

Toxicologie analytique médico-légale en 2011

François MATHIAUX, Laurent IMBERT, Jean-Michel GAULIER¹

RÉSUMÉ

Ces dernières années, l'évolution de la toxicologie analytique médico-légale a concerné 4 domaines intimement et logiquement imbriqués. Notre discipline dispose aujourd'hui d'outils analytiques sensibles et spécifiques tels que les chromatographes couplés aux spectromètres de masse. Ces outils permettent d'aborder l'analyse de matrices biologiques non conventionnelles. Ainsi, des investigations toxicologiques rétrospectives sont aujourd'hui possibles en routine au travers de la recherche des psychotropes dans les cheveux. L'amélioration des performances des outils et l'application de ceux-ci à l'analyse de nouvelles matrices permettent également d'aborder de nouveaux marqueurs : l'éthylglucuronide, métabolite mineur de l'éthanol, en est un bon exemple. Enfin, l'interprétation des résultats, prenant en compte l'environnement pré et post-analytique repose sur des systèmes d'assurance qualité (accréditation) qui imposent, notamment, une traçabilité sans faille.

Mots-clés : Toxicologie analytique, spectrométrie de masse, matrices non conventionnelles, éthylglucuronide, accréditation.

1. Auteur correspondant : Jean-Michel Gaulier, Unité Fonctionnelle de Toxicologie Biologique et Médico-légale
Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance, CHU Dupuytren, 2 av Martin Luther King, 87000 LIMOGES (France).
Tél. : 33 (0)5 55 05 61 40
Fax : 33 (0)5 55 05 61 62
Email : jm-gaulier@unilim.fr

SUMMARY

FORENSIC TOXICOLOGY IN 2011

In recent years, progress in forensic toxicology has concerned four areas which are closely and logically inter-related. Sensitive and specific analytical tools, such as chromatography coupled with mass spectrometry, are currently available. These techniques have made toxicological investigations possible in unconventional biological matrix. For instance, the research of psychotropic drugs in hair enables retrospective toxicological examinations in a routine way. Both efficient analytical techniques and unconventional biological matrix exploitation have allowed for the use of new markers: i.e. ethylglucuronide, a minor metabolite of alcohol. Finally, quality systems (accreditation) are crucial for the interpretation of results, taking into account the pre and post analytic environment, and a perfect traceability.

Keywords: *Analytical toxicology, mass spectrometry, unconventional matrix, ethylglucuronide, accreditation.*

INTRODUCTION

La toxicologie analytique médico-légale a pour objectif essentiel la recherche et l'interprétation de la présence de xénobiotiques dans l'organisme, vivant ou mort, dans le cadre d'une procédure judiciaire. Si les termes des missions confiées aux experts toxicologues demeurent généralement les mêmes qu'auparavant, les possibilités de ce domaine d'expertise ont beaucoup évoluées ces dernières années.

Depuis une dizaine d'années, grâce à l'application des techniques séparatives avec des détections par spectrométrie de masse, la sensibilité, la spécificité et la rapidité des outils analytiques se sont nettement améliorées. De « nouvelles » matrices biologiques (également appelées matrices non conventionnelles), telles que les cheveux et les tissus *post-mortem* sont désor-

mais exploitables et de nouveaux marqueurs d'intérêt en toxicologie peuvent être abordés. En parallèle à ces progrès, la toxicologie analytique médico-légale a suivi, voire parfois précédé, les réformes de la biologie médicale en s'inscrivant dans une démarche d'accréditation.

L'objectif de cet article est d'évoquer de manière non exhaustive et à l'aide de quelques exemples concrets, ces évolutions récentes.

I. DES OUTILS PLUS PERFORMANTS

Aujourd'hui les méthodes analytiques de référence en toxicologie pour les recherches de xénobiotiques organiques (médicaments et/ou toxiques) reposent sur des techniques de chromatographie avec la spectro-

métrie de masse (simple ou « en tandem ») comme mode de détection. Ces méthodes présentent des avantages que n'offrent pas les autres techniques, que ce soit les méthodes immuno-enzymatiques, ou même d'autres techniques séparatives.

Parmi leurs atouts, le gain de spécificité est probablement le plus important car il permet d'éviter des erreurs d'identification hautement préjudiciables dans un contexte médico-légal. Ainsi, dans le cas suivant, la spectrométrie de masse a permis d'éviter la confusion entre le témozépam, substance active contenue dans le NORMISON, et l'hydroxyprazépam, métabolite d'une autre substance de la même famille, le prazépam, commercialisée sous le nom de LYSANXIA. Il concerne un enfant de 3 ans, amené par ses parents aux urgences pédiatriques pour des troubles de l'état de conscience provoquées, selon la mère, par une ingestion accidentelle de LYSANXIA et de NOCTAMIDE. Une fois la prise en charge médicale urgente effectuée, la possibilité d'une maltraitance par soumission chimique (hypothèse d'un « enfant chimiquement battu ») est soulevée par les pédiatres. Un prélèvement urinaire est alors adressé au laboratoire afin de confirmer l'intoxication aux LYSANXIA et NOCTAMIDE, et vérifier l'absence d'autres médicaments psychotropes. Une première recherche immédiate (destinée à la réalisation de diagnostic d'intoxication en urgence) est effectuée par technique immuno-enzymatique. Le résultat qualitatif positif ne peut que confirmer l'ingestion de benzodiazépines. Une confirmation est réalisée le lendemain par chromatographie en phase liquide avec une détection par spectrophotométrie à barrettes de diodes (CL-UV/BD). Elle montre la présence dans l'urine de trois benzodiazépines clairement identifiables : l'oxazépam, métabolite du prazépam (LYSANXIA), le lorémazépam (NOCTAMIDE), et le lorazépam métabolite du lorémazépam. Toutefois, une quatrième substance de type benzodiazépine est également décelée dans cet échantillon urinaire. Sur le plan purement analytique, celle-ci présente des caractéristiques d'identité (notamment, un indice de rétention de 0,92) proche de celles du témozépam (indice de rétention de 0,94). La possibilité de la présence dans l'urine de cet enfant de témozépam, principe actif d'un médicament hypnotique NORMISON, constitue à ce moment là, un argument fort en faveur d'une soumission chimique. C'est une nouvelle analyse, réalisée cette fois-ci par chromatographie en phase liquide avec détection par spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) qui permet finalement de lever cette hypothèse : elle confirme la présence d'oxazépam, lorémazépam, et

lorazépam, et identifie formellement la quatrième substance comme étant, en fait, de l'hydroxyprazépam, un métabolite mineur du prazépam. C'est donc la haute spécificité du mode de détection (spectrométrie de masse en tandem) de ce dernier outil analytique qui permet ici de conclure sans ambiguïté aux seules prises de LYSANXIA et NOCTAMIDE, en cohérence avec les déclarations des parents.

A coté de ce gain en spécificité, l'amélioration de la sensibilité des outils d'analyse constitue également un progrès. Les méthodes de CL-SM/SM permettent effectivement d'abaisser le seuil de détection de la plupart des xénobiotiques, y compris dans des matrices « complexes » sur un plan analytique, telles que du sang *post-mortem*. En toxicologie médico-légale, ce gain en sensibilité est particulièrement intéressant dans les cas d'intoxication par des substances à demi-vie d'élimination courte, et/ou dans les situations où les prélèvements biologiques sont effectués à distance des faits avérés ou supposés. Cette haute sensibilité est également précieuse lorsque la situation est compliquée par un faible volume d'échantillon biologique et un toxique actif à de très faibles concentrations sanguines, comme dans le cas suivant.

Il s'agit dans ce dossier d'un homme de 23 ans décédé, en pleine nuit, d'un accident de la voie publique alors qu'il « divaguait » sur la route et présentait, selon les témoins, un comportement « erratique ». Les termes de la mission consistent en une détermination de l'éthanolémie, et en la réalisation d'une recherche de stupéfiants et médicaments dans un échantillon sanguin *post-mortem*, d'un volume « limité » de 4 mL, selon les modalités définies dans ce cadre d'accident de la voie publique (Arrêté du 5 septembre 2001 fixant les modalités du dépistage des stupéfiants et des analyses et examens prévus par le Décret n° 2001-751 du 27 août 2001). Ces textes sont intéressants à préciser dans le contexte de ce manuscrit car le législateur y définit les méthodes d'analyses toxicologiques à utiliser *ad minima* : recherche spécifique des 4 grandes familles de produits stupéfiants (cannabis, amphétamines, cocaïne et opiacés) par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM), et recherche de médicaments psychoactifs (« screenings ») par CG-SM et CL-UV/BD. Ces analyses sont mises en oeuvre dans cet échantillon sanguin et s'avèrent négatives à l'exception d'une éthanolémie à 0,6 g/L. Il est alors réalisé un « screening » supplémentaire par CL-SM/SM dans le peu d'échantillon sanguin restant (moins de 1 mL) [1]. Il faut préciser ici que cette technique (CL-SM/SM) était encore relativement

« confidentielle » en 2001 et ne constituait pas encore le « gold standard » dans notre discipline : en conséquence, son utilisation n'était pas, alors, préconisée par le législateur. Le résultat de cette analyse consiste en la mise en évidence de LSD à une concentration sanguine de 2,5 µg/L, accompagné d'iso-LSD à la concentration de 0,4 µg/L et d'un métabolite du LSD (le 2-oxo-3-hydroxy LSD) à la concentration de 0,1 µg/L. Le LSD est probablement l'un des toxiques les plus difficile à mettre en évidence sur le plan analytique, compte tenu, essentiellement, de concentrations sanguines pharmacologiquement actives extrêmement faibles. De fait, il s'agit d'un xénobiotique échappant généralement aux méthodes de dépistage (« screenings ») par CG-SM et CL-UV/BD, et qui n'était abordable sur la plan analytique, il y a quelques années encore, qu'à l'aide de méthodes spécifiques de dosage, hautement spécialisées. Enfin, dans le cadre de ce dossier, la présence de cet hallucinogène dans le sang de la victime (i) signe une consommation de LSD au cours des quelques heures ayant précédé le décès, (ii) pouvant expliquer les troubles du comportement et de l'état de conscience rapportés par les témoins.

Ces outils analytiques, du fait d'une sensibilité et d'une spécificité accrues, permettent également d'obtenir des résultats à valeur médico-légale dans des délais relativement courts. Par conséquent, les toxicologues peuvent aujourd'hui s'adapter à certaines situations médico-légales urgentes, tout en maintenant la fiabilité des résultats de leurs expertises. Le cas suivant en apporte une illustration.

Il concerne une jeune fille de 14 ans qui déclare avoir été violée la veille au soir par son beau-père, et exprime une amnésie partielle des événements. Admise 16 heures (H16) après les faits à l'hôpital, et l'examen gynécologique réalisé confirmant le viol, des prélèvements biologiques (sang, urine et cheveux) à visée toxicologique sont réalisés. Ces échantillons, accompagnés d'une mission d'expertise sollicitant une recherche de substance de soumission chimique (c'est-à-dire d'un psychotrope ayant pu être administré à son insu afin de faciliter l'agression), sont réceptionnés dans le laboratoire à H36, en même temps que commence la garde à vue du beau-père. Les analyses sont alors réalisées par CG-SM et CL-SM/SM et les résultats communiqués à J4, avant que ne prenne fin la garde à vue de 72 heures. Il est retrouvé du bromazépam (LEXOMIL) dans le sang et l'urine de la jeune victime, avec une concentration sanguine cohérente avec l'hypothèse de l'administration d'un comprimé de LEXOMIL au moment des faits. A la suite de ce résultat, il est effec-

tué une recherche de psychotropes (incluant le bromazépam) dans les cheveux de la jeune fille. Cette recherche qui s'avère négative permet (i) d'exclure l'hypothèse de prises antérieures de bromazépam par la jeune victime, (ii) et d'estimer comme très probable la survenue de troubles de l'état de conscience chez cette jeune « naïve » vis-à-vis de la prise de psychotropes. Ce résultat contribuent finalement aux aveux complets du beau-père ; aveux incluant l'administration d'un comprimé de LEXOMIL à sa belle fille, par le biais du dessert qu'il lui avait servi dans la soirée.

Aujourd'hui, les toxicologues analystes disposent donc d'outils analytiques qui sont particulièrement performants. Toutefois, malgré ces progrès, ces techniques analytiques ne sont pas encore « universelles » au double sens qu'il est encore impossible avec un seul outil analytique de réaliser une recherche réellement exhaustive de l'ensemble des xénobiotiques [2] et que cette haute technicité s'accompagne également d'une complexité pouvant être à l'origine, parfois, d'erreurs d'interprétation [3].

II. DES MATRICES BIOLOGIQUES NON CONVENTIONNELLES

L'augmentation des performances analytiques rendent possible la recherche de xénobiotiques dans échantillon biologiques non conventionnels : organes, tissus osseux, phanères...

Ainsi, il est ainsi désormais possible d'envisager des mesures de la teneur en monoxyde de carbone (CO) dans des tissus et organes comme le foie et les poumons. Cette approche est nécessaire dans les cas de cadavres carbonisés où il n'est pas possible de prélever du sang pour en mesurer le taux de carboxyhémoglobine. Or, ce paramètre est important pour déterminer si le sujet est mort d'une asphyxie liée à l'incendie, ou déjà décédé avant le déclenchement de ce dernier. Malheureusement, les appareils permettant habituellement une mesure de carboxyhémoglobine (co-oxymètres) utilisent une technique d'électrochimie qui n'est applicable qu'aux échantillons liquides, tel que le sang. La chromatographie gazeuse couplée à la détection par spectrométrie de masse avec un système d'injection de type « head-space (HS-CG-MS) permet de réaliser un dosage direct de monoxyde de carbone dans les tissus *post-mortem* et d'envisager, ou non, l'existence d'une anoxie par intoxication au CO [4].

Dans les cas de cadavre en état de décomposition très avancé dans lesquelles les milieux biologiques conventionnels ne sont plus disponibles, le tissu musculaire devient une matrice dans lequel il est aujourd’hui possible de réaliser des investigations toxicologiques. Richement irrigué par le sang, des xénobiotiques et/ou des métabolites de xénobiotiques peuvent y être décelés, en particulier certaines benzodiazépines et les opiacés [5]. Par contre, l’interprétation des résultats est soumise à des limitations. Ainsi, ce tissu semble exposé à des phénomènes de redistribution *post-mortem*, c’est-à-dire, à des variations des concentrations des xénobiotiques présents au cours de la période *post-mortem* [6]. Par ailleurs, les concentrations des xénobiotiques qui peuvent y être mesurées semblent varier de manière importante selon le type de muscle analysé [7]. Enfin, il s’agit d’un tissu très riche en cellules et qui, par conséquent, va fortement subir les effets délétères de la putréfaction. C’est la raison pour laquelle les substances éventuellement présentes vont être exposées à un risque important de dégradation au cours de la période *post-mortem* [8].

L’analyse toxicologique des os peut éventuellement être envisagée dans le cadre de découverte de squelettes. Les os sont irrigués par le sang, en particulier via la moelle osseuse qui est un tissu richement vascularisé. Par conséquent, des xénobiotiques (et leurs métabolites) peuvent être incorporés dans ce tissu, et y être décelés en période *post-mortem*. Plusieurs références bibliographiques concernent la mise en évidence dans les os d’antidépresseurs, de benzodiazépines, de certains neuroleptiques, de cocaïne, de morphine, d’amphétamines... [9]. Des dosages de certains médicaments antibiotiques ou antifongiques, peuvent également être effectués dans cette matrice, dans le cadre d’applications médicales. L’analyse toxicologique des os reste malheureusement sujet à caution dans la mesure où tous les toxiques ne s’y incorporent pas et la liste exhaustive des substances susceptibles de s’y incorporer n’est pas connue. Par ailleurs, il n’est pas impossible que des toxiques éventuellement présents dans l’os, puissent subir une dégradation partielle ou totale au cours d’une longue période *post-mortem* précédant le recueil de cette matrice. A ces limitations, s’ajoute la difficulté d’analyser une telle matrice. Les méthodes d’analyse doivent effectivement intégrer, compte tenu de la matrice concernée, une étape d’extraction adaptée. La plupart des quelques méthodes décrites dans la littérature reposent sur la réalisation d’une extraction méthanolique à partir de fins frag-

ments d’os [10]. Pour notre part, nous avons l’expérience d’une extraction reposant sur une étape de lyophilisation [11].

La recherche de xénobiotiques peut également être envisagée dans les insectes et les larves d’insectes qui ont colonisé le cadavre. Le principe, connu depuis long-temps, est que des médicaments ou des drogues, présents initialement dans le corps de la victime, sont ingérés par les insectes et les larves des insectes qui se développent sur l’organisme en putréfaction [12]. En particulier, il semble possible de retrouver dans ces insectes et ces larves des traces d’opiacés, de cocaïne et d’amphétamines. Il va de soi qu’aux difficultés précédemment évoquées, s’ajoute ici le fait que ces insectes ont pu eux-mêmes métaboliser et éliminer les xénobiotiques dans leurs déjections, ces xénobiotiques n’étant alors plus détectables par l’analyse des insectes.

Enfin et surtout, les analyses capillaires font aujourd’hui partie de la routine des laboratoires de toxicologie car même si les cheveux ne constituent pas le « milieu biologique idéal », ils présentent plusieurs avantages. La vitesse de pousse des cheveux est relativement régulière, d’environ 1 cm par mois (0,9 à 1,2 cm par mois). Dans ces conditions (i) l’analyse réalisée dans une mèche de cheveux de x cm permet théoriquement de déceler un certain nombre de xénobiotiques (médicaments et/ou toxiques) qui auraient pu s’y incorporer au cours des x mois précédant le prélèvement de ces phanères, (ii) et il est possible de réaliser une analyse dite segmentaire (par exemple, cm par cm) afin d’obtenir un profil chronologique d’administration (par exemple, mois par mois) : les prises les plus récentes correspondent aux segments capillaires les plus proches de la racine, les prises les plus anciennes correspondent aux segments capillaires situés vers la pointe. Il s’agit d’une matrice qui résiste habituellement à la putréfaction et dans laquelle les xénobiotiques sont « relativement » stables. Les substances lipophiles sont celles qui s’incorporent le mieux dans les cheveux (cannabis, cocaïne, opiacés, médicaments psychotropes en règle générale...). Cette recherche des psychotropes dans les cheveux est aujourd’hui réalisée par de nombreuses équipes, à l’aide de méthodes analytiques éprouvées [13]. Enfin, l’interprétation des résultats peut s’appuyer sur une bibliographie encore limitée, mais existante [14]. Diverses situations médico-légales sont concernés par cette avancée : vérification d’une abstinence aux stupéfiants (dans les cas des restitutions de permis de conduire à la suite d’une condamnation initiale pour conduite sous influence de produits stupéfiants, par exemple), documentation d’une toxi-

comanie, recherche d'une soumission chimique à distance, recherche d'une intoxication unique mais ancienne, ...

Ainsi par exemple, le cas d'un jeune homme auteur d'un homicide et interpellé 6 mois après les faits, qui déclare au Juge d'Instruction avoir été héroïnomane, et en état de manque au moment des faits ; situation qui aurait alors favorisé le passage à l'acte. Un prélèvement capillaire est réalisé pour vérifier l'existence de cette consommation d'héroïne 6 mois auparavant. Cette mèche de cheveux de 7 cm de longueur est segmentée de la manière suivante : du cuir chevelu à 2 cm, de 2 cm à 4 cm, et de 4 cm à la pointe. Les analyses réalisées montrent la présence de morphine, méthylmorphine et de 6-monoacétylmorphine dans ce dernier segment, correspondant approximativement à une période située entre 4 et 7 mois avant le moment de la réalisation du prélèvement capillaire. Cette présence des marqueurs d'une consommation d'héroïne est donc cohérente avec la consommation alléguée du mis en examen.

Concernant la recherche de médicaments psychotropes dans les cheveux, cette analyse trouve aujourd'hui toute sa place dans la documentation des cas de soumission chimique : ainsi ce dossier concerne une enfant de 2 ans ½, admise aux urgences pédiatriques pour un coma isolé de survenue brutale. Une recherche de toxiques et de médicaments effectuée dans les urines montre initialement la présence de nordazépam, oxa-zépam et zolpidem. Dans ce dossier d'« enfant chimiquement battu », une expertise toxicologique complémentaire est demandée afin de déterminer s'il s'agit d'une maltraitance chronique, et dans l'affirmative, depuis combien de temps elle existe. Les analyses réalisées à partir d'une mèche de cheveux (d'une longueur totale de 15 cm), révèlent la présence des 3 psychotropes dans l'ensemble des segments capillaires, confirmant la chronicité des faits qui ont commencé, au moins, 15 mois auparavant.

III. DE NOUVEAUX MARQUEURS : L'ÉTHYLGUCURONIDE

La recherche et le développement de l'utilisation de marqueurs permettant de détecter l'exposition à un toxique (ou d'augmenter la fenêtre de détection de cette exposition) constituent un objectif des toxicologues analystes. Dans ce domaine, et en raison des progrès des outils analytiques, l'évolution la plus notable de ces

dernières années est l'utilisation des dosages urinaires et capillaires d'éthylglucuronide (EtG). L'alcool éthylique, largement métabolisé (90 à 95 %) par réactions d'oxydation, est également, mais de façon minoritaire (0,02 à 1,5 % de son élimination totale) transformé en EtG par conjugaison avec l'acide glucuronique activé, majoritairement par les UGT 1A9 et 2B7 [15]. L'EtG est détectable dans de nombreux fluides et tissus humains, en particulier dans l'urine et les cheveux, y compris lorsque l'éthanol n'est plus détectable dans ces milieux biologiques [16].

L'EtG apparaît dans l'urine 1 heure après la consommation de boissons alcoolisées et peut y être détecté au moins 48 heures, alors que l'éthanol n'est présent dans ce milieu que pendant quelques heures (de l'ordre de 6 heures). La présence de l'EtG dans l'urine est donc un indicateur d'absorption de boissons alcoolisées pendant les 48 heures qui suivent la prise. Toutefois, de faibles quantités d'EtG sont naturellement présentes dans l'organisme, même en l'absence de consommation d'éthanol. Effectivement, si l'organisme produit très peu d'éthanol par son métabolisme, il peut être exposé à de faibles doses d'éthanol par des sources autres que la consommation de boissons alcoolisées : les aliments, l'utilisation quotidienne de solutions d'hygiène buccale, spray buccaux, etc. Dans ces conditions, les concentrations urinaires d'EtG peuvent parfois atteindre quelques centaines de µg par litre d'urine en l'absence de consommation réelle de boissons alcoolisées [17]. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire de définir une concentration seuil (« cut-off ») d'EtG dans l'urine au-delà de laquelle il est possible d'affirmer une consommation de boissons alcoolisées au cours des 2 derniers jours. Les données d'interprétation actuellement admises dans le domaine médico-légal [18] et utilisées en routine dans notre Service, sont les suivantes :

- ✓ une concentration inférieure à 0,1 mg/L d'urines est en faveur d'une abstinence de consommation de boissons alcoolisées au cours des 2 derniers jours ;
- ✓ une concentration située entre 0,1 et 1 mg/L est difficilement interprétable car elle peut refléter une alcoolisation plusieurs jours avant le prélèvement urinaire et/ou un faible apport exogène d'éthanol, non pas par le biais de boissons alcoolisées, mais par des aliments ou l'utilisation de produits d'hygiène buccale ;
- ✓ une concentration supérieure à 1,0 mg/L d'urines (seuil de positivité) est en faveur d'une consom-

mation de boissons alcoolisées au cours des 2 derniers jours.

De manière simple et avec ces données d'interprétation, l'intérêt du dosage urinaire de l'EtG tel qu'il se présente aujourd'hui, couvre 2 domaines : (i) la mise en évidence d'une consommation de boissons alcoolisées à distance du prélèvement biologique, dans certaines situations médico-légales [16-19] comme par exemple, dans les cas de suspicion de soumission chimique (agression sexuelle) lorsque les prélèvements biologiques sont tardifs pour objectiver une consommation de boissons alcoolisées au moment des faits avérés ou supposés ; dans des cas de « délit de fuite » (après une agression, par exemple)... ; (ii) la différenciation d'une production d'éthanol liée aux phénomènes de putréfaction *post-mortem*, d'une véritable alcoolisation *antemortem* [19]. Il est effectivement et généralement difficile d'assurer que l'éthanolémie observée dans un échantillon de sang *post-mortem* est uniquement imputable à l'ingestion de boissons alcoolisées. En effet, il peut exister dans un cadavre en voie de putréfaction, une production *post-mortem* d'éthanol, telle qu'il est possible de trouver des concentrations supérieures à 1 g/L de sang en l'absence d'une consommation *antemortem* de boissons alcoolisées. Dans ces conditions, l'EtG n'est pas présent dans les urines. En revanche, la présence d'ETG dans l'urine *post-mortem* à une concentration supérieure à 1 mg/L permet de se prononcer sans ambiguïté en faveur d'une consommation de boissons alcoolisées au cours des 48 heures qui ont précédé le décès.

L'EtG s'incorpore dans les cheveux et la concentration capillaire constitue un marqueur direct sensible et spécifique de la consommation de doses élevées et répétées de boissons alcoolisées : il s'agit probablement du marqueur de l'alcoolisme chronique le plus efficient ; utilisable de surcroît chez le vivant comme en *post-mortem* [20]. Des études montrent effectivement qu'il s'agit d'un marqueur d'une efficacité probablement supérieure aux marqueurs habituellement utilisés [21]. Ainsi, une étude indique que l'EtG présente une sensibilité supérieure à celle de la concentration plasmatique de transferrine déficiente en carbohydrate [22]. Il s'agit toutefois d'un marqueur récemment décrit et les données d'interprétation des concentrations capillaires demeuraient, il y a encore peu de temps, discutées. Néanmoins, compte tenu du fait que ce marqueur est de plus en plus utilisé, validé et reconnu par la communauté scientifique [14], l'interprétation des concentrations capillaires fait aujourd'hui l'objet d'un consensus [23] :

- ✓ une concentration capillaire d'EtG inférieure à 7 pg/mg de cheveux pourrait être en faveur d'une abstinence ;
- ✓ une concentration capillaire d'EtG située entre 7 et 30 pg/mg correspond probablement à une consommation occasionnelle et modérée de boissons alcoolisées ;
- ✓ une concentration capillaire d'EtG supérieure à 30 pg/mg traduit un alcoolisme chronique, c'est-à-dire une consommation de plus de 60 grammes d'alcool par jour, depuis plusieurs semaines (définition de l'OMS).

Les possibilités d'applications de ce marqueur, en particulier dans un contexte *post-mortem*, peuvent être illustrées par le cas suivant. Un homme de 58 ans est mis en examen pour l'homicide volontaire de son épouse. Face au Juge d'Instruction, celui-ci déclare que sa femme consommait régulièrement et excessivement des boissons alcoolisées, et que cette intemperance et ses conséquences sur l'humeur de celle-ci, constituaient une des causes de son passage à l'acte. Par conséquent, une recherche *post-mortem* de marqueurs biologiques d'éthylisme chez la victime est envisagée, l'autopsie ayant déjà révélé des signes cohérents avec une intoxication alcoolique chronique (cirrhose hépatique, splénomégalie, ascite et varices œsophagiennes). La mission d'expertise consiste alors au dosage des concentrations d'EtG dans un prélèvement capillaire d'une longueur de 17 cm, réalisé lors de l'autopsie. Après segmentation et extraction, l'analyse par CL-SM/SM des différents segments de 3 cm, répartis tout au long de la mèche de cheveux, révèle des concentrations élevées, situées entre 176 et 206 pg/mg, en faveur des allégations du mari.

IV. UNE DÉMARCHE D'ACCRÉDITATION

Quelques laboratoires oeuvrant en toxicologie médico-légale ont engagé volontairement une démarche d'accréditation selon la norme ISO 17025, il y a plusieurs années déjà [24]. Dans le domaine de la toxicologie médico-légale, il faut noter que cette volonté d'accréditation s'est manifestée bien avant que l'accréditation devienne un objectif obligatoire à l'horizon 2018 pour l'ensemble des laboratoires de biologie [25]. L'accréditation est une procédure par laquelle une autorité indépendante (en France, c'est le COFRAC, Comité Français d'Accréditation) reconnaît qu'un organisme est compétent dans l'exécution de certaines

tâches au regard de référentiels. Cette compétence s'exprime aussi bien en terme organisationnel, qu'en terme de compétences techniques. L'accréditation a donc pour objectif, après l'évaluation, d'attester que des laboratoires et des organismes sont techniquement capables, respectivement, de réaliser des essais, des analyses ou des étalonnages et de procéder à des actions d'inspection ou de certification dans les secteurs dans lesquels ils se déclarent compétents. En pratique, cette accréditation repose sur quatre points :

- ✓ l'évaluation : l'évaluation du laboratoire par le COFRAC porte sur son savoir faire, qui inclut l'organisation de son système qualité ;
- ✓ la validation : la validation est importante car un laboratoire ne peut être accrédité que pour des méthodes d'analyse dûment validées. Ces méthodes peuvent être des méthodes de référence, des méthodes internes, ou des méthodes dérivées de méthodes de référence ;
- ✓ l'harmonisation : l'accréditation permet d'harmoniser les pratiques des laboratoires en proposant des règles communes à tous les critères d'accréditation. Le fait que le processus de décision d'accréditation soit identique pour tous va également dans le sens de l'harmonisation ;
- ✓ le domaine d'accréditation : un laboratoire doit être accrédité pour des méthodes précises et validées, même s'il peut être accrédité sur l'ensemble de son activité. Le domaine d'accréditation représente le champ pour lequel le laboratoire est déclaré compétent.

Sous cet éclairage et au-delà des considérations purement techniques, la toxicologie médico-légale présente certaines spécificités. En premier lieu, l'étape pré-analytique est de gestion particulièrement complexe. En effet, les contacts avec les différents intervenants (OPJ, Magistrats, Médecins légistes) doivent faire l'objet d'une traçabilité écrite rigoureuse. Dans la mesure du possible, ces échanges doivent reposer sur des procédures permettant un suivi des nombreuses informations échangées. Dans le domaine de la toxicologie médico-légale, le dialogue entre le requérant et le toxicologue est effectivement, souvent indispensable avant de définir la meilleure stratégie analytique en fonction des termes de la mission : les analyses à conduire vont dépendre de cet objectif, mais également de la nature et la quantité des échantillons biologiques disponibles et de l'anamnèse. De même, la nécessaire description rigoureuse des scellés (i.e. photographies avant et après bris des scellés) doit

être complétée par des données sur les conditions de réalisation des prélèvements, et d'acheminement. Par rapport à la toxicologie biologique classique, la phase analytique se caractérise par la variété des matrices biologiques analysées. Par conséquent, en terme d'accréditation, les méthodes analytiques doivent toutes faire l'objet de procédures validées dans ces différents milieux. De plus, la démarche analytique en toxicologie médico-légale suppose une re-évaluation constante des analyses à réaliser en fonction des résultats obtenus : ainsi, des résultats urinaires positifs vont donner lieu à des recherche plus spécifiques dans le sang. L'étape post-analytique concrétisée par la constitution du rapport d'expertise, et son dépôt, bénéficie alors de la démarche d'accréditation : traçabilité du processus pré-analytique et analytique permettant, lors de l'interprétation des résultats et des conclusions, une prise en compte exhaustive de l'ensemble des éléments (i.e. descriptifs des scellés, commémoratifs, résultats incluant les limitations analytiques...) combinée aux données bibliographiques.

CONCLUSION

En 2011, la toxicologie médico-légale dispose de techniques qui lui permettent de travailler à partir de liquides biologiques, tissus, cheveux, de rechercher avec une bonne sensibilité et spécificité un large éventail de xénobiotiques et de répondre rapidement aux questions pour lesquelles elle est missionnée. Au-delà de l'amélioration continue de la sensibilité et de la spécificité des analyses, et de la recherche de nouveaux marqueurs, l'avenir de cette discipline semble s'orienter vers le développement de la toxicogénétique afin de prendre en compte dans l'interprétation des résultats les polymorphismes génétiques des voies métaboliques, des transporteurs et des récepteurs. ■

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SAUVAGE FL, SAINT-MARCOUX F, DURETZ B, DEPORTE D, LACHATRE G, MARQUET P. – Screening of drugs and toxic compounds with liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Clin Chem*, 2006; 52 (9): 1735-1742.
- [2] SAUVAGE FL, PICARD N, SAINT-MARCOUX F, GAULIER JM, LACHATRE G, MARQUET P. – General unknown screening procedure for the characterization of human drug metabolites in forensic toxicology: Applications and constraints. *J Sep Sci*, 2009; 32 (18): 3074-3083.

- [3] SAUVAGE FL, GAULIER JM, MARQUET P, LACHATRE G. – Pitfalls of liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry in the selected reaction monitoring mode for drug analysis, and prevention strategy. *Clin Chem*, 2008; 54 (9): 1519-1527.
- [4] VARLET V, LAGROY DE CROUTTE E, AUGSBURGER M, MARGIN P. – Accuracy profile validation of a new method for carbon monoxide measurement in the human blood using headspace-gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012; 880 (1): 125-131.
- [5] GARRIOTT JC. – Skeletal muscle as an alternative for alcohol and drug analysis. *J Forensic Sci*, 1991; 36 (1): 60-69.
- [6] PÉLISSIER-ALICOT AL, GAULIER JM, CHAMPSAUR P, MARQUET P. – Mechanisms Underlying Postmortem Redistribution of Drugs: A Review. *J Anal Tox*, 2003; 27 (8): 533-544.
- [7] WILLIAMS KR, POUNDER DJ. – Site-to-site variability of drug concentrations in skeletal muscle. *Am J Forensic Med Pathol*, 1997; 18 (3):246-259.
- [8] DRUMMER OH. – Postmortem toxicology of drugs of abuse. *Forensic Sci Int*, 2004; 142 (2-3): 101-113.
- [9] DRUMMER OH – Drugs in bone and bone marrow. In : *drug testing in alternate biological specimens*. Humana Press, Totowa, NJ, USA 2008: 131-138.
- [10] WINEK CL, WESTWOOD SE, WAHBA WW. – Plasma versus bone marrow desipramine : a comparative study. *Forensic Sci Int*, 1990; 48 (1): 49-57.
- [11] DENES E, BOUMEDIENE A, DUROX H, OKSMAN A, SAINT-MARCOUX F, DARDE ML, GAULIER JM. – Voriconazole concentrations in joint liquid and bone tissues. *J Antimicrob Chemother*, 2007; 59 (4): 818-819.
- [12] BEYER JC, ENOS WF, STAJIC M. – Drug identification through analysis of maggots. *J Forensic Sci*, 1980; 25 (2): 411-412.
- [13] MUSSHOFF F, MADEA B. – New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes. *Forensic Sci Int*, 2007; 165 (2-3): 204-215.
- [14] PRAGST F, BALIKOVA MA. – State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta*, 2006;370 (1-2): 17-49.
- [15] ALSAABI A, ALLORGE D, SAUVAGE FL, TOURNEL G, GAULIER JM, PICARD N. – Identification of the human hepatic UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) involved in the metabolism of ethanol. 49th International Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists, San Francisco, USA, septembre 2011.
- [16] WURST FM, SKIPPER GE, WEINMANN W. – Ethyl glucuronide – the direct ethanol metabolite on the threshold from science to routine use. *Addiction*, 2003; 98 (S2): 51-61.
- [17] BUTTON J, MATHERS C, ELMS R, DHILLON J, HOLT DW. – False positive ethyl glucuronide resulting from incidental alcohol exposure. 46th International Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists, Schoelcher, Martinique, France, Juin 2008.
- [18] CRUZ A, MON M, DE CASTRO A, CONCHEIRO M, QUINTELA O, LOPEZ-RIVADULLA M. – Ethylglucuronide as a biomarker of ethanol intake: application to clinical and forensic cases. 46th International Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists, Schoelcher, Martinique, France, Juin 2008.
- [19] BUTTON J, MATHERS C, LEE R, DHILLON J, HOLT DW. – Measurement of ethyl glucuronide by microgenics DRI® enzyme immunoassay. 46th International Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists, Schoelcher, Martinique, France, Juin 2008.
- [20] LAMOUREUX F, GAULIER JM, SAUVAGE FL, MERCEROLLE M, VALLEJO C, LACHÂTRE G. – Determination of ethyl-glucuronide in hair for heavy drinking detection using liquid-chromatography-tandem mass spectrometry following solid phase extraction. *Anal Bioanal Chem*, 2009; 394 (7): 1895-901.
- [21] HØISETH G, MORINI L, POLETTINI A, CHRISTOPHERSEN A, MØRLAND J. – Ethyl glucuronide in hair compared with traditional alcohol biomarkers – a pilot study of heavy drinkers referred to an alcohol detoxification unit. *Alcohol Clin Exp Res*, 2009; 33 (5): 812-816.
- [22] MORINI L, POLITI L, ACITO S, GROPPA A, POLETTINI A. – Comparison of ethyl glucuronide in hair with carbohydrate-deficient transferrin in serum as markers of chronic high levels of alcohol consumption. *Forensic Sci Int*, 2009; 188 (1-3): 140-143.
- [23] Consensus of the SoHT – Annual meeting of the Society of Hair Testing, Rome, Italia, October 2009; Annual meeting of the Society of Hair Testing, Chamonix, France, Mars 2011; Experts meeting of the Society of Hair Testing about the Use of Alcohol Markers in Hair for Abstinence Assessment, Rome, Italia, October 2011.
- [24] NF EN ISO/CEI 17025. – Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. AFNOR, 2005, (www.afnor.fr).
- [25] NF EN ISO 15189. – Laboratoires d'analyses médicales – Exigences particulières concernant la qualité et la compétence » AFNOR (www.afnor.fr).