

Cannabis et fluide oral (salive)

Pascal Kintz



SECURITE ROUTIERE

Stupéfiants : tests salivaires

L'AFP, le Figaro et Libération annoncent que le ministre de l'Intérieur va « généraliser » les tests salivaires.

L'AFP rapporte que lors des questions au gouvernement à l'Assemblée nationale, le ministre de l'Intérieur a annoncé qu'il avait « pour objectif de généraliser l'emploi du test salivaire de dépistage dans le courant de l'année 2005 », un test réalisé à sa demande par le centre d'études et de recherche de la police nationale « qui a été vérifié et adopté » et qui donc « peut être utilisé et généralisé ».

26 octobre 2004

Cannabis : contexte d'usage

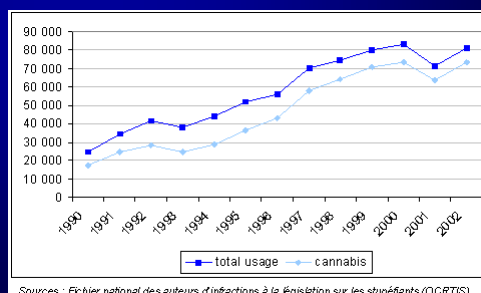
Enquête ESCAPAD 2003

Jeunes de 17 et 18 ans, n=15710

50,3 % des jeunes ont expérimenté le cannabis. Ils étaient 45,5 % en 2000.

Un tiers (37,9 % garçons et 26,3 % filles) ont consommé le mois dernier

Interpellation, ILS



Sources : Fichier national des auteurs d'infractions à la législation sur les stupéfiants (OCRTIS)

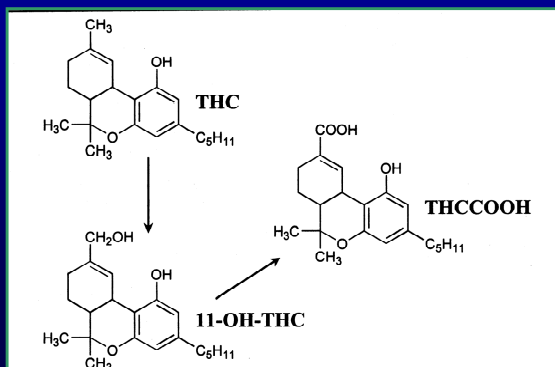
Composition de la fumée

- La fumée d'un joint de marijuana est proche dans sa composition de celle de la fumée des cigarettes, mais le mode de consommation diffère de manière notable (effets sur les concentrations en goudrons et CO) :
 - le volume de fumée inhalée est augmenté : + 66 %
 - La durée d'inhalation est plus longue : + 60 %
 - L'inhalation est plus profonde : + 33 %
 - La durée de rétention de la fumée est multipliée par 5
- Composition : cf tabac + 61 cannabinoïdes (Δ^9 THC, Δ^8 THC, CBN, CBD ...) et 360 autres composés



Métabolisme du Δ^9 THC

- Hydroxylation hépatique (cytochrome P450) : métabolite actif, **11OH- Δ^9 THC**
- Oxydation 11OH- Δ^9 THC : **Δ^9 THC-COOH**, inactif qui va être conjugué



Etude contrôlée n° 1



Hawks, NIDA Monograph 42, pp 125-137

Administration par injection IV de Δ^9 THC marqué (radioactivité)

Recueil de la salive sur 6 à 8 heures par crachat

Analyse directe sur un compteur

Aucune trace de radioactivité dans la salive

Conclusion des auteurs : le Δ^9 THC (ou ses métabolites) n'est pas excrété dans la salive

S'il y a des substances identifiées après consommation par cigarette, leur origine est à rapprocher d'une séquestration (contamination) buccale

Etude contrôlée n° 2



Huestis et Cone, *J Anal Toxicol*, 2004, 28, 394-399

Cigarette de cannabis dosée à 1,75 ou 3,55 % de Δ^9 THC chez 6 sujets

Recueil de la salive après stimulation (acide citrique)

Dosage par RIA ou GC/MS

12 min après avoir fumé : Δ^9 THC = 5800 ng/ml

20 min après avoir fumé : Δ^9 THC = 81 ng/ml

Après 120 min, les concentrations sont inférieures à 5 ng/ml

Le rapport salive/plasma a varié de 0,5 à 2,2 (théorie : $< 0,1$; Marquet, 1996)

Le 11-OH- Δ^9 THC et le Δ^9 THC-COOH n'ont jamais été identifiés

Etude contrôlée n° 2

Huestis et Cone,
J Anal Toxicol, 2004

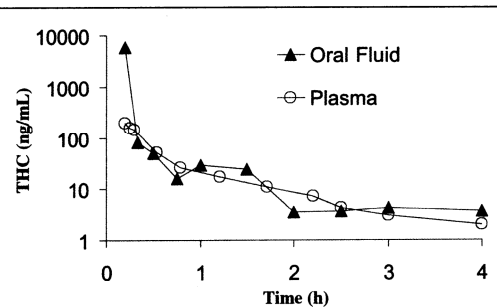


Figure 1. Simultaneous measurement of THC in oral fluid and plasma by GC-MS analysis (cutoff concentrations = 0.5 ng/mL) in a human subject (Subject G) over 4 h following smoking of a single cannabis cigarette (3.55%).

Corrélation salive / sérum

Toennes, J Anal Toxicol, 2005, 29, 22-27

Recueil systématique de salive et sérum chez des conducteurs « sous influence »

Analyse par GC/MS des 2 prélèvements

Δ^9 THC positif dans 97 échantillons de sérum et 89 salives (91,8 %)

Conclusion : si seulement la salive est recueillie, environ 10 % des conducteurs sous influence de cannabis ne seraient pas identifiés.

La présence de Δ^9 THC dans la salive correspond à la période des signes cliniques de l'intoxication.

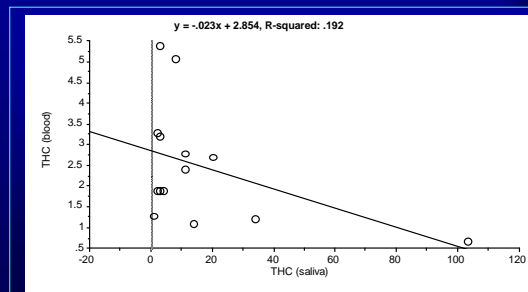
La salive est donc un milieu de choix pour démontrer un usage récent de cannabis.

Corrélation salive / sang

Kintz, J Anal Toxicol, 2000, 24, 557-561

Recueil de sang, urines, salive et sueur chez 198 conducteurs accidentés

Analyse par GC/MS des prélèvements



19 conducteurs positifs

dans le sang pour Δ^9 THC (0,4 - 5,4 ng/ml)

et 14 positifs dans la salive (1 - 103 ng/Salivette)

Dépistage par tests immuno-chimiques

Les leçons de ROSITA

Seuils de positivité SAMHSA : 4 ng/ml (dépistage) et 2 ng/ml (confirmation)

Les tests de dépistage ne sont pas assez sensibles !

- Mura et al, Acta Clinica Belgica, 1999, suppl 1, 35-38
- Grönholm et Lillsunde, Forensic Sci Int, 2001, 121, 37-46

Exemple : Samyn et Van Haeren, Int J Leg Med, 2000, 113, 150-154

15 sujets « sous influence » :

Δ^9 THC positif dans le sang par GC/MS : 10 sujets

Cannabis positif dans la salive après dépistage par Drugwipe : 1 sujet

... + 3 faux positifs par Drugwipe

Les outils de dépistage ...



Dräger,
Belgique, 50 % faux-négatifs



Cozart,
USA, 6/33 faux-négatifs



Branan,
Allemagne, entre 41 et 86 % des tests ne fonctionnent pas



Ultimed SalivaScreen,
USA, 15/22 faux-négatifs

Influence du mode de recueil de la salive

Le Δ^9 THC peut s'adsorber sur les supports de recueil

Les concentrations de Δ^9 THC sont supérieures après recueil par Salivette par rapport au recueil après crachat

Il faut extraire directement le coton de la Salivette par les solvants et ne pas juste centrifuger le système

Le recueil par Intercept semble favorable au cannabis

Le Δ^9 THC peut se fixer sur les membranes des tests de dépistage et ainsi largement diminuer leur sensibilité

Références

Kauert, Blutalkohol, 2000, 37, suppl 1, 76-83

Samyn, J Forensic Sci, 2002, 47, 1380-1387

Aspects analytiques

Après recueil par Salivette (Kintz et al, J Anal Toxicol, 2000)

Coton + 20 ng Δ^9 THC- d_3 + hexane/acétate d'éthyle (90/10)

Agitation, recueil de la phase organique, évaporation

Dérivation par méthylation (cf sang, méthode SFTA)

Analyse par GC/MS, LOQ = 1 ng/Salivette

Après recueil par Intercept (Kintz et al, J Anal Toxicol, 2005)

Liquide bleu (0,50 ml) + 20 ng Δ^9 THC- d_3 + hexane/acétate d'éthyle (90/10)

Agitation, recueil de la phase organique, évaporation

Dérivation par méthylation (cf sang, méthode SFTA)

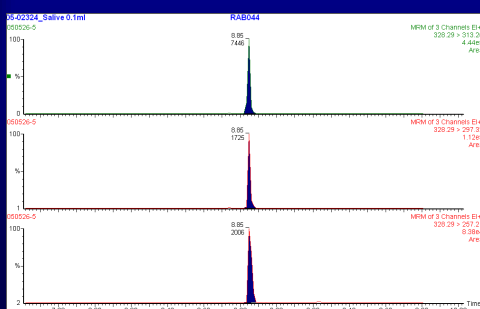
Analyse par GC/MS, LOQ = 1 ng/ml

Procédure de confirmation

En cas de besoin, ou lorsque l'échantillon de salive est très faible
utilisation de la GC-MS/MS

Waters Quattro Micro

LOQ = 0,1 ng/ml



Opération SUGUS



- Collaboration ROSITA (F), IML Bern (W. Bernhard), police du canton
- Contrôle des automobilistes sortants d'un club (Guayas),
- Evaluation de la vigilance. Si altération : investigations au poste principal
- 3 opérations (8 avril, 24 octobre, 14 novembre) : 61 conducteurs
- Dépistage par Drugwipe 5 et recueil d'un échantillon de salive par Intercept

Drugwipe 5

- Détection du cannabis, des amphetamines, de la cocaïne et des opiacés
- Frottement au niveau de la joue, des 2 cotés, pendant 15 s
- Addition d'eau (10 sec), lecture après 5 min
- Présence de 2 lignes de contrôle (de chaque côté)
- Positif : présence d'une ligne rose
- Sensibilité : ??? (dizaine(s) de nanogrammes)



Intercept (Orasure)



- Intercept : coton avec manche plastique + liquide bleu (tampon, sels, surfactant (0,5 % Tween 20) et antibactérien)
- Il est demandé au sujet de garder en bouche le coton pendant 2 min
- Mise en contact immédiat avec le liquide bleu
- Après centrifugation, conservation à + 4 °C avant analyse
- Analyse par GC/MS (cannabis) et LC-MS/MS après SPE (Waters Oasis HLB)

Résultats



- Nombre de conducteurs testés : 61
- Nombre de positifs par Intercept (GC/MS) : 18
 - Concentration en Δ^9 THC : 2,1 à 205,1 ng/ml (surtout entre 10 et 50 ng/ml)
- Nombre de positifs par Drugwipe : 1
 - Le seul + : Δ^9 THC = 146 ng/ml
 - Par exemple, sujet 8 ayant fumé 45 min avant (Δ^9 THC = 205,1 ng/ml)
- Pas de faux-négatif
 - Le Drugwipe n'est pas adapté au dépistage du cannabis

Bien plus prometteur ...



- OraLine (Sun Biomedical, USA)
- Sensibilité annoncée par le fabricant : 4 ng/ml Δ^9 THC
- Test en situation réelle (Poitiers et Strasbourg) sur des consommateurs de cannabis (aucune conséquence légale)
- Confirmation par Intercept (GC/MS)
 - Sujets positifs Intercept (GC/MS) : 18 (Δ^9 THC : 1 à 265 ng/ml)
 - Sujets positifs OraLine : 15 (dont un Δ^9 THC à 3 ng/ml)

Le problème de la contamination ... ou du fumeur passif

Niedbala et al, J Anal Toxicol, 2004, 28, 546-552

- Cohabitation de 5 fumeurs (cigarette à 1,75 % de Δ^9 THC) et de 4 non-fumeurs (vérifié par analyse des urines) dans un volume de 36 m³ pendant 4 heures
- Recueil de la salive par Intercept, analyse par GC-MS/MS
- Réponse positive chez les fumeurs dits passifs : entre 20 et 50 min après le début de l'expérience, avec des concentrations variant de 3,6 à 26,4 ng/ml
- Réponse négative au-delà
- Conclusion : le risque de contamination de la salive par un non-consommateur est limitée à une période d'environ 30 min après exposition

Conclusion

- Le Δ^9 THC n'est pas (ou très peu) excrété dans la salive depuis le sang
- La présence de Δ^9 THC peut s'expliquer par une séquestration dans la cavité buccale
- Seul le Δ^9 THC est retrouvé dans la salive, pas ses métabolites
- Il n'y a pas d'outil de dépistage à réponse immuno-chimique immédiate adapté au cannabis. Tous manquent de sensibilité (seuil SAMHSA = 4 ng/ml). De nombreux tests sont en fait des prototypes, dont certains ne fonctionnent pas (... une nouvelle version est en préparation !!!)
- La présence de Δ^9 THC dans la salive reflète un usage récent de cannabis
- Malgré l'absence de corrélation entre les concentrations de Δ^9 THC dans le sang et la salive, il est acceptable sur le plan scientifique de considérer que la présence de Δ^9 THC dans la salive est liée à une altération de la vigilance