

Echo du laboratoire

Véronique Viète, biochimiste FAMH,
Directrice ADMED Laboratoires -
Neuchâtel

Suivi thérapeutique et détection des conduites addictives: les technologies de séparation les plus modernes au service du laboratoire d'analyses médicales.

Plus de 34'000! C'est le nombre de consultations enregistrées par le Centre Suisse d'Information Toxicologique (CSIT) en 2009. Le nombre de cas d'intoxications est en progression. La facilité d'accès à des produits illicites et dangereux constitue probablement un facteur de croissance du nombre de cas.

La recherche d'un indicateur biologique témoin d'un usage abusif (alcoolisme chronique) ou le suivi thérapeutique (immuno-suppresseurs, neuroleptiques, anti-épileptiques, antibiotiques) deviennent également des outils de monitoring pour le médecin praticien.

Les laboratoires d'analyses médicales font désormais appel aux technologies de séparations modernes pour parvenir à l'identification et au dosage de plus en plus de molécules connues ou inconnues (et de leurs métabolites).

D'excellents résultats sont obtenus par l'électrophorèse capillaire et les chromatographies en phase gazeuse (GC) ou liquides à haute performance (UPLC, HPLC), couplées à des détecteurs à haute sensibilité et spécificité tels que MS ou MS-MS (spectrométrie de masse).

Moins spécifiques et sujets à de nombreuses réactions croisées, les immunodosages automatisés, permettent d'effectuer des recherches par gammes de stupéfiants correspondant à des familles chimiques moléculaires; amphétamines et ses dérivés, opiacés, cannabinoïdes, cocaïne, méthadone. Les molécules de référence servant à établir la calibration et le seuil de positivité de ces méthodes sont des molécules «mères» comme la d-amphétamine, la morphine, la méthadone ou des métabolites comme la benzoyl-



Système LC-MS/MS THERMO.

lecgonine (métabolite majeur de la cocaïne) ou le δ -9-THC-COOH (métabolite majeur du tétrahydrocannabinol). Cependant, tout résultat positif obtenu par une méthode immunologique devrait être confirmé par une méthode spécifique (GC-MS, LC-MS).

Les méthodes chromatographiques de confirmation et d'identification: LC-UV, GC-UV, GC-MS, LC-MS, LC-MS/MS

Ces méthodes de dosage et d'identification mettent en œuvre deux technologies, couplées en tandem:

1. une séparation chromatographique en phase gazeuse ou liquide à haute pression (300-500 bar). Les molécules contenues dans le matériel injecté sont séparées par une colonne en fonction de propriétés physico-chimiques;
2. le flux est ensuite injecté dans un détecteur:
 - de type UV: l'absorbance d'un faisceau UV traversant le flux est mesurée et produit un spectre;
 - ou de type MS ou MS-MS: le flux est injecté dans un spectromètre de masse à un ou plusieurs étages qui fragmente les molécules par ionisation et

produit des spectres des molécules et des fragments de molécules. La composition de la fragmentation est spécifique à chaque molécule alors que la surface du pic est proportionnelle à sa concentration.

Dans les deux types de détections, un logiciel compare les données produites en temps réel avec des bibliothèques de molécules connues et fournit un score de probabilité d'identification.

Détection des conduites addictives: cas de l'alcoolisation

L'alcoolisme chronique a des conséquences somatiques et métaboliques excessivement graves au bout d'un certain nombre d'années: pancréatite, hépatite alcoolique, cirrhose, cancers du tube digestif, troubles psychiques avec anxiété, insomnies, dépression, troubles de la mémoire, troubles mentaux, maladies cardio-vasculaires, etc.

Plusieurs marqueurs sont à disposition pour détecter les conduites d'alcoolisation: γ GT, ALAT, ASAT, VGM, mais préférentiellement la CDT (Carbohydre Deficient Transferrin).

La consommation quotidienne de 50 à 80 g d'alcool pur modifie la répartition des formes moléculaires de la transferrine avec pour consé-

quence une augmentation des formes a-, mono- et disialylées, (regroupée sous l'appellation « CDT »).

La CDT est aujourd'hui le paramètre de choix pour la détection et le suivi de l'alcoolisation en raison de son importante spécificité (> 90 %).

La méthode d'électrophorèse capillaire utilisée pour doser la CDT a l'avantage sur les méthodes immunoturbidimétriques de visualiser sur le tracé électrophorétique la présence des isoformes carboxy-déficiennes et la présence de variants génétique.

Quel milieu biologique ?

L'urine est la matrice biologique la plus utilisée pour la mise en évidence d'une consommation régulière ou occasionnelle d'une substance classée dans les stupéfiants ou dans les psychotropes. Cette matrice offre une fenêtre de détection plus grande que celle du sang. Le sang (ou le sérum) est utile pour corréliser un état clinique ou un comportement relevant d'une conduite addictive au moment du prélèvement ou dans les quelques heures qui le précède en raison de la disparition rapide des substances par métabolisation.

Particularités du recueil urinaire

Quelques mesures existent pour éviter les fraudes. Mesure de la créatinine, un résultat < 3000 $\mu\text{mol/l}$ correspond à des urines trop diluées (par apport excessif de boisson liquide dans l'heure précédant la miction urinaire). Un résultat de pH en dehors de la zone 5.0 à 8.0 peut résulter de l'ajout d'une substance exogène après la miction dans le but de fausser et/ou perturber le dépistage des substances illicites.

Quelques molécules...

Cannabis

Les tests de dépistage mettent en évidence le métabolite principal du cannabis soit le THC-COOH. Le seuil de positivité proposé (50 $\mu\text{g/l}$) permet d'ignorer une inhalation passive. En fonction de la concentration en THC dans le produit consommé, de la fréquence de la consommation, de la quantité de tissu adipeux, le relargage du THC et la persistance de l'élimination des métabolites dans les urines peut



Système LC-UV /LC-EC WATERS Acquity (UPLC avec détecteur UV).

atteindre de une à plusieurs semaines.

Opiacés

Les opiacés naturels ou semi-synthétiques (morphine, héroïne, codéine, codéthyline et pholcodine) peuvent être dépistés sur un échantillon urinaire trois à quatre jours suivant la prise thérapeutique ou la consommation illicite. Un seuil à 300 $\mu\text{g/l}$ est proposé. Un résultat positif doit être complété par une identification par méthode chromatographique afin d'identifier les produits en cause. Les méthodes de dépistage ne détectent pas les dérivés synthétiques (dextrometorphane, péthidine, fentanyl, nalbuphine) ni les traitements substitutifs (méthadone et buprénorphine).

Cocaïne

La cocaïne est essentiellement métabolisée en benzoylecgonine et ecgonine-méthylester qui sont éliminées dans les urines. Des traces de benzoylecgonine peuvent être

retrouvées dans les urines pendant deux à quatre jours après une prise de cocaïne. Les réactifs immunochimiques détectent la benzoylecgonine. Le seuil de positivité utilisé est de 300 $\mu\text{g/l}$.

Amphétamines et dérivés

Les molécules apparentées à la D-amphétamine et à la méthamphétamine sont plus ou moins reconnues. La MDMA ou « ecstasy » est détectée par la plupart des réactifs; cependant les analogues anorexigènes (éphédrine, pseudo-éphédrine) ne sont pas détectés, ni la cathinone ou la méthcathinone. La durée approximative de détection de l'amphétamine et de ses dérivés dans les urines est de deux à quatre jours, mais peut varier en fonction des particularités métaboliques individuelles, de la diurèse, de la fréquence de l'administration et des doses utilisées ou de la nature du produit utilisé.