

UE TOXICOLOGIE ANALYTIQUE,
CLINIQUE ET JUDICIAIRE

30 novembre 2016

Toxicologie
Médico-légale



Dr Elodie SAUSSEREAU

Laboratoire de Toxicologie

Groupe Hospitalier du Havre

Expert près la Cour d'Appel de Rouen

Expertise Toxicologique Judiciaire

- ✓ Critères nécessaires pour la nomination des Experts
- ✓ Les prélèvements
- ✓ Les outils analytiques
- ✓ Soumission chimique



Expertise Toxicologique Judiciaire :

Critères nécessaires pour la nomination des Experts

Titres et diplômes

Docteur en Pharmacie ou en Médecine avec DES de Biologie Médicale et/ou une qualification en analyse chimique (ou physico-chimique)

Matériel ———> disposer d'au moins :

- automate d'immuno-analyse
- HPLC-DAD ou LC-MS(MS) ou LC-MS-HR
- GC-MS(MS)
- GC-FID (GC-MS-MS)
- des moyens de conservation et congélation des échantillons
- des moyens d'assurer la sécurité des scellés

Formation continue

- **Publications en toxicologie analytiques (≥ 5)**
- **Communications à des congrès de toxicologie analytique (≥ 5)**
- **Membre de sociétés savantes (analyses-toxicologie-médecine légale)**
- **Pratique de la toxicologie ML ≥ 3 ans**
(attestée par un garant Expert Judiciaire)

Formation continue

Après cette période, démontrer la maîtrise :

- recueil, conservation des prélèvements, gestion des scellés
- identification – quantification des toxiques
- interprétation des résultats *postmortem*
- avoir participé à des formations juridiques

Contrôle de qualité

Avoir participé à des EEQ qualitatifs et quantitatifs, organisés au niveau national portant sur la recherche de médicaments, stupéfiants ou toute autre catégorie de toxiques (sang et urine, ≥ 3 /an)



Expertise Toxicologique Judiciaire : Les prélèvements

Introduction

- Toxicologie médico-légale
 - ↳ Examen complémentaire ayant le meilleur rendement diagnostique après autopsie
- Mort toxique : syndrome asphyxique non spécifique
- Analyse toxicologique + constatations cliniques/autopsiques

Prélèvements Autopsiques

- Prélèvements en double (contre-expertise)
- Echantillons scellés
- Conservation + 4°C ou (- 20°C)
- Cheveux conservés au sec, T ambiante
- Identification :
 - Nom - Prénom
 - Date autopsie
 - Nature exacte prélèvement
 - Numéro d'ordre

Prélèvements Autopsiques

CONFORMITE DES PRELEVEMENTS

FONDAMENTALE

- ACCREDITATION DES LABORATOIRES
D'ANALYSES
- RESPECT DES NORMES EXIGIBLES
- EXIGENCE +++

Prélèvements Autopsiques

- 2 types de prélèvements à visée toxicologique

<u>Obligatoires</u>	<u>Alternatifs-Facultatifs</u>
Sang cardiaque	Bile
Sang périphérique	Viscères
Urines	Humeur vitrée
Contenu gastrique	Ecouvillons naso-pharyngés
Cheveux	Liquides de putréfaction

Le sang

- **Matrice biologique la + importante**

- **Résultats quantitatifs**

(infrathérapeutique, thérapeutique, toxique, potentiellement létale)

 **Imputabilité / survenue du décès**

- **Redistribution post-mortem**

 **Sang intracardiaque et périphérique complémentaires**

Le sang

- Sang cardiaque

Abondant si cadavre frais (15-20 ml)

Screening initial qualitatif \neq dosages

→ relargage *postmortem* intracavitaire

→ redistribution *postmortem* transmembranaire

Prélèvement / sac péricardique 2 x 10 ml

(flacon verre)

Ponction trans-thoracique à proscrire

Le sang

- Sang périphérique

Moins sujet / redistribution *postmortem*

Fémoral _ Sous-clavier _ Sous hépatique

Flacon en verre avec NaF (10 ml)



blocage activités enzymatiques

≠ production *in vitro* : alcool, cyanures

≠ dégradation : cocaïne

Les urines

- Prélèvement complémentaire / sang
- Quantité abondante : investigation toxicologique sans souci d'économie
- Pureté (98 % eau) : screening qualitatif ++
- Fenêtre de détection \approx 2 - 4 j
- Peu intérêt quantitatif

Les urines

- **Ratio substance mère / métabolites**
 - **Moment de la dernière exposition / décès**
 - **Absence ou faible concentration des métabolites**
 - **décès rapide après administration**
- **Ponction vésicale (30 - 50 ml) : flacon plastique**

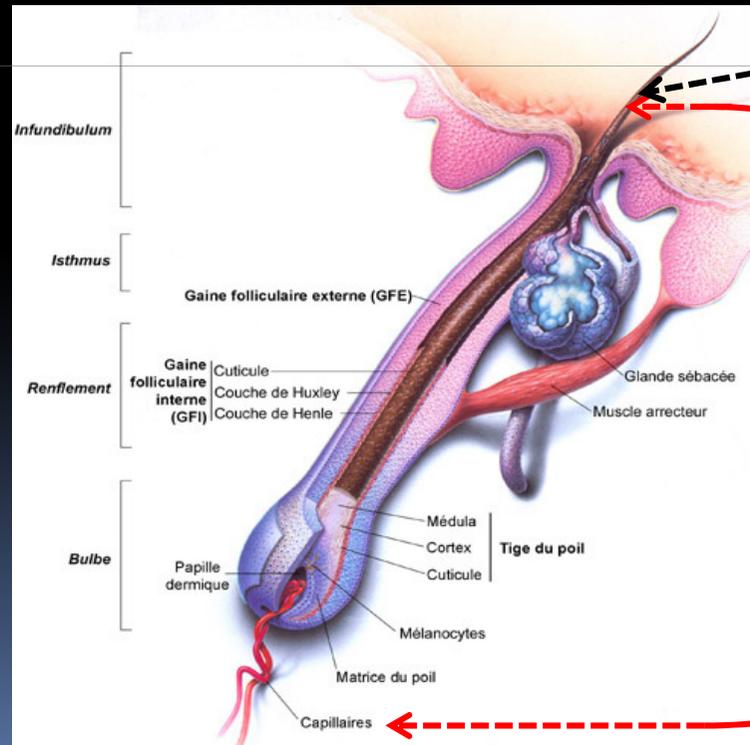
Le contenu gastrique

- Objectiver voie d'introduction du toxique
- Concentration +++ → voie orale
mais aussi intra-nasale ou sublinguale
- 30 - 50 ml / flacon plastique
- Volume total - odeur particulière - débris alimentaires/médicamenteux
- Fragments gélules, cps → flacon spécifique

Les cheveux

- Marqueur expositions répétées/chroniques
- Fenêtre de détection : plusieurs semaines
→ profil de consommation à long terme

- Structure kératinisée
- 3 phases :
 - anagène (4-8 ans)
 - catagène (2 sem)
 - télogène (3 mois)
- Vertex : 0,34 mm/j
soit 1 cm/mois
(0,7 – 1,3 cm/mois)



Localisation du
prélèvement de cheveux
= **vertex**

Temps de migration
d'une molécule dans le
follicule pilo-sébacé (des
capillaires sanguins
jusqu'au vertex \approx 1,2-1,5
cm) = **3-4 jours**

Les cheveux



- 80 cheveux
- couper au ras du scalp
- partie occipitale
(niveau supérieure)
- orientation racine-
extrémité
- conservation :
 - tube sec - enveloppe
 - température ambiante

Prélèvements facultatifs

- Bile

- **screening toxicologique** (cadavre putréfié)
- **recueil volume total** (tube sec ou flacon plastique)
- **éthanol : relation étroite bile/sang**
(phase de distribution)

- Viscères : analyse systématique sans intérêt

- cadavre entièrement putréfié
- cadavre morcelé

Prélèvements facultatifs

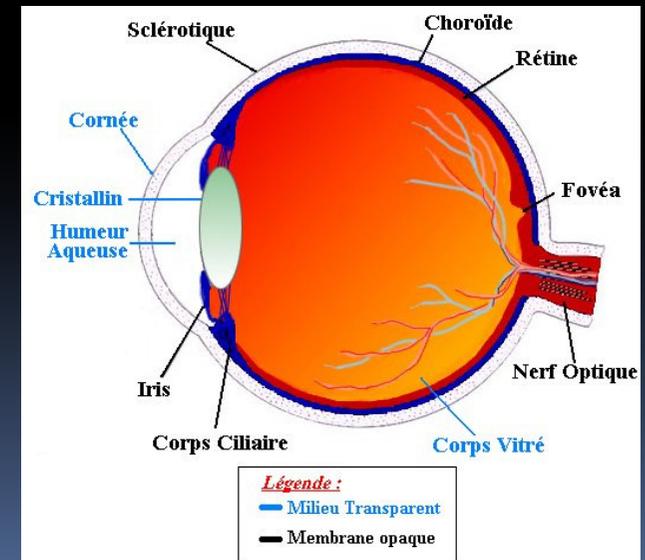
- Humeur Vitrée

- Liquéfaction après décès → fluide aqueux

- Prélèvement 2 - 4 j (tube verre monoject)

- Confirmation alcoolémie

$[\text{alcool}]_{\text{HV}} / [\text{alcool}]_{\text{sang}} : 0,9 - 1,4$



Prélèvements facultatifs

- Liquides de putréfaction
 - cavité abdominale - gouttières pleurales
 - intérêt qualitatif
 - interprétation difficile
- Prélèvements naso-pharyngés
 - stupéfiants « sniffés »
 - écouvillonnage fosses nasales et arrière gorge



Expertise Toxicologique Judiciaire : Les outils analytiques

Préparation de l'échantillon

➤ Extraction classique

- Liquide-Liquide (LLE)

- En phase solide (SPE) → cartouches

→ long, fastidieux, polluant, coût ++ (SPE), ...

➤ Préparation en ligne (on-line SPE)

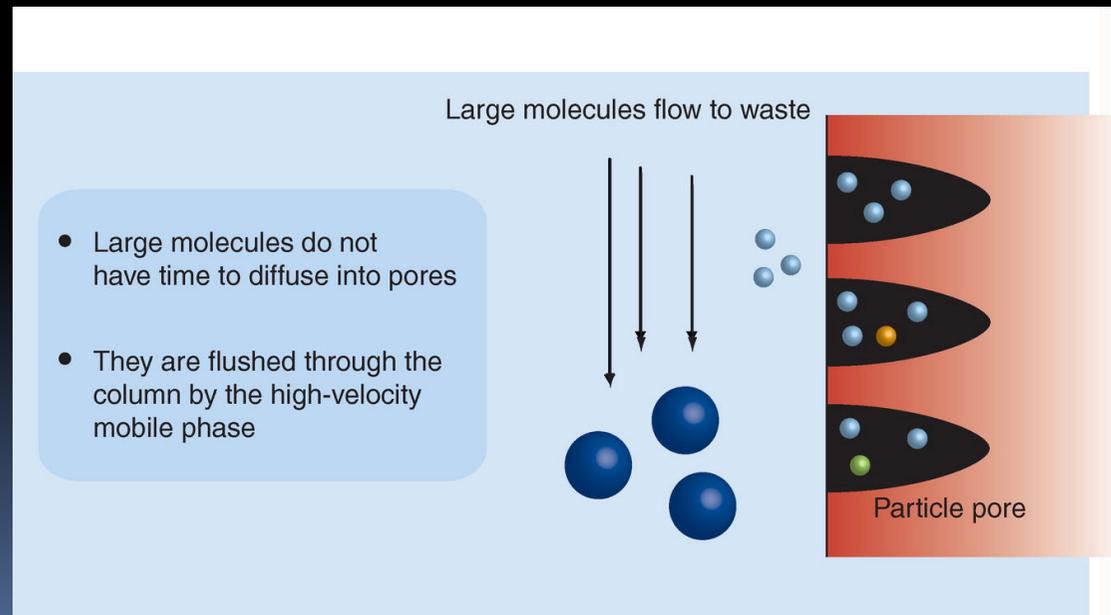
- Extraction automatisée de l'échantillon

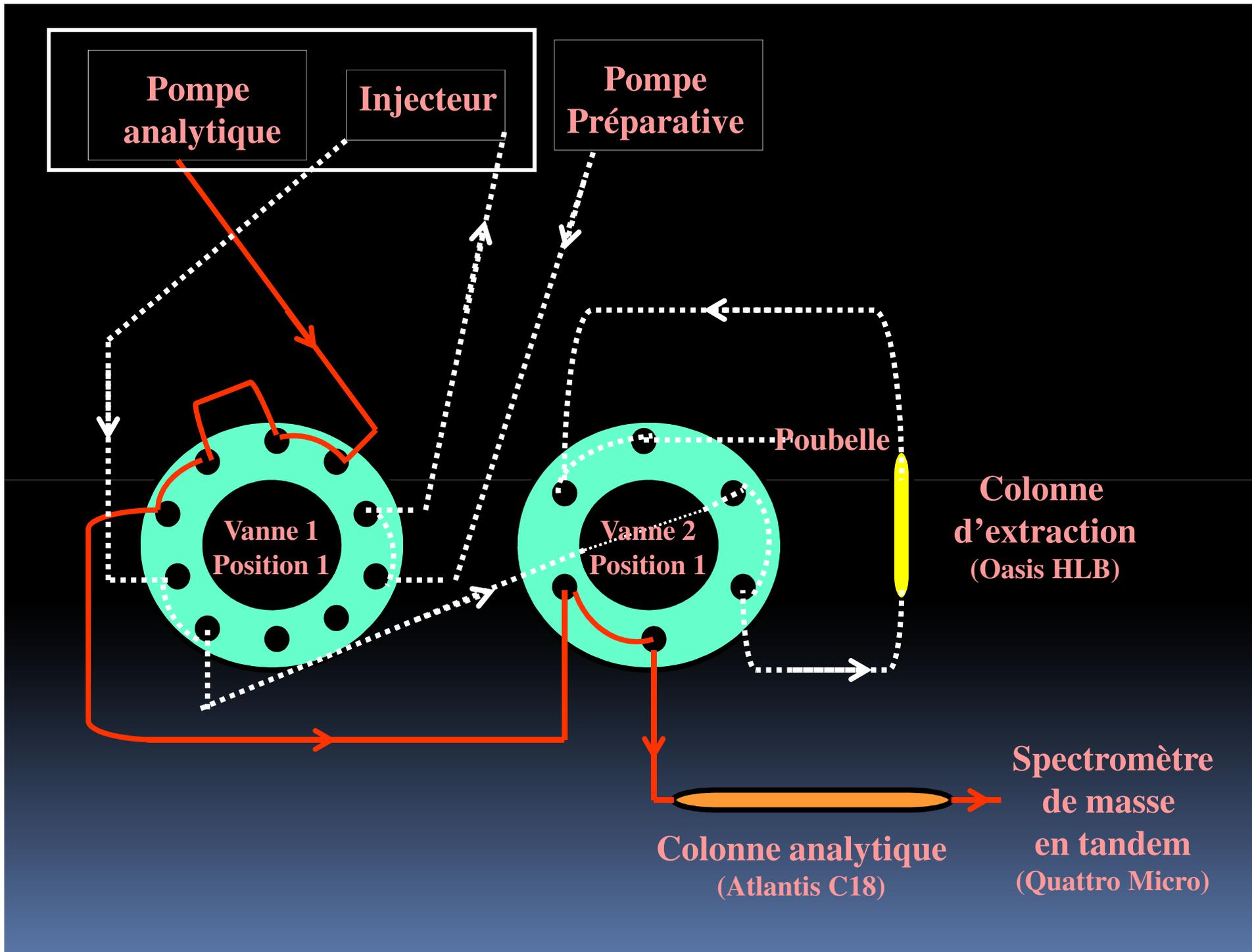
- Extraction - concentration - purification sans rupture entre les phases préparative et analytique

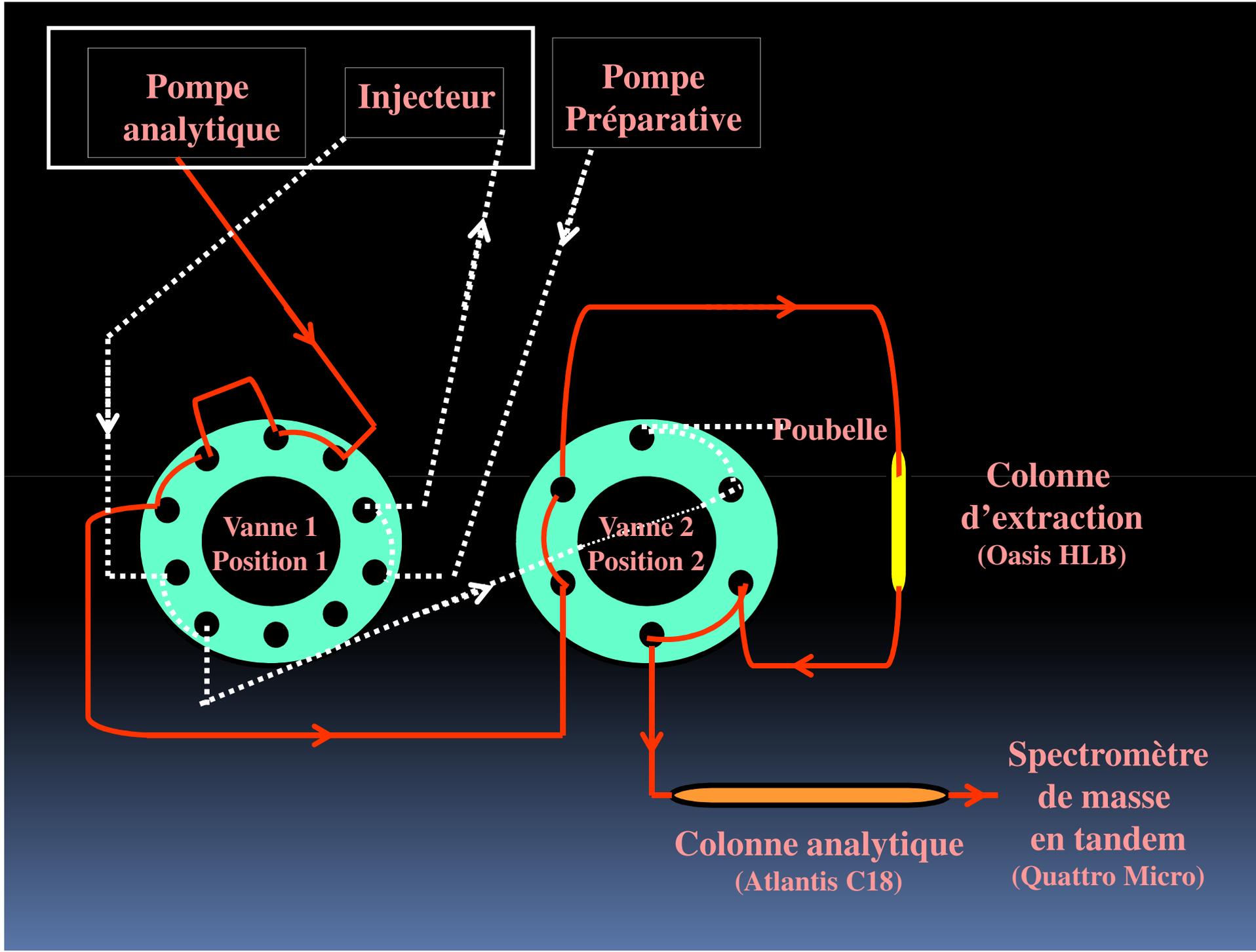
Préparation en ligne (PEL)

➤ Colonne d'extraction

- Granulométrie 30 - 60 μm
- Haut débit (2 - 5 ml/min)
- Chromatographie en flux turbulent (TFC)







Dilution de l'échantillon

- **Diminution des effets de matrice**
 - ➡ fondamental pour échantillons dégradés
(sang laqué, fibrine, *postmortem* ...)
- **Rapport signal/bruit +++**
- **Dissociation des liaisons protéiques par effet de la dilution**
- **Colonne d'extraction > 1000 injections**

Dilution de l'échantillon

➤ **GHH** : dilution des échantillons (sang, plasma, sérum, urine) dans l'eau

Médicaments

Stupéfiants

Dilution

1/100

1/50

Injection

100 µl

100 µl

**Volume
échantillon**

1 µl

2 µl

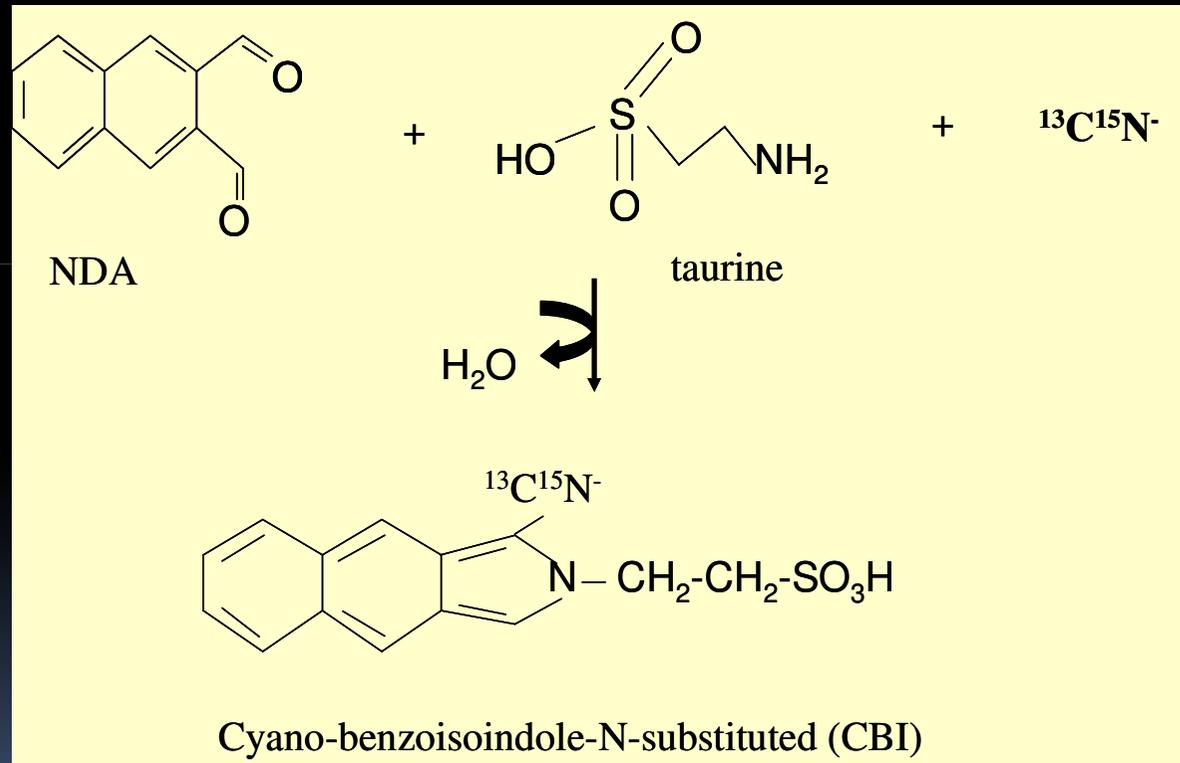
Analyse de « micro » volumes

- **médicaments et toxiques**
 - screening (LC-HR-MS) : 50 µl
 - dosage (LC-MS/MS) : 25 µl
 - **stupéfiants** : 50 µl (200 µl pour THC)
 - **cyanures** : 25 µl
 - **éthylglucuronide** : 50 µl
 - **GHB** : 50 µl
-
- Utilisation des mêmes colonnes et phases mobiles
 - Dosage stupéfiants, CN, ETG et GHB :
pas de gamme mais utilisation des étalons internes :
analogues deutérés ou isotopes marqués

Analyse de « micro » volumes

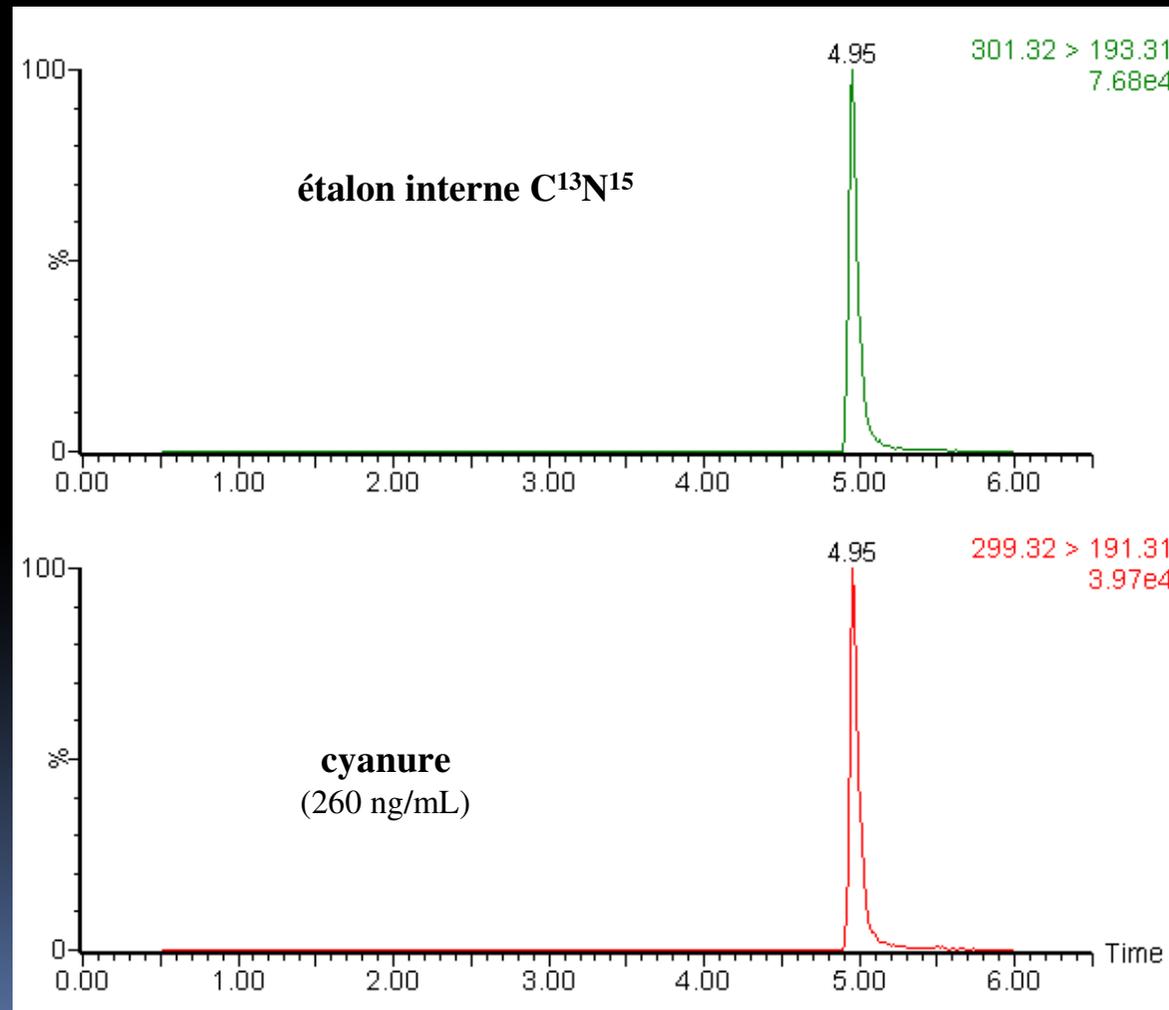
Cyanures

- 25 µl sang
- 1/10^{ème} eau
- Déprotéinisation avec MeOH
- Dérivation (30 mn)
- LOD = 10 ng/ml
- LOQ = 25 ng/ml



Analyse de « micro » volumes

Cyanures



Analyse de « micro » volumes

Spots de sang séché

Spots de Sang Séché ou « Dried Blood Spots » (DBS)

- 1960 : Guthrie et al. : dépistage phénylcétonurie
- Maladies métaboliques : screening / nouveau-né
- Suivi thérapeutique : IS, ARV, antipaludéens, antiépileptiques ...
- Pharmacocinétique / Toxicocinétique
- Stupéfiants (morphine, 6-MAM, BE)

Spots de sang séché

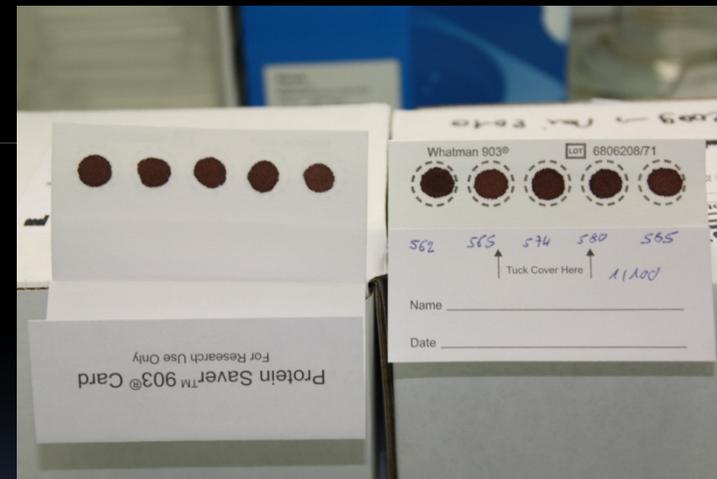
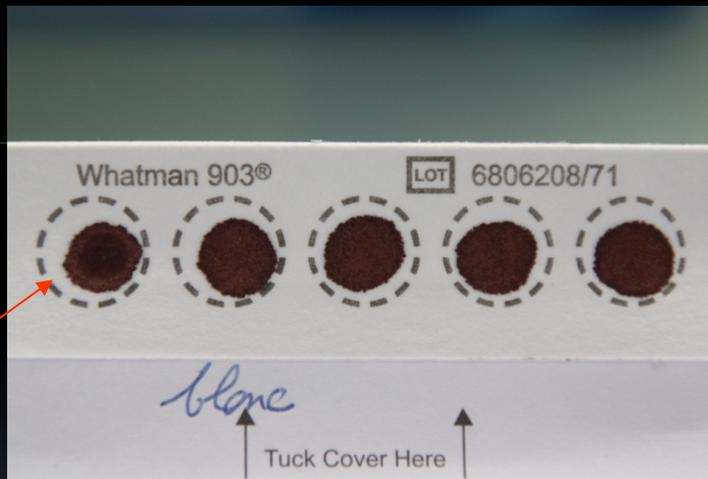
Principe

- Papier buvard type Whatmann
- Sang capillaire
- Goutte homogène - symétrique
- Séchage complet avant transport, stockage
- Pas de lumière, ni humidité
- Caractéristiques du support identiques entre les lots (absorption, épaisseur, pores...)

Spots de sang séché

Principe

Dépôt goutte de sang : homogène et symétrique
(5 à 100 μL)



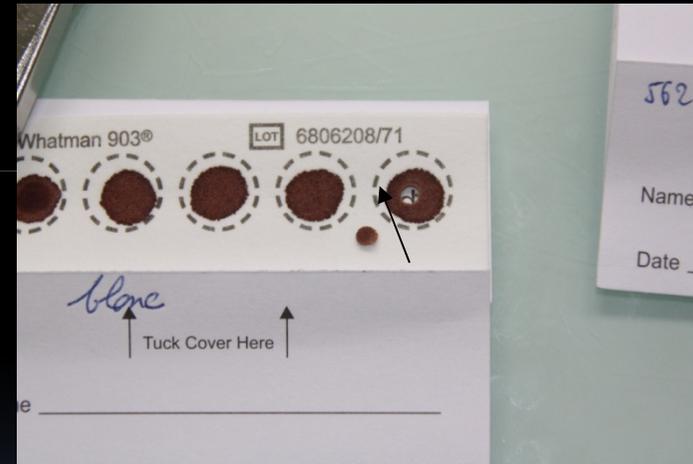
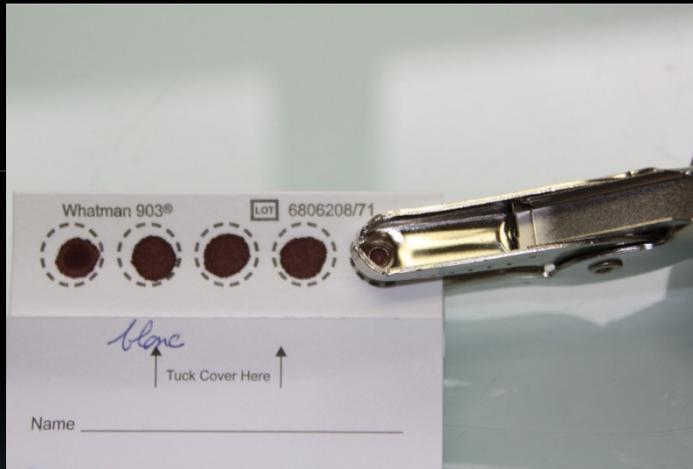
Séchage à T°C ambiante (24 h)

Etuve contre-indiquée

Spots de sang séché

Principe

Pince perforatrice → « rondelle » → Ø 3 à 13 mm



↓

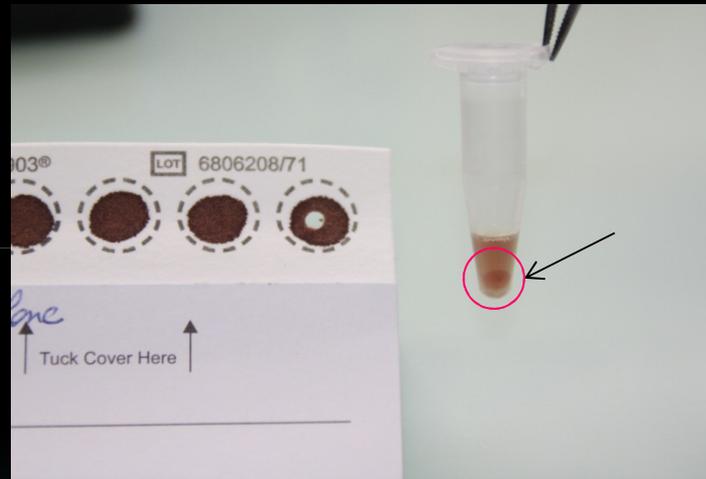
Extraction

Spots de sang séché Stupéfiants avec PEL

- **Opiacés** : morphine, codéine
- **Amphétamines** : amphétamine, MDA, MDMA
méthamphétamine
- **Cocainiques** : cocaïne, benzoylecgonine,
méthylecgonine
- 30 µL sang total
- Séchage 24 h à T°C ambiante

Spots de sang séché : Stupéfiants

Goutte 30 μL \rightarrow « rondelle » 3 mm \rightarrow 150 μL eau
(\approx 3 μL) + D_3 1 ng/mL



↓
ultrasons

10 min

↓
centrifugation

2 min

10900trs/min

injection 100 μL



Spots de sang séché : Stupéfiants

- **Technique pré-analytique simple et rapide**
 - ↩ rendement extraction $\geq 90 \%$
- **Volume d'échantillon réduit (30 μL mais 3 μL injectés)**
- **Méthode de dosage spécifique - sensible**
 - ↩ corrélation spot / sang ++
- **Stabilité à -20°C : dégradation $< 20 \%$ (12 mois)**
 - ↩ morphine, codéine, BE, amphétamine $< 5 \%$

Analyse de « micro » volumes

Spots de sang séché

- **Nouveau-né : DBS vs méconium**
- **Screening et dosage des médicaments et autres toxiques**

Dosage des cannabinoïdes en UPLC-MS/MS

Sang, urine, cheveux, résine,
huiles essentielles ...

Dosage des cannabinoïdes en UPLC-MS/MS

- Limite de la dérivation par chlorure de dabsyl
→ reproductibilité de la méthode (pH)
- Cannabinoïdes et PEL : nécessite 1 technique spécifique avec détecteurs « haut de gamme »
- LLE solution analytique fiable, reproductible avec détecteurs « moyenne gamme »
- GHH : LLE couplée à une technique UPLC-MS/MS

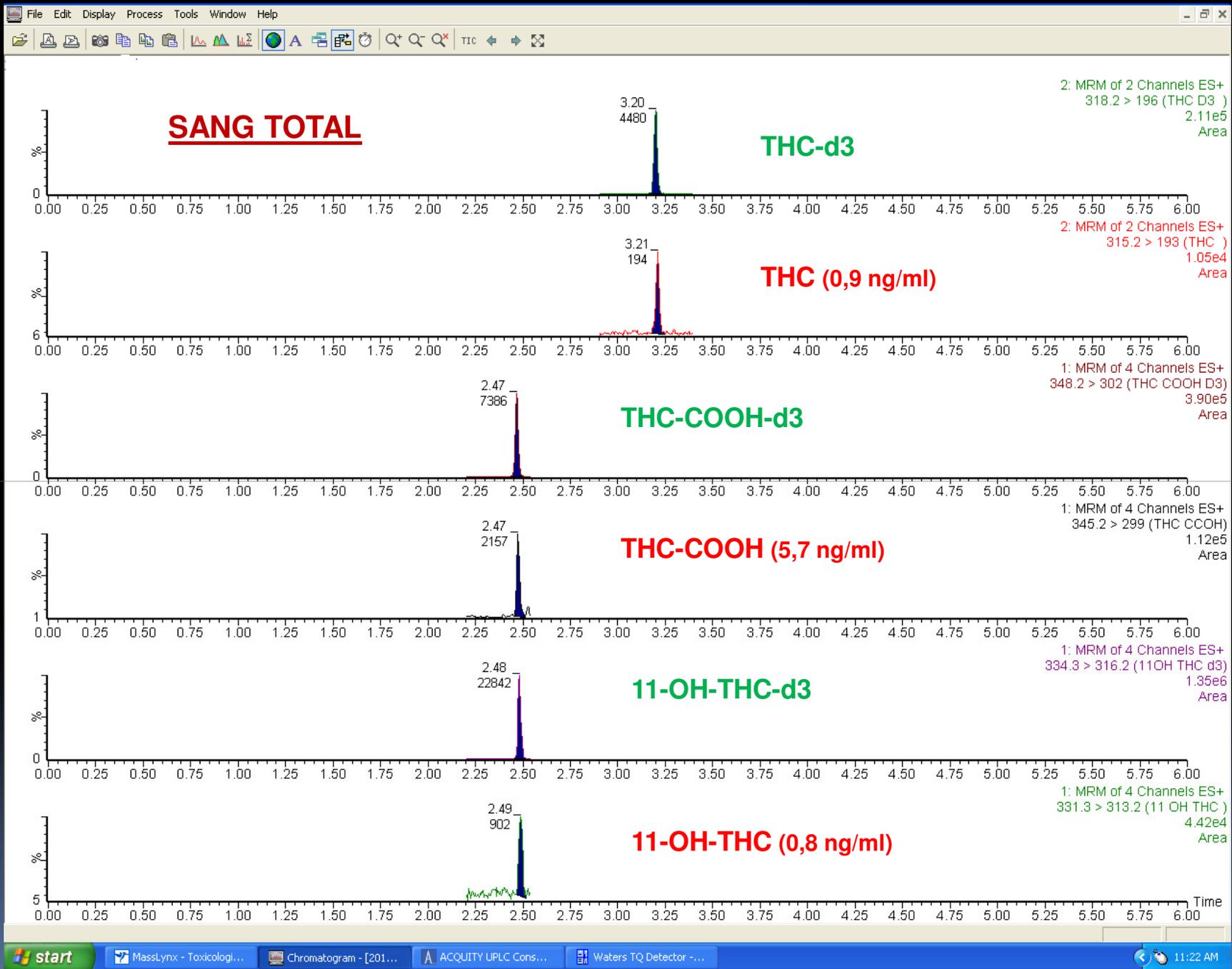
Dosage des cannabinoïdes en UPLC-MS/MS

➤ Plasma, sang, urine

- prise d'essai = 100 μ L
- déprotéinisation : ACN + US
- LLE : acide-acétique – hexane
– acétate d'éthyle
- phases mobiles : eau/AF(0,2 %) ; ACN/AF (0,2 %)
- cycle analytique : 6 min
- THC : LOD = 0,1 ng/mL - LOQ = 0,2 ng/mL

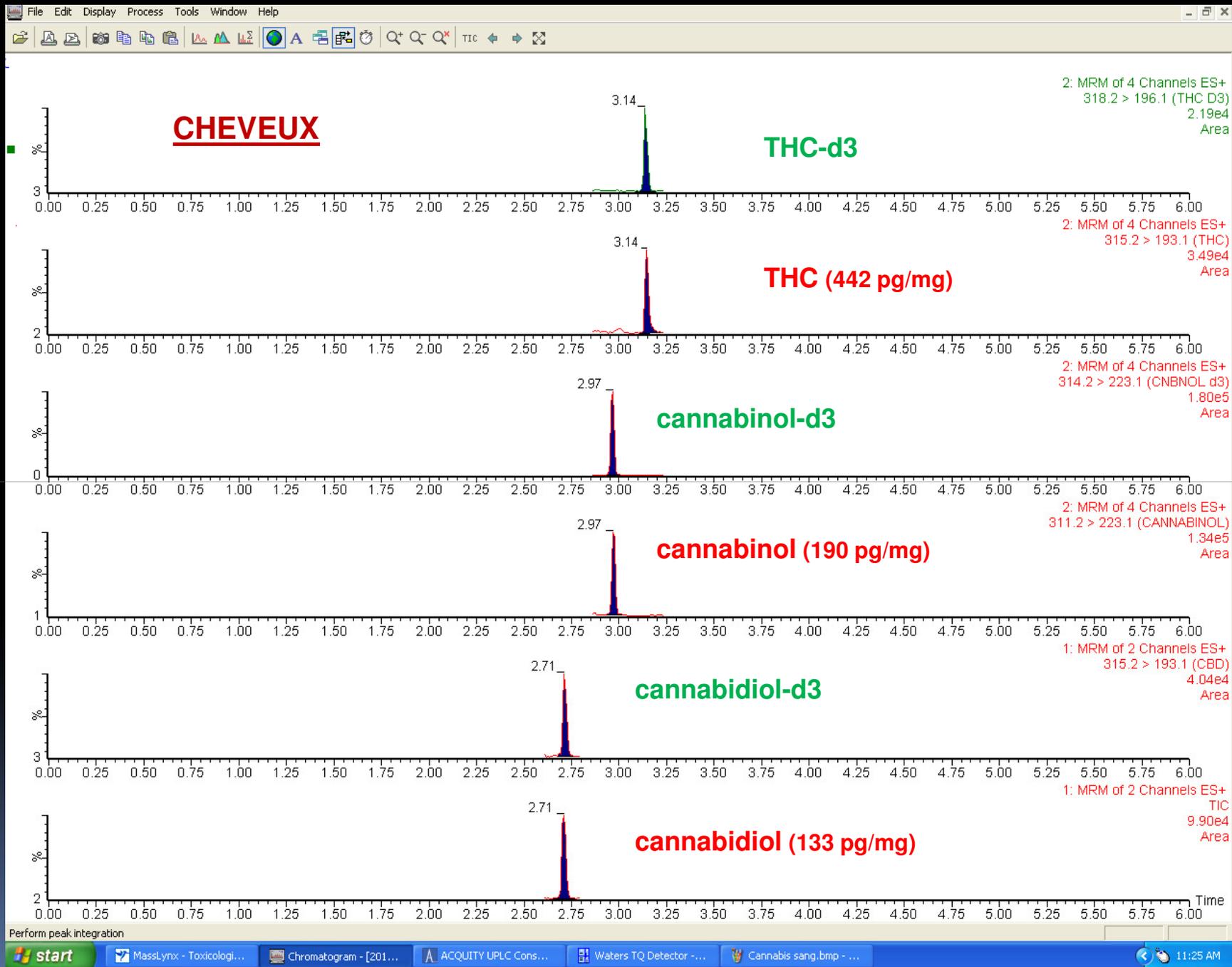


UPLC Acquity – TQD Waters®
Colonne HSS C18
(2,1 x 150 mm ; 1,8 μ m)



Dosage des cannabinoïdes en UPLC-MS/MS

- Cheveux : THC, cannabinoïde, cannabidiol
 - prise d'essai = 20 mg
 - digestion matrice capillaire : NaOH (1 N) à 90°C
 - LLE : acide-acétique – hexane - acétate d'éthyle
 - THC : LOD = 2 pg/mg
LOQ = 10 pg/mg



Dosage des cannabinoïdes en UPLC-MS/MS

➤ Matières premières : résine, herbe

- prise d'essai = 10 mg (solution 1 g/L ACN)
- analyse qualitative en GC-MS (phytocannabinoïdes)
- analyse quantitative (THC, CBD, CBN) en UPLC-MS/MS (dilution 1/100)
- **Stupéfiant** $3 < \text{THC} < 10 \%$
- **Chanvre textile** $\text{THC} < 0,2 \%$



Huile essentielle de Chanvre



Fabrication : l'huile essentielle de chanvre provient des fleurs et des tiges du chanvre (*Cannabis sativa* L.) par distillation à la vapeur basse pression.

Les cannabinoïdes n'étant pas solubles dans l'eau , la teneur en THC de ces huiles essentielles est très faible (< 0,01 %).

Ces huiles essentielles contiennent en revanche de nombreux terpènes bénéfiques au corps humain.



Huile essentielle de Chanvre



Bénéfices :

- ✓ effets relaxants
- ✓ propriétés anti-inflammatoires : protection de la peau en éliminant les réactions allergiques et irritations cutanées
 - ↪ traitement de l'eczéma et du psoriasis
- ✓ traitement des problèmes respiratoires : rhume des foins, sinusite, asthme



Huile essentielle de Chanvre



Utilisations :

- ✓ arôme alimentaire
- ✓ usage cosmétique recommandé pour ses vertus anti-inflammatoires et décongestionnantes
- ✓ application en massages (relaxation musculaire, décongestion de l'arbre respiratoire)



Huile essentielle de Chanvre



Laboratoire du Havre : Analyse par
techniques chromatographiques

✓ Analyse qualitative des cannabinoïdes
d'origine naturelle du chanvre (GC-MS)

- **delta-9-tetrahydrocannabinol** (THC), principal produit psychoactif du cannabis
- **cannabidiol** (CBD), précurseur biosynthétique du THC
- **cannabinol** (CBN), substance issue de la dégradation du THC



Huile essentielle de Chanvre



✓ Analyse qualitative des cannabinoïdes d'origine naturelle du chanvre (GC-MS)

- **cannabigerol**, phytocannabinoïde (cannabinoïde présent naturellement dans la plante)
- **cannabichromène**, dérivé du cannabidiol
- **cannabidivarol**, dérivé du cannabidiol
- **caryophyllène**, hydrocarbure sesquiterpénique bicyclique, composant de l'huile essentielle du chanvre (*Cannabis Sativa*)
- **acide cannabiel-soic**, dihydrobenzofurane tricyclique



Huile essentielle de Chanvre



✓ Analyse quantitative par UPLC-MS/MS

❑ delta-9-tetrahydrocannabinol (THC)

❑ cannabinoïl (CBN)

❑ cannabidiol (CBD)

➔ Dilution de l'huile essentielle dans ACN (1/100^e)



Spectrométrie de masse haute résolution

Screening toxicologique

- **Screening ciblé** : recherche de composés spécifiques (présence : oui ou non)
- **Screening non-ciblé** : recherche de tous composés inconnus sans aucune information au préalable sur les analytes potentiellement présents dans la matrice

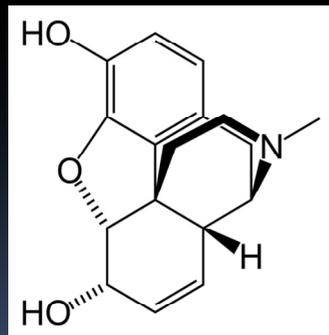
Haute Résolution - Masse Exacte

- **Masse nominale** : nombre entier de l'isotope le plus abondant de chaque élément
- **Masse exacte** : masse exacte de l'isotope le plus abondant de chaque élément

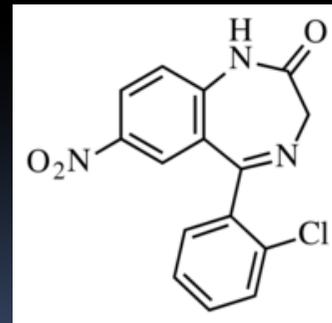
Elément	Nucléide	Masse nominale	Masse exacte	Abondance isotopique
Hydrogène	H	1	1,0078	100 %
Carbone	C ¹²	12	12,0000	100 %
	C ¹³	13	13,0034	1,10 %
Azote	N ¹⁴	14	14,0031	100 %
	N ¹⁵	15	15,0001	0,37 %
Oxygène	O ¹⁶	16	15,9949	100 %
	O ¹⁷	17	16,9991	0,04 %
	O ¹⁸	18	17,9992	0,20 %

Haute Résolution - Masse Exacte

- Mesure de la masse exacte à 4-5 décimales (masse monoisotopique)
- Identification de nouveaux composés (formule brute)
- Distinction de composés avec même masse nominale mais différente masse exacte

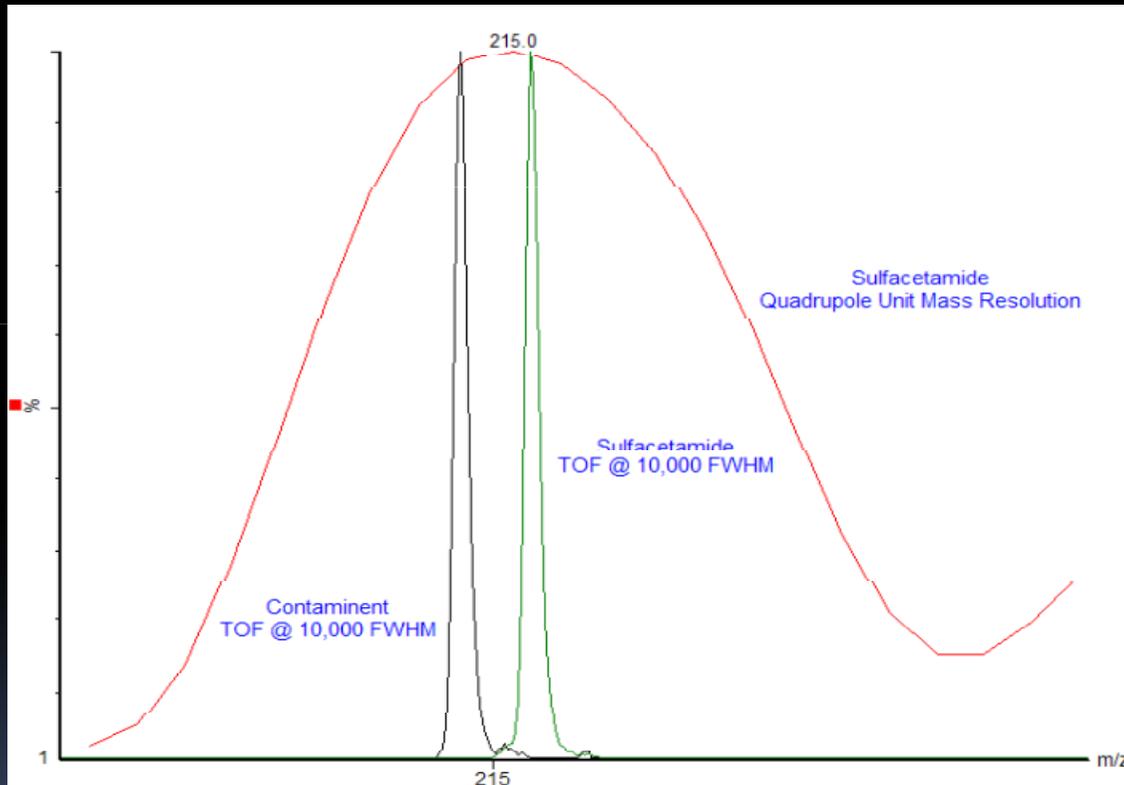


morphine
 $C_{17}H_{19}NO_3$
MM=285,3377



7-amino-clonazepam
 $C_{15}H_{12}ClNO_3$
MM=285,7283

Haute Résolution - Masse Exacte



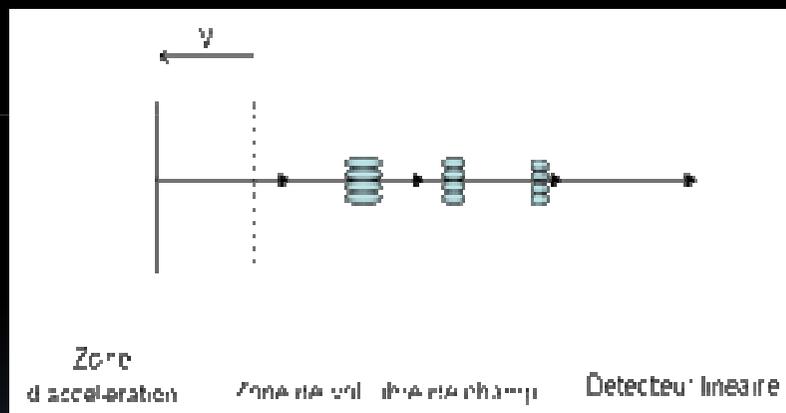
- **Quadripôle** : résolution insuffisante pour différencier les 2 molécules
- **HR** : haute résolution réduit interférences entre molécules de masse « similaires » (sélectivité ++)
→ distinction de 2 pics

Spectrométrie de Masse Haute Résolution

Analyseurs

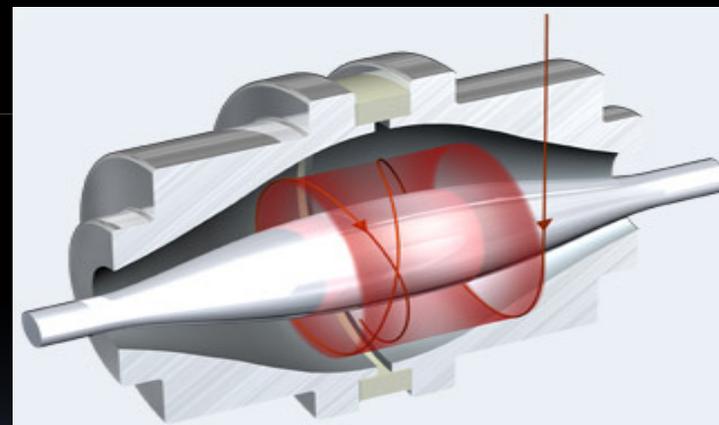
Temps de vol

Mesure le temps que met un ion m/z , accéléré par une tension, à parcourir une distance (10^{-5} sec)



Orbitrap

Mesure la fréquence d'oscillation d'un ion m/z autour de l'électrode centrale



Mesure de la masse exacte

- ✓ 5 décimales après la virgule
- ✓ améliore la confiance
- ✓ diminue faux positifs

Spectrométrie de Masse Haute Résolution « Temps de Vol - TOF »

UPLC Acquity 2D - XEVO G2 Qtof
Waters®



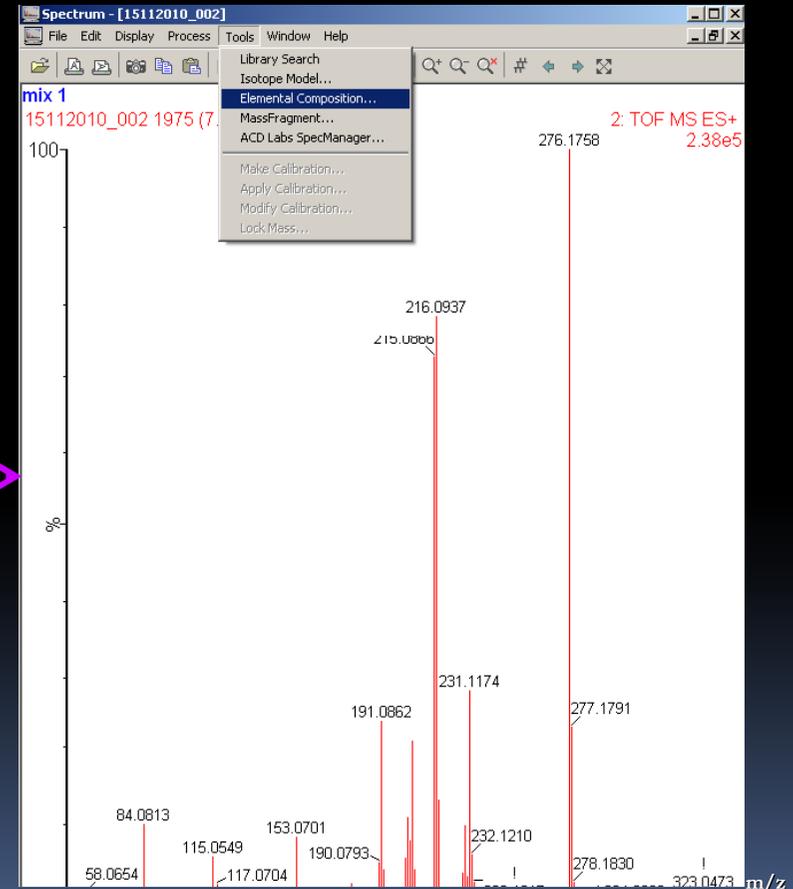
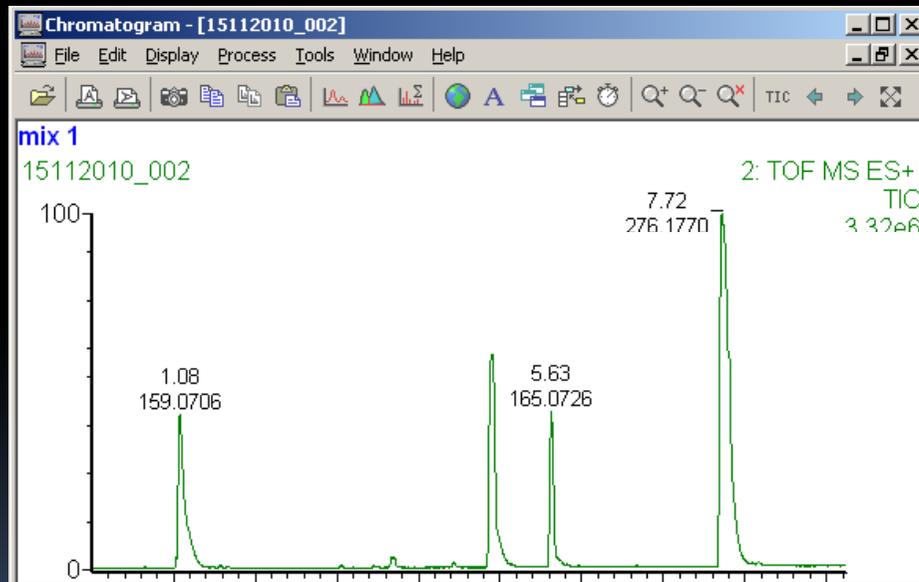
Screening Q-TOF

Objectifs

- ❖ Screening non ciblé et identification de nouveaux composés (formule brute) et élucidation structurale (formule brute – schéma de fragmentation)
- ❖ Augmenter le nombre de composés analysés (avec ou sans standards)
- ❖ Informations sur les métabolites
- ❖ Screening hautement spécifique
- ❖ « *Reprocess* » des données (pas de ré-analyse)

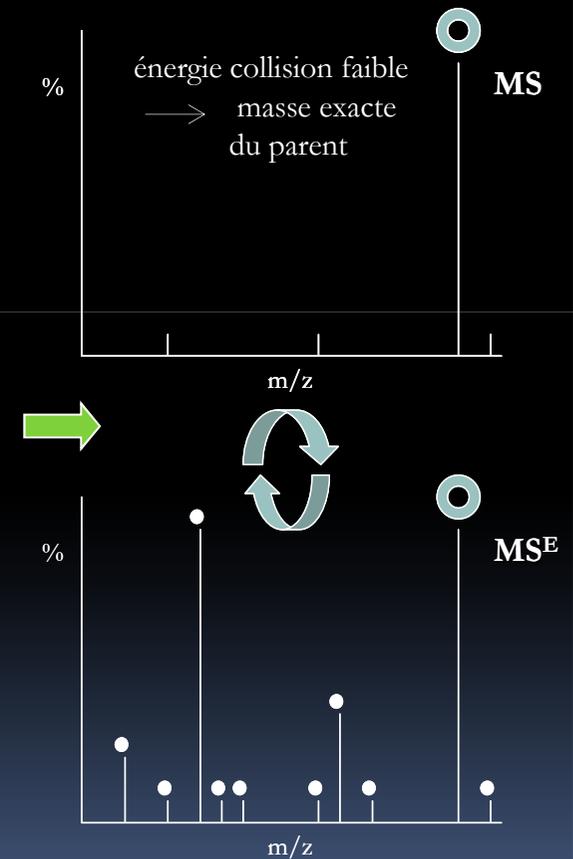
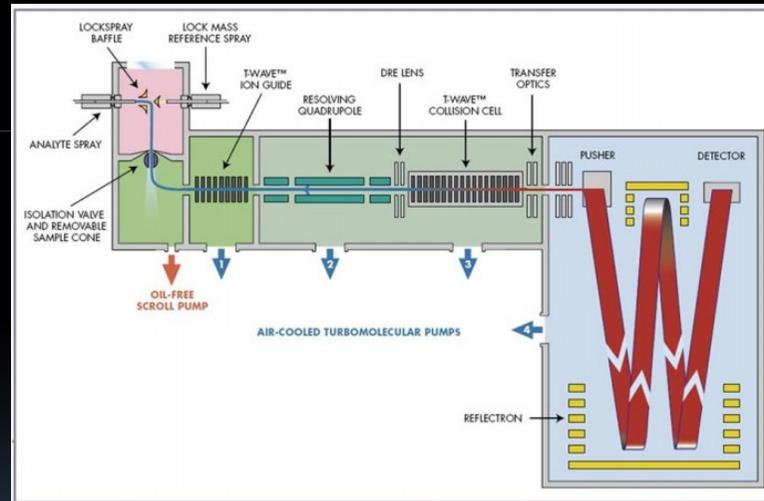
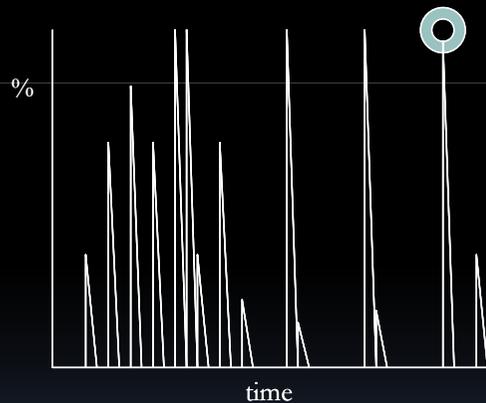
TOF - « Temps de vol »

- Screening non ciblé : analyse élémentaire



MS-TOF

➤ Mode d'acquisition MS^E - Technologie T-Wave



Alternance continue d'une fonction « faible énergie » avec une fonction « haute énergie »

énergie collision élevée
→ masse exacte de tous les ions fragments

MS-TOF

Recherche de métabolites [METABOLYNX®]

- ❖ Xénobiotiques de même masse monoisotopique
- ❖ Polymorphisme des enzymes du métabolisme (CYP 450)
- ❖ Médecine légale

- Soumission chimique : glucuronides (urines)

- Putréfaction

- dégradation des molécules peu stables : ex.

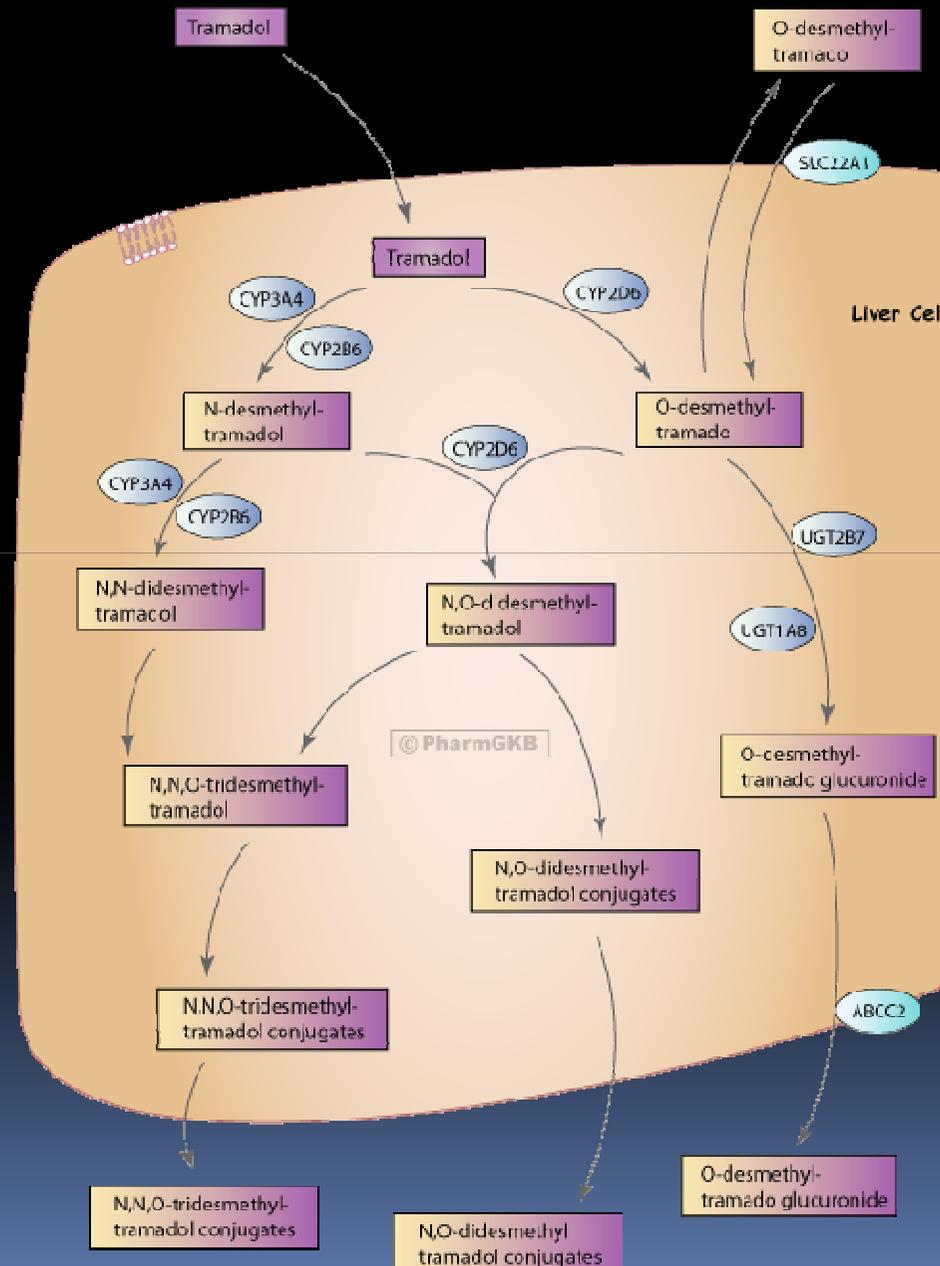
- benzodiazépines

- analyses des viscères (foie, rein, ...)

GHH : identification de plus de 150 métabolites

Exemple du tramadol et de la venlafaxine

TRAMADOL



Tramadol

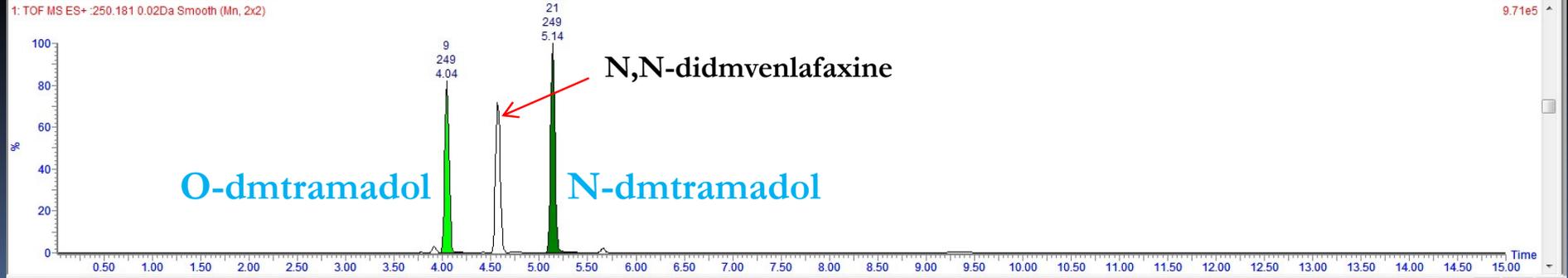
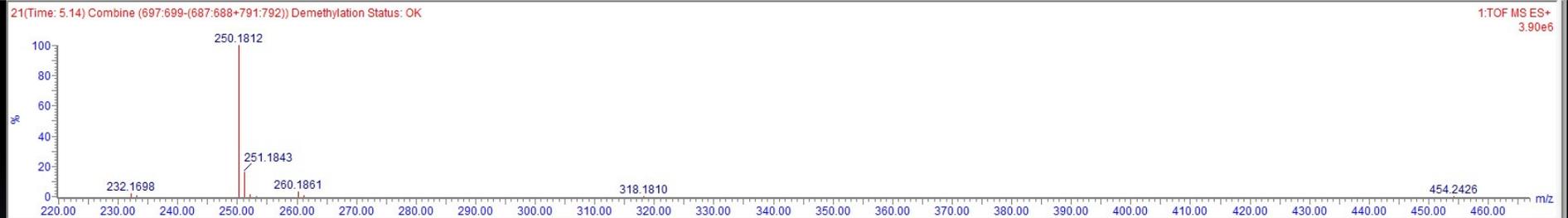
MetaboLynx XS Browser - [tramadol310815]

Plate: 1 Vial: 5

Expected Metabolites: parent C16H25NO2 (7/61 entries)

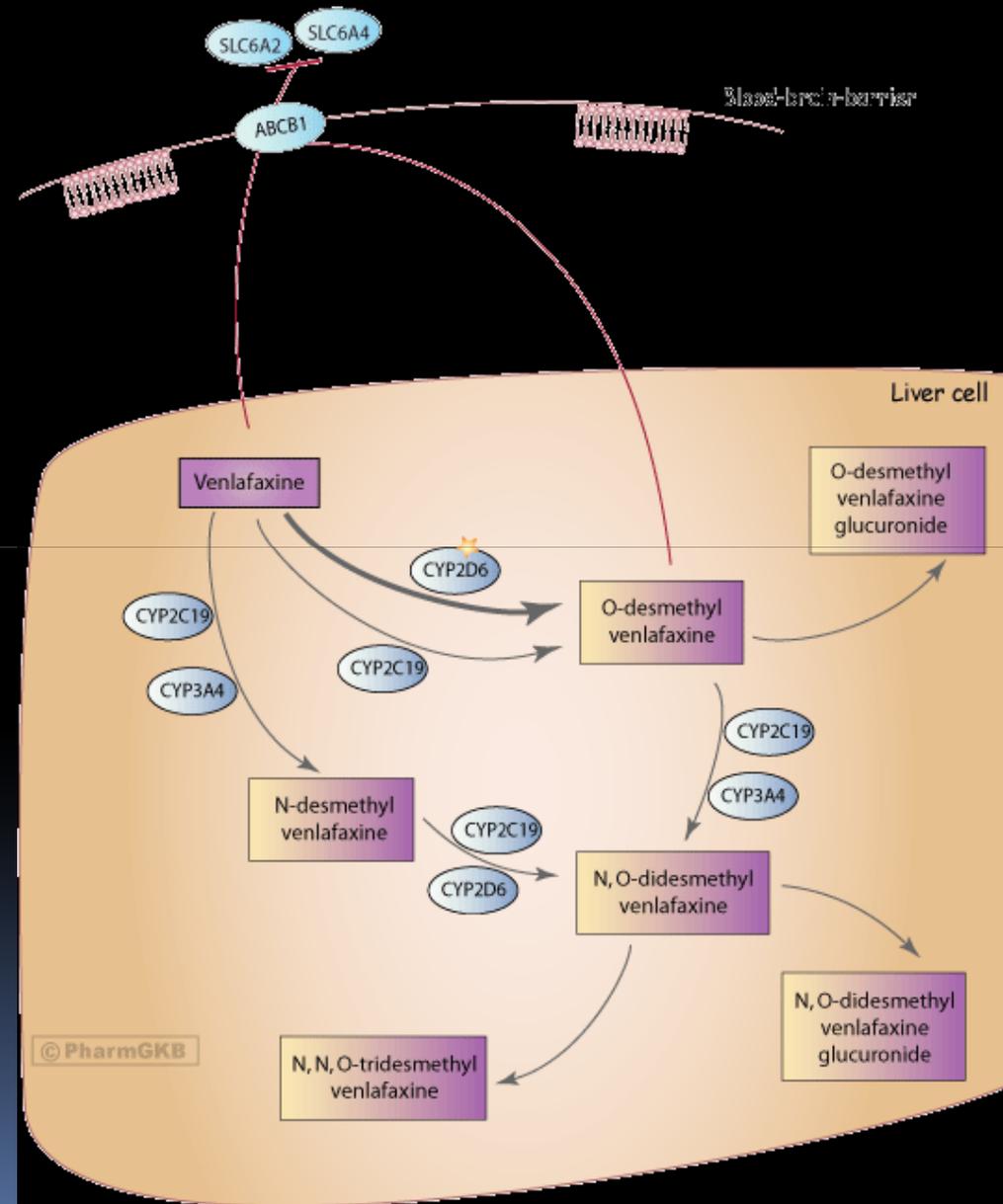
Status	MS...	Mass	Metabolite Name	Formula	Mass Difference	m/z Found	mDa	PPM	Label	Peak ID	Time	Trace	Area Abs	Area %	PDA Peak Are
✓	YES	249.1729	Demethylation	C15H23NO2	-14.0146	250.1817	1.0	4.1		9	4.04	1: TOF MS ES+ :250.1...	42496.60	13.69	...
✓	YES	249.1729	Demethylation	C15H23NO2	-14.0152	250.1812	0.5	2.1		21	5.14	1: TOF MS ES+ :250.1...	51480.20	16.59	...
✓	YES	235.1572	Didesmethyl	C14H21NO2	-28.0301	236.1662	1.2	5.0		10	4.12	1: TOF MS ES+ :236.1...	26709.60	8.61	...
✓	YES	235.1572	Didesmethyl	C14H21NO2	-28.0317	236.1646	-0.4	-1.8		19	5.02	1: TOF MS ES+ :236.1...	374.80	0.12	...
✓	YES	411.1893	Didesmethyl + Glucuronide conjugation	C20H29NO8	148.0002	412.1965	-0.6	-1.5		3	3.41	1: TOF MS ES+ :412.1...	10538.50	3.40	...
✓	YES	425.2050	Glucuronide conjugation + Demethylation	C21H31NO8	162.0181	426.2145	1.7	4.1		2	3.30	1: TOF MS ES+ :426.2...	25079.80	8.08	...
✓	YES	263.1885	Parent	C16H25NO2	0.0006	264.1970	0.7	2.5		20	5.07	1: TOF MS ES+ :264.1...	153692.91	49.52	...

Métabolite desméthyl m/z = 249.1729



Exemple du tramadol et de la venlafaxine

VENLAFAXINE



Venlafaxine

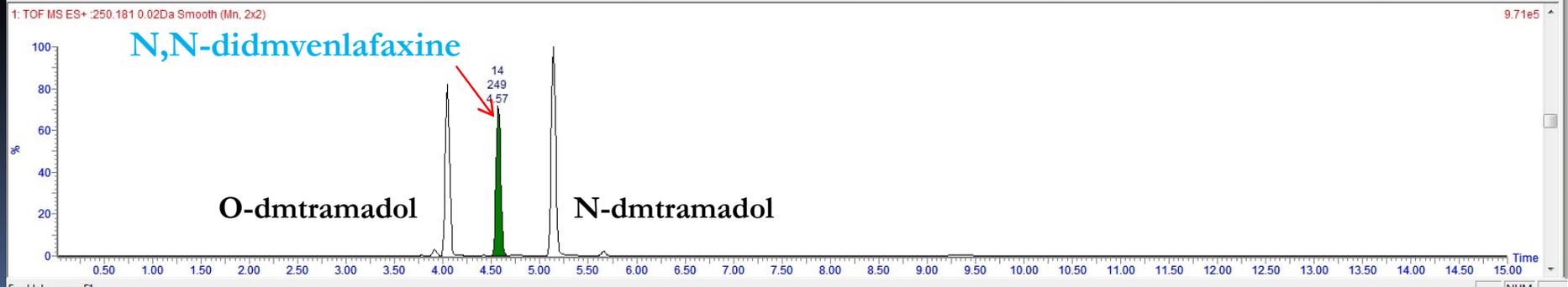
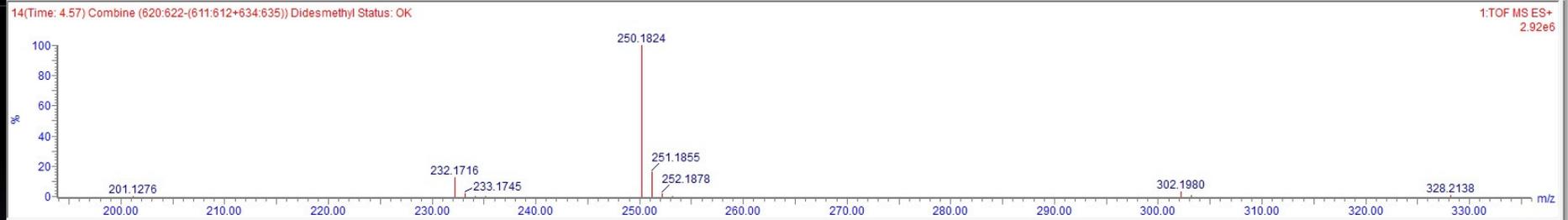
MetaboLynx XS Browser - [venlaf]

Plate: 1 Vial: 5

Expected Metabolites - parent C17H27NO2 (5/50 entries)

Status	MS...	Mass	Metabolite Name	Formula	Mass Difference	m/z Found	mDa	PPM	Label	Peak ID	Time	Trace	Area Abs	Area %	PDA Peak Area
✓	YES	263.1885	Demethylation	C16H25NO2	-14.0140	264.1980	1.7	6.3		17	4.67	1: TOF MS ES+ :264.1...	156009.59	29.91 ...	
✓	YES	263.1885	Demethylation	C16H25NO2	-14.0147	264.1972	0.9	3.3		29	5.81	1: TOF MS ES+ :264.1...	53874.60	10.33 ...	
✓	YES	249.1729	Didesmethyl	C15H23NO2	-28.0295	250.1824	1.7	6.9		14	4.57	1: TOF MS ES+ :250.1...	38737.90	7.43 ...	
✓	YES	439.2206	Glucuronide conjugation-CH2 (R,0:-CH2)	C22H33NO8	162.0169	440.2289	0.5	1.1		4	3.59	1: TOF MS ES+ :440.2...	52411.90	10.05 ...	
✓	YES	277.2042	Parent	C17H27NO2	0.0008	278.2128	0.8	3.0		30	5.96	1: TOF MS ES+ :278.2...	220538.50	42.28 ...	

Métabolite didesméthyl $m/z = 249.1729$



For Help, press F1

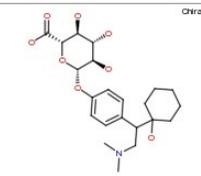
7:25 PM
8/31/2015

Venlafaxine

Report - Windows Internet Explorer
http://localhost:8100/cgi-bin/report.cgi

Report

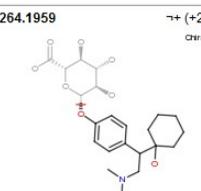
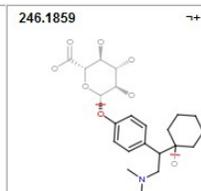
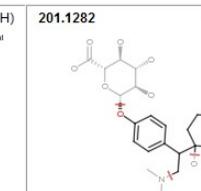
Input

	ID (job)	88
	Mass (Da)	439.2206
	Formula	C ₂₂ H ₃₃ NO ₈
	DBE	7

Experiment

Product ion(s) (Da)	107.0505 133.0664 159.0813 201.1282 246.1859 264.1959 276.1807 328.2129 422.2173 440.2282 +/- 0.001 in positive mode, structure filter off
DBE	-10 to 50
Electron count	both
Maximum H deficit	6
Fragment number of bonds	4
Scoring	aromatic: 6, multiple: 4, ring: 2, phenyl: 8, other: 1 H-deficit: 0, hetero modifier: 0.5, max score: 16
Order:	mass
Plot:	show <input checked="" type="radio"/> hide <input type="radio"/>
Files:	CSV

Results:

 264.1959 \rightarrow (+2H) Oxal 264.1964 (-0.5 mDa) (S:0.5, B:1) C ₁₆ H ₂₆ NO ₂ (-C ₆ H ₈ O ₆)	 246.1859 \rightarrow (+1H) Oxal 246.1858 (+0.1 mDa) (S:1.0, B:2) C ₁₆ H ₂₄ NO (-C ₆ H ₁₀ O ₇)	 201.1282 \rightarrow (+0H) Oxal 201.1279 (+0.3 mDa) (S:1.5, B:3) C ₁₄ H ₁₇ O (-C ₈ H ₁₇ NO ₇)
---	---	---

Done

Local intranet | Protected Mode: Off

7:17 PM
8/31/2015

O-dmvenlafaxine glucuronide

m/z = 439.2206

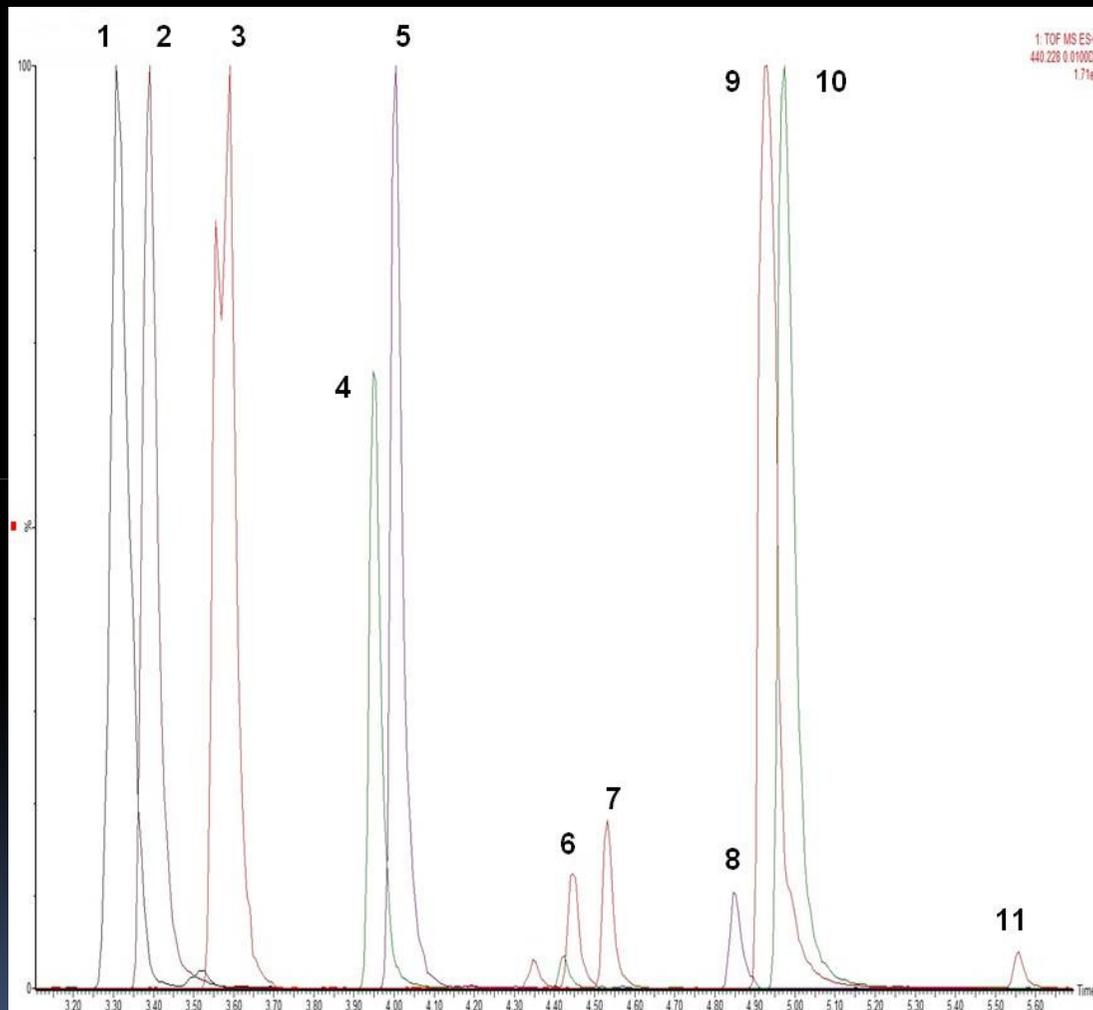
Fragments

m/z = 264.1964 (parent)

m/z = 246.1858

m/z = 201.1279

Exemple du tramadol et de la venlafaxine



1	O-dm-tramadol-glucuronide	C ₂₁ H ₃₁ N ₁ O ₈
2	O,N-didm-tramadol-glucuronide	C ₂₀ H ₂₉ N ₁ O ₈
3	O-dm-venlafaxine-glucuronide	C ₂₂ H ₃₃ N ₁ O ₈
4	O-dm-tramadol	C ₁₅ H ₂₃ N ₁ O ₂
5	O,N-didm-tramadol	C ₁₄ H ₂₁ N ₁ O ₂
6	N-didm-venlafaxine	C ₁₅ H ₂₃ N ₁ O ₂
7	O-dm-venlafaxine	C ₁₆ H ₂₅ N ₁ O ₂
8	N,N-didm-tramadol	C ₁₄ H ₂₁ N ₁ O ₂
9	tramadol	C ₁₆ H ₂₅ N ₁ O ₂
10	N-dm-tramadol	C ₁₅ H ₂₃ N ₁ O ₂
11	N-dm-venlafaxine	C ₁₆ H ₂₅ N ₁ O ₂

(dm = desméthyl)

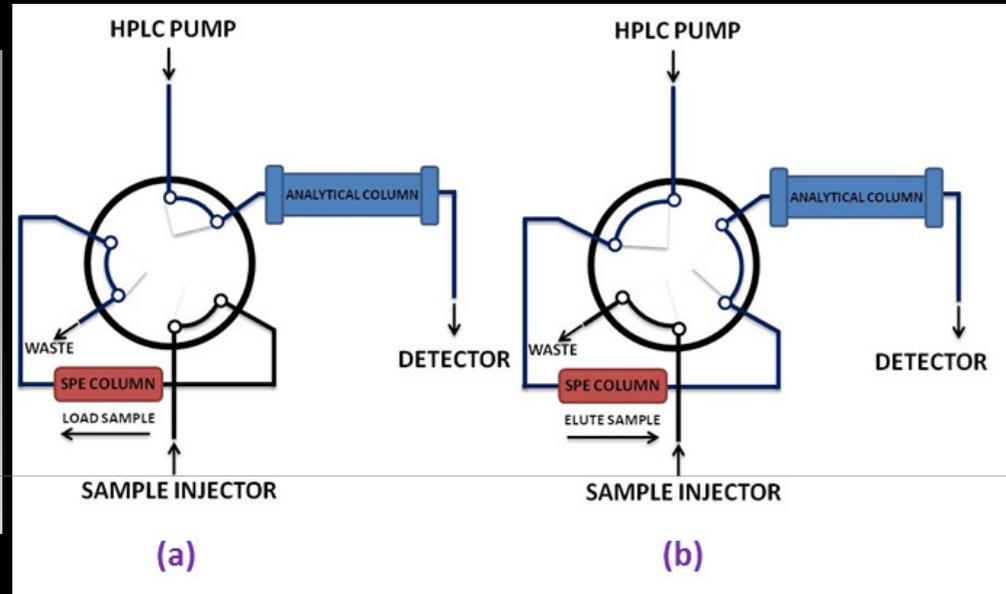
Couplage UPLC-TOF avec SPE *online*

UPLC Acquity 2D - XEVO G2 Qtof

Waters®



UPLC 2D - QToF



UPLC : temps d'acquisition réduit = robustesse du criblage toxicologique

UPLC 2D-Qtof : analyse spécifique-sensible-robuste de matrices de matrices biologiques ou non +/- complexes

Matrices biologiques complexes

Viscères

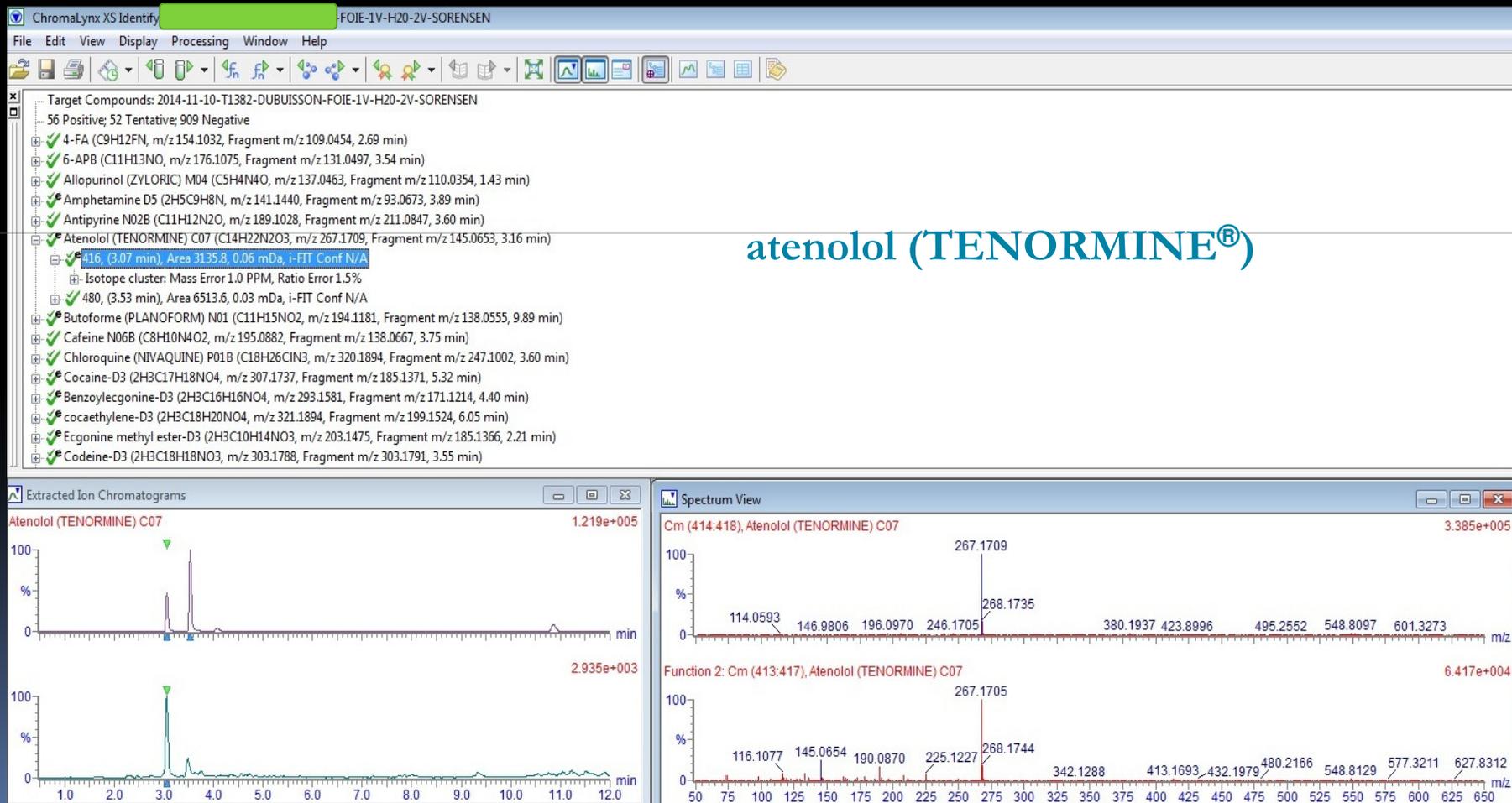
- Corps putréfié - carbonisé, exhumation ...
- Exemple : ♀ carbonisée : sang-foie déshydratés
sang = 80 % eau ; foie = 65 % eau
- Broyage après réhydratation
(eau ou Sørensen pH 6,8)



Matrices biologiques complexes

Viscères

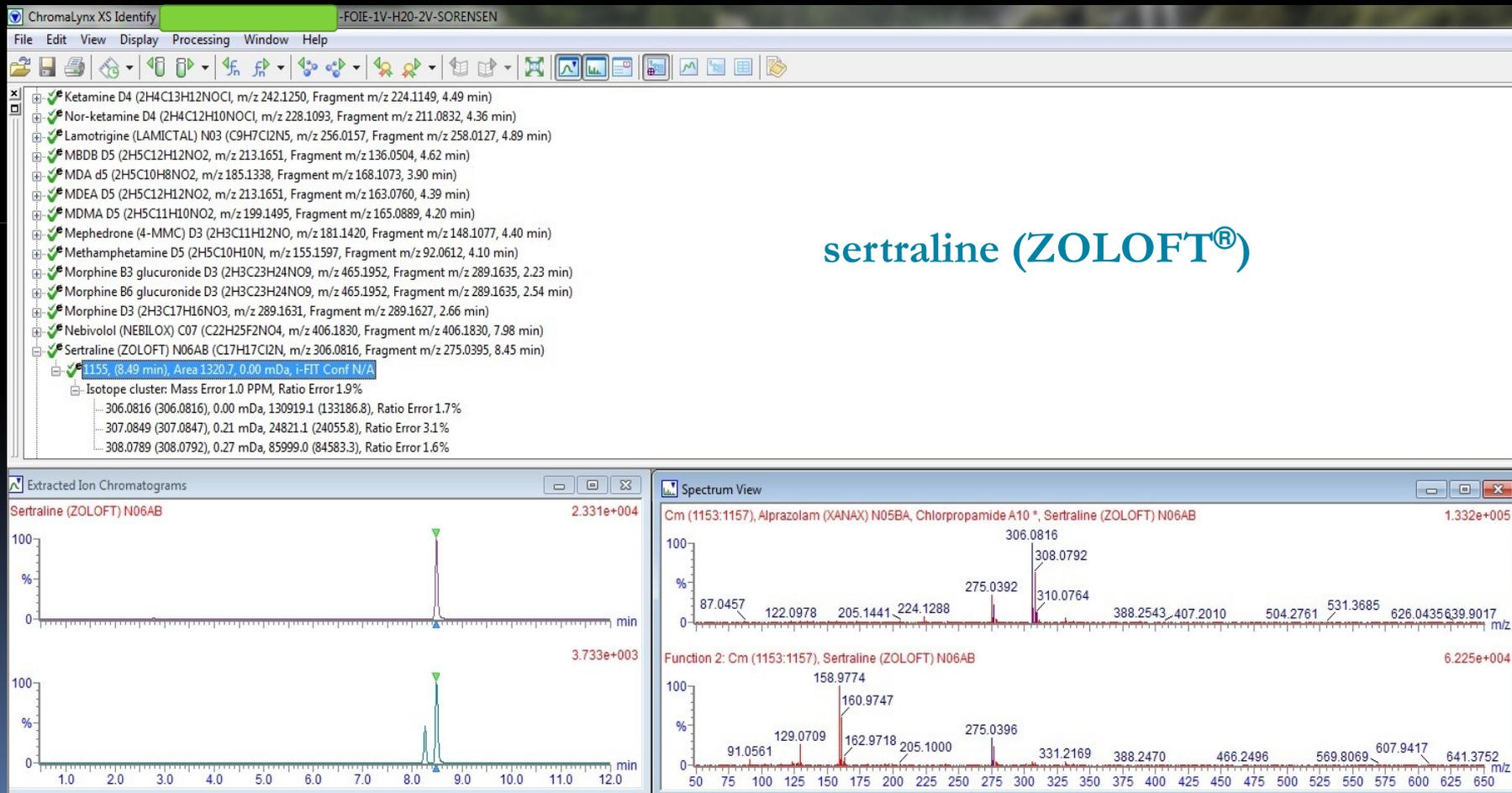
➤ Screening UPLC-Qtof avec PEL du foie



Matrices biologiques complexes

Viscères

➤ Screening UPLC-Qtof avec PEL du foie



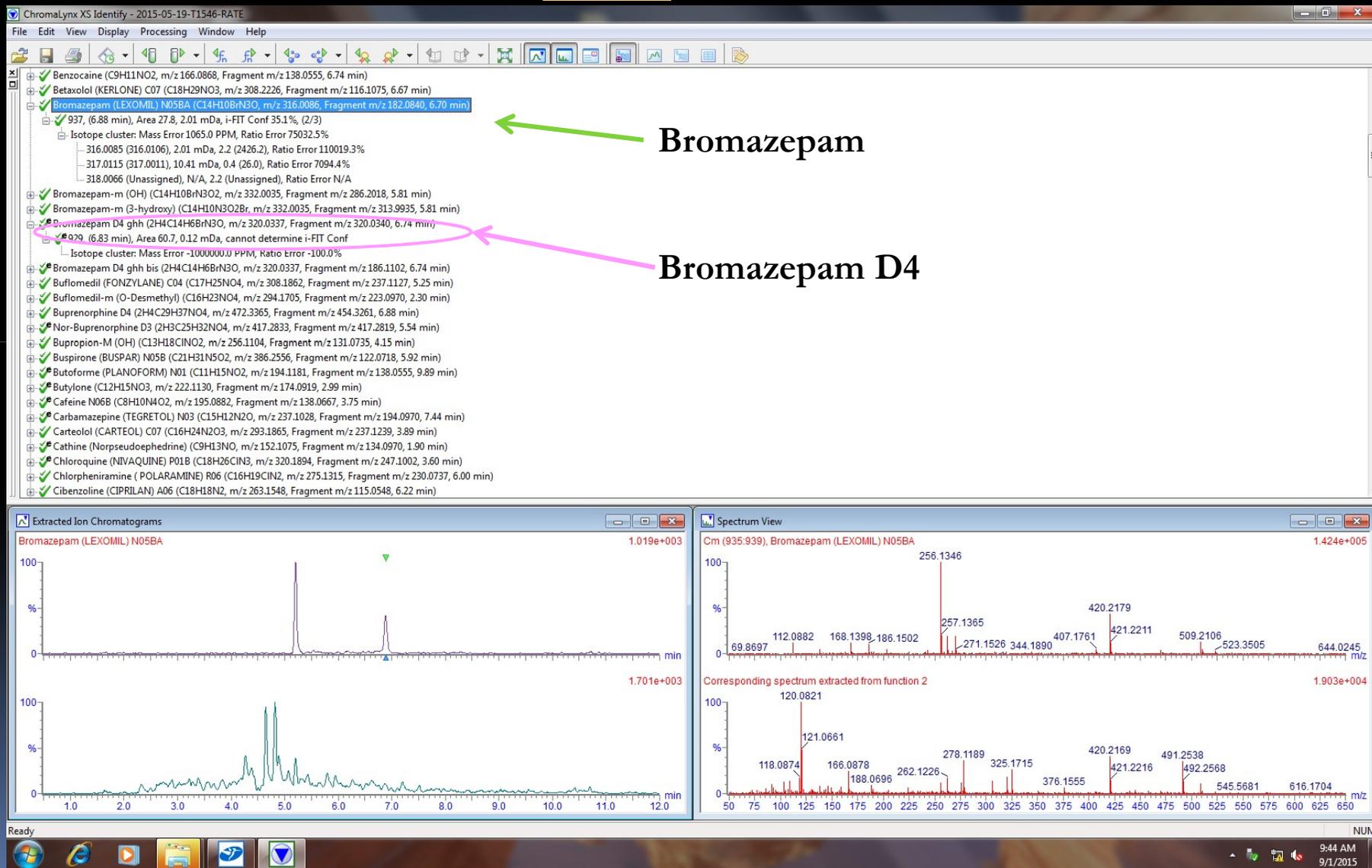
Matrices biologiques complexes

Viscères

- Analyse simultanée qualitative et quantitative avec EI deutérés
- Broyage des viscères dans tampon Sörensen avec EI deutérés (≈ 40 molécules médoc et stup)
- Ex. ♀ exhumation après 1 mois sous terre dans une bâche – putréfaction +++ : Foie, Rein, Rate

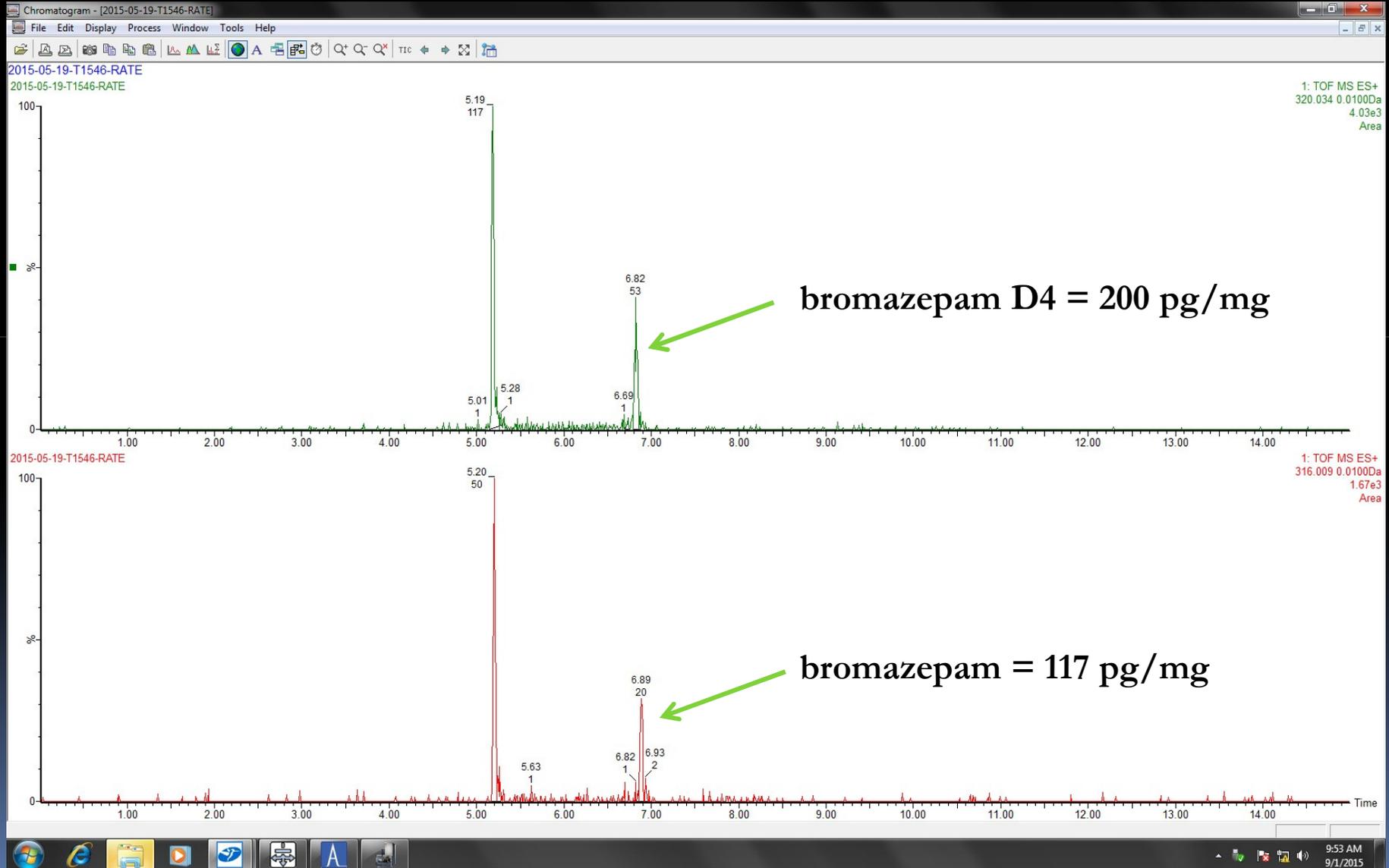
Matrices biologiques complexes

Rate



Matrices biologiques complexes

Rate

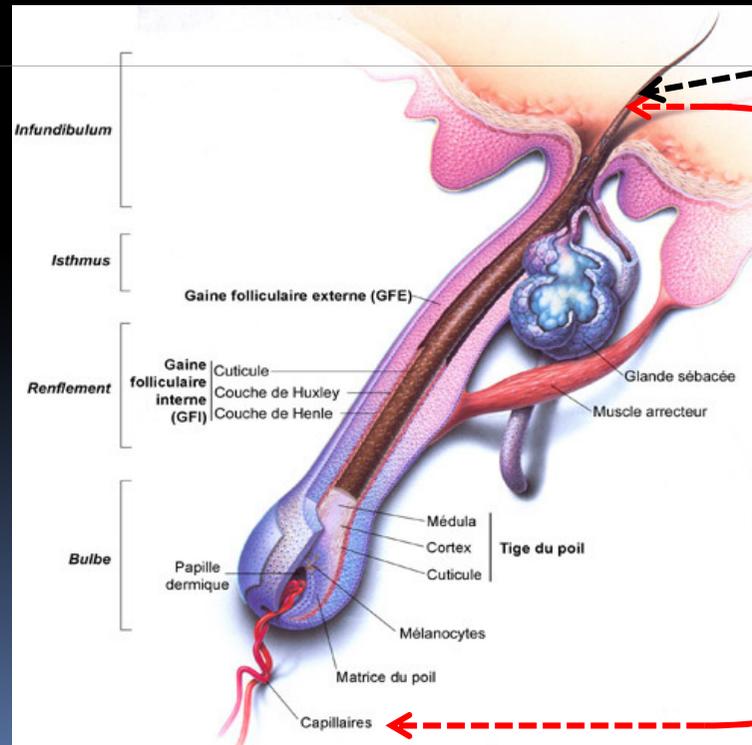


Matrices biologiques complexes

Cheveux

- Marqueur expositions répétées/chroniques
- Fenêtre de détection : plusieurs semaines
→ profil de consommation à long terme

- Structure kératinisée
- 3 phases :
 - anagène (4-8 ans)
 - catagène (2 sem)
 - télogène (3 mois)
- Vertex : 0,34 mm/j
soit 1 cm/mois
(0,7 – 1,3 cm/mois)



Localisation du
prélèvement de cheveux
= **vertex**

Temps de migration
d'une molécule dans le
follicule pilo-sébacé (des
capillaires sanguins
jusqu'au vertex \approx 1,2-1,5
cm) = **3-4 jours**

Matrices biologiques complexes

Cheveux

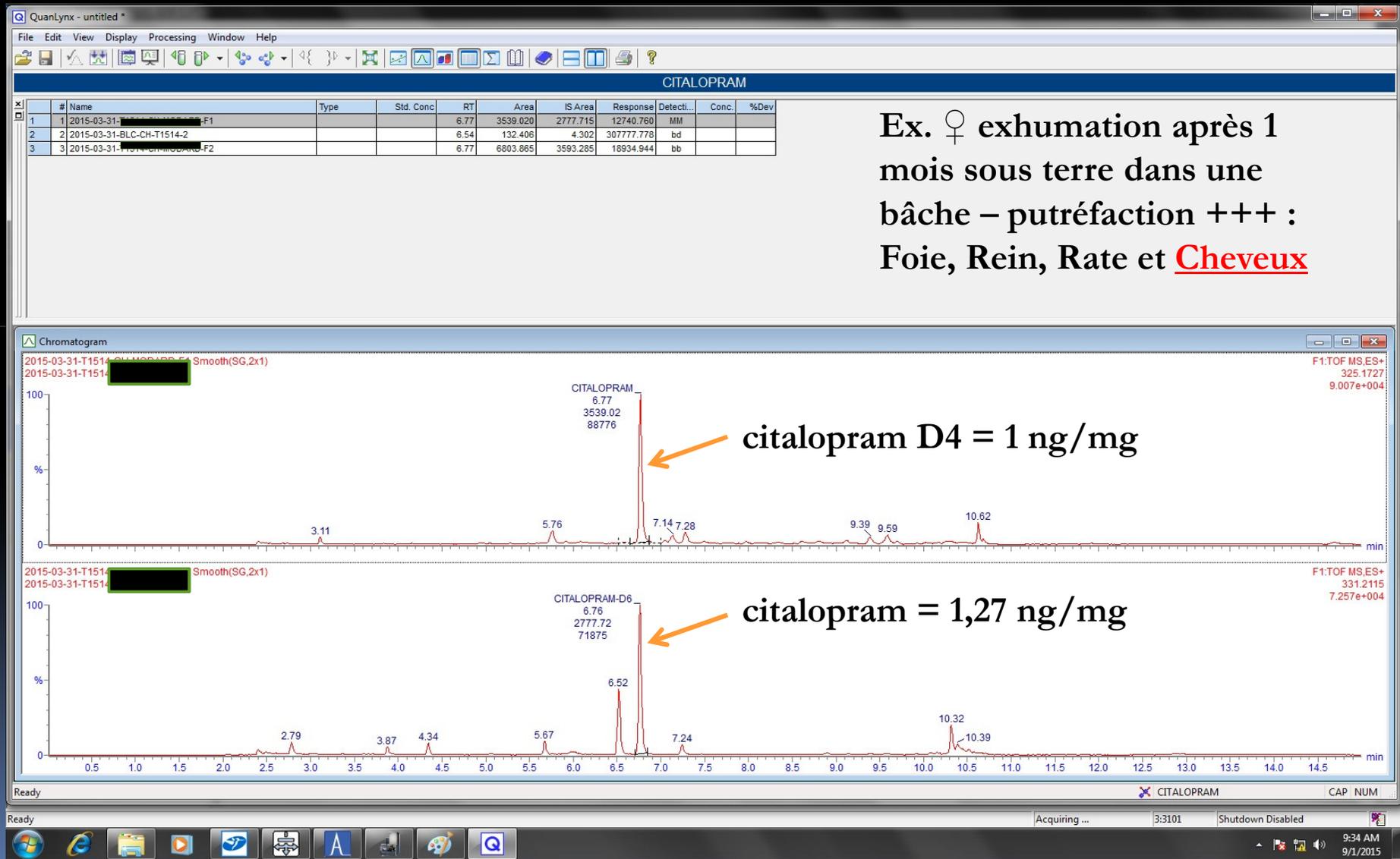
- 10 mg cheveux (poils pubiens)
- 200 µl de tampon (Sorënsen pH 6,86) + EI deutérés
- ultra-sons 2 h
- UPLC-Qtof avec PEL : injection 100 µl
- Résultats très satisfaisants (CQE) avec prise d'essai réduite à 5 mg



Si suspicion contamination externe : lavage eau, MeOH, dichlorométhane

Matrices biologiques complexes

Cheveux



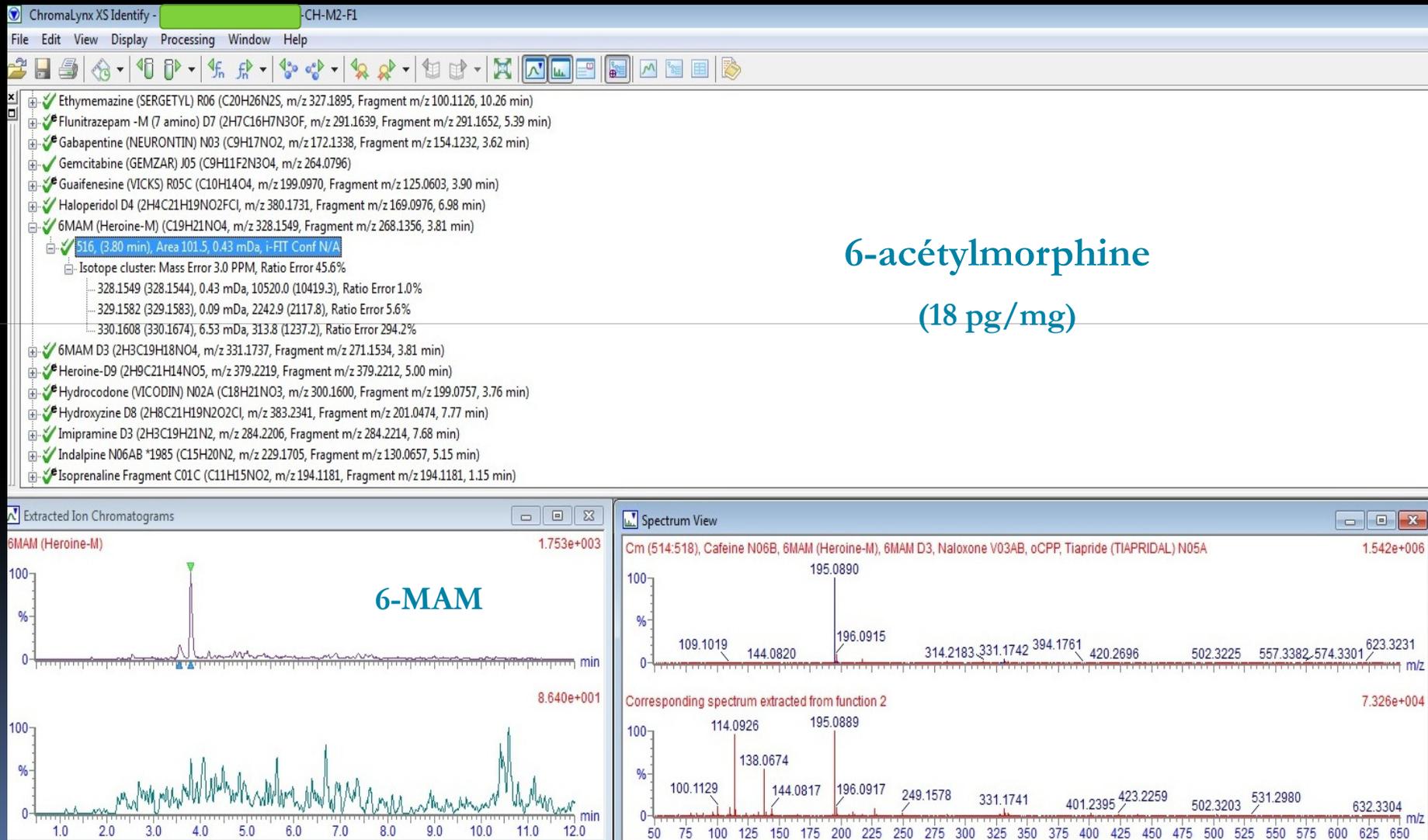
Matrices biologiques complexes

Cheveux

- ✓ ♂ alcoolique (sous traitement), dcd à domicile
- ✓ Examen de corps : syndrome asphyxique ++
- ✓ Analyse toxicologique sang et urines :
 - alcoolémie = 1,36 g/l ; alcoolurie = 2 g/l
 - présence 6-MAM, morphine, alcaloïdes de l'opium (codéine, noscapine, papavérine) et paracétamol
 - ➡ consommation d'héroïne (toxicomanie non connue)
 - morphine = 56 ng/ml ; M3G = 100 ng/ml ; M6G = 16 ng/ml
 - décès imputable à l'héroïne ?

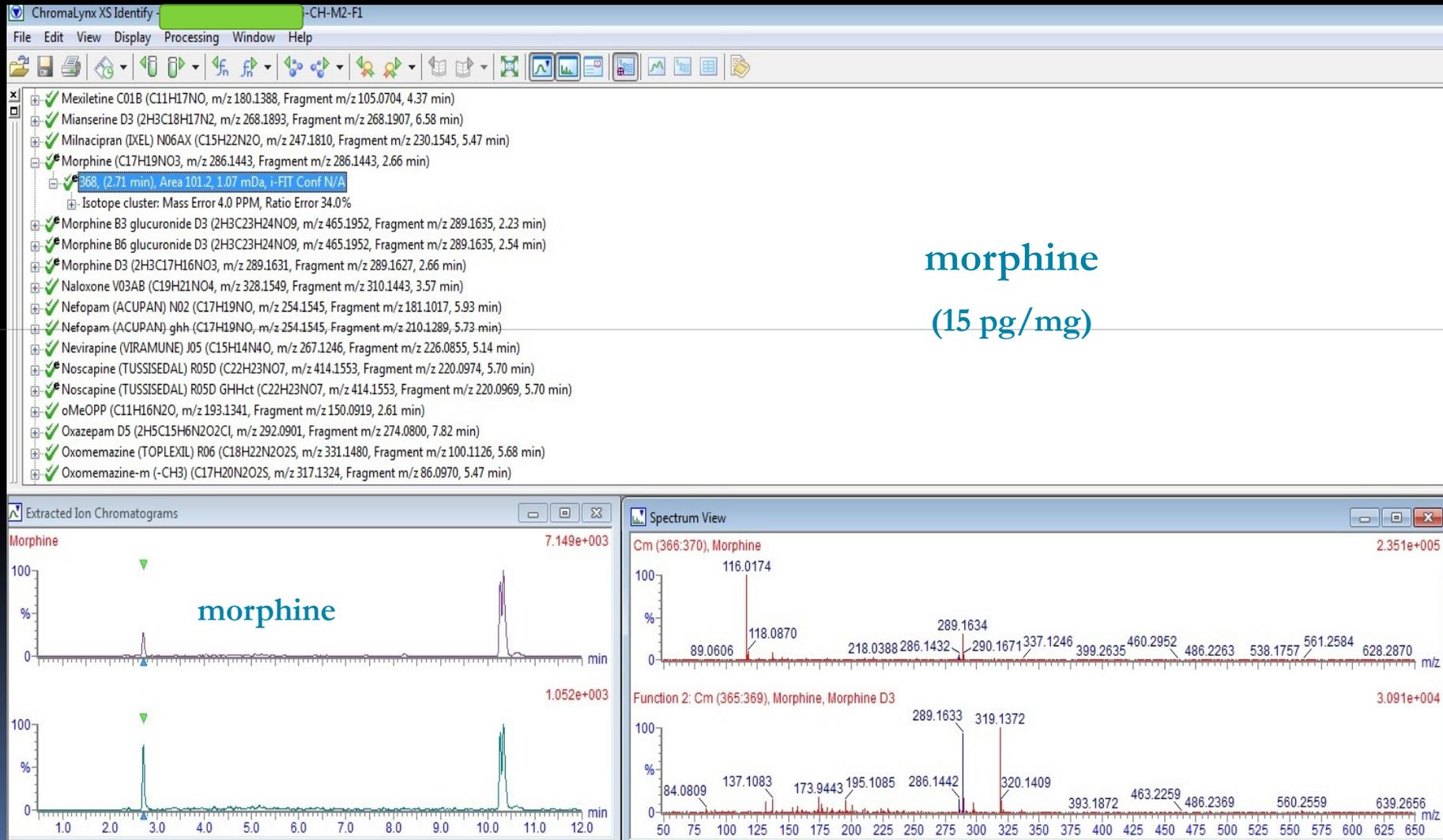
Matrices biologiques complexes

Cheveux



Matrices biologiques complexes

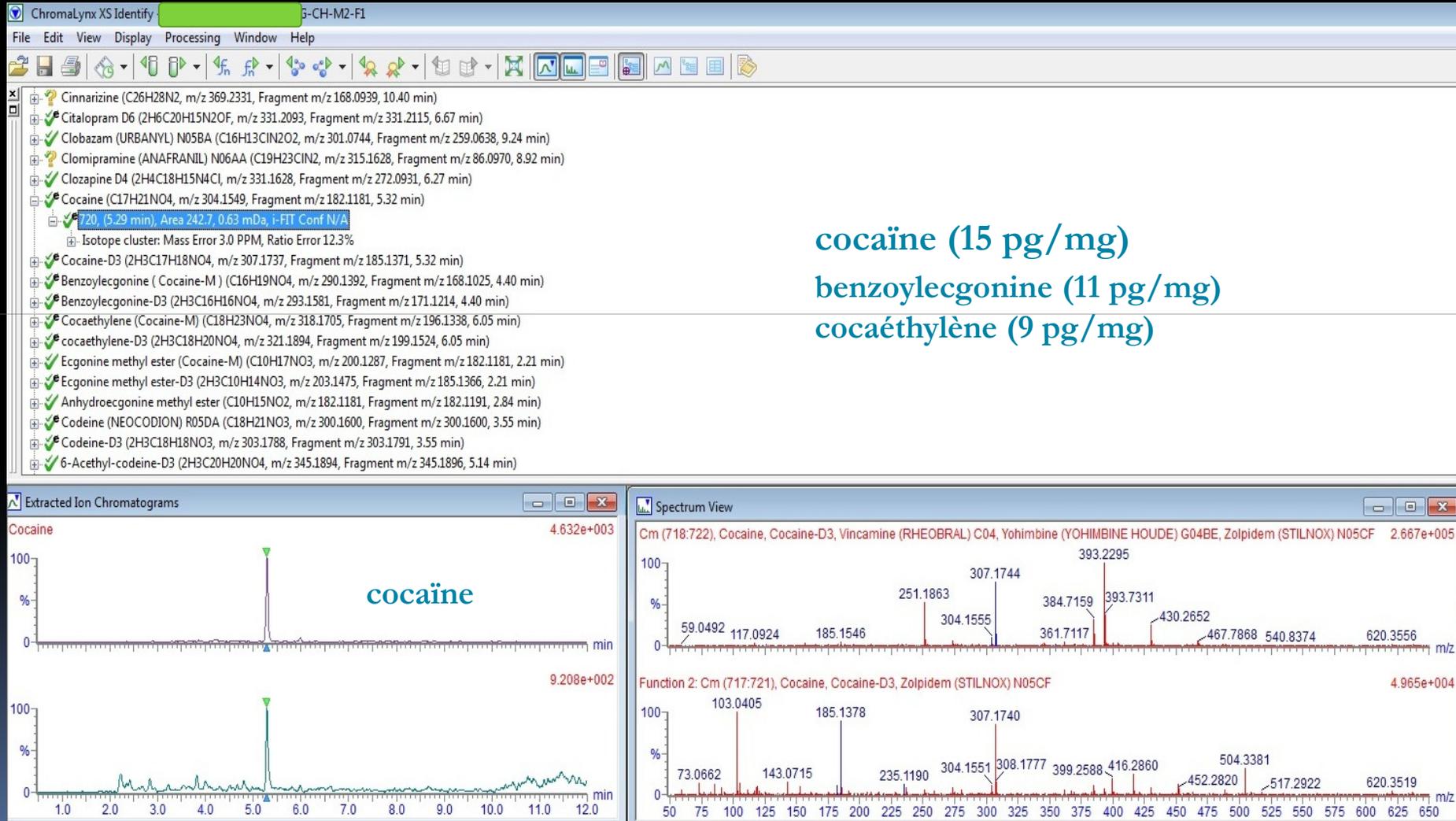
Cheveux



morphine
(15 pg/mg)

Matrices biologiques complexes

Cheveux



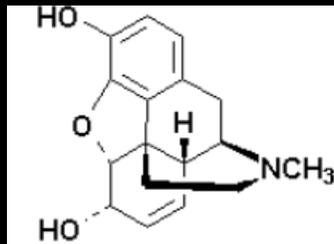
cocaïne (15 pg/mg)

benzoylcegonine (11 pg/mg)

cocaéthylène (9 pg/mg)

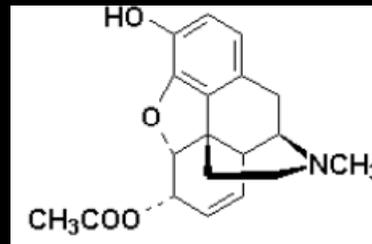
Matières premières stupéfiantes

Pavot (capsules) → Opium → extraction / morphine



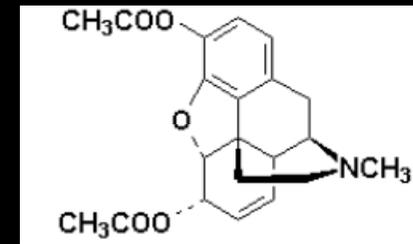
morphine

→
réactif
acétylation



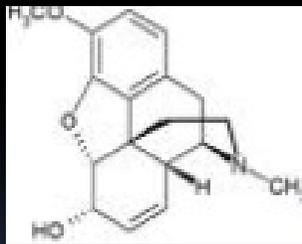
6-monoacétylmorphine

→
réactif
acétylation



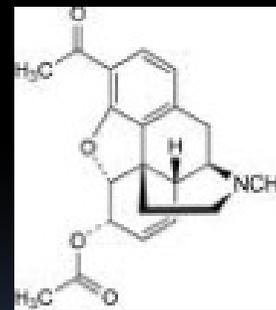
diacétylmorphine

= héroïne



codéine

→
réactif
acétylation



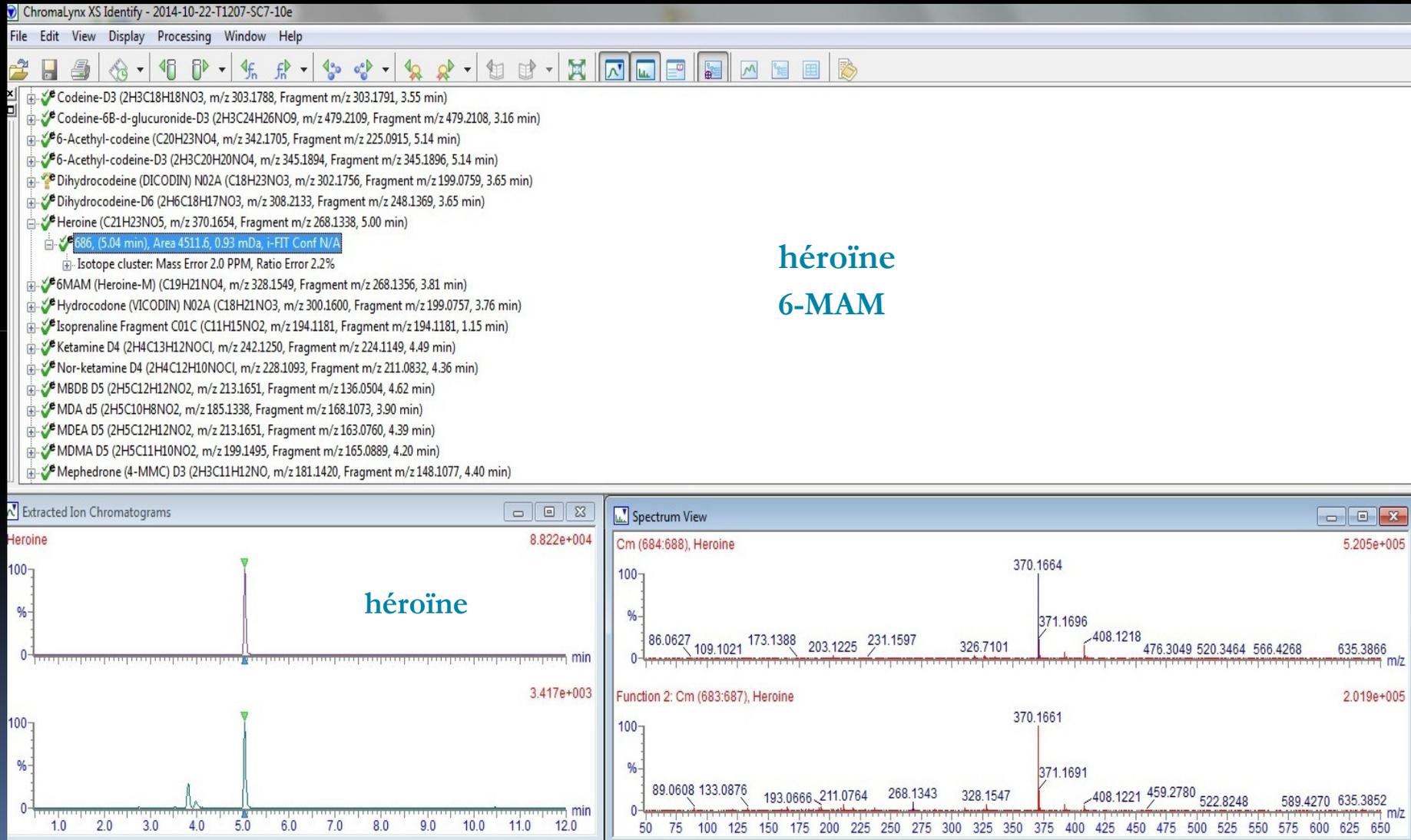
6-acétylcodéine



Autres alcaloïdes extraits : noscapine, papavérine

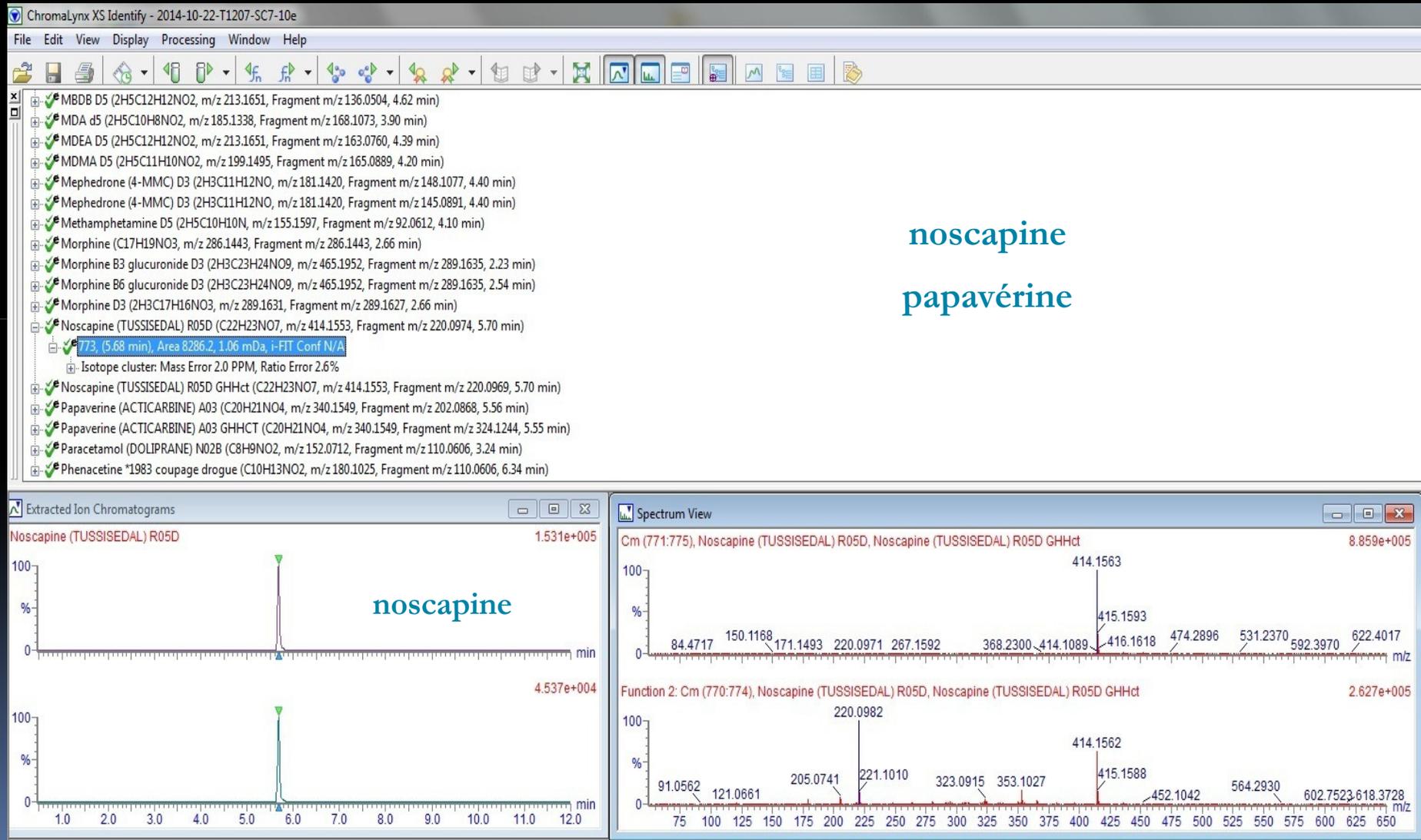
Matières premières stupéfiantes

héroïne



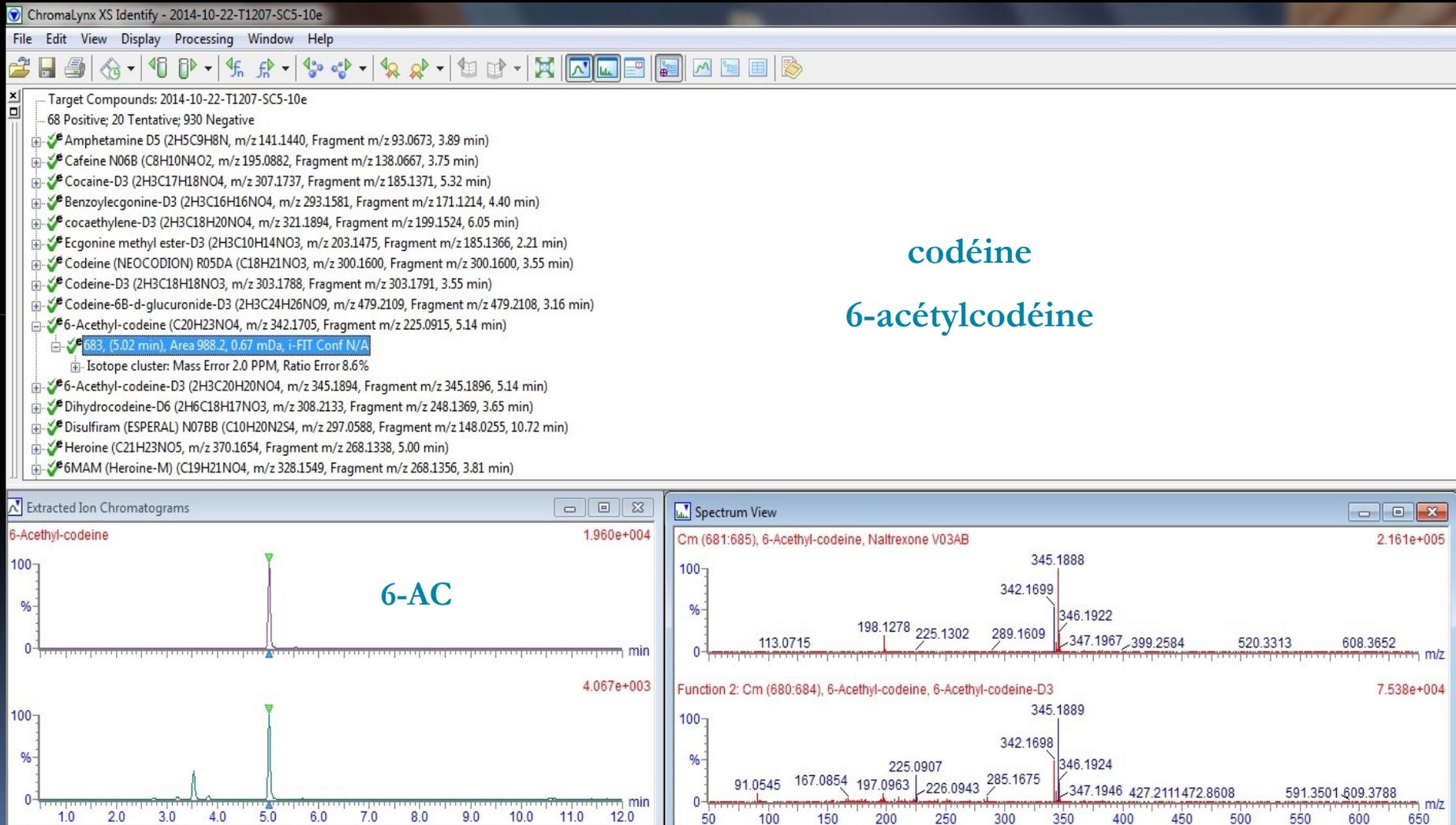
Matières premières stupéfiantes

héroïne



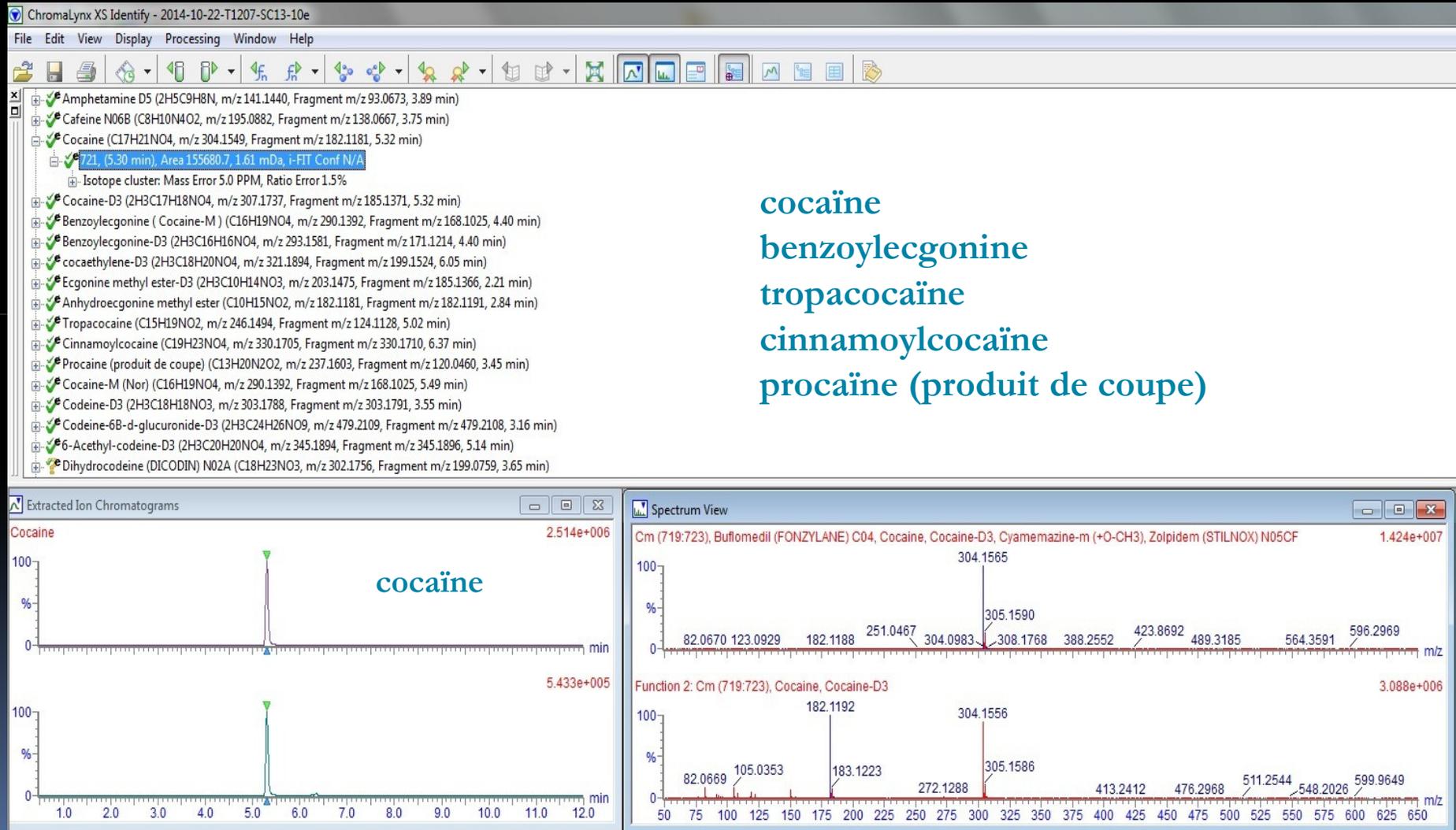
Matières premières stupéfiantes

héroïne



Matières premières stupéfiantes

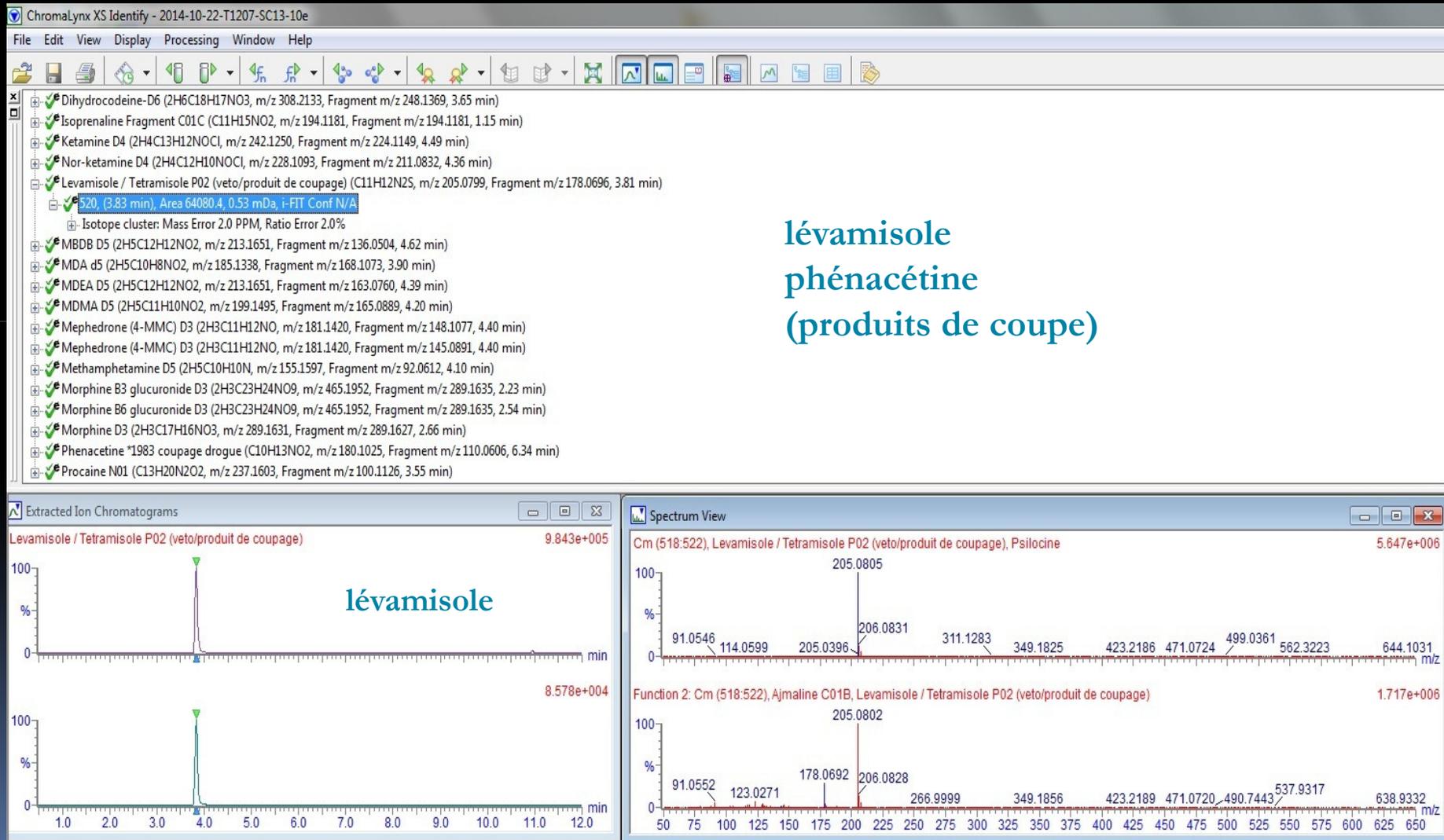
cocaïne



cocaïne
benzoylcegonine
tropacocaine
cinnamoylcocaïne
procaine (produit de coupe)

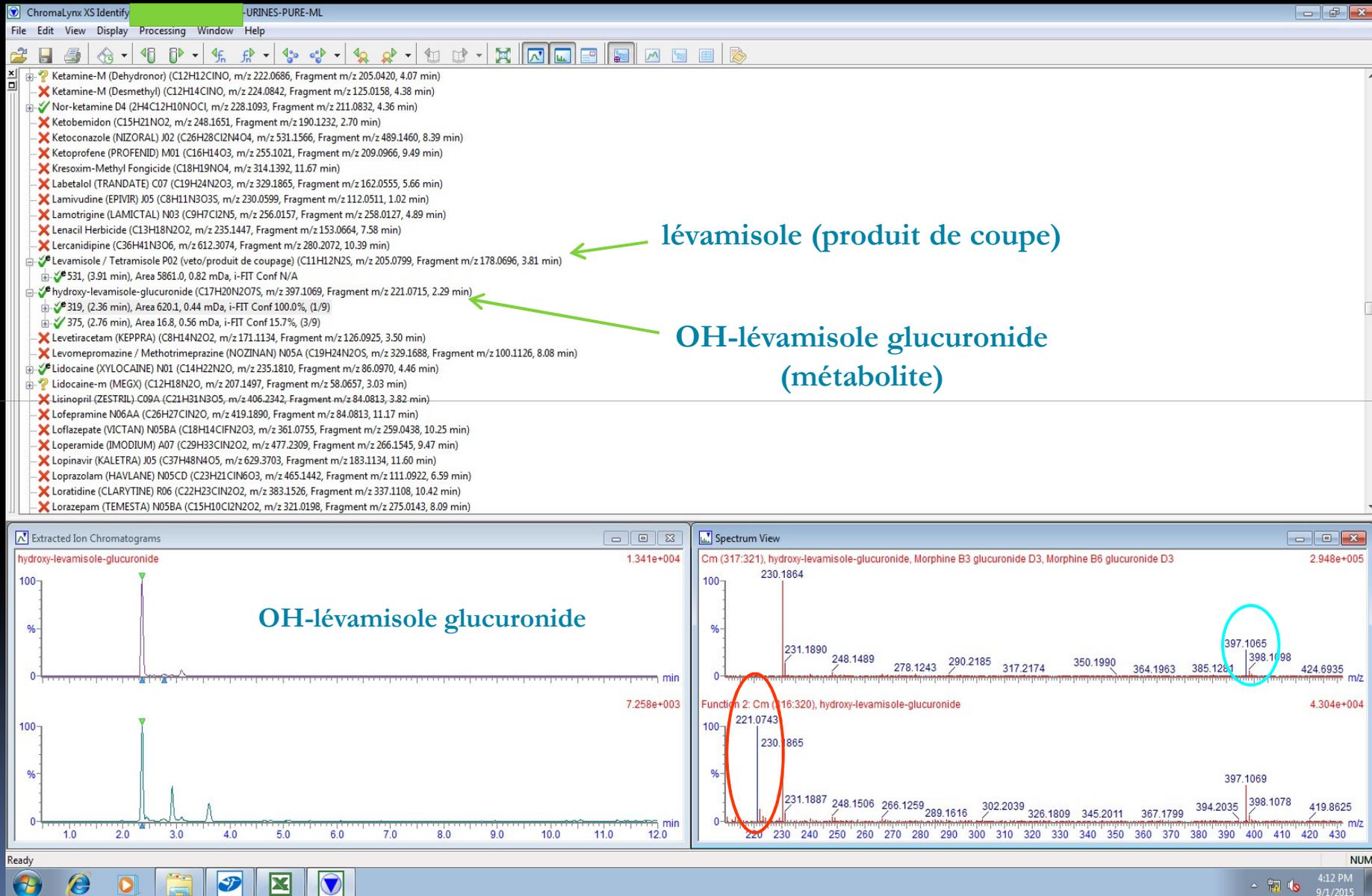
Matières premières stupéfiantes

cocaïne



lévamisole
phénacétine
(produits de coupe)

Métabolites des produits de coupe



UHPLC-Q-Orbitrap

UHPLC Ultimate 3000 RSLC – Q- Exactive Focus ThermoFischer®

Q-Exactive
Focus



UHPLC -
2 D

Thermo Scientific Q Exactive Focus LC-MS/MS system (l.)
with Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 UHPLC system (r.)

UHPLC-TSQ

UHPLC Ultimate 3000 RSLC – TSQ

QUANTIVA

ThermoFischer®

UHPLC -
2 D



TSQ-
QUANTIVA

Dernière génération : sensibilité et spécificité +++

→ dosage stupéfiants / salive, cannabinoïdes et GHB / cheveux

Sécurité routière : dosage des stupéfiants dans la salive

➤ **Décret n°2016-1152 du 24/08/2016** : confirmation des stupéfiants dans la salive dans le cadre de la sécurité routière

- ❑ prélèvement non-invasif
- ❑ sécrétion par glandes sous-maxillaires, parotides et sublinguales : 99 % eau (+ sels minéraux, protéines et enzyme de digestion)
- ❑ diffusion passive des stupéfiants (fonction propriétés physico-chimique, fixation protéique et pH plasmatique et salivaire)

Dosage des stupéfiants dans la salive

➤ Laboratoire

- ❑ centrifugation = élimination des particules en suspension
- ❑ congélation + décongélation = baisse de la viscosité
sublinguales : 99 % eau (+ sels minéraux, protéines et enzyme de digestion)

➤ Concentrations et cinétiques salivaires

- ❑ variation des concentrations : recueil, degré stimulation
débit salivaire, voie d'administration
- ❑ cinétiques salivaires \neq cinétiques plasmatiques
- ❑ peu de corrélation entre concentrations salivaires et effets toxicologiques

Dosage des stupéfiants dans la salive

Paramètres	CANNABIS	COCAINE	AMPHETAMINES	OPIACES
Analytes à rechercher	THC (THC-COOH ≈ 1-20 pg/ml)	cocaïne benzoyl-ecgonine (BE)	amphétamine méthamphétamine MDA et MDMA	morphine 6-MAM codéine dihydrocodéine codéthyline pholcodine oxycodone
Concentrations observées	THC : 10 - 100 ng/ml	cocaïne 2 - 50 ng/ml BE 50 - 200 ng/ml	50 - 1000 ng/ml	morphine 30 - 500 ng/ml 6-MAM 1 - 4000 ng/ml codéine 5 - 2000 ng/ml
Fenêtre de détection	4 - 6 h	<u>IV :</u> coc = 24h BE = 72 h <u>Sniff et crack :</u> coc = 12 h BE = 24 h	24 h amphétamine : jusqu'à 48 h	morphine 24 h 6-MAM 8 h codéine 36 h oxycodone 48 h dihydrocodéine 24 h



Expertise Toxicologique

Judiciaire :

Soumission Chimique

DEFINITION

Administration de **substances psychoactives (SPA)** à l'insu de la victime à des fins criminelles (viols, actes de pédophilie) ou délictuelles (violences volontaires, vol...)

[circulaire DGS/DHOS n°2002/626]

QUAND Y PENSER ?

Difficultés ++

- Victime agressée « se réveille »
 - ✓ Confuse,
 - ✓ Dans un lieu souvent inconnu,
 - ✓ Parfois sans ses effets personnels
- Retour progressif et fragmenté de la mémoire des faits

QUAND Y PENSER ?

- Amnésie antérograde dans 1 cas sur 2 - totale ou partielle (flashes)
- Admission aux urgences tardive
 - ✓ Agitation psychomotrice liée au stress
 - ✓ Inhibition liée à l'angoisse

QUAND Y PENSER ?

Devant tout individu (le + souvent ♀)

- Présentant
 - ✓ Soit, des **signes cliniques d'agression physique**
 - ✓ Soit, des **troubles neuropsychiques** (troubles cognitifs, du comportement, de la vigilance...)
- Alléguant une agression sous l'effet d'une substance ingérée à son insu

QUAND Y PENSER ?

Deux Tableaux Cliniques

- **Victimes « Endormies »**

⇒ sédation, troubles de la conscience

- **Victimes « Actives »**

⇒ conscientes

⇒ actes commis contre leur volonté, à leur insu, sous le contrôle de l'agresseur



Les Substances de la
soumission chimique :
Aspects pharmacologiques

Les substances de la SC

- Substances et classes médicamenteuses susceptibles d'être utilisées

⇒ nombreuses - variées

- Effets recherchés et leur combinaison obtenus par divers modes d'action neuropharmacologiques

La substance « idéale » pour l'agresseur

- Effets nécessaires à l'obtention d'un état « favorable » chez la victime
- Propriétés propices
 - A la réalisation pratique du délit
 - A l'impunité de l'agresseur

La substance « idéale » pour l'agresseur

1- Effets recherchés

Sédation- Hypnose

Perturbe

- réveil
- attention
- réponse/agression

Amnésie

Témoignage
altéré/Culpabilité

- Retarde
- Dépôt de plainte
 - Prélèvements

Hallucinations

- Perte/repères
spatio-temporels

- Témoignage
altéré (heure, lieu...)
- Modifications
affectives

Désinhibition

- Inhibition
- émotionnelle
 - fantasmatique
 - motrice
 - censure (sexuelle)

Situations
intolérables
acceptées

La substance « idéale » pour l'agresseur

2- Action rapide et brève

- T_{\max} court (< 20 min)
 - ➔ Délai entre administration dissimulée et délit le plus court possible
- Action brève →
 - Ne pas éveiller les doutes de SC
 - Absence de qqs heures plus facilement « admise »
- Métabolisme et Elimination rapides

La substance « idéale » pour l'agresseur

2- Action rapide et brève : ex. du GHB

- Absorption et effet très rapide : 15 à 30 min
- Concentration maximale en 20 à 45 min
- $T_{1/2} = 30$ min à 1h
- Elimination sous forme de
 - CO_2 (air expiré)
 - inchangé (urine ; $< 5\%$ dose ingérée)

La substance « idéale » pour l'agresseur

3- Symptômes peu spécifiques

- Eviter l'identification de la prise par la victime

ex. du GHB : effets \approx alcool

(euphorie, relaxation voire somnolence)

- Effet toxique marqué $\overrightarrow{\text{erreur}}$ de diagnostic

↓
retard de prise en charge
et du dépôt de plainte

La substance « idéale » pour l'agresseur

4- Facilité d'obtention

- Substances en vente libre (alcool)
- Substances médicamenteuses largement prescrites (Benzodiazépines)
- Internet +++
 - Achat à l'étranger
 - Techniques de préparation

La substance « idéale » pour l'agresseur

5- Administration directe

- Voie orale +++
- **Boissons alcoolisées** (potentialisation - exacerbation des effets) ou **non** (jus de fruit, café)
- **Nourriture - Comprimés**



Produits insipides - inodores - incolores

- Faible dose
- **Forme galénique liquide** (solutions buvables ++)

La substance « idéale » pour l'agresseur

6- Détection analytique difficile

Substance
active à
faible dose

$1/2$ vie courte

Instabilité
in vitro

Substances
endogènes
(ex. GHB)

Fenêtre de
détection
étroite
↓
Risque de
faux négatif
(pvt tardif)

- Dégradation
- Synthèse
(in vitro, postmortem)

Pharmacologie des substances de la SC

1- Le système GABAergique

- **GABA = principal NT inhibiteur** (40% synapses)
- **Agonistes du GABA**
 - **Sédation - hypnose ou effet anxiolytique**
 - **Propriétés amnésiantes**
- ↔ BZD et apparentés (zolpidem - zopiclone),
barbituriques, méprobamate, éthanol, hydrate de
choral, GHB (action sur les récepteurs GABA_A?)

Pharmacologie des substances de la SC

2- Le système Histaminique

- Rôle dans l'éveil et la vigilance
 - Antagonistes des récepteurs centraux (H1+++)
 - Sédation - somnolence
 - Etourdissement - ralentissement des réflexes
- ↔ Antihistaminiques-H1 : alimémazine, prométhazine, hydroxyzine

Pharmacologie des substances de la SC

3- Le système Dopaminergique

- Rôle dans la vigilance - Contrôle de la pensée (D3-D4)
et ↘ besoin de sommeil
- Antagonistes dopaminergiques centraux
 - Sédation psychomotrice - somnolence -
indifférence

↔ Neuroleptiques

Pharmacologie des substances de la SC

3- Le système Dopaminergique

- Systèmes catécholaminergiques centraux (récepteurs) et effets hallucinogènes

⇒ Activation des récepteurs D1 et D2



Apparition de délire et hallucinations

⇔ Ecstasy (MDA, MDMA, MDEA), mescaline, GHB

Pharmacologie des substances de la SC

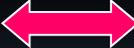
3- Le système Dopaminergique

- **Amphétamines dopaminergiques** (Fam. amphétamine)
 - ➡ **Action noradrénergique indirecte** → Effet désinhibiteur
- **Mode d'action « perturbateur » du cannabis**
 - ➡ **Action dopaminergique indirecte (CB1 et CB2)**
 - Euphorie - désinhibition
 - Somnolence - tbs de la mémoire (court terme)

Pharmacologie des substances de la SC

4- Le système Sérotoninergique

- Régulation du sommeil - humeur (action antidépressive) -
appétit (effet anorexigène)
- Hyperstimulation des récepteurs 5-HT-2 et 5-HT-1_A
  favorise l'apparition des hallucinations

  **Ecstasy (MDA, MDMA, MDEA)** (effet modérés)
- Mécanisme sérotoninergique  Désinhibition
(≈ hallucinations)

Pharmacologie des substances de la SC

5- Les récepteurs aux opiacés

- Récepteurs :
 - μ \rightarrow analgésie - intégration sensori-motrice
 - κ \rightarrow analgésie - équilibre hydrique
- **Opiacés**
 - **Propriétés sédatives** (dépression du SNC ; R. Kappa et μ)
 - **Effets potentiels sur le plan psychoaffectif** (R. Kappa)
 - euphorie, voire dysphorie (mal-être)
 - angoisse
 - hallucinations

Pharmacologie des substances de la SC

5- Les récepteurs aux opiacés

- **Kétamine et Phencyclidine (PCP)** (Anesthésiques)
 - **Propriétés hypnotiques** par activation des récepteurs μ et K
 - **Effets hallucinogènes** \rightarrow récepteurs K
 - ➔ type dissociatif (déconnexion esprit/corps)

Pharmacologie des substances de la SC

6- Les substances parasympholytiques

- **Action stimulante** (dose élevée)

⇒ Hallucinations - Délire associés à

- des troubles de la démarche - parole - vue
- des mouvements incessants - vertiges
- une incapacité de résistance physique
- une amnésie

⇔ **Atropine - Scopolamine** (alcaloïdes anticholinergique)

Pharmacologie des substances de la SC

7- Substances Amnésiantes

- Hypnotiques (BZD, Kétamine, GHB...)

➡ Action négative sur les capacités de mémorisation



Amnésie ANTEROGRADE



- La mémoire à court terme fonctionne



la victime s'adapte à la situation (répond - agit...)

- Mais pas de mémorisation à long terme



aucun souvenir de cette activité automatique

Amnésie antérograde : témoignage

Lorsque les effets de la gélule ont commencé, j'ai senti brutalement que je n'étais plus tout à fait maître de moi-même dans le sens où je restais consciente mais je me rendais compte que je n'avais plus de réflexe. J'étais comme déconnectée, complètement ailleurs. Cet état n'a duré que qqs sec., j'ai vacillé et ensuite c'est le trou noir, je n'ai aucun souvenir, ni en image, ni en parole. A mon réveil, je ne sentais plus mon corps, seul mon cerveau fonctionnait. J'étais incapable de bouger

Pharmacologie des substances de la SC

7- Substances Amnésiantes

- **Acétylcholine** : - principal NT du cortex cérébral
- contrôle l'étage sup. de la pensée

⇒ Rôle des syst. neuronaux cholinergiques dans la maturation des souvenirs

⇒ Propriétés amnésiantes des anticholinergiques (PCP, kétamine)

Pharmacologie des substances de la SC

7- Substances Amnésiantes

- **Glutamate** :
 - NT excitateur
 - Récepteurs NMDA et non NMDA
 - **Mémorisation**
 - **Potentialisation à long terme**
- ➔ **Propriétés amnésiantes des antagonistes NMDA (PCP, Kétamine, GHB)**
- **GABA** : Agonistes $GABA_A$ → amnésie (**BZD**, éthanol)

	<u>Effets recherchés</u>					<u>Aspects « pratiques »</u>			
	Sédation	Hallucination	Amnésie	Désinhibition	Action rapide	Action brève	Symptômes non spécifiques	Obtention ++	Administration discrète
Amphétamines	-	+	-	+++	++	++	-	+	+
Anticholinergiques	+	+++	++	-	+	+	-	+++	++
Anti-H1	++	+	+	-	+	-	++	++	++
Benzodiazépines	++	+	+++	+++	++	(1)	+++	++	++
Cannabinoïdes	++	++	+	++	++	+	+	++	+
Ethanol	+	+	++	++	VI	VI	++	+++	+
GHB	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kétamine	++	+++	++	+	+++	+++	++	+	+++
LSD	+	+++	+	++	++	-	++	+	+++
Méprobamate	+++	-	-	-	++	+	+++	++	++
Neuroleptiques	++ (1)	+	-	++ (1)	-	-	+	++	++
Opiacés	++	+	-	-	+++ (2)	++ (2)	-	+	++
PCP	-	++	++	++	+++	+	+	+	++
Hydrate de chloral	+++	-	-	-	++	+	++	- (3)	++

Prise en charge Biologique et Toxicologique

Analyses toxicologiques = éléments de preuve

- SI :
- réalisées après consentement de la victime
 - réalisées sur la base d'une réquisition judiciaire
 - respect des conditions légales
 - des prélèvements biologiques
 - d'apposition des scellés
 - de conservation des échantillons prélevés

Prise en charge Biologique et Toxicologique

- **Précocité des prélèvements**
 - **Avant toute administration thérapeutique de sédatifs, hypnotiques, anxiolytiques**
 - **Demi-vie courte - instabilité - production post-mortem des produits susceptibles d'être utilisés**

Prise en charge Biologique et Toxicologique

- **Prélèvements conservatoires**

↔ **Prélèvements réalisés en DOUBLE**

➤ 1 moitié à visée diagnostique
immédiate

➤ 1 moitié à visée judiciaire

Prise en charge Biologique et Toxicologique

- **Fiche de liaison entre le clinicien et le biologiste**
 - **Accompagne les prélèvements**
 - **Précise :**
 - Anamnèse du cas
 - Moment des prélèvements
 - Traitement habituel
 - Heure supposé des faits
 - Eléments cliniques évocateurs
 - Consommation de SPA depuis les faits

Prise en charge Biologique et Toxicologique

- **Les Prélèvements**

- **Sang**

- 3 prélèvements (7 ml) sur EDTA
 - 2 prélèvements (5 ml) sur NaF (alcoolémie)

- **Urine**

- 1 miction \geq 30 ml
 - 2 flacons sans antiseptique, ni conservateur (ECBU)

Prise en charge Biologique et Toxicologique

- **Les Prélèvements**

- **Cheveux**

- 4 mèches
 - Orientation racine-pointe
 - Coupés au ras du cuir chevelu en occipital
 - Diamètre \approx 5 mm

Prise en charge Biologique et Toxicologique

- **Les Prélèvements**

- **Cheveux**

- Analyse réalisée en fonction de l'anamnèse

- Concertation clinicien-toxicologue

- Prélèvement impératif 3 à 5 sem. après les faits

- ↳ Suivre par segmentation les variations
de concentrations des produits

Prise en charge Biologique et Toxicologique

- **Les Prélèvements**

- **Boisson(s)** et/ou **nourriture** susceptibles de contenir ou avoir contenu le ou les produit(s) suspect(s)

- **Réceptient(s)**

Prise en charge Biologique et Toxicologique

- **Conservation des prélèvements**

- **Sang et Urine** : - 20°C, à l'abri de la lumière

- **Cheveux** : θ ambiante, à l'abri de l'humidité

- Si dépôt de plainte, conservation jusqu'à autorisation de destruction par l'autorité requérante (sinon 12 mois)

Prise en charge Biologique et Toxicologique

- **Analyses toxicologiques**

- Analyse à effectuer **sans délai** (sinon congeler les prélèvements)
- Molécules à rechercher et doser prioritairement

- **Alcool éthylique**

- **Amphétamines**

- **Cannabinoïdes**

- **GHB**

- **BZD et apparentés**

- **Autres stupéfiants**

- **Hypnotiques**

- **Atropine, scopolamine**

Soumission chimique :
Analyses Toxicologiques

Analyses toxicologiques

Prise en charge analytique = complexe

- **Substances** : nature - mode d'action très variés
- Actives à faible concentration

⇒ méthodes analytiques spécifiques et sensibles

- Problème d'interprétation
 - ✓ vitesse d'élimination rapide
 - ✓ instabilité des prélèvements

↔ **Consensus de la SFTA**

Prélèvements Toxicologiques

Heure et date des faits

Heure et date des prélèvements

URINE

Sang

Cheveux

Prélèvements Toxicologiques

- **URINE**

- Milieu de choix

- Xénobiotiques et métabolites détectables $\approx 48h$
(jusqu'à plusieurs jours)

- Concentrations élevées ($>$ sang)

- Prélèvement non invasif

Prélèvements Toxicologiques

- **SANG**

- Intérêt analytique et médico-légal (délai < 24h)

- Recherche spécifique et dosage des substances identifiées dans les urines

- ➔ Evaluer les concentrations lors de l'agression

(Paramètres pharmaco-toxicocinétiques)

Prélèvements Toxicologiques

- **CHEVEUX**

- Kératine protège les xénobiotiques de toute dégradation (chimique - physique - enzymatique ...)

- Différencier une expo. unique d'un usage chronique

- Mise en évidence de l'agent de SC si prélèvements sang - urine tardifs

(Fenêtre de détection de plusieurs semaines)

Prélèvements Toxicologiques

- **CHEVEUX**

- Vitesse de pousse ≈ 1 cm/mois

- ➡ datation de la prise par segmentation

- Analyse avant et après les faits

- ➡ matérialiser l'abstinence de la victime à l'agent de SC

- ↔ Prélèvement effectués 3-5 sem. après les faits

Analyses Toxicologiques

- Effectuées le + rapidement possible
- Dépistage immuno-chimique à proscrire (faux négatifs)
- Utilisation de techniques séparatives chromatographiques et de détections spécifiques et sensibles

Analyses Toxicologiques

- **Sang et Urine**

- ✓ **GC - détection à ionisation de flamme (FID)**

 - éthanol

- ✓ **GC-MS avec introduction par espace de tête (HS)**

 - substances volatiles (hydrate de chloral)

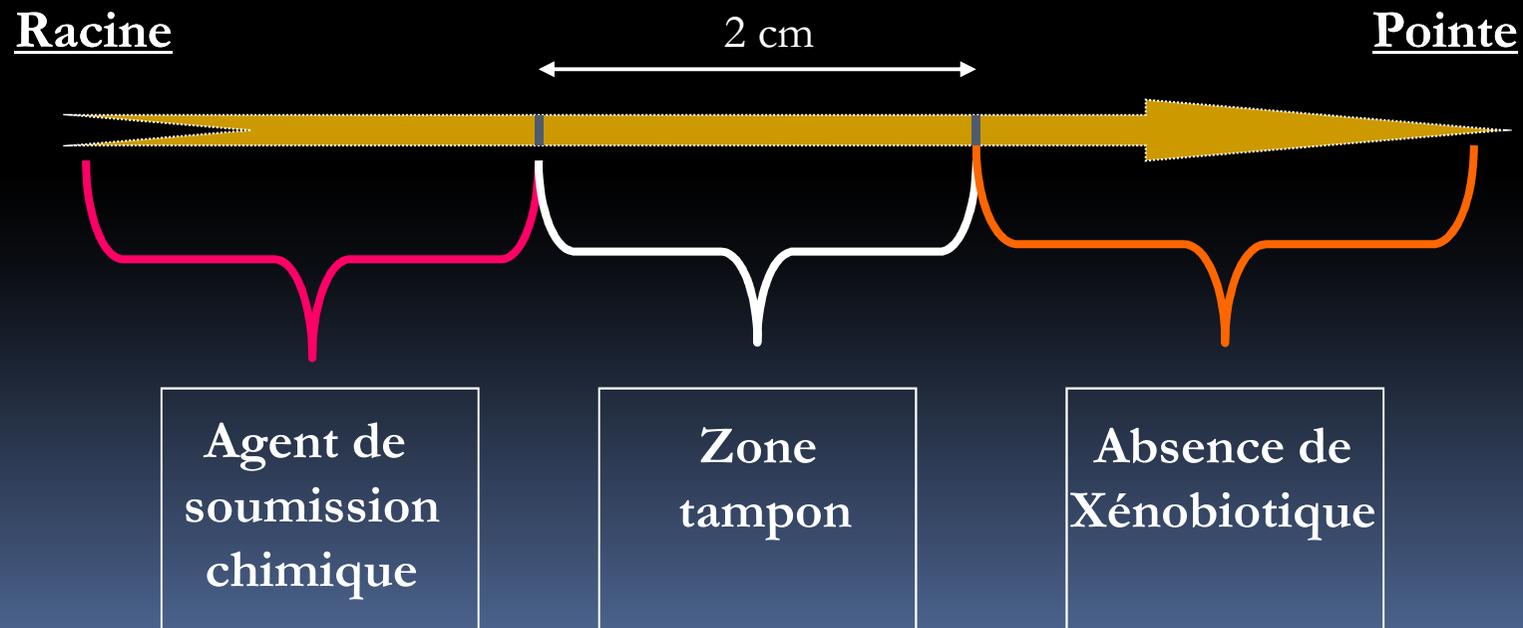
- ✓ **GC-MS , LC-MS/MS, UPLC-TOF**

 - stupéfiants, kétamine, ecstasy, GHB, neuroleptiques, anti-H1

Analyses Toxicologiques

- **Cheveux**

→ Mèche prélevée 3 à 5 sem. après les faits et sectionnée en 3 segments



Analyses Toxicologiques

- **Cheveux**

A rechercher

- **Mèche 1 :** screening / psychotropes, stupéfiants
(LC-MS-MS)
- **Mèche 2 :** cannabis (GC-MS-MS)
- **Mèche 3 :** GHB par section de 3 mm
(GC-MS-MS)

Difficultés de la prise en charge analytique

- Demande d'analyse

ABSENCE

- ✓ Notification du contexte
- ✓ Identification du clinicien
- ✓ Contact avec le clinicien pour concertation
avec le biologiste

Difficultés de la prise en charge analytique

- Demande d'analyse

ABSENCE

- ✓ Notification date - heure des faits/prélèvements
- ✓ Transmission des données de l'examen médical
- ✓ Précision d'éventuelles notions de prise médicamenteuse ou de stupéfiants avant ou au décours des faits

Difficultés de la prise en charge analytique

- Demande d'analyse

↔ Risque :

- Stratégies analytiques erronées
- Réalisation d'analyses non pertinentes
- Conclusion erronée et/ou analyses non poursuivies

Difficultés de la prise en charge analytique

- Prélèvements

- **Mal conservés** (non congelés)

- dégradation *in vitro*

- **Non effectués en double**

- problème si contre-expertise

Difficultés de la prise en charge analytique

- Prélèvements

- Absents

Urine : problème si prélèvement tardif

Cheveux : pas de possibilité d'investigation si prélèvement sang-urine tardifs

- Quantité insuffisante ou non conformes

→ Intérêt de la réalisation des prélèvements (cheveux +++) par le biologiste

Soumission chimique :

Cas Cliniques

Cas n°1

- Jeune ♀ violée porte plainte 24 h après les faits
- Prélèvements réalisés : **sang et urine** transmis immédiatement au laboratoire (congelés jusqu'à l'analyse)
- Questionnaire : - conso. de raviolis (goût suspect)
→ endormissement
 - Traitement par Subutex[®] (buprénorphine)
 - Pas de conso. d'autres xénobiotiques entre les faits et les prélèvements

Cas n°1

- Analyses → **Urine**
 - buprénorphine et métabolite (norbuprénorphine)
 - **bromazepam** (Lexomil[®])
(administré à son insu)
 - THC-COOH
(conso. non signalée ?)

Cas n°2

- 3 jeunes ♂ (30 ans) abordés par 1 inconnu dans un bar
 - conso. d'un verre d'alcool → amnésie
 - reprise de conscience après qqs h → vols (CB, montre,...)
- Analyses
 - Sang et urine : **7-amino-flunitrazepam**
(métabolite actif du Rohypnol®)
 - Cheveux (analyse segmentaire) : présence de **7-amino-flunitrazepam** sur 1 période d'une semaine comprenant la date des faits

Cas n°3

- ♀ (28 ans) rencontre ♂ (41 ans) dans un club de sport
- Après conso. d'un cocktail,
 - Souvenirs confus, par bribes
 - Semble avoir eu 1 relation sexuelle non consentie à laquelle elle n'a pu s'opposer (état de faiblesse ++)
 - Porte plainte pour viol le lendemain

Cas n°3

- Analyses

- **Urine** : - immuno-analyse négative (hôpital)

- expertise : **zopiclone** (Imovane®) → 0,67 µg/ml

- **Sang** : absence de **zopiclone** (1/2 vie très courte)

- **Cheveux** : 13 pg/ng dans le segment correspondant à la période des faits

- (absence de zopiclone avant et après les faits)

Cas n°4

- Jeune ♀ violée consulte aux UMJ
 - 1/4 d'heure après conso. d'1 café
 - ➡ Frissons, malaise, vertiges, alternances hypo-
hyperthermie, vision de flashes colorés
 - Violences sexuelles, physiques (cheveux arrachés),
morales
 - Souvenirs partiels des faits (Etat de confusion -
Incapacité de résister à ces agresseurs)

Cas n°4

- Analyses

- Immuno-analyse négative dans les urines

- Expertise :

- Sang : **LSD** (0,45 ng/ml)

- Urine : **LSD** (0,12 ng/ml)

- Phanères : négatif

- Tasse : **LSD** - caféine - acide chlorogénique

Cas n°5

- Jeune ♀ noire (OPJ) se fait offrir 1 coupe de champagne par 1 collègue (22h)
 - qqs min. après → inconsciente
 - elle se réveille 2 h après, seule, nue, sans souvenir des faits (sauf conso. champagne)
- Urines prélevées 24 h après les faits
 - taux physiologique de **GHB** (0,24 µg/ml)

Cas n°5

- Analyse du reste de la bouteille
→ Négatif
- Présence de **GHB** dans les résidus restant de la coupe retrouvée cassée dans le vide-ordure
- **Cheveux** : ↗ significative du **GHB** dans le segment correspondant aux faits comparativement aux précédents

Cas n°6

- Jeune ♀ ayant rencontré 4 ♂ dans une soirée, consomme une boisson alcoolisée
 - sombre dans l'inconscience peu après
 - violée par un des ♂
 - se réveille le lendemain (endroit inconnu), sans aucun souvenir (sauf conso. alcool)

Cas n°6

- Pas de prélèvement sang - urine
- Prélèvement de cheveux après plusieurs semaines

⇒ Analyse des phanères pour recherche de
GHB

↔ 5,5 ng/pg dans segment correspondant
aux faits (1,8 ng/pg avant les faits)

Conclusion

Diagnostic toxicologique = difficile

⇒ repose sur 3 points

1- Prélèvements biologiques

- précoces
- en quantité suffisante
- de qualité (conservation, acheminement)

↪ Rôle du biologiste hospitalier primordial

Conclusion

2- Obligation de disposer et de mettre en œuvre des techniques et méthodes de dosage spécifiques et sensibles

3- Collaboration clinico-biologique

↔ Connaissance de l'anamnèse ++

Conclusion

- Imputabilité de la substance psycho-active identifiée forte
- **BZD et analogues (zolpidem-zopiclone)** les + fréquemment utilisées
 - ↔ Propriétés amnésiantes - sédatives - désinhibitrices
- Pratiquement toutes les BZD sont représentées (autres médicaments et SNM incriminés plus rares)

Conclusion

- **GHB** très marginal, mais problème de délai de détection +++
- **Association avec l'alcool** pas nécessaire à la
Soumission Chimique
- Rôle des **stupéfiants (Cannabis ++)** difficile à apprécier

Convergence x Laboratoire de Pharmaco-To

www.labo-expertox.ch-havre.fr

 Unité
Pharmaco-Toxicologie
Groupe Hospitalier du Havre

www.labo-expertox.ch-havre.fr

Pharmaco-Toxicologie Biologique Toxicologie médico-légale Publications scientifiques FAQ

Toxicologie Médico-légale

Les investigations analytiques en toxicologie judiciaire consistent à analyser des prélèvements biologiques (sang, urines, viscères, cheveux, ...) ou non biologiques (poudres, comprimés, plantes, ...) à la demande des magistrats et des forces de l'Ordre, ainsi que des médecins légistes.

Le laboratoire de pharmaco-toxicologie effectue principalement de la recherche, de l'identification et des dosages de médicaments et différents toxiques (stupéfiants, volatils, ...) pour le Groupe Hospitalier du Havre, mais aussi pour d'autres établissements