



Compte-rendu du congrès de Toxicologie de Martigny, 19 au 21 Juin 2002

C'est en la ville de Martigny dans la superbe vallée du Trient en Suisse que des scientifiques du Centre de Compétence en Chimie et Toxicologie Analytiques (CCCTA) ont organisé une rencontre internationale francophone de toxicologie en associant le dixième congrès de la Société Française de Toxicologie Analytique (SFTA) et les sixièmes journées scientifiques du CCCTA.



Des conférences, des communications et des posters ont été présentés, ils ont été regroupés par thèmes.

- [La toxicologie prédictive](#), p1
- [Expertises et média](#) p2
- [Les plantes hallucinogènes](#) p2
- [Le dopage](#) p 4
- [Conduite automobile sous l'emprise de drogue](#) p 6

Une partie analytique comprenant

- [Le dosage des xénobiotiques faiblement dosés](#) p 9
- Les [extractions](#) p 10
- [L'immunoanalyse](#) p10
- [La chromatographie liquide/spectrométrie de masse \(LC-MS\)](#) p 11
- [L'ICP-MS](#) p14
- [Les intoxications par les médicaments](#) : p15 apomorphine , hypoglycémiant, le Lopinavir p 16, les [benzodiazépines](#) p16, les [cardiotropes](#) p17, les [diurétiques](#) p 20, les [produits euthanasiants](#) p 21,
- [Les cheveux et autres matrices alternatives](#) p 22 : (toxicomanie, éthylglucuronide, 19-norstéroïdes, furosémide, cocaïne...)
- [Les contrôles de qualité](#) p 26
- [La modélisation moléculaire](#) p 27

Les présentations étaient de qualité. Des thèmes originaux ont été abordés comme la toxicologie prédictive et les média et les expertises judiciaires, ainsi que des thèmes d'actualité comme la conduite automobile sous l'emprise de drogue et le dopage.

Au niveau analytique, les apports de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) ont été largement démontrés. Les concentrations retrouvées dans les cas d'intoxications par des médicaments ou produits euthanasiants vont enrichir nos données de référence.

La toxicologie prédictive

Toxicologie prédictive. Présenté par **Denis Hochstrasser**, associé à Marc Fathi du Laboratoire Central de Chimie Clinique des Hôpitaux Universitaires de Genève.

Plutôt que de faire une série d'analyses après avoir donné à un patient un traitement dont les effets secondaires ne sont pas négligeables, des développements récents en génomiques, transcriptomiques et protéomiques offrent la possibilité d'effectuer de la toxicologie prédictive, c'est-à-dire, d'étudier les processus toxiques au niveau de l'expression des gènes à large échelle. Une connaissance " mécanistique " de l'effet toxique des médicaments sur le réseau épigénétique peut être obtenue en utilisant les outils bio-informatiques appropriés. Il est très probable que ces outils de recherche pourraient être appliqués en clinique de routine dans un avenir proche. Ainsi, le traitement médicamenteux des patients pourra être adapté prospectivement en tenant compte de leur prédisposition génétique et de l'environnement. Des exemples ont été donnés notamment celui d'une patiente ayant présenté des complications hépatiques après avoir eu une quadrithérapie antituberculeuse. La présence de certaines enzymes intervenant dans l'action des médicaments est liée au patrimoine génétique. En établissant un génotype, on peut mieux adapter la posologie et être vigilant aux interactions médicamenteuses. Ce sujet est développé dans " Health on the net " : www.HON.CH

Ce sujet très novateur donne des perspectives intéressantes et en même temps nous rappelle nos limites lorsque en toxicologie médico-légale nous avons à interpréter des taux post-mortem.

Expertises et média

Expertises et média : la vérité n'appartient pas qu'aux journalistes

Présenté par **Pascal Kintz** de l'Institut de Médecine Légale de Strasbourg,

P. Kintz nous a rapporté, par de nombreux exemples, les liens qui existent entre la presse et les travaux des experts traitant d'affaires médiatiques.

L'objectif des média est de vendre leur journal ou de faire de l'audimat. Les décès de personnalités et les crimes sordides font partie des sujets qui émeuvent ; le dopage des sportifs est un sujet qui intéresse et la preuve scientifique est attendue avec impatience.

Cette presse peut être également utile à l'expert pour asseoir sa notoriété ou favoriser sa promotion. Depuis le procès Festina, plus personne n'ignore la place des cheveux dans la lutte contre le dopage et le refus du CIO et de certains dirigeants de considérer cette matrice comme utile. A l'opposé, les incertitudes de la science et en particulier de la toxicologie ont porté tort à notre discipline. En France, les contestations dans l'affaire de la Josacine empoisonnée ou dans les résultats de l'expertise du chauffeur de Diana ont marqué les esprits, chacun dans le public se substituant alors à l'expert. Enfin, quand les journalistes mènent l'enquête ou refont les investigations, les débordements sont parfois inévitables.

Les plantes hallucinogènes

Laurent RIVIER de chez " Laurent Rivier Scientific Consulting " à Lausanne, Suisse, nous a présenté : **Ethnotoxicologie de l' Ayahuasca**

Une décoction hallucinogène, appelé Yage ou Yaje, en Colombie, Caapi au Brésil et Ayahuasca en Équateur et au Pérou, est régulièrement utilisée par de nombreuses tribus indigènes depuis des siècles. Elle est préparée principalement à partir du tronc d'une plante grimpante Banisteriopsis Caapi. Les sections de cette liane sont bouillies avec les parties aériennes d'autres plantes (telles que Psychotria viridis ou Diplopterys cabrerana). Cette boisson très amère contient des alcaloïdes hallucinogènes puissants de type bêta-carboline tels que l'harmine, l'harmaline, et surtout la d-tetrahydroharmine, accompagnés le plus souvent par la N,N-diméthyltryptamine (DMT). L'absorption de 2 à 3 dL de cette préparation provoque après 20 à 30 min environ l'apparition de visions colorées comparables à celles obtenues avec la mescaline, la psilocybine ou le LSD. Le temps d'action de la drogue qui peut durer de 2 à 6 heures, dépend de la nature du mélange des bêta-carbolines et de l'action synergique qui se développe entre la DMT et ces dernières. De telles préparations hallucinogènes - beaucoup d'entre elles ayant en plus une action émétique, purgative ou cathartique et facilitant l'induction de rêves - sont utilisées traditionnellement pour accéder à des états de conscience que les indigènes croient favorables pour effectuer un voyage dans le monde des esprits. Les médecins-sorciers ou shaman en sont les spécialistes après un apprentissage long et difficile. Découvertes au début du 20ème siècle, des manifestations similaires à la consommation de l'Ayahuasca sont encore observables dans d'autres parties du monde. L'usage du peyolt (Lophophora williamsii) chez certaines tribus du Nord-Ouest du Mexique et l'emploi traditionnel de la racine d'iboga (Tabernanthe iboga) dans le centre de l'Afrique de l'Ouest en sont les exemples les plus typiques. Echappant à la tradition indigène, des " églises " - basées sur la consommation rituelle d'Ayahuasca sont nées au Brésil à partir de 1930 avec l'afflux de colons dans le bassin de l'Amazone. En dépit de différences, toutes ces pratiques partagent des ressemblances qui dérivent de la nature intégrative de l'action de l'Ayahuasca elle-même. Les alcaloïdes de l'Ayahuasca sont généralement considérés comme des stupéfiants selon la loi. Suivant les pays, les plantes et la préparation elle-même ne le sont pas systématiquement. Comme l'usage de l'Ayahuasca s'étend rapidement en dehors du Brésil, cette nouvelle " consommation sauvage " représente des risques liés de la

prohibition. Ces dernières années des " églises " en Europe et aux Etats-Unis ont subi plusieurs saisies et arrestations. Beaucoup de cas sont en suspens devant les tribunaux, pourtant une décision le 21 mai 2001 de la cour hollandaise a acquitté les adeptes d'une de ces églises en invoquant le droit constitutionnel à la liberté de religion.

Certains pseudo-scientifiques se sont emparés de la question pour y apporter une " diversification légale " par la sélection de plantes plus facilement accessibles. Certaines échoppes appartenant à la culture alternative proposent généralement par Internet, soit la drogue elle-même, soit les ingrédients de base pour confectionner soi-même le breuvage. Diverses recettes sont proposées. Une adresse de forum réunit les internautes qui peuvent confronter leurs expériences. Actuellement, on constate une tendance à utiliser tout et n'importe quelle plante psychotrope, peu importe sa toxicité de base. Un projet de traitement de toxicomanes péruviens se propose d'utiliser comme traitement curatif non seulement l'Ayahuasca, mais aussi toute une panoplie de plantes réputées "dépuratives" dont certaines sont reconnues comme hautement toxiques. L'introduction de ce type de pratiques en dehors de son cadre traditionnel fait craindre les manipulations et les fraudes. Les centres anti-poisons et les laboratoires de toxicologie doivent être avertis de l'existence de ce nouveau phénomène au cas où ils seraient amenés à être confrontés un jour à des accidents éventuels résultant de ces dérives.

Y. Gaillard, et col. du LAT, La Voulte sur Rhône, France a présenté : Identification de la 5-hydroxy-diméthyltryptamine (5-OH-DMT) dans le Takini, breuvage shamanique des hauts plateaux guyanais

Dans l'étude des plantes médicinales et toxiques de la Guyane française publiée en 1987, Greland et Moretti avaient signalé l'usage par les shamans de la communauté Palikur du latex de *Brosimum acutifolium* comme hallucinogène, cette drogue étant dénommée Takini. Cette découverte soulevait plusieurs questions : Les analyses effectuées alors ne permettaient pas de conclure quant à l'action psychotrope de la drogue. Par ailleurs, l'usage populaire répandu de cette espèce sous le nom de mururé dans toute l'Amazonie paraissait peu compatible avec des propriétés hallucinogènes prononcées du latex, dont les écorces sont fortement imprégnées. Le latex a été prélevé en Guyane française, sur 2 individus différents. Le premier liquide qui s'écoule d'aspect laiteux et translucide a été séparé du latex de couleur rouge sombre qui s'écoule ensuite et qui est selon les enquêtes, utilisé par les shamans.

Une recherche des molécules psychoactives a été réalisée après extraction liquide-liquide du latex en présence de psilocine d-10, servant d'étalon interne. L'analyse qualitative a été opérée au moyen d'une CPG-SM-SM Saturn 2000 suivant différent mode d'ionisation et au moyen de réactifs de dérivation variés en utilisant le logiciel de recherche développé au sein du laboratoire.

La 5-OH-DMT a été identifiée puis dosée après dérivation au BSTFA. La teneur moyenne dans le latex a été mesurée à 25 µg/ml.

Les enquêtes ethnobotaniques extensives menées en Guyane montrent que le Takini représente un complexe culturel particulier aux communautés de l'est des Guyanes, et que cet usage recouvre l'aire d'extension de la sous espèce : *Brosimum acutifolium* Huber ssp *acutifolium*,

Cette espèce n'est pas mentionnée par Schultes dans sa monographie sur les plantes hallucinogènes.

Dans le latex de cette espèce a été mis en évidence de la 5-OH-DMT, un composé dont les propriétés psychotropes peuvent expliquer l'usage comme hallucinogène dans le plateau des Guyanes. La prise de 500 ml du latex de l'arbre comme décrite par les shamans représentant une dose active totale de 5-OH-DMT de 10 à 15 mg.

Le dopage

Michel AUDRAN de la Faculté de Pharmacie de Montpellier nous a présenté : Dopage dans les sports d'endurance: substances et détection.

Le facteur primordial de la performance physique dans les sports d'endurance (courses de fond, ski de fond, cyclisme...) est le rendement énergétique aérobie. Il est exprimé par la consommation maximale en oxygène ou VO₂max. Les facteurs physiologiques susceptibles de limiter cette VO₂max sont : le système pulmonaire, le débit cardiaque maximal, la capacité de transport de l'O₂ dans le sang et certaines caractéristiques des muscles squelettiques telles que la densité des capillaires, la concentration en enzymes, la masse musculaire. Dans le domaine de la physiologie de l'effort physique, la VO₂max est limitée par la capacité du système cardiovasculaire (cœur, poumons et sang) à transporter l'O₂ au muscle et non par la capacité des mitochondries des muscles à consommer l'O₂. D'où l'idée qu'une augmentation " artificielle " du transport de l'O₂ devrait améliorer la performance dans les sports d'endurance.

La première idée fût d'accroître la concentration sanguine en hémoglobine (Hb) en augmentant le nombre d'érythrocytes circulants. Ceci peut être obtenu tout naturellement en effectuant des stages en altitude de trois ou quatre semaines et, aujourd'hui d'une façon moins naturelle, grâce aux chambres hypoxiques ou hypobares, dont l'usage est de plus en plus répandu. Mais un accroissement immédiat du nombre d'érythrocytes circulants peut être obtenu par re-infusion de 1000-2000 ml de sang total ou 400-500ml de globules rouges, prélevés quelques semaines ou quelques mois plutôt sur le sportif concerné. Il s'agit là d'un procédé de dopage, avec effets

immédiats, initié par les athlètes scandinaves dans les années soixante. Il est évidemment interdit mais cependant indécélable.

En 1989 la commercialisation de l'érythropoïétine (Epo), sous la forme d'érythropoïétine recombinante humaine (rhu-Epo), a mis fin, au moins pendant la dernière décennie, à la pratique de la transfusion sanguine. Sa facilité d'utilisation a permis d'étendre la pratique du " dopage sanguin " dans le milieu sportif. Aujourd'hui, à côté de l'Epo l'ARANESP (Epo retard) et de l'Epo d'origine humaine (Dynepo), de nouveaux médicaments, sont susceptibles d'être détournés à des fins de dopage. Il s'agit des transporteurs d'oxygène (émulsions de perfluorocarbures et solutions d'hémoglobines) et des modificateurs allostériques de l'hémoglobine, molécules permettent à cette protéine de libérer plus d'oxygène au niveau des tissus qu'elle ne le fait naturellement. D'ici quelques années, la thérapie génique risque de venir compléter l'arsenal des méthodes de dopage. Le dépistage de l'utilisation illicite des xénobiotiques ne pose pas de problème analytique particulier, mais le milieu biologique prélevé pour le contrôle doit pouvoir permettre leur détection. Le dépistage du dopage avec des composés endogènes est bien plus complexe puis qu'il faut faire la différence entre la production endogène et l'apport exogène. Le dépistage de la transfusion sanguine autologue n'est toujours pas possible. La mise au point du dépistage du dopage à l'Epo recombinante humaine a certainement constitué l'avancée la plus remarquable dans la lutte anti dopage de cette dernière décennie. Elle est basée sur des différences de profils isoélectriques de l'Epo urinaire qui sont eux-mêmes la conséquence de différences structurales entre Epo physiologique et recombinante. Néanmoins ce mode de détection est limité, en raison de la courte demi-vie de l'Epo, à quelques jours après l'arrêt du traitement, alors que l'effet dopant peut persister plusieurs semaines. D'autre part, la commercialisation prochaine d'un Epo d'origine humaine et, dans quelques années peut être, la thérapie génique, pourraient limiter le champ d'application de cette technique au demeurant lourde à mettre en œuvre et quelque fois même à interpréter. Les méthodes " indirectes ", basées sur la détermination d'un certain nombre de paramètres hématologiques et biologiques, trop tributaires du protocole d'administration de l'Epo et des substances adjuvantes, le fer en particulier, sont inaptes à fournir une preuve irréfutable d'un dopage. La solution, au moins dans un futur proche, serait d'établir un profil hématologique individuel des athlètes avec quelques paramètres seulement. Le suivi régulier de ce profil au cours de l'année permettrait d'éliminer momentanément des compétitions tout athlète dont les paramètres sortiraient de l'intervalle de variation physiologique, préalablement déterminé sur une population de sportifs pratiquant la même activité. Le développement des techniques de la biologie moléculaire pourrait, à plus long terme, permettre de mettre en évidence la sur-expression ou la sous-expression de gènes suite à l'administration de substances actives sur l'érythropoïèse, et dont la quantification relancerait l'intérêt pour les méthodes indirectes de détection.

Marjorie Cheze, et col, Laboratoire Toxlab, Paris. a présenté : Saisie judiciaire d'une ampoule d'"hemassist" : une démarche analytique lourde pour un résultat inattendu

Les Experts ont été requis pour l'examen d'une solution incolore suspectée dopante, contenue dans une ampoule bouteille de 2 ml dont l'étiquette indiquait " HEMASSIST Baxter - Recombinant human hemoglobine - (2000 uI) 1ml - i.v i.m s.c. use- STOREAT 2°-30°" et ne correspondait pas à celle du produit effectivement commercialisé par cette firme qui, de ce fait, portait plainte. Un seul millilitre était disponible pour analyse, une seconde fiole devant demeurer pour une contre expertise éventuelle. Les auteurs présentent la démarche et les méthodes analytiques mises en œuvre pour la recherche des substances dopantes chimiques et protéiniques connues à ce jour, sur un très faible volume.

A - Techniques mises en œuvre pour l'identification des hormones, peptides, polypeptides et protéines : La recherche d'hemassist était faite par perméation de gel et détection à barrette de diodes. La recherche d'EPO (et ARANESP ou EPO retard), de HCG (human chorionic gonadotrophin), de LH (hormone lutéinisante), d'ACTH (adrenocorticotrophic hormone), de GH (growth hormone), d'IGF-1 (insulin-link growth factor) et d'insuline étaient réalisées par immunodosages.

La recherche large de protéines était réalisée par micro méthode à détection de fluorescence pour une sensibilité de 1 µg/ml.

B - Techniques mises en oeuvre pour l'identification des composés organiques et inorganiques :

La recherche de molécules organiques était réalisée par screening en injection directe sur CPG/MS - HP5890 / 5973 et HPLC/BD sur chaîne Alliance Waters puis infusion directe et injection sur colonne C18 mode gradient en LC/MS LCQ-Duo à trappe d'ions de Thermo-Finnigan (max 2000 uma)

La recherche d'éléments inorganiques était réalisée par ICP/MS sur Elan 5000A de Perkin Elmer.

Une recherche d'absorption IR était également réalisée sur le lyophilisat par accumulation de signal compte tenu de la très faible quantité disponible.

Une ultime infusion en LC/MS était réalisée après dialyse (cut-off 100 Da) pour écarter un éventuel masquage du produit par les éléments inorganiques du solvant mis en évidence par ICP/MS. L'ensemble des premières analyses montrait, sur cette solution aqueuse, l'absence d'EPO, d'hormones, de peptides, de polypeptides et de protéines. La seconde partie des analyses montrait, outre l'absence de molécules répondant classiquement en CPG/MS et HPLC/BD, un spectre d'infusion directe en LC/MS inattendu écartant la présence d'une protéine et

comportant des massifs typiques de molécules chlorées et/ou bromées et des masses atteignant au moins $m/z = 1833$ u.m.a. Compte tenu des valeurs des masses, l'hypothèse d'une molécule de type transporteur d'oxygène enrichie en chlore ou en brome était écartée. L'information sur ce spectre demandée auprès de divers spécialistes de masse structurale nous orientait d'abord sur un mélange de polymères type PPG, d'octabromodiphényl, de polyéthylène, d'interférents de membranes purificatrices d'eau... puis à la Faculté de Montpellier sur du NaCl conduisant à la détection de clusters dépassant les 25 molécules ! L'infusion de sérum physiologique dans les mêmes conditions permettait de vérifier cette hypothèse et d'écarter par soustraction du bruit de fond la présence de toute autre molécule détectée. L'ICP/MS nous permettait parallèlement de confirmer la présence de NaCl dans la solution aqueuse à des concentrations dites " physiologiques ". L'IR réalisé sur le lyophilisat et l'infusion après filtration sur membrane permettait d'écarter la présence de toute molécule organique active dans cette solution en définitive de sérum physiologique.

La mise en œuvre de l'ensemble de ces analyses sur un très petit volume (1 ml) a démontré sans équivoque le caractère frauduleux de cette fiole et la supercherie dont sont " victimes " les sportifs de haut niveau dans le cyclisme, prêts à payer très cher ... un placebo constitué de sérum physiologique.

Conduite automobile sous l'emprise de drogue

Patrick Mura du Laboratoire de Biochimie et Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers a présenté : **Cannabis et conduite automobile : une valeur sanguine limitée est-elle nécessaire ?**

Dans de nombreux pays des législations ont été mises en place, visant à sanctionner les conducteurs sous influence de cannabis. Pour mettre en évidence cette influence sur les conducteurs, certaines nations ont opté pour les tests comportementaux (lois " impairment ") tandis que d'autres ont choisi une approche analytique (lois " per se "). A l'instar de l'alcool, est-il possible de déterminer une valeur sanguine en THC en dessous de laquelle aucune modification comportementale des conducteurs ne pourrait être observée ? .

La réponse à cette question est apportée par les éléments suivants :

- Contrairement à l'alcool, il n'y a pas un seul principe actif mais deux : le delta-9 tétrahydrocannabinol (THC) et le 11-hydroxy delta-9 tétrahydrocannabinol (11-OH THC), dont les proportions respectives sont fonctions du mode de consommation.

Après inhalation, les concentrations sanguines augmentent très rapidement pour atteindre plusieurs dizaines de ng/ml, le pic plasmatique étant observé 8 à 10 minutes après le début de la consommation. Le THC étant un composé très lipophile, il quitte très rapidement le sang pour se distribuer dans les tissus lipidiques de l'organisme, dont le cerveau. Pendant cette phase cinétique, l'évolution des concentrations sanguines est inversement proportionnelle à celle des effets chez le consommateur, qui atteignent leur apogée au moment où les concentrations sanguines sont devenues très basses.

- Le dosage du cannabis dans le sang par GC-MS est un dosage difficile, dont les résultats subissent des variations inter-laboratoires non négligeables. C'est la raison pour laquelle il est conseillé de fixer un seuil analytique. Le seuil recommandé par la SFTA est de 0,2 ng/ml.

En raison de tous ces éléments, il paraît illusoire de vouloir déterminer un seuil sanguin de dangerosité au volant. Compte tenu du fait que la durée des effets est sensiblement identique à la période pendant laquelle les principes actifs sont détectables dans le sang, la seule présence de THC et/ou de 11-OH THC dans le sang permet d'estimer que le sujet était sous influence au moment du prélèvement.

Alain Verstraete du Laboratoire de biologie clinique, Hôpital Universitaire de Gent, Belgique a présenté : **L'après ROSITA: les futurs développements en Europe**

Le projet Rosita, financé en partie par l'Union européenne, avait pour but de déterminer s'il existe des tests fiables de détection de drogues pouvant être utilisés au bord de la route.

L'étude a démontré l'utilité pour la police des tests rapides, la relative fiabilité des tests urinaires, les attentes des forces de police en matière de tests salivaires et les performances jusqu'à présent insuffisantes des tests existants de détection de drogues dans la salive et la sueur.

L'étude a eu un grand impact, aussi bien en Europe qu'aux Etats-Unis. Les résultats ont été présentés à différents congrès et ont fait l'objet de différentes publications. L'étude a souvent été mentionnée dans la presse, même dans la presse alternative pro-usage de drogues. Le site web www.rosita.org est fréquemment consulté et les rapports ont été téléchargés par plus de 500 personnes. Les résultats ont été évalués lors d'une réunion organisée à Bruxelles en novembre 2001.

Après la fin de l'étude, des tests rapides ont continué à être utilisés en Belgique et en Allemagne. En Finlande, des organisations caritatives ont fait don d'instruments de lecture Rapiscan à la police, qui les utilise, malgré leurs limitations. En Norvège, la police a cessé d'utiliser les tests rapides et continue à se baser sur les signes cliniques. En Espagne, l'étude a sensibilisé le public et le monde politique et a contribué à un début de changement de législation. En Allemagne, les contrôles autour des dancings pendant les week-ends et la publicité autour de ces actions, ont probablement contribué à la diminution très significative (-68%, comparé à -

3% dans toute l'Allemagne), du nombre de tués chez les jeunes âgés de 18 à 24 ans. Le nombre de blessés a également diminué de plus de 30 %.

Différents nouveaux projets sont en préparation. Un livre qui contient tous les rapports a été publié. Une demande d'organisation d'euroconférence a été introduite et si elle est acceptée, 2 conférences seront organisées en 2002 et 2003 et des moyens seront disponibles pour couvrir tous les frais de participation de 25 jeunes scientifiques de l'Union Européenne et des pays associés. Des préparations sont en cours pour un projet Rosita 2, qui évaluera les tests salivaires dans 4 pays européens et quatre grandes villes américaines.

Chez les partenaires industriels, Rosita a stimulé la recherche d'améliorations des tests existants (Cozart Rapiscan et Drugwipe) et le développement de nouveaux prototypes chez Dräger/Orasure, Lifepoint et Ansys. Certains sont déjà en évaluation. Les premiers résultats du Dräger DrugTest montre une bonne spécificité, mais une sensibilité parfois insuffisante.

En conclusion, l'étude Rosita a eu un impact important dans de nombreux pays et l'approche multidisciplinaire a stimulé les nouveaux développements en matière de recherche de drogues chez les conducteurs de véhicules, surtout les tests salivaires.

Thomas A. Briellmann de l'Institut de Médecine Légale de Bâle, Suisse nous a présenté :

Médicaments et drogues au volant ("MDV"): La situation actuelle en Suisse

En Suisse, la capacité de conduire est appréciée en fonction du rapport de la police, du rapport médical et des analyses toxicologiques.

Les analyses toxicologiques sont soumises à des directives strictes, ordonnées par le gouvernement.

Actuellement, 8 laboratoires sont reconnus, provisoirement ou définitivement, pour ces analyses "MDV" en Suisse. Cette reconnaissance est délivrée par l'Office fédéral des routes. Les laboratoires doivent participer aux contrôles de qualité organisés par le Centre Suisse de Contrôle de Qualité (CSCQ) deux fois par an sur le sang et l'urine.

Ces dernières années les délits "MDV" ont augmenté en Suisse. En 2000 : ~1200 cas, en 2001: ~1600 cas. Avec la révision de la Loi fédérale sur la circulation routière, il est possible maintenant d'effectuer une prise de sang lorsqu'une personne est soupçonnée d'incapacité de conduire parce qu'elle a consommé des stupéfiants. Les valeurs limites pour les stupéfiants seront fixées par le Conseil Fédéral, suite à des propositions émanant d'une commission d'experts.

Actuellement, dans un petit nombre de cantons, la police effectue, elle-même, des tests préliminaires au bord de la route. Mais d'une manière courante, la presque totalité des analyses est effectuée dans les laboratoires reconnus pour ce type d'analyses. Avec l'introduction de nouveaux tests de dépistage un changement dans cette pratique est possible dans le futur.

Françoise Vincent, et col. de la Fédération de Toxicologie - CHU de Grenoble. a présenté

Prévalence de substances psychoactives chez les conducteurs de la région grenobloise impliqués dans un accident non mortel de la circulation routière ; comparaison de données cliniques et biologiques.

Le CHU de Grenoble a participé à une étude multicentrique française (Projet Hospitalier de Recherche Clinique), pilotée par le CHU de Poitiers. Cette étude avait pour objectif de déterminer la fréquence de l'usage de stupéfiants et de médicaments psychoactifs chez des conducteurs impliqués dans un accident corporel non mortel de la circulation routière. En complément de cette étude nationale, les conducteurs accidentés dans la région grenobloise ont subi un examen clinique dans le but de rechercher une possible altération comportementale liée à la prise de substances psychoactives (SPA) ; notre second objectif était donc d'établir une comparaison clinico-biologique.

Entre le 1er février 2000 et le 31 août 2001, 160 conducteurs accidentés, admis aux urgences chirurgicales, ont été appariés par sexe et âge (+/- 3 ans) à des témoins admis aux urgences médicales pour une pathologie non traumatique. Des prélèvements systématiques de sang ont été pratiqués chez ces patients pour rechercher et doser l'alcool, le cannabis, la morphine et ses dérivés, les amphétamines, la cocaïne ainsi que les principaux médicaments psychotropes (barbituriques, benzodiazépines (BZD)...). Les méthodes utilisées ont été la FPIA, la CPG/SM, la CLHP/BD. Les paramètres cliniques de la fiche " E " du décret du 27 août 2001 ont été retenus pour l'examen des conducteurs. Pour l'exploitation des résultats, les tests du Chi2 et de Kruskal-Wallis (StatView® 5.0) ainsi que le logiciel Epi-Info® ont été utilisés.

147 dossiers appariés ont été retenus pour la comparaison de l'imprégnation par une SPA. L'âge moyen est de 36,7 ans et le sexe ratio homme/femme est de 3. La présence de SPA (toutes substances confondues) est multipliée par 3 chez les conducteurs accidentés par rapport aux témoins (tous âges confondus), celle de l'alcool seul par 9, celle du cannabis seul par 2 et celle de l'association alcool-cannabis par 25. Dans les deux groupes, aucune présence de cocaïne ou d'amphétamine n'a été décelée ; la présence de psychotropes (BZD, barbituriques, autres) n'est pas significativement plus fréquente chez les accidentés.

L'examen clinique des conducteurs accidentés semble montrer un rôle prépondérant de l'alcool par la plus grande fréquence des paramètres cliniques répertoriés (odeur de l'haleine, troubles du comportement...). La détection

des effets du cannabis a probablement manqué de sensibilité du fait : des effets cliniques prononcés de l'imprégnation alcoolique, des concentrations sanguines faibles de THC, des caractéristiques de la grille d'évaluation clinique utilisée et des conditions difficiles de recueil dans un service d'urgences. La responsabilité du cannabis ne doit pas pour autant en être négligée.

Marie-France Kergueris, et col. Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, CHU, Nantes, France. a présenté : **Cannabis et Accident de la Circulation - A propos d'un cas extrême**

Un " jeune conducteur " étudiant de 19 ans, provoque un accident lors d'un dépassement hasardeux. Il meurt sur le coup, les deux passagers succombent également dans les heures qui suivent. Des prélèvements sanguins ont été réalisés sur le conducteur afin de rechercher l'alcool, les stupéfiants et les médicaments psychotropes. Les stupéfiants sont dosés en CG/SM, le même prélèvement a été analysé, pour contrôle, dans un deuxième laboratoire utilisant également la CG/SM. Le " screening " médicamenteux a été réalisé conjointement en CLHP/BD et CG/SM.

Le dosage des stupéfiants a révélé la présence de delta-9-tétrahydrocannabinol (THC), de 11-hydroxy-delta-9-tétrahydrocannabinol (11-OH-THC) et de 11-nor-9-carboxy-delta-9-tétrahydrocannabinol (THC-COOH) en quantités importantes soit : THC = 300 ng/ml ; 11-OH-THC = 40 ng/ml ; THC-COOH = 223 ng/ml.

L'alcoolémie, mesurée dans un laboratoire proche du lieu de l'accident, était à zéro. Le " screening " n'a pas révélé la présence de médicaments.

Une surévaluation du THC due aux conditions de prélèvement ou d'analyse paraît peu probable en raison de la mesure conjointe de valeurs élevées de métabolites. La quantité très importante de THC laisse supposer une prise récente de cannabis.

L'étude présentée par E. Johansson, et col. " Prolonged apparent half-life of D1-tetrahydrocannabinol in plasma of chronic marijuana users. " J. Pharm. Pharmacol. 1988 ; 40 : 374-375 a montré un allongement de la demi-vie apparente et une accumulation possible des cannabinoïdes chez des usagers " intensifs ", mais à ce jour il n'a pas été trouvé dans la littérature de concentrations aussi élevées. Est-ce un record chez un conducteur ?

Partie analytique

Hans Maurer, de l' " Institute of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology " de Homburg dans la Saar, nous a parlé des **possibilités et des limites du dosage des drogues faiblement dosées**.

En toxicologie criminalistique, clinique, dans le dopage et le suivi thérapeutique, la détection de faible trace dans les liquides biologiques est difficile. Aujourd'hui la GC-MS ou la LC-MS sont les techniques les plus adaptées à ces recherches. Les bibliothèques de spectres permettent l'identification de plus de 200 000 produits chimiques. Des techniques telles que l'ionisation chimique négative ou les dérivations améliorent la sensibilité de l'analyse. Des molécules dernièrement apparues au cours des analyses telles que les phenylpipérazines ont fait l'objet de nouveaux protocoles. Certaines, comme le muscimol ou la mescaline nécessitent des extractions sophistiquées. Ces méthodes doivent s'adapter à différentes matrices et doivent être validées.

Beat Aebi de l'équipe de W. Bernhard de l'institut de médecine légale de Bern nous a parlé de la **difficulté d'identifier certains spectres de masse**. 30 cas d'analyses toxicologiques difficiles ont été traités avec un logiciel " masslib " (www.masslib.com) La validation de cette recherche d'inconnue en toxicologie a été validée en accord avec les normes ISO/EN 17025

Extraction

Serge Rudaz du Laboratoire de chimie analytique pharmaceutique, Université de Genève, a présenté : **Utilisation de supports d'extraction adaptés à l'injection directe de fluides biologiques en chromatographie liquide**

Une optimisation de la préparation d'échantillon est recherchée. L'apparition de nouveaux types de support d'extraction en phase solide (RAM, support à larges particules, etc.), permettant l'injection directe de fluides biologiques représente une approche attractive dans la perspective d'analyses entièrement automatisées.

Immunoanalyse

François PARANT, du Laboratoire de Biochimie - Pharmacotoxicologie et Traces. Hôpital Edouard Herriot. Lyon a présenté : **A propos de trois cas d'intoxication à l'Atarax®** : interférence de l'hydroxyzine et de son principal métabolite, la cétirizine, avec l'immunodosage de la carbamazépine par la technique petinia (dade behring)

L'hydroxyzine (Atarax®), dérivé de la pipérazine, aux propriétés anxiolytiques sédatives et antihistaminiques

H1, est rapidement métabolisée principalement en cétirizine (Zyrtec® - Virlix®) antihistaminique H1 non sédatif. Plusieurs cas d'intoxications avec pour conséquence inattendue une interférence avec le dosage de la carbamazépine par la technique Petinia sont présentés.

Nous avons suivi trois intoxications volontaires chez un même patient de 32 ans, marginal, connu des urgences pour de multiples tentatives de suicide à l'Atarax®. Les concentrations d'hydroxyzine et de cétirizine ont été dosées par HPLC-SM. Le dosage de carbamazépine a été réalisé par trois techniques différentes (Petinia, Emit 2000 et HPLC-DAD) chez ce patient épileptique traité par Tégretol 400 LP®. L'interférence a été également étudiée aux concentrations thérapeutiques d'hydroxyzine (patiente de 87 ans traitée par Atarax® sirop 20 à 60 mg/j) et chez un volontaire sain prélevé à T2h (Cmax) après l'absorption de 2 cp de Zyrtec®. Une étude de charges en hydroxyzine et cétirizine a complété le travail. Les résultats sont les suivants : Intoxication à l'Atarax® : (taux toxiques > 0,10 mg/L) ; Traitement à l'Atarax® : (taux thérapeutiques : 0,05 à 0,09 mg/L). Prise unique de 2 cp de Zyrtec® : Concentration de cétirizine à T2h : 0,47 mg/L. Concentration apparente de carbamazépine : 0,6 mg/L (Petinia) / <0,5 mg/L (Emit). Charges de 5mg/L d'hydroxyzine et de cétirizine croisent respectivement à 77% et 120% (réactifs Petinia). Absence de croisement avec les réactifs Emit
Un surdosage en Atarax® est responsable d'une interférence avec le dosage de la carbamazépine par la technique Petinia. Cette interférence, absente avec les réactifs Emit, reste présente aux concentrations thérapeutiques. Qu'elle est la part des métabolites autres que la cétirizine dans cette interférence ?

Analyses par LC/MS

Pierre Marquet, du Service de Pharmacologie et Toxicologie, CHU Dupuytren, de Limoges, a présenté la **LC-MS : une technique utile pour le dépistage des drogues et médicaments en toxicologie clinique ?**

Dans un premier temps Pierre Marquet a rappelé les différentes techniques basées sur le couplage LC-MS utilisées pour développer une méthode de recherche générale d'inconnus en toxicologie. La plupart des analystes utilisaient des sources de type électrospray avec différentes approches instrumentales :

- spectrométrie de masse en tandem (MS/MS),
- MS/MS avec acquisition en mode adaptatif (data dependent acquisition " DDA ")
- spectrométrie de masse simple avec fragmentation par collision induite dans la source (FCIS).

Cependant la stratégie MS/MS n'est pas réellement compatible avec une procédure de recherche d'inconnus dans la mesure où elle nécessite de sélectionner un nombre limité d'ions parents dans une première étape, avant de les fragmenter. La DDA est un mode auto-adaptatif dans lequel la détection des substances éluées est effectuée en simple MS, puis les ions d'intensité supérieure à un seuil, instantanément fragmentés et leurs fragments analysés. Des études préliminaires ont montré leur potentiel pour le screening toxicologique, mais il sera nécessaire d'améliorer la détection des signaux dans le bruit de fond. C'est également le cas pour les techniques en simple MS avec FCIS. De telles méthodes ont été proposées par plusieurs équipes qui ont démontré leur répétabilité et leur reproductibilité, du moins pour un même type d'instrument et mis au point des bibliothèques de spectres plus ou moins larges, le plus souvent en mode d'ionisation positive.

Des procédures de préparation d'échantillon optimisées sont nécessaires pour extraire, en plus des substances apolaires, les produits polaires voire même hydrophiles non détectables par GC-MS et supposés l'être par LC-ES-MS. De telles procédures non spécifiques s'accompagnent généralement d'un fort bruit de fond chimique. Les conditions chromatographiques conditionnent également l'efficacité de telles méthodes, du fait de ce bruit de fond chimique et de la vaste étendue de gamme de polarité des produits à séparer.

Puis, il a montré que la comparaison d'une méthode optimisée de screening toxicologique par LC-ES-MS avec la GC-MS et l'HPLC-BD pour l'analyse d'une cinquantaine d'échantillons de sérum de patients pour lesquels une recherche large de toxique était demandée, était en faveur de la LC-ES-MS (détection de 73% des produits présents) et complémentaire des deux autres techniques en effet, 10% des produits sont détectés uniquement par LC-ES-MS.

Peter Jackson et col. de chez Micromass a présenté le **Potentiel de la LC-MS/MS pour l'identification et la quantification de toxiques dans différentes matrices biologiques.**

Le couplage de la LC avec la MS/MS donne une haute spécificité sans qu'il soit nécessaire de dériver l'échantillon. Des applications dans l'analyse des amphétamines et psychotropes sont présentées. La procédure comprend une simple précipitation des protéines, suivie de LC-MS/MS. La préparation de l'échantillon et l'analyse prennent moins de 20 minutes.

L. Humbert et col. du Laboratoire de Biochimie & Biologie Moléculaire, Hôpital Calmette, de Lille nous présente **l'Apport de la CLHP/DAD/ESI/MS en toxicologie hospitalière**, ainsi que deux cas de tentative d'autolyse par absorption massive de médicaments.

Les liquides biologiques sont extraits à deux pH (4,5 - 9,0) par un mélange de solvants organiques (dichlorométhane, éther, hexane, (30 : 50 : 20, V/V) contenant 0,5 % d'alcool isoamylique). L'extrait sec obtenu

est repris par la phase mobile (tampon formiate d'ammonium 0,005M pH 3,0 - acétonitrile) et injecté dans un système de chromatographie en phase liquide couplé à une détection par barrette de diode (acquisition de 210 - 400 nm), suivi d'une interface ES/MS. La détection MS est réalisée en mode full scan de 100 à 650 m/z sur 7 canaux différents d'acquisition (1 ES- et 6 ES+) suite à la variation des tensions appliquées sur le cône. L'identification des molécules a été faite par comparaison avec une librairie initialement développée au laboratoire.

Une femme de 65 ans dépressive est admise dans le service des Urgences après une tentative d'autolyse, elle est inconsciente et présente des troubles cardiovasculaires. L'analyse des profils chromatographiques montre la présence dans le sérum de l'admission de trimétazidine, paracétamol, caféine, quinidine, zolpidem, méprobamate, miansérine, acéprométazine, hydroxyzine et propoxyphène.

Un homme dépressif de 44 ans est pris en charge à son domicile par le SMUR après une nouvelle tentative d'autolyse (la 5ème), il est admis dans le service de réanimation. Il présente une bradycardie, une hypotension, une hypothermie avec vasoconstriction aux extrémités. Du sotalol, hydroxyzine, alprazolam, tétrazepam sont retrouvés dans le sérum. La concentration de ces substances a pu être déterminée et suivie sur une période de 21H30. Les concentrations trouvées à l'entrée étaient de : sotalol : 4041 ng/mL ; hydroxyzine : 162 ng/mL ; alprazolam : 353 ng/mL et tétrazepam : 147 ng/mL.

Cette technique est très rapide, elle offre grâce à ce couplage la possibilité de rechercher les molécules en librairie, d'identifier des substances n'absorbant pas dans l'ultraviolet. La combinaison de la détection en spectrométrie de masse ES en modes négatif et positif la rend plus performante et permet de détecter un plus grand nombre de substances organiques éluées d'une colonne. Il est également possible, par l'adjonction d'un standard interne et après validation de la quantification de déterminer la concentration des molécules dans les liquides biologiques.

Hervé Sayer et col. du CHU Dupuytren de Limoges, nous a présenté la " Recherche et dosage de cinq médicaments curarisants et d'un produit de dégradation dans les milieux biologiques "

Une méthode analytique permettant de doser en routine les curarisants les plus utilisés à des concentrations relativement faibles, compte-tenu de la courte demi-vie d'élimination de ces molécules, est développée par chromatographie liquide en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse. Les molécules curarisantes recherchées sont atracurium, laudanosine, rocuronium, pancuronium, vecuronium, mivacurium. L'ambenonium est utilisée comme étalon interne. Le dosage est réalisé dans 500 µL de milieu biologique (sérum, sang total, urines, liquide gastrique), acidifié dès réception par 20 µL d'une solution à 0,5 M d'H₂SO₄, puis déprotéinisé par 1 mL d'acétonitrile. La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne X-TERRA (C18; 3,5µm; 150mm x 1mm), avec comme phase mobile un mélange d'acétonitrile et de tampon formiate d'ammonium 2 mM ajusté à pH=3 avec de l'acide formique (90/10 ; v/v). L'ionisation est effectuée en mode positif dans une source TurboIonSpray (IS = 5800V, OR optimisé pour chaque valeur de m/z; Ring: 275V). Les molécules étudiées ont été dans un premier temps identifiées en mode full scan, puis dosées en mode SIM (pour un gain de sensibilité) sur un ion de quantification et un ion de confirmation par molécule. Les ions sélectionnés sont les suivants : atracurium m/z 464,6 et 358,4 ; laudanosine m/z 206,1 et 358,4 ; rocuronium m/z 529,4 et 358,4 ; pancuronium m/z 430,5 et 472,5 ; vecuronium m/z 557,4 et 398,4 ; mivacurium m/z 446,2 et 402,5 ; ambenonium m/z 125,2 et 411,6.

Les limites de quantification (LDQ) sont de 2,5 µg/L (mivacurium et laudanosine), 5 µg/L (rocuronium et pancuronium) et 10 µg/L (atracurium et vecuronium). Le domaine de linéarité est compris entre la LDQ et 2000 µg/L, avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,999. Les coefficients de variation inter- et intra-jours de cette méthode sont inférieurs à 11% sur toute la gamme de linéarité

Dans un cas d'autolyse par perfusion de produits médicamenteux, cette méthode a permis d'identifier et de doser de la laudanosine (produit de dégradation de l'atracurium ou du cisatracurium) et du rocuronium dans le sang total, aux concentrations respectives de 8,86 mg/L et 1,53 mg/L ainsi que du rocuronium dans l'urine à la concentration de 2,18 mg/l. Par ailleurs, de la paroxétine, de l'alfentanyl, de la phénopéridine et du dextromoramide étaient retrouvés à concentrations élevées dans le sang.

Gérard Hopfgartner, du Laboratoire de Chimie Analytique Pharmaceutique, Genève, a présenté : L'analyse quantitative et qualitative à haut débit des composés pharmaceutiques dans les liquides biologiques: possibilités et limitations

Le couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse (CL-MS) est devenu la méthode de choix pour le support d'études pharmacocinétiques ou de métabolisme. L'ionisation à pression atmosphérique (API) et une détection par spectrométrie de masse en mode tandem de composés pharmaceutiques et de leurs métabolites s'est révélée, entre autre, comme une technique extrêmement efficace pour l'analyse de composés organiques de polarité intermédiaire à polaire dans les milieux biologiques. Des méthodes aux temps d'analyses inférieurs à 5 minutes avec une limite de quantification de l'ordre de quelques picogrammes par ml sont devenues routinières. La stratégie de préparation d'échantillon joue un rôle primordial dans l'analyse à haut débit et peut être

automatisée. L'utilisation de systèmes informatiques de traitement des analyses est également indispensable. L'analyse à haut débit n'est pas seulement utile pour l'analyse de milliers d'échantillons provenant d'études cliniques, mais elle joue également un rôle primordial dans certaines études qui nécessitent l'analyse en ligne. Dans ce cas, un relativement petit nombre d'échantillons doit être analysé dans un intervalle de temps de quelques heures. En accélérant la chromatographie liquide, il est possible de réaliser avec certaines classes de composés des temps d'analyse de 10 secondes. Cependant la suppression de l'ionisation due à des composés endogènes présent dans les matrices biologiques où la co-élution de métabolites requiert souvent une séparation chromatographique longue. Dans ce cas l'utilisation de système en parallèle avec la commutation de colonne permet de maintenir l'intégrité chromatographie tous en diminuant considérablement les temps d'analyse. La détection et la caractérisation des métabolites produits in vitro ou vivo s'effectuent dans un premier temps principalement par LC-MS/MS en utilisant différents types de spectrométrie de masse. Ce type d'analyse est complexe et longue.

Sandrine Souverain, et col. Du laboratoire de chimie analytique pharmaceutique, Université de Genève a présenté : **Analyse stéréosélective de la méthadone par injection directe de plasma en LC-MS**

La méthadone (MTD) est un opioïde de synthèse largement utilisé dans le traitement de substitution à l'héroïne et comme analgésique puissant. La méthadone présente un atome asymétrique et existe donc sous la forme de deux énantiomères. L'activité pharmacologique est essentiellement contenue dans l'isomère lévogyre (R-méthadone). Pour des raisons économiques, le racémate est administré dans la plupart des pays européens. Malgré des dosages constants, les concentrations plasmatiques de ce composé présentent des variations inter-individuelles importantes. De plus, il a été démontré qu'un métabolisme stéréosélectif de la MTD conduisait à des rapports énantiomériques très variables et donc une réponse au traitement différente. Ainsi, des dosages stéréosélectifs de la MTD sont nécessaires afin que le clinicien puisse ajuster les doses administrées en fonction des concentrations de l'énantiomère actif.

Un système à commutation de colonnes comprenant une extraction des échantillons couplée en ligne à un système chromatographie liquide chirale (de type cellulose) - spectrométrie de masse (LC-MS) a été développée. Le temps consacré au processus d'extraction, basé sur l'utilisation d'un support à larges particules à haut débit de phase mobile, est considérablement réduit. En effet, l'analyse stéréosélective de la MTD à partir de 50 µL de plasma est obtenue en moins de 16 min (préparation de l'échantillon comprise).

La linéarité de la méthode est évaluée et jugée satisfaisante pour une gamme de concentration de 10 à 1000 ng.mL⁻¹ pour chaque énantiomère. Avec une détection par spectrométrie de masse utilisant une ionisation par électrospray, des limites de quantification de 5 ng.mL⁻¹ sont atteintes. En outre, la méthode est appliquée avec succès à l'analyse d'échantillons plasmatiques de patients sous traitement de MTD.

M. Fathi, et col. du Laboratoire central de chimie clinique / Hôpitaux Univesitaire de Genève, a présenté : **Détermination du sirolimus dans le sang total par HPLC/MS**

Le sirolimus ou rapamycine des laboratoires Wyeth est un agent immunosuppresseur récent utilisé en combinaison avec la ciclosporine ou le tacrolimus lors de transplantations.

Tout comme la ciclosporine et le tacrolimus, le sirolimus emprunte la voie métabolique du cytochrome P450A. Il agit sur l'activation des lymphocytes T et B d'où son effet immunosuppresseur.

La concentration du sirolimus est mesurée dans le sang total car sa distribution est à plus de 94 % dans les érythrocytes et seulement 3 % dans le plasma.

Une méthode de détermination du sirolimus dans le sang total par HPLC/electrospray-MS en utilisant le demethoxyrapamycine comme étalon interne a été développée.

Après une extraction liquide-liquide de 300 µl d'échantillon, la séparation des composés est faite sur une colonne à polarité de phase inversées avec une élution isocratique.

L'acquisition des données se fait en mode SIM en détectant les induits sodium du sirolimus à m/z 936.60 et celui de l'étalon interne à m/z 906.60.

La linéarité de la méthode a été testée jusqu'à une concentration de 30 µg/l, donnant une équation $Y = 0.03393X - 0.03432$ avec un $r = 0.99904$. Les CV intra-série de la méthode était de 8.1 %, 5.2 % et 3.4 % respectivement pour les valeurs basses, moyennes et élevées respectivement. Ceux inter-série étaient de 9.7 %, 7.6 % et 5.6 %. La limite inférieure de la quantification est de 1 µg/l. La méthode développée est simple et fiable, nécessitant un faible volume d'échantillon.

ICP-MS

Laurence Labat, et col. Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHRU Lille - Hôpital Calmette - Lille, France a présenté : **Dosage du sélénium plasmatique par ICP-MS**

Les effets toxiques du sélénium étaient connus bien avant que son rôle nutritionnel comme élément trace essentiel ne soit découvert. Ceux-là restent cependant rares alors que des concentrations inférieures à 30 µg/L sont très souvent associées à des symptômes cliniques sévères de déficience en sélénium.

Une nouvelle procédure de préparation d'échantillons plasmatiques pour un dosage par la technique de la torche à plasma couplée à une détection en spectrométrie de masse (ICP-MS). est effectuée sur une série de prélèvements de patients hospitalisés en gastro-entérologie au CHRU de Lille.

Le dosage du sélénium plasmatique ^{82}Se est réalisé en ICP-MS (Agilent 7500a) après une simple dilution au 1/10^{ème} de chaque échantillon avec une solution d'acide nitrique à 1% contenant du butanol (0,8%) et du triton (0,1%). Le volume d'échantillon nécessaire est au minimum de 0,3 mL. Le dosage est réalisé en mode "quantitatif". 23 prélèvements plasmatiques et 3 contrôles (UTAK et Séronorm) ont été analysés par ICP-MS et par spectrométrie d'absorption atomique, technique habituellement utilisée au laboratoire. Les résultats ont ensuite été comparés.

La linéarité de la méthode a été vérifiée pour des concentrations variant de 1 $\mu\text{g/L}$ à 40 $\mu\text{g/L}$, correspondant à des concentrations de 10 à 400 $\mu\text{g/L}$ avant dilution. La limite de détection est de 0,5 $\mu\text{g/L}$. La quantification du sélénium dans le plasma a été vérifiée par la méthode des ajouts dosés. La répétabilité et la reproductibilité de la méthode sont bonnes avec des coefficients de variation inférieurs à 3,2 %. Les concentrations plasmatiques des 23 prélèvements étudiés varient de 34,7 à 146,3 $\mu\text{g/L}$ et nous décrivons une bonne corrélation avec les résultats obtenus en spectrométrie d'absorption atomique ($r^2 = 0,96$).

L'ICP-MS couplée à cette procédure simple et rapide de préparation de l'échantillon semble adaptée à une utilisation en routine pour le dosage du sélénium pour des concentrations plasmatiques variant de 10 à 400 $\mu\text{g/L}$. C'est une méthode précise et qui apparaît plus sensible que celles classiquement utilisées pour ce dosage. Des problèmes d'interférences ont été décrits limitant le dosage direct du ^{82}Se dans les différentes matrices biologiques. Une simple dilution en présence de butanol, indispensable pour limiter les effets d'amplification d'ionisation due à la présence du carbone dans le plasma est proposée.

Analyses de médicaments dans les liquides biologiques.

D Richard et col. de Pharmacologie Médicale, Faculté de Médecine, Clermont-Ferrand présente :

Mise au point du dosage plasmatique et urinaire de l'apomorphine et de ses métabolites par GC-MS

L'apomorphine (APOKINON®) (APO) est un agoniste dopaminergique mixte D1+D2, couramment utilisé dans le traitement de la maladie de Parkinson compliquée de fluctuations motrices. Son emploi est limité par une courte durée d'action liée à un important effet de premier passage hépatique avec formation de d'apocodéine (APC), de norapomorphine (NPO) et de dérivés glucurono-conjugués. L'étude des modifications cinétiques provoquées par l'administration d'inhibiteur enzymatique de la catéchol-O-méthyl transférase (ICOMT), enzyme clé du métabolisme de la dopamine, nous a conduit à développer une méthode de dosage plasmatique et urinaire de l'APO et de ses métabolites.

L'extraction liquide-liquide (éther, acétate d'éthyl) est suivie d'une analyse chromatographique en CPG-MS (Hewlett Packard® HP 6890 et HP 5973 MS) sur une colonne HP-5-MS (30m x 0,25mm, 0,25 μm) après dérivation des extraits par le Sylonâ. Les urines sont préalablement hydrolysées par action enzymatique (Helix Pomatia, 5h à 55°C). Chaque analyse est précédée de l'extraction d'une gamme réalisée avec un étalon interne (propylnorapomorphine) dans un témoin surchargé de concentrations variables des différents analytes.

Les temps de rétention de l'APO, APC et NPO sont respectivement de 8,5, 9,05 et 9,20 min (EI : 9,90 min) et les ions de quantification (qualification) sont 410 (322), 352 (264), 396 (308) et 438 (410). Les limites de détection sont 0,1 ng/ml et 0,5 ng/ml pour l'APO et les deux métabolites respectivement. Pour ces molécules, les reproductibilités inter- et intra-journalières (CV), respectivement aux concentrations de 1 et 2,5 ng/ml, sont 2,8 et 5,4 %, 6,4 et 7,0 %. Les courbes de calibration (0-100 ng/ml) sont linéaires et reproductibles (pente : 0,2355 $\pm 5,5.10^{-5}$; ordonnée à l'origine : -15,5.10⁻⁵ $\pm 87.10^{-5}$; r : 0,9994 $\pm 0,0013$). Les pourcentages d'extraction sont de 19,8 $\pm 6,3\%$ et 44,2 $\pm 14,7\%$ respectivement pour l'APO et l'APC (5 ng/ml). Dans les urines, les reproductibilités (CV), sont, aux concentrations de 5, 25 et 100 ng/ml, respectivement de 4,2, 2,1 et 0,5%, 7,0, 13,2 et 2,4%, 17,7, 5,0 et 2,0% pour l'APO, l'APC et la NPO.

Cette technique spécifique et sensible a été appliquée à l'étude cinétique d'une première série de patients parkinsoniens (n = 10) traités par une injection s.c. d'APO à dose efficace sur les signes de moteurs puis par une administration p.o. (200 ou 400 mg) d'un ICOMT, l'entacapone. A ces doses, les C_{max} sériques d'APO sont de 31,3 $\pm 9,8$ et 54,0 $\pm 29,0$ ng/ml. Aucun métabolite n'a été détecté dans le sérum. Aux doses respectives de 200 et 400 mg d'entacapone, les quantités urinaires d'APO, d'APC et de NPO sont de 1099,6 $\pm 553,0$ et 667,3 $\pm 375,0$ ng/ml, 369,2 $\pm 652,0$ ng/ml et 260,1 $\pm 560,1$ ng/ml, 384,4 $\pm 464,0$ ng/ml et 191,1 $\pm 251,2$ ng/ml.

Ces résultats préliminaires montrent une baisse dose-dépendante des quantités éliminées de métabolites et suggèrent un effet de l'antagoniste de la COMT sur la cinétique et le métabolisme de l'APO. Ils doivent être confirmés par l'analyse des autres séries de patients.

Séverine Hughes-Frutiger et col. Laboratoire central de chimie clinique/HUG, Genève, a présenté : Screening of hypoglycaemic sulfonylurea drugs in the serum of type 2 diabetic patients : From compliance to overdose
Recherche de glibenclamide (Daonil), glimepiride (Amaryl), glipizide (Glibenese) et de gliclazide

(Diamicon) dans le serum. Glibenclamide et glibepride sont extraites du sérum à pH acide en utilisant des cartouches C18. Glipizide et gliclazide sont extraites à pH 6.5. Les analytes sont séparés sur une colonne Varian C18 Omnispher (détection UV à 226 nm) . Les phases mobiles sont légèrement différentes. La répétabilité est de 10.6% pour la glibenclamide, 10.2% pour la glibepride, 6.6% pour la glipizide et 12.1% pour le gliclazide.

Olivier J. Lassout et col , Laboratoire Central de Chimie Clinique et Examens Biologiques, Genève, Suisse a présenté : **Anti-protéases et anti-viraux : Cas du Lopinavir**

Le Lopinavir est métabolisé par le cytochrome P450. Son action est approximativement dix fois supérieure à celle du Ritonavir. L'administration simultanée du Ritonavir inhibe la métabolisation du Lopinavir et augmente la concentration plasmatique de cette anti-protéase. La demande des cliniciens est essentiellement la mesure du taux résiduel en Lopinavir. Les anti-protéases sont séparées par HPLC (HP1090 série I) avec détection UV (205 nm). La séparation est effectuée à température ambiante sur une colonne à polarité de phases inversées Phenomenex Kromasil C18 équipée d'une pré-colonne Phenomenex C8. La préparation des échantillons s'effectue sur des colonnes SPE Bond Elut C18 (Varian).

La méthode utilisée est linéaire dans la gamme de concentration choisie (250-9000 ng/ml) avec des $r^2 > 0,99$. Les coefficients de variation intra et inter essai sont inférieurs à 5% (4,49% et 4,78% respectivement) et le recouvrement est supérieur à 90%. La limite inférieure de quantification (250ng/ml) a été fixée avec les cliniciens.

Pour doser toutes les anti-protéases (Indinavir, Amprenavir, Saquinavir, Nelfinavir) et l'Efavirenz, nous utilisons la même méthode de préparation mais deux systèmes chromatographiques différents. Les temps d'analyses courts (20 min), permettent un rendu des résultats rapide.

Les benzodiazépines

Stéphane PIRNAY, et col. du Laboratoire de toxicologie de la Préfecture de Police de Paris, nous a parlé d'une **Méthode GC-MS/MS de détection de 22 benzodiazépines dans les milieux biologiques**

Un protocole sélectif et sensible de détection de 22 benzodiazépines par GC-MS/MS en 1 seule injection, applicable en routine est présenté.

La dérivation des composés est réalisée. L'analyse se fait dans un GC-MS Varian " Saturn 2000 " associant un chromatographe 3800 à un spectromètre de masse de type trappe ionique. Parmi les 22 benzodiazépines, 10 d'entre elles présentant un atome d'hydrogène échangeable, sont triméthysilylées par du BSTFA-TMCS (90/10). La méthode s'applique à l'ensemble des molécules dérivées ou non, et alterne les modes d'ionisation impact électronique (EI) et ionisation chimique (CI). Les segments d'acquisition sont optimisés notamment par le choix des tensions de collision en mode MS/MS et en mode MRM (" multiple reaction monitoring ") selon chaque benzodiazépine.

La préparation de l'échantillon comporte une étape d'extraction liquide-liquide par toxi-tubes A (Toxi-Lab Ansys™). Les seuils de détection et de quantification sont établis pour chaque benzodiazépine et le meilleur mode d'ionisation est retenu.

Le flunitrazépan, clonazépan, prazépan, lormétazépan et flurazépan sont ionisés en mode CI, les autres le sont en mode EI. La méthode alterne dans ces deux modes des segments de MRM pour le bromazépan, tétrazépan, diazépan, clotiazépan, nitrazépan, chlordiazépoxyde, témazépan, midazolam, clonazépan et prazépan et de MS/MS pour les autres molécules. La méthode est appliquée aux sangs et urines après extraction. La méthode est validée sur des milieux sanguins et urinaires surchargés en benzodiazépine. Les seuils de quantification sont de 10 pg/µl (médazépan, nordazépan, oxazépan, diazépan) de 500 pg/µl (bromazépan, tétrazépan, midazolam), de 1000 pg/µl (estazolam, alprazolam, triazolam) et de 100 pg/µl pour toutes les autres benzodiazépines.

A. Bugey et Ch. Staub de l'Institut Universitaire de Médecine Légale, Genève, Suisse, ont présenté : **Analyse rapide de benzodiazépines dans le sang par chromatographie liquide haute performance : utilisation d'une colonne Chromolith™.**

Une méthode utilisant une colonne Chromolith™ en chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes a été appliquée au dosage des benzodiazépines dans le sang complet.

La durée de l'analyse a été considérablement diminuée tout en permettant de mesurer les doses toxiques et thérapeutiques habituellement rencontrées pour ces substances.

La préparation des échantillons sanguins est effectuée par extraction liquide / liquide (LLE).

Les benzodiazépines sont analysées au moyen du système de couplage chromatographie en phase liquide / détecteur à barrette de diodes (HP 1100) et la séparation des composés est réalisée sur une colonne Chromolith™ Performance RP - 18e (100 x 4.6mm) en utilisant le méthylclonazépan comme standard interne. La phase mobile est constituée d'un mélange tampon phosphate (pH=2.1) / acétonitrile délivrée en mode isocratique. Le débit est fixé à 2 ml/min et la détection à 220 nm.

La méthode a été appliquée à huit benzodiazépines couramment prescrites en Suisse. Pour des raisons pratiques, elles ont été séparées en deux groupes : le clonazépam, le diazépam, le flunitrazépam et l'oxazépam d'une part puis le lorazépam, le désalkylflurazépam, le midazolam et le nordazépam d'autre part.

Le dépistage complet de chaque groupe de substances est effectué en moins de quatre minutes. Les droites de calibration sont linéaires ($R^2 > 0.99$) sur les domaines de concentration suivants : clonazépam, flunitrazépam, désalkylflurazépam, midazolam, lorazépam de 30 à 500 ng/ml ; oxazépam, diazépam, nordazépam de 150 à 5000 ng/ml.

Les limites de quantification sont de 20 ng/ml pour le flunitrazépam et le clonazépam et de 30 ng/ml pour les autres benzodiazépines permettant ainsi de mesurer les concentrations thérapeutiques pour toutes les benzodiazépines à l'exception du flunitrazépam pour lequel seules les concentrations dans la fourchette supérieure de la zone thérapeutique peuvent être mesurées. La répétabilité à trois concentrations différentes a été déterminée et les CV obtenus sont inférieurs à 5%.

A. El Mahjoub et christian Staub ont présenté un poster sur : **Détermination des benzodiazépines dans les fluides biologiques par chromatographie liquide haute performance (CLHP) et par technique de commutation de colonnes**

Les Cardiotropes

Flesch Françoise, et col. du Centre Antipoison de Strasbourg. a présenté : **Prévalence des cardiotropes dans une population de patients hospitalisés pour intoxication.**

Cette étude a été réalisée à partir d'une analyse rétrospective sur une population de 10 000 patients hospitalisés dans un service de réanimation et d'urgences médicales de Janvier 1990 à décembre 2000.

Les principaux critères analysés ont été : l'âge et le sexe des patients, les molécules en cause, le type d'intoxication, la gravité et l'évolution. Ce travail a été réalisé à l'aide du logiciel SIMA (Système d'Information Médico-Administratif) qui a permis la génération de questionnaires personnalisés, la saisie des données et l'interrogation multicritères.

Les cardiotropes étaient en cause dans 3 % des cas d'intoxications soit chez 275 patients .

69 patients avaient ingéré un seul cardiotrope, 23 deux cardiotropes ou plus, 42 avaient associé cardiotrope et antalgique et 141 avaient associé cardiotrope et psychotrope.

L'intoxication était volontaire dans 83 % des cas. La moitié des cas concernait une prise de Bêta-bloquants. 13 patients sont décédés, dont 5 après surdosage digitalique (moyenne d'âge : 80 ans) 2 après accident thérapeutique (patients respectivement âgés de 73 et 92 ans et traités par Flécaïne® ou Tildiem®) et 6 après intoxication volontaire dont 3 pluri-médicamenteuses.

Un dosage de cardiotrope a été réalisé dans un quart des cas.

Une étude détaillée de 3 cas cliniques permet de souligner l'intérêt de ces dosages pour le clinicien : dosage des digitaliques en urgence en raison de l'implication thérapeutique, ou dosage différé (Bêta-bloquants, Inhibiteurs calciques) pour confirmer le diagnostic et (ou) vérifier la corrélation clinico-biologique.

	Bêta-bloquants	Digitaliques	Anticalciques	Antiarythmiques	Autres
Nombre	135 (49%)	42 (15 %)	36 (13%)	21 (8 %)	76 (28 %)
Médicaments en cause	43 Avlocardyl® 23 Tenormine®		10 Isoptine® 8 Tildiem®	7 Flécaïne® 6 Rythmol®	Catapressan® IEC, Nitrés...
Age moyen	37	73	50	46	39
Intox volontaire	95 %	26 %	89 %	90 %	96 %
Troubles cardiovascul	22 %	83 %	36 %	19 %	
Ventilation artificielle	13 %	10 %	17 %	29 %	4 %
Décès	3 %	12 %	6 %	10 %	1 %

Bruno Mégarbane, du service de Réanimation Médicale et Toxicologique, Hôpital Lariboisière et INSERM U26 - Paris, France. a présenté : **Prise en charge des intoxications aiguës par bêta-bloquants et toxiques avec**

effet stabilisant de membrane.

Les manifestations cardiovasculaires dominent le tableau de l'intoxication aiguë par bêta-bloquants. Celui-ci dépend des propriétés pharmacologiques de la molécule en cause : cardio-sélectivité, lipophilie, activité sympathomimétique intrinsèque et/ou effet stabilisant de membrane. La morbidité des intoxications par bêta-bloquants augmente lors de co-ingestion d'autres cardiotropes. L'ECG montre le plus souvent une bradycardie sinusale à QRS fins. Des troubles de conduction sino-auriculaire, auriculo-ventriculaire voire intra-ventriculaire peuvent survenir au cours de l'évolution. L'hypotension artérielle résulte d'une baisse de la contractilité myocardique, à laquelle s'ajoute, pour le labétalol, une vasodilatation artérielle, par effet bêta-bloquant. Au cours des intoxications sévères, il existe un risque de coma, de convulsions, de dépression respiratoire, d'hypoglycémie et d'hyperkaliémie. La détermination de la concentration plasmatique du bêta-bloquant à l'admission du patient est réalisable, mais sa valeur pronostique n'est pas établie. Le traitement doit être adapté à la gravité des troubles cardiovasculaires. La surveillance de la pression artérielle et de l'ECG est suffisante chez les patients asymptomatiques. Le risque de complications ultérieures est peu probable chez un patient resté asymptomatique, 6 heures après l'ingestion. L'absence d'accélération de la fréquence cardiaque sous atropine confirme le blocage des récepteurs adrénergiques. En cas d'hypotension, le remplissage doit être prudent. Le glucagon en IV directe (2 à 5 mg) puis continue (2 à 5 mg/h) est efficace sur la pression artérielle, mais son effet chronotrope est plus modéré. Il agit en court-circuitant la liaison du bêta-bloquant à son récepteur. En cas d'échec et si la bradycardie n'est pas très marquée, la dobutamine est la molécule de choix. L'adrénaline est l'option thérapeutique, s'il s'agit d'une prise de labétalol. En cas d'intoxication par le sotalol, il convient d'accélérer la fréquence cardiaque par l'isoprénaline, en raison du risque de torsade de pointe. Devant une bradycardie réfractaire ou des troubles importants de la conduction auriculo-ventriculaire, la mise en place d'un entraînement électro-systolique peut se révéler nécessaire.

Les intoxications aiguës avec effet stabilisant de membrane (antidépresseurs polycycliques, chloroquine, flécaïne, propranolol ou acébutolol et cocaïne) sont à l'origine d'une mortalité élevée, aux environs de 5%. Le tableau clinique initial est souvent faussement rassurant, car un arrêt cardio-circulatoire inopiné peut survenir de façon précoce et brutale. L'ECG montre un aplatissement des ondes T, un allongement du segment QT et un élargissement de la durée des complexes QRS qui constitue le principal facteur pronostique. Ces effets sont liés au blocage du canal sodique, responsable du courant entrant de la phase 0 du potentiel d'action. Le tableau clinique comporte un collapsus avec un risque de troubles du rythme ventriculaire (torsades de pointe, tachycardie ou fibrillation ventriculaire) ou de bradycardie à complexes larges, pouvant évoluer vers l'asystole. L'état de choc est principalement cardiogénique, mais comporte toujours une composante vasoplégique. Les formes graves s'accompagnent d'hypoxie secondaire à un œdème pulmonaire lésionnel d'apparition retardée. L'hypokaliémie, parfois profonde, est liée à un mécanisme de transfert et expose, en cas de supplémentation excessive, au risque d'hyperkaliémie, après élimination du toxique. Les sels molaires de sodium (bicarbonate ou lactate) représentent le traitement spécifique en cas de bloc intra-ventriculaire. Seules les mesures symptomatiques de réanimation, et notamment la ventilation assistée, réalisée précocement, peuvent permettre d'améliorer le pronostic des formes sévères. Pour les intoxications graves à la chloroquine, le traitement associé, dès la phase pré-hospitalière, intubation, ventilation assistée et perfusion d'adrénaline et de diazépam. La persistance d'un collapsus sous adrénaline impose de pratiquer une étude hémodynamique, qui montre le plus souvent une correction insuffisante de la baisse des résistances systémiques. En cas de formes réfractaires au traitement médical conventionnel, il peut être licite d'envisager une thérapeutique d'exception, comme l'assistance circulatoire externe.

Brigitte Delhotal Landes et col. du laboratoire de toxicologie Hôpital A.Paré, Boulogne, France a présenté : Recherche de cardiotropes en urgence ?

Les intoxications par cardiotropes, bien que représentant 2% à 4% des intoxications médicamenteuses, sont potentiellement graves. Les chances de succès d'une réanimation spécifique restent essentiellement liées à la précocité de sa mise en œuvre. Dans ce contexte, la confirmation de la prise d'un cardiotrope en urgence est donc nécessaire. Les cardiotropes ont des structures chimiques très hétérogènes. En dehors des cardiotropes recherchés par méthode immunologique (cardiotoniques, cocaïne, antidépresseurs tricycliques...) ou dosés par méthode CPG (chloroquine, méprobamate...) l'apparition dans les laboratoires de toxicologie d'urgence du système HPLC avec DAD avec ou sans extraction on line leur a permis d'effectuer un screening plus large. Cependant, classiquement, ces systèmes ont des limites car ils ne permettent de mettre en évidence que des molécules neutres ou basiques et la limite de détection pour certaines molécules est trop élevée pour les mettre en évidence alors qu'elles sont déjà présentes à des concentrations toxiques (exemple : nicardipine, nifédipine). En urgence à l'aide du REMEDI™, la recherche et l'estimation quantitative de cardiotropes est effectuée pour plusieurs hôpitaux de Paris et de sa région. Une étude retrospective sur environ 1 an, montre que 134 demandes de recherches de cardiotropes (excluant antidépresseurs tricycliques, cocaïne, carbamates, chloroquine) nous sont parvenues de 26 services de réanimation. Soixante six de ces recherches étaient libellées " recherche de bêta-bloquants ", et 3 " recherches d'inhibiteurs calciques ". Sur ces 134 prélèvements, ont été retrouvés dans 53 cas

des b-bloquants, dans 7 cas des inhibiteurs calciques, dans 21 cas des antiarythmiques, dans 16 cas des phénothiazines, dans 18 cas des IRSS, 1 alpha-bloquant, dans 2 cas du dextropropoxyphène, dans 10 cas des antipsychotiques (sulpiride, hydroxyzine, tiapride, risperidone, amisulpride). Pour 22 prélèvements aucune molécule cardiotrope n'a pu être identifiée et 26 des intoxications correspondaient à des associations de cardiotropes. Une première approche des résultats nous conduit à penser que des troubles cardiaques sévères peuvent apparaître pour des concentrations inférieures à celles publiées dans le cas d'intoxications poly médicamenteuses.

Jean-Pierre Goullé et col. du Groupe Hospitalier du Havre, Le Havre (France) a présenté : Deux cas de décès impliquant un antiarythmique, la propafénone.

L'objectif de ce travail est de présenter deux intoxications à conséquence mortelle secondaires à une ingestion volontaire de propafénone. Cet antiarythmique du groupe I est couramment utilisé depuis de nombreuses années et paradoxalement les intoxications létales documentées avec des dosages sanguins sont peu nombreuses. Observation 1 : un homme de 46 ans est trouvé mort à son domicile. De nombreux médicaments sont présents à proximité du corps. Le médecin légiste ne constate aucune trace de violence, un prélèvement sanguin est réalisé. Observation 2 : un homme de 43 ans ayant des antécédents de tentative de suicide est découvert mort dans son véhicule après semble-t-il une absorption massive de médicaments provenant de son traitement : de la propafénone et de la clomipramine sont retrouvés près du cadavre. Le médecin légiste conclut à un décès probable par intoxication médicamenteuse en l'absence d'autre cause. Du sang et des urines sont prélevés. La recherche d'éthanol et de molécules volatiles est effectuée dans le sang total et les urines par chromatographie en phase gazeuse couplée à l'espace de tête. Les dépistages des principaux stupéfiants et de quelques médicaments sont réalisés dans le sérum et les urines par immunoanalyse. Ces dépistages sont complétés par l'analyse du sérum et des urines par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) et par chromatographie en phase liquide couplée à la mesure par barrette de diodes (CLHP/BD). Le dosage de la propafénone, de la clomipramine et de leur métabolite est effectué par CLHP/BD après extraction en phase liquide.

Observation 1 : l'expertise toxicologique montre la présence d'éthanol dans le sang (2,71 g/l) ainsi que de propafénone à l'exclusion de toute autre substance détectable. Le dosage de propafénone dans le sang révèle une concentration de 4180 ng/ml. On note l'absence de norpropafénone détectable.

Observation 2 : les dosages sanguins révèlent outre la présence de clomipramine et de desméthylclomipramine (respectivement 532 et 601 ng/ml), une teneur massive en propafénone 9423 ng/ml avec une concentration de 416 ng/ml pour la norpropafénone.

Depuis 1990, la propafénone est réservée aux troubles du rythme menaçant le pronostic vital en raison du risque léthal chez les sujets traités. L'ingestion d'une quantité inférieure à 3 g soit 10 comprimés est susceptible de menacer le pronostic vital. .

Les diurétiques

Mme Pechère-Bertschi de la Division d'Endocrinologie et Policlinique de Médecine de Genève nous a présenté : Un grain de sel dans les diurétiques

Au cours de l'Antiquité déjà, il est fait mention de substances augmentant le flux urinaire, mais ce n'est qu'en 1957 avec la synthèse du chlorothiazide que l'usage de ces drogues s'est répandu. L'utilisation judicieuse de ces médicaments nécessite de connaître leurs sites d'action au niveau rénal. Malgré certaines réserves émises à leur rencontre dans les années 1980 et réfutées depuis, quant à leur effets métaboliques potentiellement délétères sur la mortalité coronarienne, ils sont un outil thérapeutique redoutable dans le traitement des états oedémateux et de l'hypertension artérielle. Leur aptitude à réduire la survenue des accidents cardio-vasculaires, dont l'attaque cérébrale, est largement démontrée. Le concept de les combiner à faibles doses, ce qui en minimise les effets secondaires, avec d'autres classes thérapeutiques, comme les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou les antagonistes du récepteur de l'angiotensine II, donne une synergie très intéressante. Après quelques notions de physiologie rénale et de pharmacologie, l'utilité de ces médicaments dans des indications particulières comme l'hypertension artérielle réfractaire, l'hypertension dite sensible au sodium, et l'intérêt éventuellement néphroprotecteur des molécules type de anti-aldostérone ont été évoqués.

Carine Schweizer du Laboratoire Suisse d'Analyse du Dopage à Lausanne nous a parlé de Recherche des diurétiques dans la lutte anti-dopage

Les diurétiques sont des médicaments interdits dans la pratique du sport pour deux raisons principales. Dans les disciplines à catégories de poids, ils pourraient être utilisés pour baisser artificiellement et rapidement la charge pondérale afin de correspondre à la bonne catégorie. Ils sont en outre connus pour éliminer plus rapidement les traces de certains produits interdits. Dans ce cas particulier, les diurétiques entrent dans la famille des produits dits "masquants".

Ces dernières années, les laboratoires d'analyse du dopage ont, dans leur majorité, utilisé la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pour l'analyse des diurétiques. Cette famille de médicaments étant représentée par des substances aux caractéristiques physico-chimiques très différentes, c'est une méthode d'extraction méthylique qui permet de les extraire et de les dériver afin de les rendre propices à l'analyse.

La méthode utilisée permet la détection des produits recherchés avec une fiabilité conforme aux standards habituels en chimie analytique et une sensibilité suffisante pour la fourchette de concentrations recherchée. Cette méthode de screening permet également de détecter d'autres produits comme la benzoyl-ecgonine, le THC-COOH et une grande majorité des anti-inflammatoires non-stéroïdiens.

La mise sur le marché de produits de plus en plus spécifiques pose actuellement quelques problèmes de détection à l'analyse. En effet, les doses utilisées étant souvent plus faibles et les modes d'élimination moins connus, on aura, dans le futur proche, recours de manière préférentielle aux techniques liquides de séparation couplées à la spectrométrie de masse.

Suicide par produit euthanasiant

Jean Pierre Anger et col. du Laboratoire de Toxicologie - Faculté de Pharmacie -Rennes, a présenté : **Suicide par injection de T-61**

Le T-61 ou TANAX® est un agent euthanasiant vétérinaire parfois impliqué dans les tentatives de suicide chez l'homme en administration par différentes voies. Le produit commercial est un mélange de trois principes actifs : l'embutramide, le mébezonium et le chlorhydrate de tétracaïne dont l'association entraîne plus ou moins rapidement la mort par anoxie cérébrale. Le cas d'une jeune femme décédée des suites de l'injection intraveineuse de T 61 est présenté.

L'analyse toxicologique a porté sur le sang, le foie et le cerveau où l'on a recherché et dosé les produits volatils par CPG-HS, les principaux psychotropes par HPLC-DAD ainsi que l'embutramide par CPG-SM. L'analyse HPLC-DAD permet d'identifier seulement l'embutramide et confirme l'absence de tout autre xénobiotique. Des trois constituants du T 61, seul l'embutramide, a pu être dosé par CPG-SM et a montré les concentrations suivantes dans les milieux examinés : Sang total : 751 mg/l ; Foie : 64,4 mg/kg; Cerveau : 14 mg/kg.. La concentration sanguine retrouvée se révèle supérieure aux données de la littérature fournies à l'occasion d'intoxications humaines (15,3-226 mg/l), qui dépendent grandement de la voie d'administration et de la dose reçue.

Alvarez JC et col. Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, Garches, France a présenté : **Dosage de l'embutramide : à propos d'un cas de suicide par administration intraveineuse de T-61**

Le Tanax® ou T-61® est un soluté euthanasique très utilisé en médecine vétérinaire. L'embutramide est un des trois principes actifs du T-61. Lors d'intoxications accidentelles ou de suicide par le T-61, le dosage de l'embutramide permet de confirmer l'hypothèse de l'intoxication.

100 µl de sang ou de solution sont extraits par le dichlorométhane (1ml) en milieu alcalin (NaOH 1M) après ajout de 0,2 µg de prazépam (EI). Après agitation et centrifugation, la phase organique est récupérée, évaporée et le résidu repris par 100 µl d'un mélange tampon phosphate 25 mM et acétonitrile (70/30, V/V). 10 µl sont injectés dans le système chromatographique constitué d'une pompe quaternaire (ThermoFinnigan), d'un injecteur automatique AS 3000, d'une colonne HyPurity C18 ThermoHypersil (250 x 4,6 mm) et d'une pré-colonne C18 ThermoHypersil (4 x 4,4 mm) maintenues à 35°C et d'un détecteur à barrette de diodes UV 6000. La phase mobile est un mélange de tampon phosphate 25 mM pH 3,8-acétonitrile avec un gradient de 30-80% en 18 min. Les Tr de l'embutramide et du prazépam sont respectivement de 10,5 et 17 min. La méthode apparaît fiable, sensible et spécifique. Les limites de détection et de quantification sont respectivement de 0,2 et 0,5 mg/l avec un volume injecté de 10 µl. La calibration est linéaire de 0,5 à 50 mg/l. La variabilité intra- et inter-analyses est toujours inférieure à 10%.

Cas clinique : un vétérinaire est retrouvé mort, une perfusion posé à son bras. Le flacon de T-61 fixé à la perfusion est quasiment vide. Le reste de la solution injectée est analysé et montre une concentration de 200 g/l, ce qui correspond à la concentration des flacons de T-61. Il y a donc eu administration de 10 g d'embutramide (flacon de 50 ml), soit 140 mg/kg. La concentration retrouvée dans le sang total est de 90 mg/l. Un cas préalable suite à une ingestion par voie orale de 2 flacons de 50 ml de T-61 avait montré des taux sanguins d'embutramide de 31 mg/l. Ce cas sera le premier cas d'intoxication mortelle chez l'homme après administration intraveineuse d'une quantité connue d'embutramide. Cette étude permet d'évaluer le volume de distribution de l'embutramide chez l'homme à environ 1,6 l/kg.

Christian Giroud, et col. de l'Institut Universitaire de Médecine Légale Lausanne a présenté : **Suicide d'un vétérinaire par injection d'une solution de pentobarbital (Vetanarcolâ) utilisée pour l'euthanasie des animaux, comparaison avec les cas " Exit "**

En Suisse, les intoxications aux barbituriques sont devenues de plus en plus rares. Font exception les cas " Exit ". Cette association qui pratique l'assistance au suicide recommande l'usage du pentobarbital pour abrégé les souffrances d'individus gravement atteints dans leur santé. Les vétérinaires constituent une autre exception qui est favorisée par leur pratique de l'euthanasie d'animaux à l'aide de produits fortement dosés en pentobarbital. Nous présentons ici un cas d'intoxication volontaire au pentobarbital qui concerne un vétérinaire; les résultats des analyses toxicologiques sont discutés et comparés avec ceux des cas " Exit ".

Les échantillons biologiques sont analysés par le biais de tests immunologiques et de méthodes chromatographiques (GC-FID, HPLC-DAD et GC-MS). Le pentobarbital est dérivé par méthylation rapide dans l'injecteur avec le TMAH puis dosé par GC-MS.

Les analyses toxicologiques ont révélé la présence de pentobarbital seulement. Aucun produit volatil n'a pu être détecté. Les dosages indiquent les concentrations ou les quantités suivantes : sang périphérique : 13,5 mg/l ; sérum : 21,7 mg/l ; urine : 7,2 mg/l ; contenu gastrique : 0,7 mg ; humeur vitrée : 12,6 mg/l ; LCR : 13,9 mg/l ; cortex cérébral : 33,2 mg/kg ; bile : 67,4 mg/l ; foie : 27,5 mg/kg. Pour 8 cas " Exit ", les concentrations se situaient dans une fourchette allant de 16,1 à 59,6 mg/l. La voie orale est la méthode d'administration usuelle dans les cas " Exit ", cette administration de pentobarbital (10 g) est en général précédée de la prise d'un antiémétique. L'injection est très probablement la voie utilisée par le vétérinaire. L'absence de détection de tout antiémétique, la présence d'une seringue vide (10 ml) et l'existence de plaies punctiformes sur l'abdomen viennent étayer cette hypothèse. La présence de pentobarbital dans le contenu gastrique est attribuée à une diffusion post mortem. Les concentrations déterminées dans le sang périphérique, l'humeur vitrée et le liquide céphalorachidien sont très proches les unes des autres.

Les cheveux & autres matrices alternatives

Christian Staub de l'Institut Universitaire de Médecine Légale de Genève, nous a présenté **Les cheveux sont-ils devenus un prélèvement indispensable en toxicologie judiciaire ?**

Les cheveux possèdent la propriété d'être le marqueur d'une exposition répétée et permettent, en outre, d'établir un profil de consommation sur une période longue (plusieurs semaines voire plusieurs mois). Ce n'est que depuis 1998 que ce prélèvement et ce type d'analyse sont utilisés en routine à l'Institut de Médecine Légale de Genève. L'interprétation des résultats, comme pour d'autres matrices, nécessite d'avoir recours à des valeurs de référence. Il est même souhaitable que chaque laboratoire possède ses propres valeurs. Des contrôles de qualité externes sont organisés par la " Society of Hair Testing " (SOHT), une société savante ayant pour objectif de promouvoir cette technique.

E. Vinner et col. du laboratoire de l'Hôpital Calmette, Lille, présente : **Intérêt de l'analyse par CPG/SM des cheveux de nouveau-nés exposés aux drogues in utero dans la prévision d'un syndrome d'abstinence**

Les nouveau-nés, exposés aux drogues durant leur vie fœtale, peuvent souffrir d'un syndrome d'abstinence (SAN) plus ou moins sévère un à plusieurs jours après la naissance, nécessitant la mise en place d'un traitement par morphine. Le diagnostic d'un SAN peut ne pas être évoqué rapidement en raison des symptômes atypiques présentés par le nouveau-né : cris, agitation, coliques..., notamment lorsque l'historique de la conduite addictive de la mère n'est pas révélé.

Pour tenter d'estimer et de mesurer les facteurs toxicologiques permettant de prévoir l'apparition et la sévérité du SAN d'enfants nés de mères à conduites addictives et pour confirmer le diagnostic clinique, un protocole approuvé par le comité d'éthique a été mis en place entre le 01/06/99 et le 31/12/01.

Sur la base d'une participation et après consentement éclairé, toutes les parturientes à conduites addictives suivies en consultations prénatales ont été incluses, et également des mères ayant accouché sans consultations préalables mais ayant une consommation avérée ou découverte de substances illicites. Etaient exclues du protocole les parturientes à consommation isolée de substances psychoactives et/ou d'alcool.

Les urines des nouveau-nés ont été recueillies en 4 fractions sur le nyctémère, les méconiums dans les 48 H suivant la naissance et les cheveux selon la procédure préconisée par la SHT. Des résultats concernant la détection par méthodes immunologiques et la quantification par CPG-SM des opiacés, des cannabinoïdes, des dérivés de la cocaïne et de la méthadone dans les 3 matrices sont décrits pour 17 couples mère/enfant.

Un profil d'exposition aux opiacés avec ou sans molécule substitutive ou autres substances associées a pu être défini et relié aux données cliniques concernant le SAN. Il semble se dégager le fait qu'un SAN apparaît plus fréquemment après une exposition in utero à une association opiacés/molécule de substitution (8 sur 10 SAN de l'étude). La participation d'autres substances comme les benzodiazépines et la cocaïne est également à prendre en compte. La substitution par méthadone ou buprénorphine de femmes enceintes à conduites addictives reste cependant le traitement de choix au regard des risques encourus par le fœtus et le nouveau-né en l'absence d'une telle thérapeutique. L'analyse des cheveux par CG-SM associée à l'analyse des autres matrices pourrait permettre de prévoir l'apparition d'un SAN et renseigner ou confirmer le clinicien dans son diagnostic.

Michel Yegles, et col. du Laboratoire National de Santé, Toxicologie, Luxembourg a présenté : Mise en évidence de l'éthyl glucuronide (EtG) par GC/MS-NCI dans les cheveux. Intérêt de l'EtG par rapport aux marqueurs sanguins de l'alcoolisme chronique

L'éthyl glucuronide (EtG) est un métabolite mineur non-volatile de l'éthanol. L'EtG est encore décelable dans les prélèvements biologiques à un moment où l'éthanol non conjugué ne l'est plus. Il est détecté par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en mode d'ionisation chimique négative (GC/MS-NCI). Afin d'évaluer l'alcoolisme chronique chez un certain nombre de sujets des paramètres sanguins tels que la Béta-glutamyl transférase (gamma-GT) et la transferrine déficiente en hydrates de carbone (CDT) ont également été déterminés.

Une quarantaine d'échantillons de cheveux ont été analysés provenant soit de personnes décédées, soit de volontaires consommateurs occasionnels de boissons alcoolisées (ad 20g d'EtOH pur par jour). Pour l'analyse de l'EtG les cheveux ont été incubés dans une solution de MeOH-H₂O (1:1) pendant la nuit. Après centrifugation, le surnageant est évaporé à sec sous azote et le résidu est dérivé à l'aide d'anhydride pentafluoropropionique avant analyse par GC/MS-NCI. Le d₅-EtG est utilisé comme étalon interne et les fragments m/z 496 et 342 sont tracés pour l'EtG. Le rendement d'extraction est de 60 % et la limite de détection est de 30 pg/mg cheveux. Les résultats ont montré qu'aucun EtG n'a pu être décelé dans les cheveux de buveurs occasionnels. Chez les 10 personnes autopsiées les concentrations de l'EtG étaient situées entre 60 et 5800 pg/mg de cheveux alors que les valeurs de CDT variaient de 2,8 à 51 % et celles de la GT de 19 à 186 UI/L. Par ailleurs, une étude de décoloration par peroxydation des cheveux a montré une diminution de la concentration capillaire de l'EtG de 78 %.

La GC/MS-NCI a permis d'améliorer sensiblement la LOD. Les résultats de la mesure de l'EtG dans les cheveux peuvent apporter des informations tout à fait pertinentes et complémentaires aux marqueurs sanguins de l'alcoolisme chronique.

V. Dumestre-Toulet et col. Laboratoire BIOFFICE, Artigues près Bordeaux, France a présenté : Lutte antidopage : Pourquoi faut-il rechercher les 19-norstéroïdes dans les cheveux ?

L'identification et la quantification des 19-norstéroïdes dans les cheveux est utile pour discuter sur le plan médico-légal un résultat urinaire positif pour la norandrostérone à partir d'une technique. 100 mg de cheveux, décontaminés avec du dichlorométhane sont incubés dans 1 ml de NaOH 1N, 15 min à 95°C, en présence de nandrolone D3, étalon interne. L'homogénat ainsi obtenu est neutralisé par de HCl 1N. 2 ml de tampon pH 7 sont ajoutés. Les molécules sont extraites en phase solide/liquide par passage sur des colonnes isolute C18 et éluées par trois aliquots de méthanol. Une extraction liquide/liquide de l'éluat alcalinisé est réalisée avec du pentane. La phase organique est évaporée à sec. Une dérivation par le mélange MSTFA/NH₄I/2-mercaptoéthanol (1000 :2 :5, v/v/v) est réalisée pour obtenir des composés énoil-silylés qui seront analysés par GC/MS/MS. La technique est linéaire entre 1 et 50 pg/mg de cheveux et offre une limite de détection comprise entre 0,5 et 1 pg/mg.

Cette technique a permis de documenter plusieurs cas de dopage à la nandrolone et de mettre en évidence la présence de norandrostenedione à un taux de 7 pg/mg dans les cheveux d'un athlète réfutant la prise de nandrolone. En 2001, 29 athlètes ont été déclarés positifs dans les contrôles anti-dopage. Parmi eux, 14 l'étaient pour la nandrolone, c'est-à-dire avaient une concentration urinaire du métabolite norandrostérone supérieure à 2 ng/ml. Les spécialistes s'accordent à dire aujourd'hui que les laboratoires dépistant aisément ce type de dopage, Si les athlètes sont confondus c'est sans doute parce qu'ils prennent des suppléments alimentaires contaminés. Ces suppléments, que l'on trouve le plus souvent sur Internet, ne sont pas contrôlés par la FDA et seraient actifs parce qu'ils contiennent des anabolisants... L'équipe du Prof Schänzer à Cologne s'est vu confier par le CIO une mission d'enquête sur ces produits et révèle 16 cas de contamination sur les 100 premiers produits analysés. Ces compléments contiendraient parfois de la nandrolone ou du stanozolol mais aussi et surtout de la norandrosténolone et de la norandrostenedione, en vente libre aux USA. Ces molécules donnent les mêmes métabolites urinaires que la nandrolone et donc des résultats positifs aux contrôles antidopage.

Bien que la nandrolone et toutes les molécules apparentées soient classées comme produits interdits dans la liste du CIO, il convenait de pouvoir distinguer la nature de la molécule en cause lors d'un dépistage urinaire positif à la nandrolone et éventuellement mettre en évidence un dopage " à l'insu de l'athlète " par un autre norstéroïde.

Vincent Cirimele, et col. de l'Institut de Médecine Légale, Strasbourg, France a présenté Caractérisation du furosémide dans les cheveux par LC-MS/MS

Après obtention de leur consentement, une mèche de cheveux a été prélevée chez 20 patients (16 hommes et 4 femmes âgées de 29 à 91 ans) traités par Lasilix® aux posologies de 20 à 250 mg/jour sur une période de 10 jours à 10 ans.

Les cheveux, coupés en segments courts (< 1mm), ont été incubés une nuit à 45°C dans 1mL de méthanol/HCl (99:1, v/v). Après incubation, le solvant a été centrifugé et évaporé. Les analyses ont été réalisées par LC-MS/MS (Esquire 3000, Bruker Daltonique) après séparation chromatographique des constituants de l'extrait par un gradient d'acétonitrile (30 à 50% en 10 min) sur une colonne C18 (15 x 1 mm, d.i.). Lors de la détermination

par MS/MS, l'ion pseudomoléculaire du furosémide (m/z 329) a été isolé et fragmenté pour générer les fragments fils (m/z 285 et 287). L'étape unique de solubilisation-purification par le mélange méthanol/HCl (99:1, v/v) s'est avérée être l'approche la plus satisfaisante. Les autres méthodes testées faisaient appel à une incubation des cheveux dans des conditions acides (HCl 0.1N, 16h à 56°C), alcalines (NaOH 1M, 10 min à 95°C) ou tamponnées (pH 5.5 or 7.6) suivie d'une étape de purification par extraction liquide-liquide (acétate d'éthyle ou éther diéthylique à pH 1,0 ou 5,5) ou solide-liquide (Isolute® C18 ou Bond Elut Certify®). Le procédé analytique a été validé en terme de linéarité, rendement d'extraction, répétabilité et limite de détection. Les résultats préliminaires obtenus à partir d'échantillons de cheveux prélevés chez des patients traités par Lasilix® annoncent déjà des concentrations de furosémide de l'ordre du pg/mg.

Les diurétiques sont incorporés dans les cheveux et peuvent être isolés par un procédé simple et rapide. Néanmoins, leur détection n'a pu être réalisée qu'à l'aide d'un appareillage spécifique et sensible comme la LC-MS/MS, confirmant ainsi que l'analyse des substances de la performance (anabolisants, corticoïdes et maintenant diurétiques) dans les cheveux est particulièrement difficile du fait des très faibles concentrations à mesurer.

E. Cognard, et col. de l'Institut Universitaire de Médecine Légale, Genève, Suisse a présenté : Analyse de la cocaïne, de l'anhydroecgonine-méthylester et de la cocaéthylène dans les cheveux par GC/MS.

Lors d'une analyse de cheveux, le composé parent est présent majoritairement. Dans le cas de la cocaïne (COC), l'interprétation des cas positifs est difficile, car la présence de cette dernière dans les cheveux ne permet pas d'affirmer qu'il y a eu consommation. En effet, la cocaïne prise sous forme de base ("crack"), est fumée, ce qui peut entraîner une déposition de cocaïne à la surface des cheveux. Il est donc d'un grand intérêt de disposer d'une méthode permettant le dosage simultané de la cocaïne et de ses deux métabolites spécifiques : l'anhydroecgonine-méthylester (AEME) et la cocaéthylène (COET).

Les cheveux sont décontaminés par une série de lavages successifs, puis séchés, broyés et hydrolysés avant d'être extraits par SPE automatisée. Les analyses sont ensuite réalisées en utilisant un GC-MS Saturn 2000 Varian couplant un GC 3400 à un spectromètre de masse de type trappe ionique.

La méthode a été validée en utilisant des cheveux enrichis et en effectuant la quantification de la COC, l'AEME et la COET respectivement sur les ions 304+182, 150+182, et 318+196 m/z . Les droites de calibration sont linéaires ($R_2 > 0.99$) entre 1 et 20 ng/mg pour les trois composés. Les LOQ de la COC, de l'AEME et de la COET sont respectivement de 0.10, 0.05 et 0.08 ng/mg et leurs LOD sont respectivement de 0.002, 0.004 et 0.002 ng/mg. Le rendement d'extraction est de 80 % pour les trois substances. L'ensemble de la validation a été effectué en injection splitless. Or, une dégradation non négligeable de la cocaïne en AEME (max. 3 %) est observée (pyrolyse au niveau de l'injecteur), ce qui risque de poser un problème lors de l'analyse quantitative de cas réels puisqu'on ne pourra pas dire si l'AEME détectée est due à la dégradation de la cocaïne pendant l'injection ou à une consommation effective de crack. La technique d'injection a donc été modifiée pour travailler non plus en splitless, mais en injection on-column à froid. L'utilisation de cette technique d'injection permet non seulement de réduire la dégradation de la cocaïne dans l'injecteur à des valeurs négligeables mais aussi d'obtenir une meilleure sensibilité et une meilleure répétabilité qu'en mode splitless.

Fabienne Jeanneret, et col. des Hôpitaux Universitaires de Genève, LCCC, Genève, Suisse, a présenté : Liquide interstitiel comme matrice alternative au sang ? Etude en cours des acides aminés par LC-MS et recherche d'autres composés endogènes ou de médicaments.

La nature invasive des prises de sang et leur difficulté pratique chez certaines catégories de patients comme les jeunes enfants ou les personnes âgées ont conduit à rechercher des procédés non invasifs de prélèvements d'échantillons biologiques. La substitution de la prise de sang par l'iontophorèse est étudiée dans ce travail. Cette technique utilise le passage d'un faible courant à travers la peau pour délivrer des molécules ou pour les extraire du liquide interstitiel. Une corrélation entre le glucose du sang capillaire et celui extrait par iontophorèse est déjà établie et a mené à la commercialisation d'un capteur appelé GlucoWatch[®]. D'autres composés, endogènes ou exogènes, sont également extraits par iontophorèse et un screening général de ceux-ci est actuellement en cours. Les premières molécules étudiées sont les acides aminés dosés lors de maladies métaboliques comme la phénylcétonurie, l'homocystinurie, ou la tyrosinémie.

Les cellules d'iontophorèse sont placées sur les avant-bras d'adultes volontaires sains et remplies avec une solution saline. Un courant de 0.5 mA/cm² est appliqué pendant 25 minutes, puis les solutions des cellules sont récupérées et d'autres intervalles d'iontophorèse sont réalisés. Les extraits iontophorétiques sont analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) sans préparation ni traitement des échantillons.

Les essais in vivo démontrent une extraction de la plupart des acides aminés, séparés dans les compartiments anodiques ou cathodiques selon leur charge. Les quantités obtenues sont de l'ordre d'une centaine de nmoles. Il reste maintenant à établir si une corrélation avec les valeurs plasmatiques existe en effectuant des prises de sang simultanément à l'analyse par iontophorèse. Le système GlucoWatch[®] nécessite une période de lavage de deux heures avant d'obtenir une corrélation avec les valeurs du sang capillaire. Pour les acides aminés, ce laps de

temps est à déterminer et à minimiser au plus bas possible.

L'utilisation de l'iontophorèse comme procédé non invasif est en cours d'étude et s'inscrit dans le cadre de la recherche de matrices alternatives. Dans ce travail, des substances endogènes ont été choisies comme modèle d'étude, mais des essais in vitro ont montré une extraction à travers la peau de médicaments tels que la théophylline, la phénytoïne, le valproate ou le lithium. L'extraction transdermique semble donc être une voie intéressante et prometteuse pour le dosage de différents types de molécules.

Contrôles de qualité

L. Humbert et col. Laboratoire de Biochimie & Biologie Moléculaire, Hôpital Calmette, Lille a présenté : **Dosage de la buprénorphine et de la norbuprénorphine dans le sang total et l'urine : Résultats de la première évaluation externe de la qualité.**

Le traitement substitutif des pharmacodépendances majeures aux opiacés par la buprénorphine haut dosage (Subutex®) connaît depuis 1995 un succès croissant (80 000 patients en 2002). De nombreux laboratoires réalisent sa recherche et son dosage dans les liquides biologiques. La commission assurance de qualité de la SFTA a proposé fin 2001 le premier contrôle externe de qualité qui comprenait deux échantillons lyophilisés, d'origine humaine, supplémenté en buprénorphine et norbuprénorphine (sang total et urine). 30 laboratoires étaient inscrits. Les concentrations en buprénorphine et norbuprénorphine ont été collectées en même temps que le mode opératoire mis en œuvre. Les calculs statistiques (moyenne, écart-type et Z-score) ont été effectués et les laboratoires dont le Z-Score était > 3 pour chaque dosage étaient écartés du calcul de la moyenne.

Sur les 30 laboratoires inscrits à cette évaluation, 22 laboratoires ont rendu leurs résultats. Les méthodes séparatives se répartissent à part égale entre la chromatographie liquide et la chromatographie phase gazeuse. 90 % des laboratoires utilisent la détection par spectrométrie de masse. Neuf laboratoires sur 10 réalisant le dosage par CG/SM procèdent à une silylation avant chromatographie. Tous les laboratoires qui réalisent ce dosage avec une détection par spectrométrie de masse utilisent le ou les homologues deutérés des molécules (15 utilisent les deux homologues, 3 la buprénorphine D4).

Pour chaque analyte et dans chaque milieu la moyenne obtenue par CLHP/SM est inférieure à celle obtenue par CG/SM mais avec un écart type plus restreint.

Modélisation moléculaire

J.H. Bourdon et col. Hôpital Salvator, Laboratoire de toxicologie et des pharmaco-dépendances, Marseille. France a présenté : **La modélisation moléculaire, outil de détection d'une potentialité d'activité amphétaminique ?**

L'utilisation de la modélisation moléculaire, outil de l'industrie pharmaceutique peut être envisageable dans la détermination de l'activité pharmacologique d'une nouvelle substance à potentiel d'abus, cela évite les mois nécessaires pour procéder à l'évaluation préalable du potentiel d'abus et de dépendance. Une étude de faisabilité est réalisée à partir des dérivés de la phényléthylamine. Le but de cette étude est de prédire les effets pharmacologiques des nouvelles molécules dérivées de la phényléthylamine en utilisant des relations dérivées de l'analyse des propriétés des molécules déjà connues.

Le matériel informatique est constitué d'un micro-ordinateur d'une station de travail Silicon Graphic. Sybyl 6.3. Les études de QSAR ont été réalisées à l'aide de tables organisées en lignes pour les substances étudiées et en colonnes pour les valeurs des paramètres physico-chimiques. Une base de données a été constituée à partir de nombreuses molécules dérivées de la phényléthylamine, et d'actions pharmacologiques différentes. Les paramètres étudiés sont le pKa, le Log P (lipophilie), le Log D (lipophilie en fonction du pH), l'énergie de la molécule et le poids moléculaire.

L'association des techniques statistiques (ACP et clustérisation) et de l'étude par CoMFA apparaît intéressante pour répondre à l'objectif de classification des substances amphétaminiques. L'exemple de l'ACP (CoMFA, poids moléculaire et Log P) montre la possibilité de séparation des substances amphétaminiques des autres dérivés de la phényléthylamine. L'étude du CoMFA par clustérisation améliore cette séparation.