans deux cas, les taux de GHB étaient inférieurs à 1 mg/l, dans 1 cas, il était de 2,3 mg/l au bout de 10 jours.

D'après de récentes études, il apparaît que chez des sujets décédés, un taux de GHB inférieur à 50 mg/l n'est pas interprétable et que l'analyse simultanée de l'urine présente un grand intérêt.

Le **psilocybe** est le champignon le plus utilisé en France pour ses propriétés hallucinogènes. Sa toxicité est liée à la présence de deux principes actifs à noyau indolique, la psilocybine et la psilocine (le ratio variant d'une espèce à l'autre) qui réalisent un syndrome narcotinique ou hallucinatoire ou psilocybien précoce (délai inférieur à 6 heures après ingestion) résultant d'une inhibition de la neurotransmission sérotoninergique. Les effets cliniques comportent des effets psychodysléptiques (comparables au LSD et variables selon les individus et la dose ingérée) avec délires dissociatifs, hallucinations visuelles et des signes sympathomimétiques (mydriase bilatérale, tachycardie, hypertension artérielle, agitation). La durée des symptômes est de 6 à 8 heures, la "pointe de l'expérience" ayant lieu en général 90 minutes après l'ingestion. Le **Dr C Aillouch** a rapporté une intoxication touchant un adulte jeune de sexe masculin, intoxication confirmée par la mise en évidence urinaire par séparation chromatographique de l'agent pharmacologiquement actif, la psilocine (la psilocybine étant rapidement déphosphorylée en psilocine). Au plan toxicologique, la recherche de médicaments et de toxiques sanguins s'est avérée négative, mais le dépistage urinaire par méthode immunoenzymatique (EMIT®) et chromatographique (Remedi®) a permis de mettre en évidence la présence de benzodiazépines (desmethyldiazepam) et de psilocine. La présence du principe actif a été confirmée par CG-SM après silylation (ions caractéristiques : 348, 290, 73, 58). Du point de vue législatif, la consommation et le commerce de la psilocybine et de la psilocine en vue de leur utilisation psychotrope sont interdits. Cependant, les spores, ne comportant aucun principe actif, autorisent la libre circulation, nationale et internationale, du champignon. Les intoxications sporadiques par le psilocybe ne doivent pas être négligées. Le diagnostic précoce par méthode

chromatographique permet de limiter les examens complémentaires et une prise en charge adéquate.

La consommation d'alcool associée à celle de cocaïne est fréquente. Le **cocaéthylène**, produit de transestérification de la cocaïne en présence d'alcool est pharmacologiquement actif. La comorbidité de cette association ont été étudiée par le **Dr C. ragoucy-Sengler** à partir d'une revue de la littérature et des résultats obtenus à partir d'une étude clinique réalisée entre 1996 et 1998 au CHU de Pointe à Pitre et à l'Institut Médico Légal de Strasbourg. L'étude clinique a été réalisée à partir de patients hospitalisés au CHU de Pointe à Pitre et les analyses ont été faites à Strasbourg. La prévalence de la consommation d'alcool parmi les toxicomanes chroniques à la cocaïne était de 47%. Le cocaéthylène peut être retrouvé dans le sang, les urines, la salive, les cheveux. Seule la fonction cardiaque semble différemment perturbée selon que le consommateur chronique de cocaïne consomme de l'alcool ou pas. En effet les consommateurs de cocaïne-alcool présentent, d'une manière très significative ($p < 0.001$), les signes d'une insuffisance cardiaque. Ces résultats confirment ceux des études précédemment publiées. Selon Andrews (1997), le cocaéthylène induit un risque de mort brutale de 18 à 25 fois plus importante que la cocaïne : les 2 décès enregistrés lors de cette étude correspondent à des patients consommateurs chroniques de cocaïne et d'alcool. Il a été conclu que le risque de surmorbidity et de surmortalité lié à la consommation simultanée de cocaïne et d'alcool doit conduire à rechercher et doser le cocaéthylène dans tout échantillon biologique prélevé chez un cocaïnomane.

Huestis et Cone ont proposé 2 modèles de calcul rétrograde permettant d'évaluer le moment de la prise de Cannabis à partir des taux plasmatiques de THC seul (modèle I) ou de THC et de carboxy-THC (modèle II). Puisque les modèles développés sont basés sur les taux plasmatiques, le **Dr C. Giroud** a déterminé les valeurs des rapports de concentration plasma/sang du THC et du carboxy-THC au cours d'une étude menée avec un groupe de 20 volontaires fumeurs invétérés de Cannabis. Dans un deuxième temps, une étude croisée a été réalisée à deux reprises avec chaque fois le même groupe de 6 volontaires sains auxquels il a été administré par voie orale du Cannabis sous la forme de décoction aqueuse ou d'infusion dans le lait. Les concentrations de THC, 11-OH-THC et de carboxy-THC dans les échantillons de sang complet prélevés périodiquement au cours de l'étude ont été déterminées par GC-MS. Les intervalles de temps (IT) séparant les ingestions des infusions de chanvre des prises de sang ont été déterminés au moyen des modèles de Huestis, en tenant compte de la distribution plasma/sang des cannabinoïdes et les résultats obtenus confrontés aux temps réels. En prenant en considération uniquement les temps pour lesquels les concentrations de cannabinoïdes étaient supérieures à 1 ng/ml de sang, il a été constaté que les valeurs de IT réelles étaient incluses dans les intervalles de confiance des valeurs calculées dans la mesure où la prise remontait à au moins 1 heure et ne dépassait pas une dizaine d'heures.

Quel que soit l'échantillon biologique analysé, une grande vigilance doit accompagner l'interprétation des résultats analytiques. Pour les échantillons urinaires, l'absence de spécificité des techniques immunologiques (réactivité croisée) a conduit les analystes à utiliser des méthodes séparatives de confirmation telles que la chromatographie en phase liquide ou gazeuse. En toxicologie médico-légale, tout résultat positif nécessite une confirmation par un second procédé indépendant. Pour l'analyse des cheveux, les risques potentiels de contamination passive par des agents externes ne doivent pas être minimisés. De plus, l'apparition (dans certains pays) de produits alimentaires, cosmétiques ou autres renfermant des produits stupéfiants rend l'interprétation

encore plus difficile. **Le Dr V. Cirimele** a récemment été confronté à trois exemples qui illustrent ces difficultés. a) Un homme de 63 ans, admis aux urgences psychiatriques, présentait des urines positives pour les dérivés amphétaminiques par immunoanalyse (FPIA et EMIT). La confirmation par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) s'est avérée négative pour l'amphétamine, la méthamphétamine, la méthylènedioxyamphétamine, la méthylènedioxyméthamphétamine, la 3,4-méthylènedioxyéthylamphétamine et les butanamines, mais positive pour la norfenfluramine (687 ng/ml). La fenfluramine (Pondéral®) n'a pas été retrouvée. L'analyse des cheveux a confirmé la seule présence de norfenfluramine (8,4 ng/mg). Lors d'un entretien, un traitement chronique par Médiator® (benfluorex, 150 mg, hypolipémiant) est évoqué. La consommation d'un comprimé de Médiator® par 2 sujets témoins du laboratoire a permis de confirmer le métabolisme du benfluorex en norfenfluramine et donc d'exclure un usage détourné de fenfluramine dans ce cas. b) Deux métabolites de la cocaïne (benzoylecgonine 812 ng/ml, ecgonine méthyl ester 691 ng/ml) ont été identifiés dans les urines d'une femme de 35 ans. Celle-ci déclare ne pas "sniffer" de cocaïne mais avoir consommé récemment un thé à base de maté de coca (Zurit®, ASA Alimentos S.A., Lima 05, Pérou) rapporté du Pérou (Fig 2). Après analyse, la teneur en cocaïne de ce thé a été évaluée à 3,9 mg/g. La consommation d'une infusion de ce thé par un sujet sain du laboratoire (38 ans) a positivé ses urines pour la cocaïne pendant 24 heures par FPIA (seuil à 300 ng/ml) et plus de 33 heures par CPG/SM. c) Un homme de 35 ans déclare n'avoir jamais consommé de cannabis alors que l'analyse d'un segment de ses cheveux a révélé la présence de D9-tétrahydrocannabinol (THC : 0,54 ng/mg), de cannabidiol (1,02 ng/mg) et de cannabinoles (0,73 ng/mg). Il explique ce résultat par l'utilisation quotidienne d'un shampoing à base de chanvre. L'utilisation quotidienne d'un shampoing (Fig 3) très riche en THC (412 ng/ml) par 3 sujets témoins (homme de 38 ans aux cheveux châtains, homme de 29 ans aux cheveux bruns et femme de 28 ans aux cheveux bruns) pendant deux semaines n'a pas positivé leurs cheveux pour les 3 cannabinoïdes recherchés. La connaissance de ces trois exemples renforce l'idée qu'un résultat positif doit systématiquement être confirmé par une technique spécifique et univoque. Néanmoins, même après confirmation, chaque résultat doit être interprété avec prudence en prenant en considération les facteurs susceptibles de moduler les conclusions, en particulier en matière de stupéfiants.

Un mois, un an, dix ans après le décès et l'inhumation d'un corps, il arrive que des éléments nouveaux d'une enquête rendent nécessaire des examens ou des observations complémentaires. Plus simplement, il peut arriver qu'une enquête ne soit réellement ouverte que longtemps après le décès et qu'une première autopsie soit ordonnée par le magistrat instructeur ainsi que des analyses toxicologiques. C'est par exemple le cas des homicides par empoisonnement et dont les circonstances de la mort sont d'abord restées inaperçues. Une analyse toxicologique sur un cadavre exhumé est toujours une tâche difficile. Au problème d'échantillonnage pour lequel les matrices ne sont pas nécessairement discernables se rajoutent les phénomènes de redistribution partiellement connus et une stabilité de la ou des molécules fréquemment inconnue. Dans ces conditions, il est bien difficile d'interpréter une concentration. Pupes, bouillie encéphalique, cheveux, dents, la matrice est parfois très difficile à travailler et représente une source supplémentaire d'interférences. Heureusement, dans de nombreuses affaires médico-légales, la seule mise en évidence d'une molécule peut s'avérer décisif pour l'enquête. Le Dr G. Pépin a présenté différents cas rencontrés en médecine légale. Un cas d'empoisonnement par l'hydroxyzine a été mis en évidence par l'analyse des cheveux de la victime après 3 mois d'inhumation. Un cas d'homicide par le chloralose a été découvert après une inhumation de 4 années (analyse du foie, des urines et des cheveux). Une

exhumation pratiquée 6 ans après le décès d'une personne âgée cachexique a révélé la présence anormale de pethidine, de prométhazine et de chlorpromazine (analyse des pupes et de la bouillie encéphalique). L'analyse toxicologique sur des corps exhumés est toujours un exercice délicat mais qui peut s'avérer décisif pour une affaire judiciaire. L'apport de la spectrométrie de masse tandem est considérable sur des matrices putréfiées grâce à sa haute spécificité.

Lors du drame de l'Ordre du Temple Solaire, survenu en décembre 1995 dans le Vercors, le laboratoire de Médecine Légale de Grenoble a eu pour mission de procéder à l'analyse toxicologique de prélèvements biologiques réalisés à l'autopsie, ainsi que de divers flaconnages saisis sur les lieux du drame. La première étape de screening toxicologique a été réalisée de façon systématique. Celle-ci a comporté, outre une recherche de cyanure par réaction colorée et un dosage de carboxy-hémoglobine par spectrophotométrie, la recherche des principales classes pharmaceutiques et celle des stupéfiants par FPIA. Un screening à large spectre a ensuite été effectué en HPLC et CPG/SM. Les résultats obtenus par le Dr H. Eysseric lors de cette première étape ont permis de confirmer les éléments d'orientation (emballages vides de digoxine et de benzodiazépines). Les dosages sanguins de benzodiazépines par CPG/NPD ou CPG/ECD ont permis la détection à des taux thérapeutiques de flunitrazépam dans 7 cas (2,2 à 5,0 ng/ml) et de tétrazépam dans 6 cas (50 à 680 ng/ml). Les dosages de digoxine par FPIA ont été confirmés à l'Institut Médico-Légal de Strasbourg.

Thème 2: Nouvelles technologies et toxicologie analytique à l'aube de l'an 2000

Le dosage sanguin des cyanures reste toujours délicat et consommateur de temps. Les techniques colorimétriques nécessitent généralement une diffusion du cyanure en cellule de Conway suivi d'une réaction colorée ou d'une fixation sur l'hydroxocobalamine pour former de la cyanocobalamine. La CPG ou CPG/SM nécessite également la volatilisation du cyanure en espace de tête couplée ou non à une micro-extraction (SPME). Quelques travaux font état de l'HPLC mais les techniques proposées restent complexes et nécessitent souvent une étape préalable de diffusion ou de dialyse. Sano et coll (J. Chromatogr.B., 1992, 582, 131-135) ont proposé une méthode HPLC simple et séduisante. Après déprotéinisation méthanolique du sang (50 ml), le surnageant est additionné de taurine et de 2,3-naphtalène-dialdéhyde à température ordinaire pour former un dérivé fluorescent. **Le Dr C. Lacroix** a appliqué cette technique à une intoxication mortelle (7,22 mg/L) par le cyanure et à trois prélèvements recueillis après des décès par incendie (cyanures 0,47 mg/L et CO 5,5 %; cyanures 0,26 mg/L et CO 3,9 %; cyanures 1,54 mg/L et CO 23,7 %). L'intérêt de cette technique réside dans sa rapidité et sa simplicité. Sa limite de détection (3 mg/L) permet également le dosage des cyanures chez les fumeurs.

Les parahydroxybenzoates de méthyle, d'éthyle, de propyle et de butyle (parabens) sont des conservateurs très employés dans les médicaments et les produits cosmétiques. Leur utilisation est alors réglementée : Pour les produits cosmétiques, la limite est de 0,4% (m/m) pour chaque paraben, avec une limite supérieure de 0,8% dans le cas d'un mélange. Classiquement, leur dosage s'effectue en chromatographie liquide haute performance (CLHP). **Le Dr L. Labat-Deschamps** a mis au point la séparation et le dosage de ces quatre dérivés par électrophorèse capillaire (EC). Une extraction simplifiée à partir de différents produits cosmétiques a été décrite, permettant de réaliser une étude

comparative de ces deux techniques, CLHP et EC, pour le dosage des parabens. Les parabens ont été extraits d'échantillons cosmétiques (prise d'essai de 1 g) de natures diverses (lotions, gels, crèmes...) par de l'éther éthylique en milieu acide. Des dilutions successives dans du méthanol puis dans les phases mobiles respectives ont été réalisées. En CLHP, les extraits sont analysés sur une colonne en phase inverse Lichrospher C18 (125 mm x 4 mm d.i, particules de 5 µm) par détection en ultraviolet à $\lambda = 260$ nm. L'utilisation d'un gradient de solvant méthanol et eau à 1% d'acide acétique a permis la séparation des conservateurs d'avec le phénoxyéthanol, couramment utilisé comme solvant des parabens. En EC les extraits ont été analysés sur un capillaire en silice fondue (700 mm x 75 µm d.i) conditionné par un tampon borate 15 mM à 15% de méthanol, en mode de détection ultraviolet à $\lambda = 295$ nm. Une différence de potentiel de 20 kV et une température de 40°C sont maintenus pendant l'analyse. Le temps d'injection est de 2,5 sec. Dans ces conditions, les durées d'analyse étaient respectivement de 40 min. et de 10 min. en CLHP et EC. Les limites de quantification étaient de 0,25 mg/ml en CLHP (1 mg/ml en EC) pour le méthylparaben et de 0,04 mg/ml en CLHP (0,2 mg/ml en EC) pour l'éthyl-, le propyl- et le butylparaben. La linéarité des deux méthodes a été vérifiée jusqu'à 40 mg/ml en CLHP (100 mg/ml en EC) pour le méthylparaben et jusqu'à 8 mg/ml en CLHP (20 mg/ml en EC) pour les autres dérivés. Pour les quatre parabens, les précisions étaient moins bonnes en EC (CV de 3,2% à 4,9%) qu'en CLHP (CV de 0,5% à 3,8%) (étudiées sur un type d'échantillon cosmétique). La méthode d'extraction des parabens mise au point pour cette étude comparative est une méthode simple et rapide. La technique chromatographique d'utilisation courante est plus sensible, plus reproductible mais nécessite un temps d'analyse beaucoup plus long. En revanche, le dosage des parabens en EC est une technique très rapide, facile à mettre en oeuvre en routine et de moindre coût.

Les fumées d'incendie agissent en provoquant des brûlures thermiques, une déplétion en oxygène et une poly-intoxication par les produits chimiques qu'elles renferment. Le monoxyde de carbone et les cyanures, connus pour leur très grande toxicité, ne peuvent toutefois expliquer à eux seuls la totalité des pathologies lourdes constatées. L'analyse des effluents gazeux prélevés au cours de "feux réels" et de "brûlages" en laboratoire de matériaux utilisés dans la fabrication de mobilier "grand public" a permis au **Dr A. Campillo** de retrouver de nombreux composés et d'établir une classification des molécules rencontrées en fonction de leur fréquence d'apparition, de leur abondance et de leur appartenance à une famille chimique. Parmi ces produits, certains sont certainement à l'origine de décès, de séquelles, voire de conduites inadaptées empêchant la fuite. Des brûlages expérimentaux ont permis de vérifier que, pour des conditions opératoires identiques et pour un même type de matériau, les composés obtenus étaient sensiblement différents selon la nature du traitement de surface. Ainsi les peintures et les colles sont responsables de l'augmentation significative du nombre de molécules libérées lors du chauffage des échantillons, dès la phase de pyrolyse, avant même l'apparition des premières fumées. L'analyse qualitative précoce des molécules présentes dans les fumées, réalisée sur les lieux mêmes d'un incendie urbain grâce à la présence d'un laboratoire "mobile" de spectrométrie de masse, paraît constituer une source précieuse de renseignements pour les services hospitaliers (urgences, réanimation et Centre Anti-Poisons) qui vont accueillir la victime. Par ailleurs, la découverte d'un produit "à effets cliniques retardés" peut être déterminante pour la mise en observation d'éventuels impliqués. Des mesures quantitatives par spectrométrie de masse doivent, dans un proche avenir, compléter cette étude: elles concerneront des molécules "à taux de présence élevée" et/ou pour lesquelles il existe des données toxicologiques suffisantes. La toxicité des produits chimiques sous forme de gaz

est peu connue notamment en matière de dosimétrie. Les valeurs disponibles dans la plupart des ouvrages de toxicologie concernent exclusivement le risque professionnel et correspondent à des normes d'exposition pour des produits pris isolément à température ambiante, ce qui n'est évidemment pas le cas dans les incendies. Par ailleurs le retentissement sur l'organisme humain, pour des expositions prolongées et/ou répétées même à doses subaiguës, reste mal connu et cette méconnaissance des effets à long terme rend extrêmement empirique la surveillance médico-professionnelle des pompiers. Enfin, des comparaisons "feux réels – brûlages", à condition de diversifier ces derniers, pourraient vraisemblablement permettre de mieux appréhender la composition des effluents présents dans les fumées et aider à dresser une sorte de "typologie" des feux, et donc des risques en fonction du lieu de survenue.

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse par interface électrospray (LC-ES-MS) s'est révélée efficace pour l'analyse de nombreux xénobiotiques inaccessibles à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Le but de l'étude menée par le **Dr P. Marquet** était de mettre au point et d'optimiser une méthode de recherche large ("screening") de xénobiotiques dans le sérum par LC-ES-MS, destinée à compléter la procédure par GC-MS utilisée en routine. La comparaison de différentes méthodes d'extraction a permis de choisir une méthode de concentration sur phase solide (Extrelut) avec reprise de l'extrait sec par un déprotéinisé de l'échantillon sérique. Un injecteur automatique, des pompes chromatographiques à micro-débit Perkin-Elmer 200MS et un spectromètre de masse API 100 Sciex équipé d'une source ionspray ont constitué le matériel analytique. La séparation chromatographique a été réalisée à l'aide d'une colonne Nucleosil C18, 5 mm (150 x 1 mm d.i.) et d'un gradient d'acétonitrile (5 à 95% en 40 min) dans une solution de formiate d'ammonium 5 mM, pH 3,0 comme phase mobile, délivrée au débit de 50 ml/min. Après ionisation de l'effluent chromatographique, les ions ont subi alternativement une faible et une forte fragmentation par collision dans la source (un balayage sur 2). Les ions positifs et les ions négatifs ont été ensuite alternativement transmis vers le spectromètre de masse (2 balayages sur 4), où ont été analysés en mode de spectre complet de 100 à 1100 uma, avec un pas de 0,2 uma. Le logiciel analytique et les macro-commandes mises au point avec la société Sciex ont permis d'enregistrer, puis de rechercher de façon automatique en bibliothèque les spectres de masse reconstitués (somme d'un spectre à faible fragmentation et d'un spectre à forte fragmentation), en mode positif et en mode négatif séparément. Chaque produit a été ainsi caractérisé au mieux par deux spectres de masse, correspondant à quatre conditions différentes. Environ 1200 xénobiotiques ont pu être analysés par le système décrit, avec des temps de rétention entre 1,5 et 47,4 min, permettant de constituer une bibliothèque d'environ 1000 spectres en mode positif et une autre d'environ 500 spectres en mode négatif. Les spectres de masse reconstitués se sont avérés aussi riches que les spectres obtenus par spectrométrie de masse en tandem, permettant une reconnaissance spécifique des produits. Une procédure de traitement du signal a été optimisée pour réduire le bruit de fond analytique, plus important en LC-ES-MS qu'en GC-MS. L'analyse d'échantillons de sérum provenant de l'activité de toxicologie hospitalière a mis en évidence la sensibilité, la spécificité et la puissance de cette méthode de "screening", permettant de détecter de nombreuses substances, en particulier polaires, échappant à nos procédures habituelles de "screening" par GC-MS, voire par HPLC couplée à un spectrophotomètre à barrette de diodes (HPLC-DAD). L'appareillage, les logiciels et la procédure analytique utilisés ont permis la mise au point d'une méthode efficace de recherche large de toxiques, complémentaire des méthodes conventionnelles faisant appel aux couplages GC-MS et HPLC-DAD.

Une quarantaine de plantes (genre ou espèce) sont responsables à travers le monde de 95% des décès publiés ayant pour origine un toxique végétal. Bien que l'ensemble des poisons disponibles ne soient pas tous connus avec précision, les molécules actives recensées sont susceptibles d'être dosées par des méthodes analytiques utilisant les chromatographies en phase gazeuse ou en phase liquide. Les méthodes disponibles sont peu nombreuses, pas toujours sensibles et/ou spécifiques et dédiées à quelques molécules ou métabolites. Il n'existe pas de méthode utilisable en toxicologie permettant une recherche large. Le **Dr M. Cheze** a mis au point une méthode générale de dosage des principaux toxiques par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse ou à la spectrométrie de masse tandem. L'extraction des molécules est conduite soit par précipitation des protéines, lavage par une phase organique pour l'atractyloside ; soit par extraction liquide-liquide à pH = 9,5 pour l'oléandrine, le taxol et certains alcaloïdes ; soit par triple extraction en phase liquide avec étape de purification acide/base pour les alcaloïdes bases faibles. La séparation chromatographique est réalisée en phase inverse sur une colonne C18 de 150 mm de long au moyen de deux phases mobiles acide ou basique en mode gradient. La détection des ions est généralement réalisée en mode positif, excepté pour le taxol (mixte) et l'atractyloside dont l'acquisition en mode négatif est la seule envisageable. La méthode a été appliquée avec succès dans différents cas médico-légaux présentés dont deux intoxications par un datura (atropine et scopolamine), deux par le vétrate (vératridine et cévadine), un par la lobélie (lobéline), un par l'atropine, un cas par la colchicine et un cas par la yohimbine. Enfin une affaire judiciaire vétérinaire rapporte l'empoisonnement de bovidés par un fourrage avec une plante adventice contenant de l'atractyloside.

Le **Dr M. Imbenotte** a rapporté un cas d'intoxication volontaire polymédicamenteuse associée à une ingestion de tétrahydrofuranne (THF) chez une femme de 55 ans. La patiente, après intubation et ventilation, a été hospitalisée en coma profond ; hypotonique, elle présentait une mydriase bilatérale et du charbon actif lui a été administré. L'évolution a montré une oesophagite et une gastrite sans gravité ainsi qu'une pneumopathie d'inhalation. La patiente est sortie de l'hôpital sans séquelle apparente au bout de huit jours. Une recherche toxicologique portant sur les salicylés, les barbituriques, les antidépresseurs, les benzodiazépines a été réalisée par les méthodes usuelles de la toxicologie analytique. La recherche de THF a été effectuée par analyse RMN 1H : deux échantillons, d'urine et de sang, obtenus à l'admission, ont été analysés sur un spectromètre Bruker DPX 300 MHz, en utilisant un capillaire titré d'acide 2, 2', 3, 3'-triméthylsilyl tétradeutéropropionique (TSP-d4) comme référence. Pour confirmer les résultats, des analyses par CPG-SM ont été réalisées sur un chromatographe HP5890 couplé à un spectromètre de masse quadropolaire HP5989, en impact électronique à 70 eV. Dans ce cas, les urines ont été extraites, soit par le dichlorométhane et l'extrait analysé tel quel, soit par l'acétate d'éthyle en milieu acide et l'extrait analysé sous forme de dérivés triméthylsilylés. Les analyses toxicologiques classiques ont permis de révéler la présence de zoldipem et de fluoxétine; aucune autre substance n'a été détectée. L'analyse par RMN 1H a permis de mettre en évidence dans le sérum et les urines, du THF et du GHB. L'identification de ces composés a été confirmée par CPG-SM. La quantification directe dans les échantillons biologiques a été effectuée par intégration des pics et en comparaison à celui du TSP-d4. Le THF a été mesuré à 11,3 mmol/L dans le sérum et 11,8 mmol/L dans l'urine (respectivement 813 et 850 mg/L). L'acide 4-hydroxybutyrique a été quantifié à 2,29 mmol/L dans le sérum et 28,6 mmol/L dans l'urine (respectivement 238 et 2974 mg/L). Les intoxications au THF décrites dans la littérature concernent des intoxications à long terme, en milieu professionnel, par contact ou inhalation. L'intoxication au THF décrite par le Dr M.

Imbenotte, a permis facilement de mettre en évidence, non seulement le toxique lui-même, mais aussi le GHB. Ce cas exceptionnel d'intoxication massive fournit un nouvel exemple, en complément des techniques habituelles, de l'efficacité d'aide au diagnostic et de quantification des xénobiotiques par spectroscopie RMN.

Contrairement à d'autres molécules, il n'existe pas pour le cannabis de concentration létale, ce qui a conduit d'aucuns à affirmer que l'on ne meurt pas du cannabis. Cependant, les troubles des fonctions sensorielles cognitives et motrices ainsi que l'ivresse cannabique sont bien connus et peuvent conduire des individus, jeunes pour la plupart, à des modifications comportementales graves pouvant avoir une conséquence mortelle. Les **Dr J.P. Goullé, P. Mura, G. Pépin, V. Dumestre-Toulet et P. Kintz** ont rapportés plusieurs cas réels (une voiture qui tombe d'un pont causant la mort de 5 personnes âgées de 20 à 25 ans, un motard qui s'écrase contre un arbre, les récits d'un conducteur qui percute violemment l'arrière d'un autre véhicule, la réalisation d'une mousse au cannabis par un cuisinier ayant conduit à l'hospitalisation de 5 individu et à un accident mortel de la circulation, un piéton écrasé par un automobiliste l'ayant confondu avec un sac poubelle, la perte de contrôle en ligne droite à l'origine d'un face à face mortel et la chute fatale d'un jeune homme à la descente d'un train). Dans tous les cas, les analyses toxicologiques ont révélé que le cannabis était présent dans l'organisme, illustrant ainsi le fait que si on ne meurt pas du cannabis, il tue.

L'Assemblée Nationale et le Sénat ont récemment adopté un projet de loi précisant qu'un dépistage de stupéfiants sera pratiqué chez les conducteurs impliqués dans un accident mortel et que les résultats positifs devront être confirmés par des examens cliniques et biologiques. Une étude réalisée en 1998 sur des échantillons sanguins prélevés pour la détermination de l'alcoolémie a permis de montrer que 19,5% d'entre-eux contenaient au moins un des stupéfiants recherchés (cannabis, amphétamines, cocaïne, héroïne) dont 16% du cannabis. Sensibilisés par ce problème de santé publique et par ces résultats, de nombreux Procureurs de la République ont devancé la mesure législative sus-citée et, s'appuyant sur la "mise en danger d'autrui" telle qu'elle est définie par l'article 223-1 du nouveau Code Pénal, requièrent des experts en pharmacologie et toxicologie pour effectuer la recherche de stupéfiants dans le sang de conducteurs impliqués dans des accidents mortels voire corporels graves. Le **Dr P. Mura** a regroupé tous les résultats obtenus au cours des 12 derniers mois (avril 1997 à avril 1998). 167 échantillons sanguins ont été analysés par CPG/SM, correspondant à 80 conducteurs impliqués dans un accident corporel et 87 dans un accident mortel. Le cannabis, recherché dans tous les échantillons, était présent chez 43 sujets (23 accidents mortels, 20 accidents corporels). Les opiacés, les amphétamines et la cocaïne ont été recherchés dans 128 cas. La morphine était présente dans 4 cas d'accidents corporels (associée à de la codéine dans 1 cas) et dans 7 cas d'accidents mortels (associée à de la codéine dans 3 cas). Des amphétamines étaient présentes dans 3 cas, 1 mortel (MDMA) et 2 corporels (amphétamine). La cocaïne était retrouvée dans 3 cas d'accidents corporels. Le résultat de cette étude confirment tout l'intérêt de rechercher la présence de stupéfiants chez les conducteurs impliqués dans un accident mortel et indiquent que la même démarche est tout aussi justifiée chez les conducteurs impliqués dans un accident corporel.

Le prélèvement non invasif de la salive présente un intérêt potentiel en tant qu'alternative aux prélèvements biologiques classiques (sang, urines). Les risques d'adultération de l'échantillon salivaire sont considérablement réduits car le prélèvement peut être effectué sous contrôle visuel du personnel médical ou d'officiers de police bien formés, ce qui est important dans le cas de la recherche des stupéfiants. En théorie, les concentrations salivaires de nombreux xénobiotiques

seraient fortement corrélées aux concentrations plasmatiques. Dans la majorité des publications disponibles, il apparaît cependant que les cinétiques salivaires des xénobiotiques diffèrent notablement des cinétiques sanguines, ce qui implique que la valeur diagnostique de la salive doit être étudiée séparément pour chaque analyte. Les résultats présentés par le **Dr N. Samyn** étaient issus de deux laboratoires ayant étudié les rapports salive/plasma (S/P) pour plusieurs drogues. Les échantillons analysés à Strasbourg provenaient de volontaires ou de toxicomanes admis au Service des Urgences. A Bruxelles, l'étude a été réalisée dans le contexte de la sécurité routière. Dans le cas de la cocaïne et de la plupart des opiacés, ayant un pKa proche du pH de la salive, un faible changement de pH (par stimulation du flux salivaire) induit un changement important du degré d'ionisation reflété par le rapport S/P. Tenant compte du fait que les protocoles de recueil salivaire sont très variables selon les études, les rapports S/P déterminés expérimentalement peuvent être différents des valeurs théoriques, calculées à partir des équations de Henderson-Hasselbach. De nombreuses publications ont décrit l'excrétion de la cocaïne et de ses métabolites dans la salive après administration par voie intraveineuse, intranasale ou fumée. La cocaïne est toujours l'analyte prédominant et les rapports S/P mesurés sont supérieurs à 1. La contamination de la cavité bucale après consommation sous forme sniffée ou fumée est significative durant les premières heures consécutives à l'administration. Les études effectuées en Belgique ont permis de mesurer des rapports S/P compris entre 15 et 36 pour la cocaïne et entre 0.6 et 1.3 pour la benzoylecgonine. A Strasbourg, les ratios S/P mesurés pour la benzoylecgonine étaient proche de l'unité. L'héroïne peut être détectée dans la salive après administration par voie intraveineuse, intranasale ou fumée. Les rapports S/P sont beaucoup plus élevés lorsque l'héroïne base est fumée. Ceci est de nouveau confirmé par les résultats de l'étude belge. La codéine a été détectée dans la salive de 3 volontaires durant une période de 9 à 12 heures après administration orale; les ratios S/P étaient supérieurs à 1. Dans le cas du cannabis, les ratios du D9-tetrahydrocannabinol ont varié de 1.16 à 7.56, probablement du fait d'une contamination de la cavité buccale lors de l'inhalation. Aucune étude contrôlée n'a été publiée sur le dosage salivaire des "designer amphétamines". Au cours des contrôles routiers en Belgique, les rapports S/P mesurés pour l'amphétamine et ses dérivés étaient presque toujours supérieurs à 5. Pour la plupart des stupéfiants, les concentrations salivaires et la fenêtre de détection sont au moins de l'ordre de celles du plasma. Ainsi, la positivité pour un composé dans la salive signe une prise récente et serait donc plus représentative d'une modification de la vigilance au moment du prélèvement qu'un résultat positif obtenu à partir d'un échantillon urinaire.

Pour échapper à la détection de leur toxicomanie, certains usagers ont recours à l'adultération de l'urine qui va être testée. Le **Dr A. Verstraete** a présenté différentes méthodes et produits proposés sur Internet et dans certaines publications qui circulent parmi les toxicomanes. L'adultération peut se faire *in vivo* et *in vitro*. Le but de l'adultération *in vivo* est d'absorber avant le prélèvement urinaire une substance médicamenteuse, chimique ou naturelle, qui réduit considérablement la concentration urinaire du produit à détecter, sa fenêtre de détection ou bien qui modifie les caractéristiques physico-chimiques de l'urine pour perturber le test de dépistage. Les méthodes utilisées sont la dilution, le lavage (flushing), les modificateurs du pH urinaire et les médicaments comme l'aspirine, le métronidazole, la vitamine B2, le fluconazole, l'ibuprofène et le probénécide. L'adultération *in vitro* consiste en un ajout une fois l'urine émise. Les produits utilisés sont le nitrite de potassium et de sodium, les alcalis et acides faibles, le glutaraldéhyde, les oxydants, les savons, le NaCl et les produits riches en sels, le sang, le thé Golden Seal® et les collyres. L'adultération par

certaines produits peut être détectée par l'aspect (couleur, turbidité) de l'urine, l'odeur, la mesure de la température de l'urine immédiatement après le prélèvement, du pH, de la créatinine, de la densité, de l'osmolalité, des nitrites et du glutaraldéhyde. Certaines bandelettes de détection d'adultérants sont disponibles. Pour les grandes séries, ces tests sont également disponibles sur des automates de type Hitachi. Il y a peu de données sur la fréquence d'urines adultérées, mais les auteurs s'accordent pour dire qu'elle n'est pas grande (< 0.1 %). L'identification de l'adultération demande cependant un grand investissement en temps et matériel de la part du laboratoire et certains comme les collyres sont difficilement détectables. La détection de l'adultération urinaire se doit donc d'être une préoccupation du laboratoire de toxicologie aujourd'hui et il y a lieu de mettre en place des procédures de prévention, tout en respectant les droits du sujet testé.

Une étude épidémiologique rétrospective des accidents de plongée survenus dans les Bouches du Rhône de 1991 à 1993, confirmée dans les années suivantes a souligné la vulgarisation de la pratique de ce sport, la multiplication des accidents à symptomatologie atypique, enfin l'aveu fréquent de prises médicamenteuses diverses. Par une étude prospective à la recherche de toute imprégnation médicamenteuse et toxique de la population des plongeurs accidentés, Le **Dr E. Bergmann** a tenté d'établir un rôle éventuel dans la survenue de l'accident mais également un diagnostic différentiel en cas de symptomatologie inhabituelle. Du 1 avril 1995 au 31 décembre 1998, tous les patients admis à l'hôpital Font-Pré de Toulon et à l'hôpital Salvator de Marseille pour accident de plongée ont fait l'objet de prélèvements sanguins et urinaires systématiques. Un screening toxicologique est réalisé par des techniques immunochimiques (Emit et FPIA), par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et par chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diodes après extraction sur colonne SDS. Le monoxyde de carbone et l'éthanol ont été systématiquement recherchés. 320 plongeurs ont été explorés, 124 bilans se sont avérés négatifs. Aucune intoxication au monoxyde de carbone n'a été retrouvée. Dans 120 cas, la prise de salicylés après l'accident a pu être confirmée. Les produits utilisés lors de la prise en charge de l'accidenté (pentoxifylline, buflomedil, metoclopramide) ont été retrouvés dans 31 cas. L'éthanol est retrouvé uniquement dans 2 cas. 9 imprégnations par les stupéfiants (3 opiacés, 4 cannabis et 2 amphétamine) n'ont pu être formellement rendues responsables de la survenue ou de la symptomatologie des accidents présentés. Enfin les traitements pour une pathologie intercurrente ont été décelés en particulier la chloroquine, les benzodiazépines, les dérivés de l'éphédrine souvent associés au paracétamol. Dans 8 cas, l'analyse toxicologique a permis d'expliquer la symptomatologie atypique. Malgré le développement récent de la plongée sous-marine en tant que loisir accessible à tous, la population des pratiquants semble globalement conserver une hygiène de vie satisfaisante au cours de son activité. Contrairement aux études réalisées sur les accidentés de la circulation, à l'heure actuelle et dans le cadre de cette étude, aucune corrélation entre l'imprégnation médicamenteuse ou toxique et l'accident n'a été retrouvée.

Le **Pr J.P. Anger** a présenté le cas d'un homme dépressif de 39 ans s'étant suicidé par ingestion de phosphore d'aluminium, un puissant taupicide. La victime, un ingénieur du Service de la Protection des Végétaux, s'était procuré le produit sur les lieux de son travail. Le phosphore d'aluminium au contact de l'humidité dégage de grandes quantités d'hydrogène phosphoré, gaz très toxique. A la demande des autorités judiciaires une autopsie médico-légale a été réalisée ce qui a permis d'écartier une autre cause de décès. Les constatations macroscopiques lors de l'autopsie ont mis en évidence un syndrome asphyxique très important avec congestion viscérale majeure. Des prélèvements de sang, urine, foie, rein, surrénale, cerveau et coeur ont été placés dans de petites fioles serties pour

être analysés. Pour ces échantillons, le dosage de l'hydrogène phosphoré a été réalisé par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode de l'espace de tête. Après digestion acide des échantillons, les dosages de phosphore total et d'aluminium ont été réalisés par spectrométrie d'émission avec excitation par plasma - spectrométrie de masse (I.C.P-M.S). Les prélèvements des principaux viscères ont bénéficié d'un examen anatomo-pathologique. L'hydrogène phosphoré était présent principalement dans le cerveau (94 µg/g), le foie (24 µg/g), le rein (41 µg/g), les surrénales (2,4 µg/g) et le coeur (0,9 µg/g) mais absent dans le sang et l'urine. Les teneurs en phosphore total et aluminium sont très nettement supérieures aux valeurs usuelles publiées. Elles ont donné les résultats suivants : Phosphore total : sang (76,3 mg/l), cerveau (4,3 mg/g), foie (8,2 mg/g), surrénale (4,5 mg/g), rein (2,05 mg/g) ; Aluminium : sang (1537 mg/l), cerveau (36 mg/g), coeur (4,6 mg/g), foie (75 mg/g), surrénale (44 mg/g), rein (3 mg/g). Ce cas était l'occasion de rappeler la rareté de cette intoxication en France et la toxicité de l'hydrogène phosphoré.

L'acétone est normalement produite en très faible quantité dans l'organisme. Hormis les exceptionnels cas d'intoxication par ce solvant ou l'isopropanol, son élévation est le témoin d'une déviation métabolique. Le glucose constitue la principale source d'énergie pour les cellules, mais dans certains nombre de circonstances, ce substrat n'est pas disponible (diabète, jeûne prolongé, maladie métabolique). Les acides gras provenant de la métabolisation des tissus adipeux fournissent alors l'énergie de substitution indispensable. Les produits finaux de ce catabolisme sont les corps cétoniques. L'acétonémie s'avère extrêmement utile pour apprécier la gravité de la déviation métabolique. Par ailleurs, immédiatement après le décès, les paramètres biochimiques classiques n'étant pas interprétables, la mesure de l'acétone est le seul marqueur valide post-mortem qui permet de confirmer le diagnostic de diabète acido-cétosique grave ayant conduit au décès. Depuis 5 ans, dans le cadre de la détermination systématique de l'éthanolémie et de substances volatiles par HS-GC/MS, le **Dr J.P. Goullé** a relevé 2 cas médico-légaux présentant des acétonémies élevées (1100 et 250 mg/l) et 1 cas décédé aux urgences de l'hôpital malgré les manoeuvres de réanimation (440 mg/l). Les valeurs habituellement admises sont les suivantes: N < 20 mg/l, concentrations toxiques 200 à 400 mg/l, valeur létale 550 mg/l. Ces 3 observations ont été comparées à celles de comas diabétiques acido-cétosiques graves de sujets ayant survécu après réanimation.

Le dosage de la cotinine, métabolite principal de la nicotine, dans le sérum, la salive ou les urines, peut être utilisé comme marqueur des habitudes tabagiques d'un patient. Sa demi-vie, plus longue que celle de la nicotine, lui permet d'être retrouvée en plus grande quantité et pendant un temps plus long dans les liquides biologiques. **Le Dr B. Poussineau** a proposé le dosage de la cotinine dans le méconium par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse comme critère d'imprégnation tabagique chez le fœtus. Après consentement éclairé, 43 patientes ont été incluses dans l'étude. Un interrogatoire a permis leur classement en non-fumeur ou fumeur, actif ou passif. Un prélèvement sanguin a été effectué dans le cadre du bilan systématique réalisé lors de l'accouchement, ainsi qu'un prélèvement de sang du cordon. Le taux de carboxyhémoglobine dans le sang maternel et dans le sang du cordon a été corrélé à la concentration de cotinine dans le méconium. La cotinine a été dosée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Hewlett Packard 5971A) après extraction par le dichlorométhane. La quantification a été effectuée à l'aide d'un étalon deutéré (cotinine D3). Le domaine de linéarité s'étendait de 20 à 200 ng de cotinine par gramme de méconium. D'après l'interrogatoire, 24 patientes étaient non-fumeuses et 15 fumeuses, alors que dans 2 cas l'interrogatoire n'a pas permis de classer les patientes. Parmi les 41 échantillons analysés, 13 contiennent de la cotinine et 28 en

étaient dépourvus. Il a été mis en évidence une corrélation entre la présence de cotinine dans le méconium et le taux de carboxyhémoglobine chez 9 enfants. Les résultats étaient discordants pour 3 patients et non-interprétables chez un patient. Les résultats obtenus ont montré qu'il existe, en général, une bonne corrélation entre le taux de cotinine du méconium et le taux de carboxyhémoglobine chez le fœtus et chez la mère. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse semble donc être une méthode appropriée au dosage de la cotinine dans le méconium et de nouvelles études devraient permettre son optimisation.

Les oxydes d'azote et les oxydants à demi-vie longue contenus dans la phase goudronneuse de la fumée de cigarette sont responsables in vitro de l'oxydation de la vitamine C, de la vitamine E et de l'acide urique. Chez l'adulte, l'inhalation de la fumée de cigarette entraîne une diminution de la vitamine C. Le **Dr V. Millet** a étudié les modifications du statut en antioxydants plasmatiques induites par le tabagisme maternel chez le nouveau-né. Le dosage des antioxydants suivants: vitamines A, E, C (HPLC), acide urique, bilirubine (Analyseur automatique) et la détermination du pouvoir antioxydant total du plasma selon la méthode du FRAP ont été effectués chez 41 couples mère-enfant. Les prélèvements sanguins chez la mère et au sang du cordon ont été réalisés après obtention du consentement éclairé. Les individus ont été répartis en 2 groupes selon la présence ou non de cotinine dans le méconium. Dans 13 cas, la présence de cotinine a affirmé l'imprégnation tabagique fœtale. Les cas négatifs (n=28) constituaient le groupe de référence. Les taux d'acide urique étaient significativement plus bas dans le groupe des mères tabagiques, aucune modification n'a pu être mise en évidence chez l'enfant. Les taux maternels en vitamine C étaient très bas dans les deux groupes, alors que les taux fœtaux étaient normaux. Le tabac a entraîné une diminution significative du FRAP chez les mères, chez le nouveau-né cette diminution n'était pas significative. Le statut en antioxydants maternels est altéré par le tabagisme, comme en témoigne la diminution du pouvoir antioxydant total du plasma. L'imprégnation tabagique fœtale, certifiée par le dosage de la cotinine, n'a pas entraîné pas de modification significative du statut néonatal en antioxydants.

L'utilisation des pesticides aussi bien en santé publique (lutte anti-vectorielle) qu'en agriculture, suscite quelques inquiétudes liées notamment à leur toxicité et à leur impact sur l'homme et son environnement. Alors que, dans les pays développés, une restriction sévère frappe ces produits, dans les régions sous développées la situation est tout à fait différente. C'est le cas en particulier du DDT dont l'usage agricole est actuellement interdit dans la plupart des pays développés. L'objectif de l'étude du **Dr A. Diouf** qui s'inscrit dans le cadre du contrôle de la pollution de l'environnement par les pesticides, consistait à vérifier si le pp'DDT (poison cumulatif) était encore utilisé au Sénégal. Le bioindicateur choisi a été la feuille de manguier. Les prélèvements des échantillons de feuilles de manguier ont été effectués dans différents sites se trouvant sur l'axe Dakar-Thiès (Sénégal). L'analyse par chromatographie en phase gazeuse d'extraits hexaniques purifiés des différents échantillons a permis de constater la présence du pp'DDT et de ses métabolites. La comparaison des teneurs en pp'DDT par rapport à celles de son principal métabolite (pp'DDE) a permis de différencier une contamination ancienne d'une utilisation plus ou moins récente. Les faibles teneurs en pp'DDT (en moyenne 2,6 ng/g d'échantillon) associées à des teneurs élevées en pp'DDE (en moyenne 27,6 ng/g d'échantillon) ont indiqué une contamination ancienne. Les teneurs en pp'DDT les plus importantes (en moyenne 35,3 ng/g d'échantillon), associées à de faibles teneurs en pp'DDE (en moyenne 9 ng/g d'échantillon) ont été retrouvées dans les échantillons provenant de zone de maraîchage. A partir de ces résultats, il a été conclu que le DDT, pesticide caractérisé par sa grande rémanence, était encore utilisé dans certaines zones du pays, notamment dans les zones de cultures maraîchères.