

Centre Universitaire Romand  
de Médecine Légale

# Application de la spectrométrie de masse en toxicologie médico-légale

Marc Augsburger



# Définition de la toxicologie médico-légale ou forensique

**La toxicologie forensique est une activité scientifique qui s'occupe de :**

- la recherche de substances ayant pu jouer un rôle dans la cause de la mort**
- la recherche de substances ayant pu jouer un rôle lors d'une intoxication non létale**
- la recherche de substances ayant pu modifier le comportement d'un individu**



**Mathieu-Joseph-Bonaventure Orfila**  
(1787 – 1853)

« *Traité des poisons tirés des règnes minéral, végétal et animal ou toxicologie générale* »,  
publié en 1813

« *Secours à donner aux personnes empoisonnées ou asphyxiées, suivis des moyens propres à reconnaître les poisons et les vins frelatés et à distinguer la mort réelle de la mort apparente* »,  
publié en 1818

« *Leçons de médecine légale* »,  
publié en 1821,  
puis « *Traité de médecine légale* »

Deux affaires impliquant des intoxications avec de l'arsenic :

- Affaire Mercier (1838)
- Affaire Lafarge (1840)

***SOLA DOSIS***

***FACIT VENENUM***



*« Si vous vouliez expliquer de façon précise l'action de chaque poison, il faut alors se demander qu'est-ce qui n'est pas un poison ?*

***Toute substance est un poison et aucune n'est inoffensive. C'est simplement la dose qui fait qu'une substance n'est pas toxique. »***

Théophraste von Hohenheim (Paracelsus) (1493-1541)

## Aujourd'hui, les analyses sont de plus en plus sensibles et rapides

Les concentrations des substances recherchées dans le sang (de l'ordre du  $\mu\text{g/l}$ ), par exemple le THC, substance active du cannabis, sont du même ordre de grandeur que la détection de la présence d'un morceau de sucre dissout dans le volume d'eau contenue dans une piscine olympique.



# Importance de la spectrométrie de masse dans l'analyse de biomolécules

## Prix Nobel de chimie 2002



**John B. Fenn**  
(1917 – 2010)



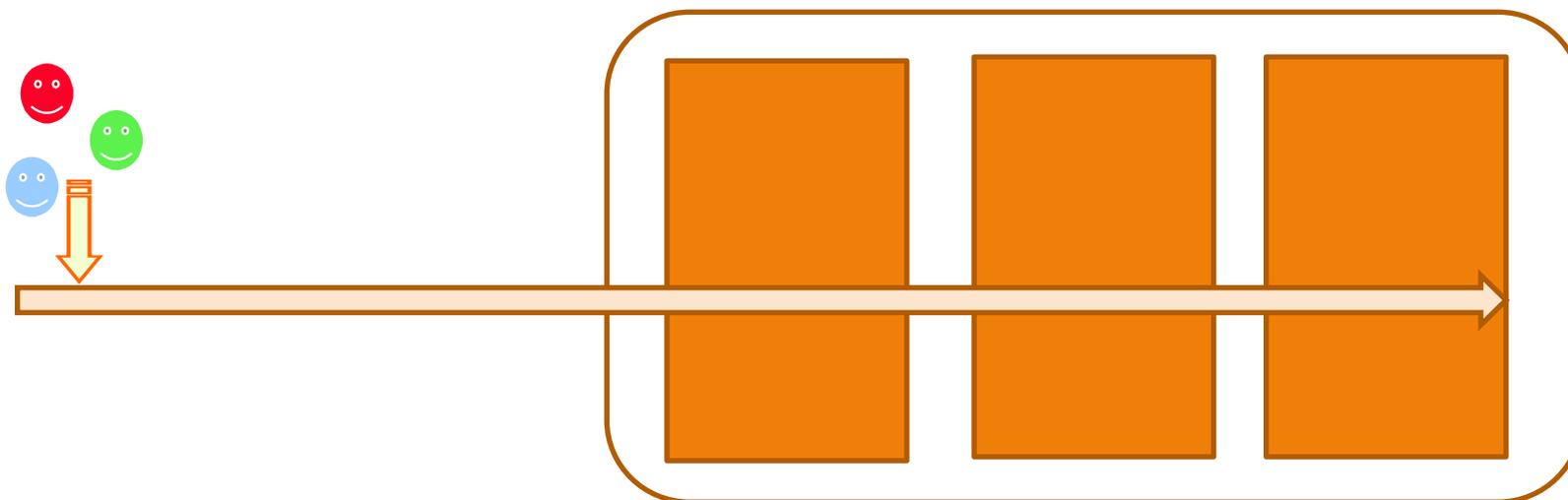
**Koichi Tanaka**  
(1959 - )



**Kurt Wüthrich**  
(1938 - )

*"for the development of methods for identification and structure analyses of biological macromolecules" with one half jointly to John B. Fenn and Koichi Tanaka "for their development of soft desorption ionisation methods for mass spectrometric analyses of biological macromolecules" and the other half to Kurt Wüthrich "for his development of nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the three-dimensional structure of biological macromolecules in solution" (nobelprize.org)*

# Les composants d'un spectromètre de masse



## Introduction de l'échantillon

- Chromatographie (GC, LC)
- Injection directe
- Electrophorèse capillaire

## Ionisation

- ESI
- MALDI
- Ion. chim.
- Imp. élec.

## Analyseur

- Quad.
- Trappe
- TOF
- Secteur

## Détection

- Mult. élect.
- Dynode de conv.
- MCP



# Stratégie analytique

Réception des échantillons



Screening, analyses qualitatives

Quoi ?

Dosage, analyses quantitatives

Combien ?

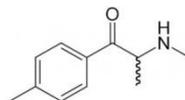
Rapport, expertise



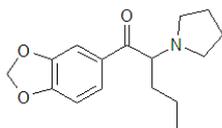
# Les substances recherchées



... mais aussi



Méphédronne (méthylméthcathinone) –  
MCAT / Miaou Miaou / Méphistophélès



MDPV (3,4-methylenedioxyprovalerone)

# **Objectif des analyses quantitatives**

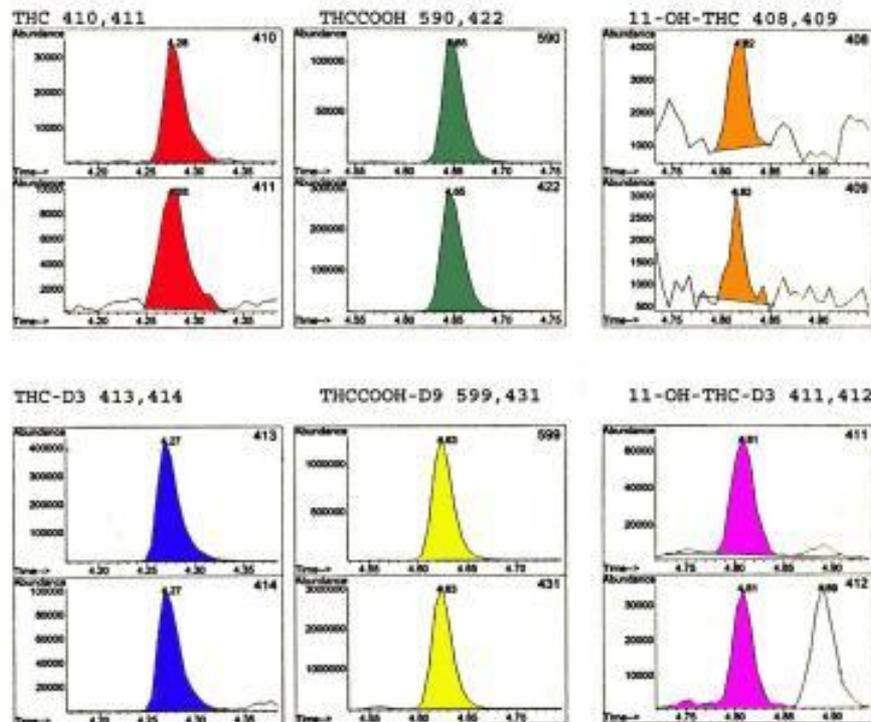
**Mettre en évidence dans un ou plusieurs échantillons  
la présence ou l'absence d'un xénobiotique de manière  
la plus certaine possible**

- 1. Recherche cadrée, liste de substance**
- 2. Recherche large, « unknown screening »**

Dosage du THC, du 11-OH-THC et du THCCOOH dans le sang par GC-MS-NCI

Information from Data File :

File : E:\031121\ST04.D  
Date, operator : 21 Nov 2003 17:50 , ame  
Sample Name : 1.0 /2.0  
Vial Number : 5  
Current Method : THCNCI  
Misc Info :  
Ions m/z : 408,409,410,411,412,413,414,422,431,590,599



## Exemple 1.

Recherche cadrée, liste de substance :

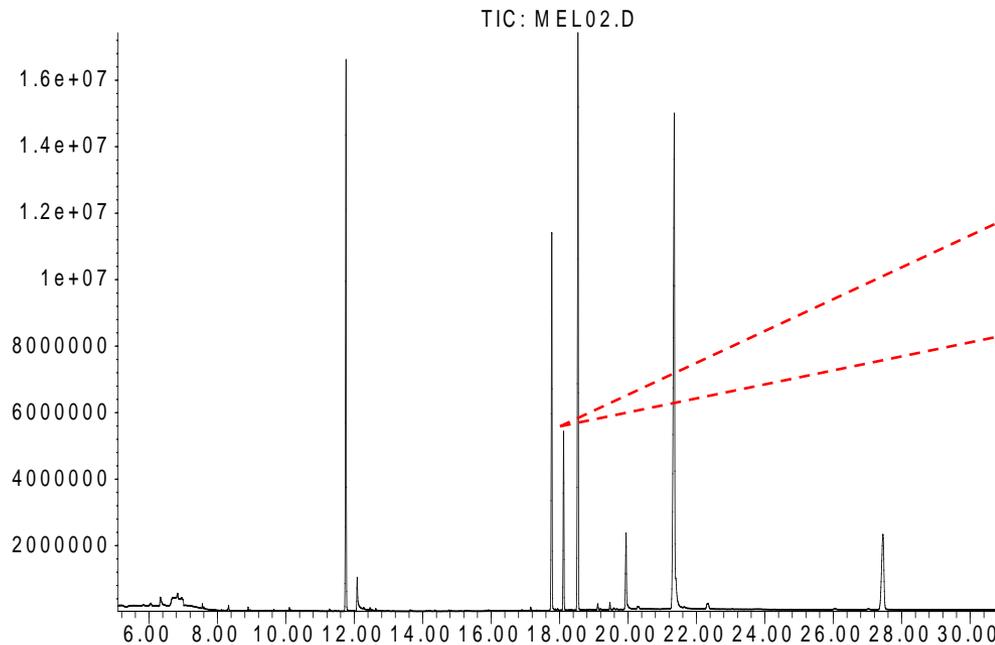
les cannabinoïdes dans le sang

# Exemple 2 : screening GC/MS

(chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse)

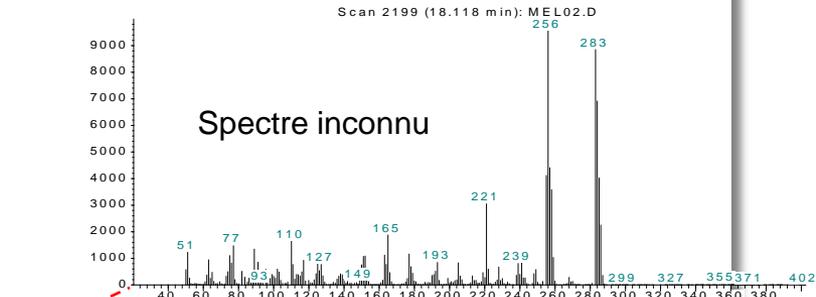
## Recherche de l'identité des spectres de masse à l'aide de bibliothèques de spectres de masse

Abundance



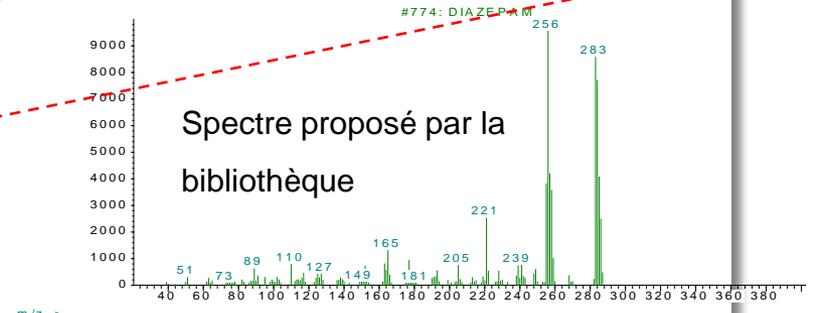
Time-->

Abundance



m/z-->

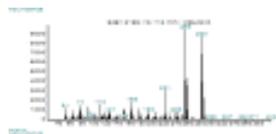
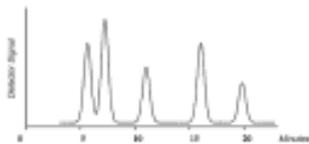
Abundance



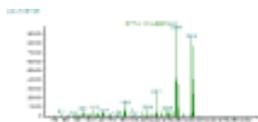
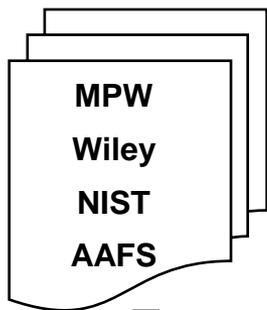
m/z-->

# Identification des spectres de masse à l'aide de bibliothèques

1.

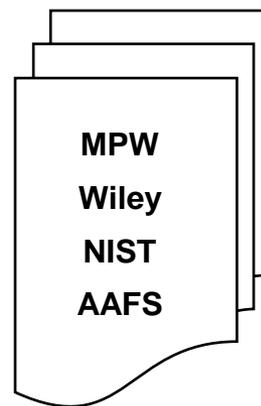


Spectre inconnu

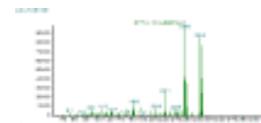
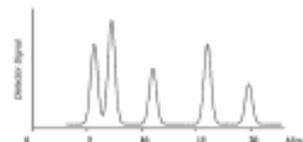


Spectre proposé par la bibliothèque

2.



Spectre contenu dans la bibliothèque



Spectre proposé par la bibliothèque

# Exemple - Intoxication

## Brève description du cas

En moins de 48 heures, trois chiens sont décédés subitement en milieu urbain après s'être promenés dans le même parc public.

Plusieurs échantillons suspects ayant pu servir d'appâts ont été prélevés dans le parc et analysés.



PARC PUBLIC À LAUSANNE

# DEUX CHIENS TUÉS PAR UN POISON VIOLENT

UN INCONNU JOUE AVEC LA VIE DES BÊTES. ET CELLE DES ENFANTS? LIRE EN PAGE 5

**MEURTRES DE CHIENS** Un inconnu répand du poison dans un parc public

## QUI EST L'EMPOISONNEUR?

**LAUSANNE** Un puissant insecticide, disséminé dans le parc du Denantou, a tué deux chiens. Un troisième, dans le coma, a pu être sauvé en extrême. La police est sur les dents. Et la justice a été saisie par un des propriétaires

Evelyne Emeri

Un produit organophosphoré. Derrière ce qualificatif se cache la substance qui tue. Un insecticide hyperpuissant contenant du carbone et du phosphore qui a tué deux fois vendredi soir un Labrador et un terrier scotte. La seule au soir, c'est un terrier caenn qui a failli passer l'arme à gauche. Points communs entre ces trois bêtes: une promenade au parc du Denantou,

Un ennemi des bêtes a largement répandu ce toxique... à priori dans des boîtes appâtissantes - afin d'attraper, non pas tant les insectes, mais manifestement des animaux. Voire de jeunes enfants susceptibles d'en avaler? La question est sur toutes les lèvres. Et la réponse est oui. Oui, ce poison ultra-fort, introuvable sur le marché pour un quidam, peut aussi anéantir un être humain. Tout dépend évidemment de la quantité ingérée.

**Folles rumeurs**

Depuis, les rumeurs les plus folles circulent. Y compris qu'un homosexuel - l'endroit est très couru par les gays - aurait succombé... Pour faire taire ses bruits alarmistes, la police municipale a choisi d'informer hier en fin de journée. Vendredi soir, elle a effectivement été alarmée par la vétérinaire



**WC PUBLICS** Les enquêteurs ont prélevé la majorité des échantillons de produits suspects aux abords de ces toilettes situées à quelques pas des quais d'Ouchy et du Musée olympique.

Arlette Besson

ment infectée, environ 1500 m<sup>2</sup>. Cinq échantillons de produits suspects ont été prélevés, mais des toilettes, à quelque chose de plus, il ne présenterait plus de risque.

## Chiens empoisonnés

**LAUSANNE** Deux canidés sont morts après avoir ingurgité un insecticide dans le parc du Denantou.



Lire en page 34

Une zone d'environ 1500 mètres carrés, à la hauteur des toilettes publiques, a été passée au peigne fin. Cinq échantillons de produit toxique ont été prélevés.

Valérie Virelizier

**REGARD EN COIN**

**Denantou: c'est la serial psychose!**

**C'**est un peu le monde à l'envers au parc du Denantou depuis un mois ce sont les chiens qui trépassent, et la cavalerie qui aboie. A deux semaines d'intervalle, trois toutous sont donc morts après avoir ingurgité un mortel insecticide. Quelques-uns l'a répandu dans le parc. On ne sait pas qui. On ne sait pas pourquoi. Un juge a ouvert une enquête suite à la plainte d'un des propriétaires endeuillés. Deux inspecteurs de la police judiciaire sont sur le coup. Voilà pour les faits bruts.

Il n'en fallait pas plus pour que s'installe la psychose. Dans la presse, on parle volontiers de «parc maudit». Le mystérieux empoisonneur devient même un «serial killer». Du sérieux. Il faut rassurer les Lausannois. Alors on passe une nouvelle fois les lieux au peigne fin. C'était jeudi matin. On mobilise une vingtaine d'employés communaux. On

leur donne des pinces métalliques, des râteaux, des bidons pour collecter d'éventuels indices. Les médias prennent les hommes en photo. Le déploiement est spectaculaire. Mieux deux indices sont dégotés. Les limiers de Pares et promeneurs ont ainsi été intrigués par des feuilles à l'aspect huileux. Elles ont aussi été analysées. Verdict: il s'agit... des restes d'un petit animal répurgité par un osseau.

Re-mobilisation dans la nuit de jeudi à vendredi. Un passant appelle police secours. Il a découvert des produits suspects. Une dizaine de bouts de viande non loin du Denantou, déposés le long de la Vaudère. Nouveau verdict: il s'agit... de peau de porc, flambée puis râclée. En un mot, de la croûte de bard vraisemblablement tombée d'un sandwich. Distraire! La bête du Denantou a encore frappé!

Laurent Amisell

# Résultat du screening GC-MS :

## Fonofos

Le fonofos (Dyfonate) est un organothiophosphoré utilisé comme insecticide.

Nom chimique :	éthylidithiophosphonate d'O-éthyl et de S-phényl
Formule chimique :	$C_{10}H_{15}OPS_2$
PM :	246.33
Classe de toxicité (Suisse) :	2
Remarque :	1) le fonofos n'est plus mentionné dans l'index des produits phytosanitaires autorisés en Suisse 2) le fonofos ne fait pas partie des organophosphorés fréquemment mis en évidence dans des cas d'intoxication de chiens en Italie (phorate, parathion, azinphos et malathion) <sup>#</sup>

<sup>#</sup> Calzetta et al., Incidence of intentional poisoning of dogs in the Abruzzo region of Italy. Vet. Human Toxicol. (2002) 44 : 111 - 112

# Résultats quantitatifs

Concentration de fonofos dans le sang, la bile et le contenu stomacal des 3 chiens :

	<b>Sang</b> ( $\mu\text{g/l}$ )	<b>Bile</b> ( $\mu\text{g/l}$ )	<b>Contenu stomacal</b> ( $\text{mg/l}$ )
<b>Chien 1</b>	<b>27</b>	<b>436</b>	<b>97</b>
<b>Chien 2</b>	<b>32</b>	<b>367</b>	<b>999</b>
<b>Chien 3</b>	<b>14</b>	<b>292</b>	<b>13</b>

Concentration de fonofos dans un échantillon suspect, prélevé dans le parc :

	<b>Fonofos</b> ( $\text{mg/kg}$ )
<b>Echantillon 1</b>	<b>900</b>

Valeur de tolérance pour le fonofos dans les denrées alimentaires (Ordonnance sur les substances étrangères et les composants – RO 2002) :

**0.05 mg/kg**

# La soumission chimique

## DEFINITION

**Administration de substances psychoactives à l'insu de la victime à des fins criminelles ou délictueuses (viols, actes de pédophilie, enlèvements, violences volontaires, vol, ...), et parfois à des fins simplement ludiques ou malveillantes.**

**Le produit idéal pour un agresseur est celui qui est actif à faible dose, rapidement soluble en milieux aqueux, sans goût, et dont les effets sont rapides à s'installer, tout en provoquant une amnésie des faits (amnésie antérograde)**

- ⇒ Substances psychoactives à action sédatives, desinhibitrices et amnésiantes**
- ⇒ Substance à action rapide et demi-vie courte**

## **Substances concernées :**

- **alcool éthylique (éthanol)**
- **benzodiazépines**
- **zolpidem, zopiclone**
- **gamma hydroxybutyrate (GHB)**
- **hydrate de chloral**
- **Ecstasy (MDMA) et dérivés**
- **cannabis**
- **hallucinogènes (LSD, scopolamine, atropine, ...)**
- **autres médicaments (neuroleptiques, anti-histaminiques, ...)**

## Exemple

### Brève description du cas :

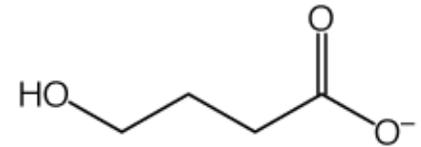
Une jeune femme est admise dans un service d'urgence pour une suspicion d'intoxication à la cocaïne.

Un prélèvement d'urine pour des analyses toxicologiques est effectué dans l'heure qui suit son admission.

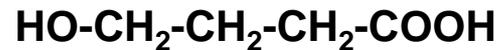
### Résultats

<b>Urine (dépistage)</b>	<b>cocaïne et métabolites : non détecté</b> (lim. décision : 300 ng équivalents benzoylecgonine / ml)
<b>Urine (GC-MS)</b>	<b>GHB (321 mg/l)</b> <b>caféine et théobromine</b>

## Le GHB



**GHB, «la drogue du violeur»**

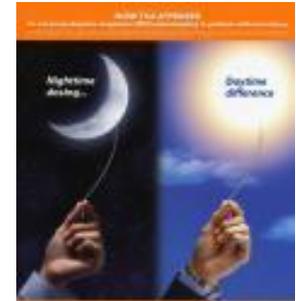


**Traitement des troubles du sommeil, en particulier la narcolepsie (oxybate de sodium, Xyrem<sup>®</sup>, médicament A<sup>†</sup>, autorisé en Suisse depuis le 9 juin 2006 par Swismedic).  
Sédatif, dépresseur du SNC.**

**Usage récréatif (euphorie, relaxation, désinhibition, amnésie antérograde).**

**Le GHB est naturellement présent dans l'organisme.  
=> origine endogène ou exogène ?**

**Élimination rapide de l'organisme  
(env. 6 à 8 h du sang et env. 12 h de l'urine)  
=> rapidité des prélèvements**



## Le GHB

La détermination de l'origine endogène ou exogène du GHB peut être effectuée par GC-C-IRMS (gas chromatography / combustion / isotope ratio mass spectrometry).

### Exemple :

Echantillon	GHB (mg/l) (sang)	GHB $\delta^{13}\text{C}$ o/oo
Personne vivante (intoxication GHB)	215	- 40.3
Personne décédée (sans indication de consommation de GHB)	14	- 24.7
Echantillon de référence (Aldrich)		- 40.8

Saudan C., Augsburger M., Kintz P., Saugy M. and Mangin P., Detection of exogenous GHB in blood by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry : implications in postmortem toxicology. Journal of Analytical Toxicology, 29(8) (2005) 777-781

# Les cheveux



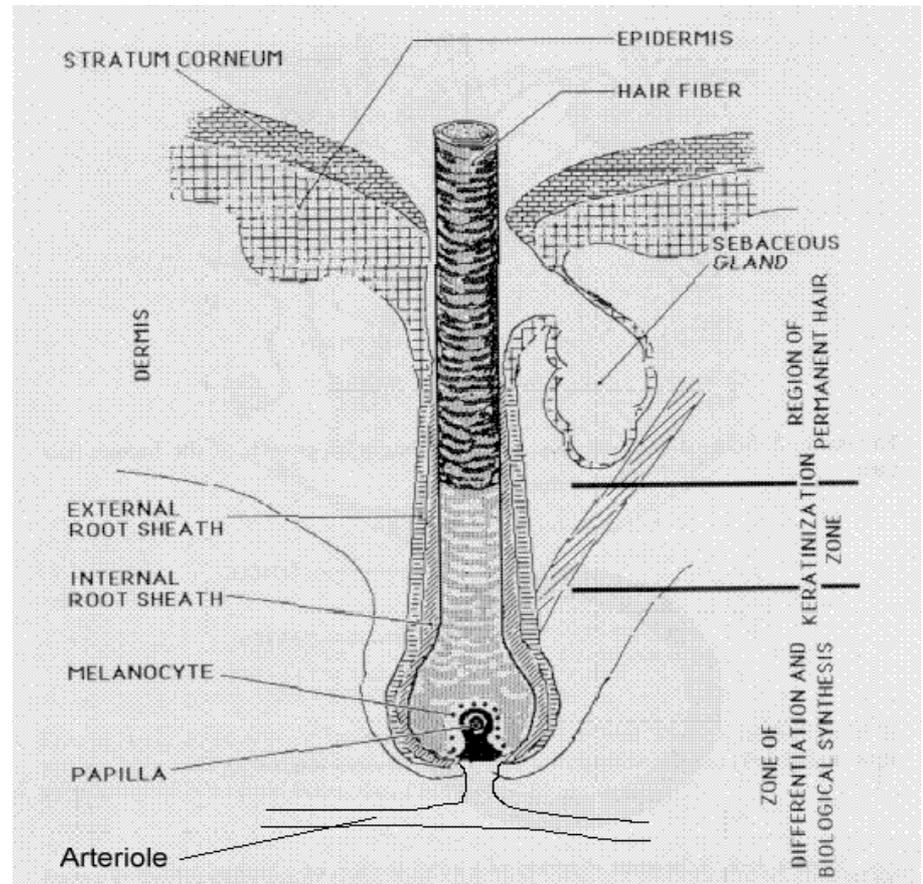
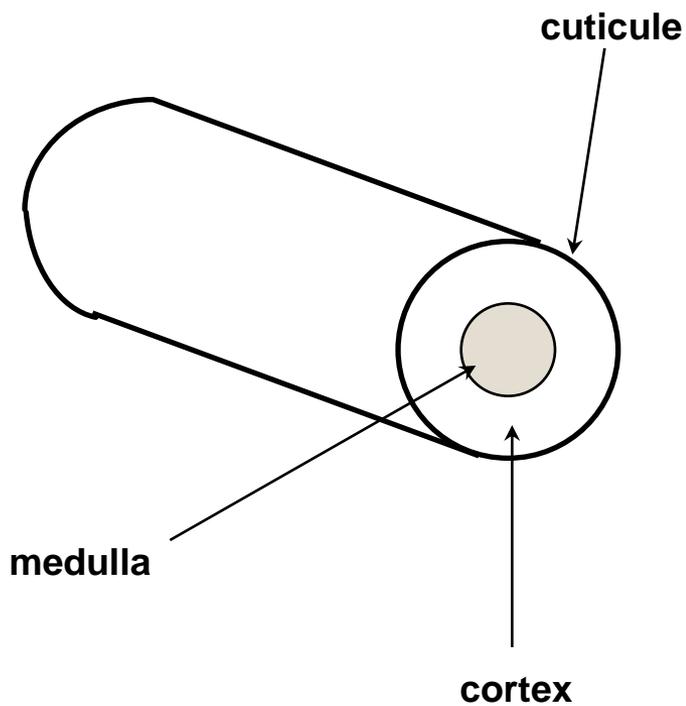
## **Les cheveux**

**Matrice permettant de remonter de plusieurs semaines, voire mois dans le passé toxicologique du patient.**

**Les cheveux sont coupés au ras du scalp.**

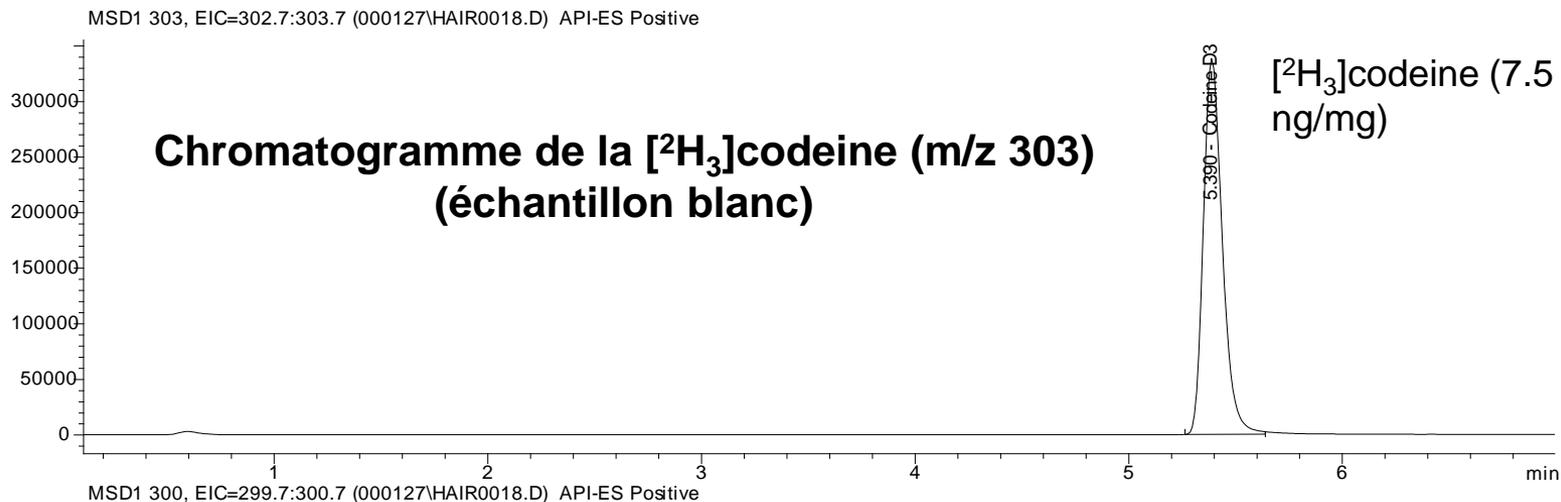
**Les échantillons peuvent être segmentés.**

**En cas d'absence de cheveux, les poils axillaires ou pubiens peuvent être utilisés.**



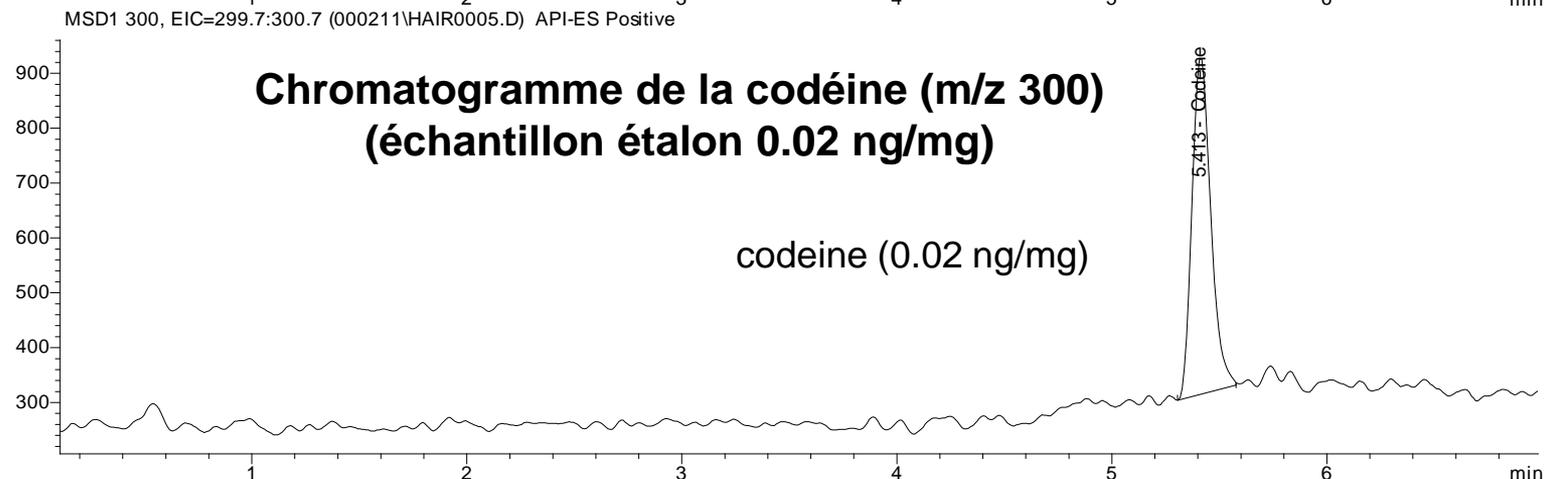
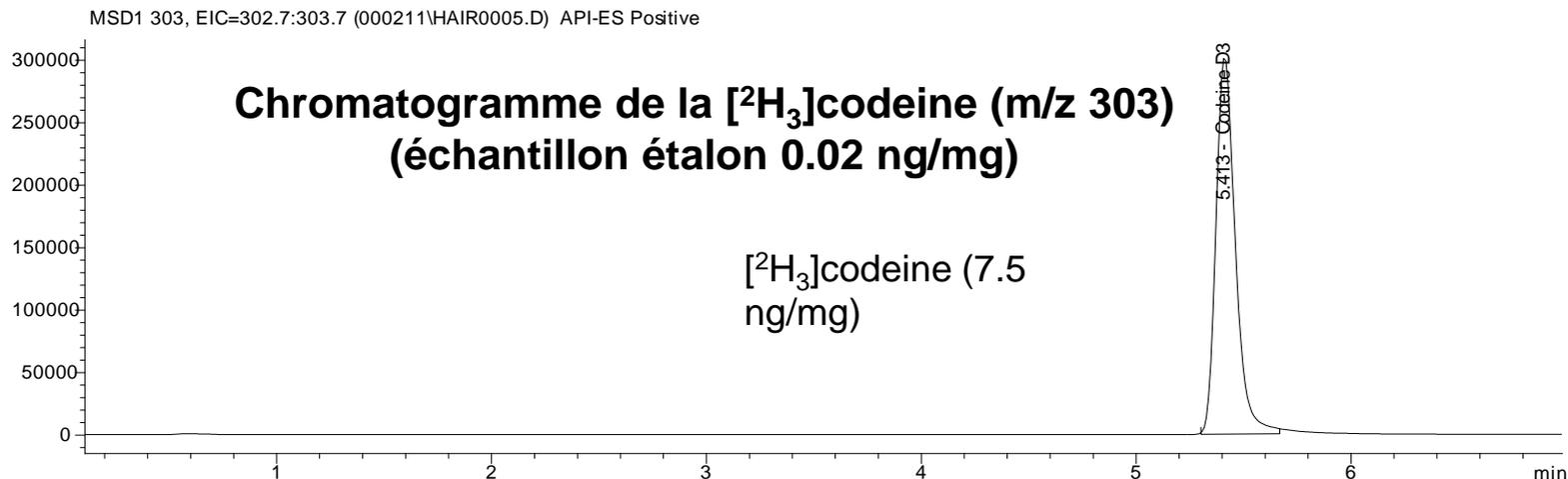
Adapted from Robbins, C. R. Chemical and Physical Behavior of Human Hair. 3rd ed. Springer-Verlag, New York (1994).

# Quantification de la codéine dans les cheveux par LC/MS



Ion chromatograms of the base peaks of  $[^2\text{H}_3]$ codeine (m/z 303) and codeine (m/z 300) (internal standard at 7.5 ng/mg) from 20 mg of extracted, drug-free, black human hair.

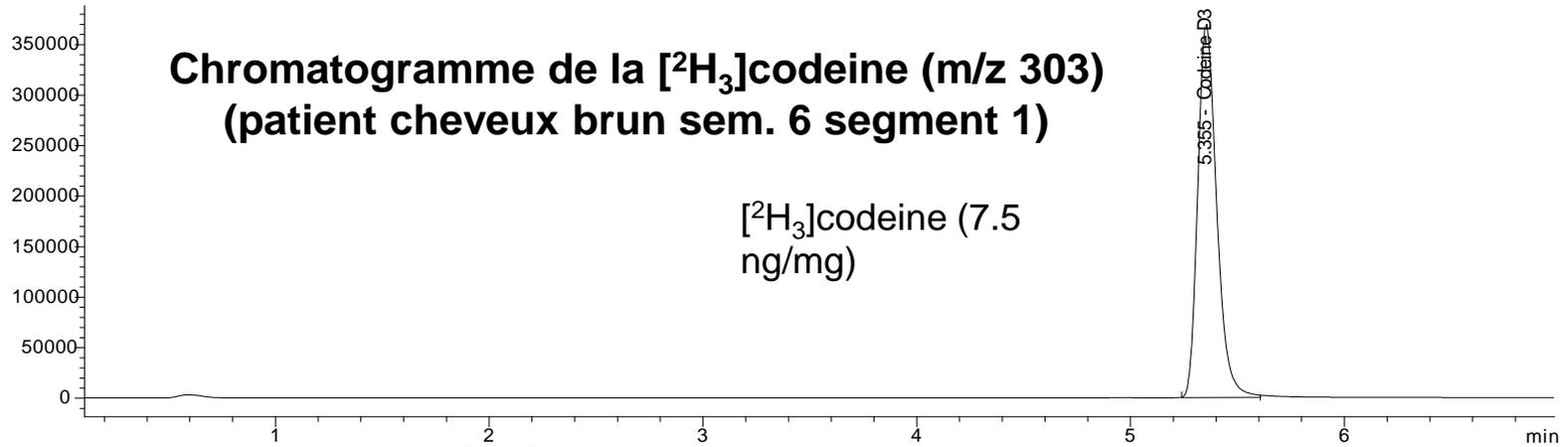
# Quantification de la codéine dans les cheveux par LC/MS



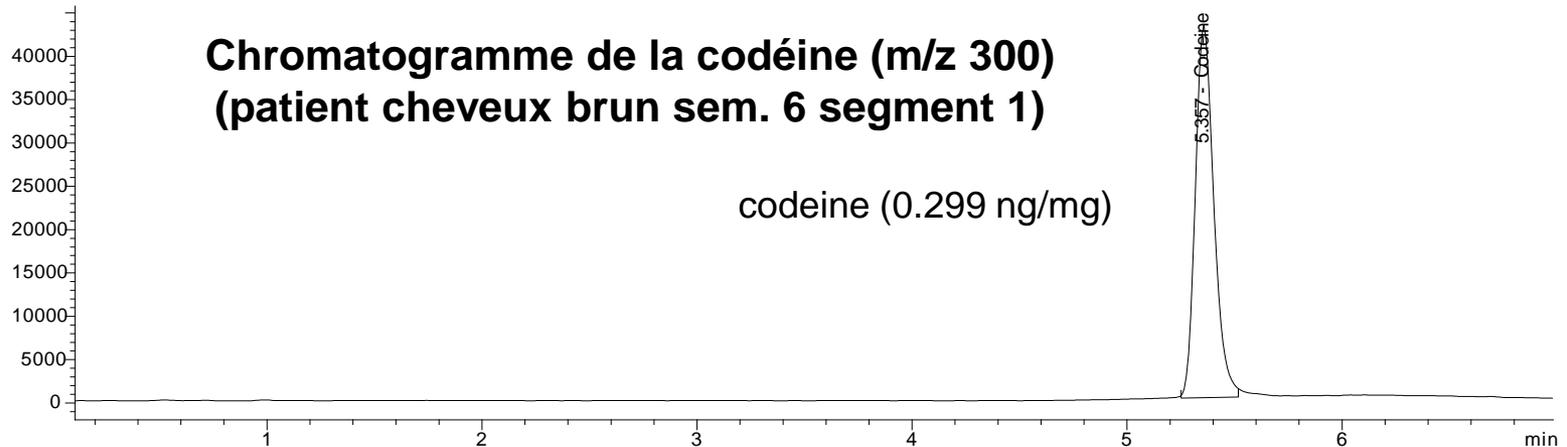
Ion chromatograms of the base peaks of [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]codeine (m/z 303) and codeine (m/z 300) (internal standard at 7.5 ng/mg) from 20 mg of extracted, drug-free, black human hair fortified with 0.02 ng/mg of codeine.

# Quantification de la codéine dans les cheveux par LC/MS

MSD1 303, EIC=302.7:303.7 (000127\HAIR0028.D) API-ES Positive



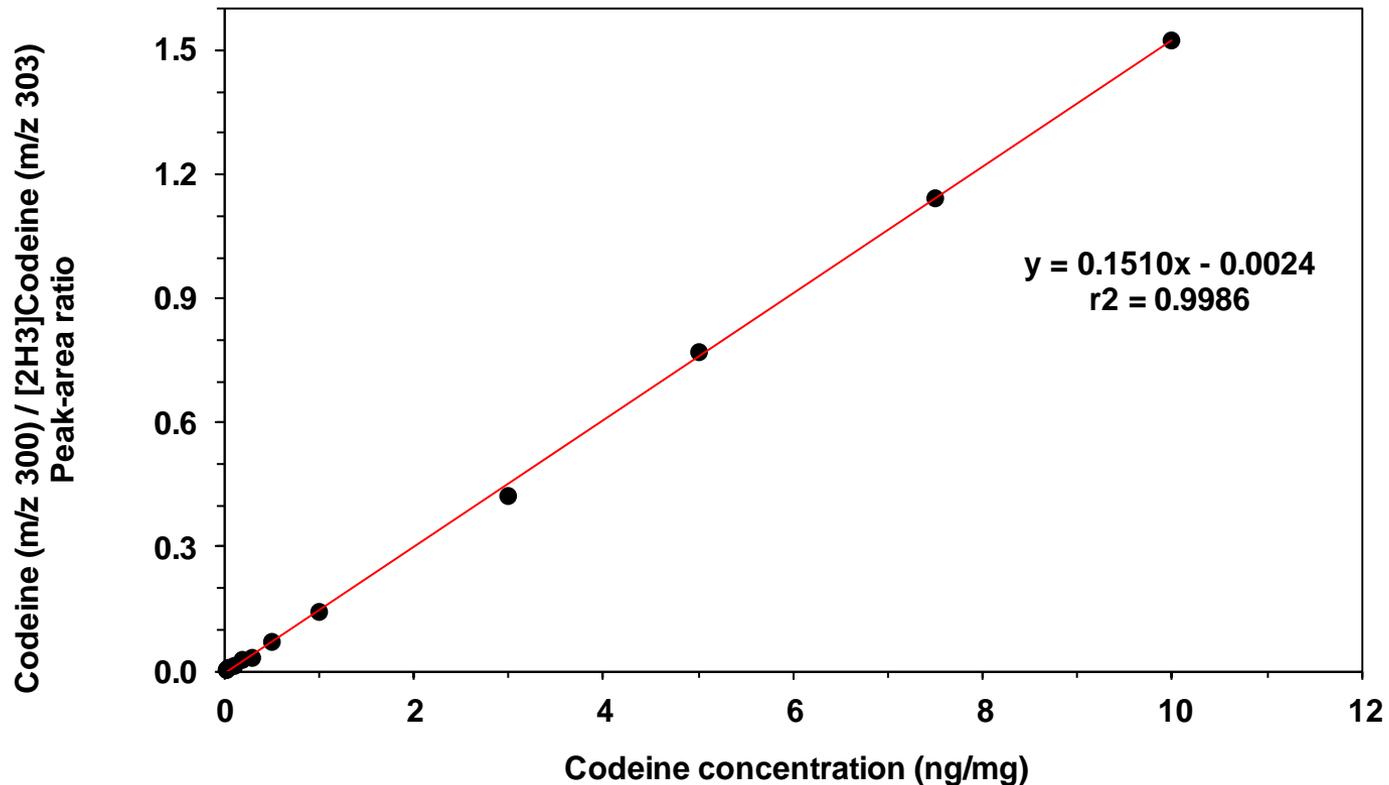
MSD1 300, EIC=299.7:300.7 (000127\HAIR0028.D) API-ES Positive



Ion chromatograms of the base peaks of [2H<sub>3</sub>]codeine (m/z 303) and codeine (m/z 300) (internal standard at 7.5 ng/mg) from 21.7 mg of extracted, brown human hair from subject #21.

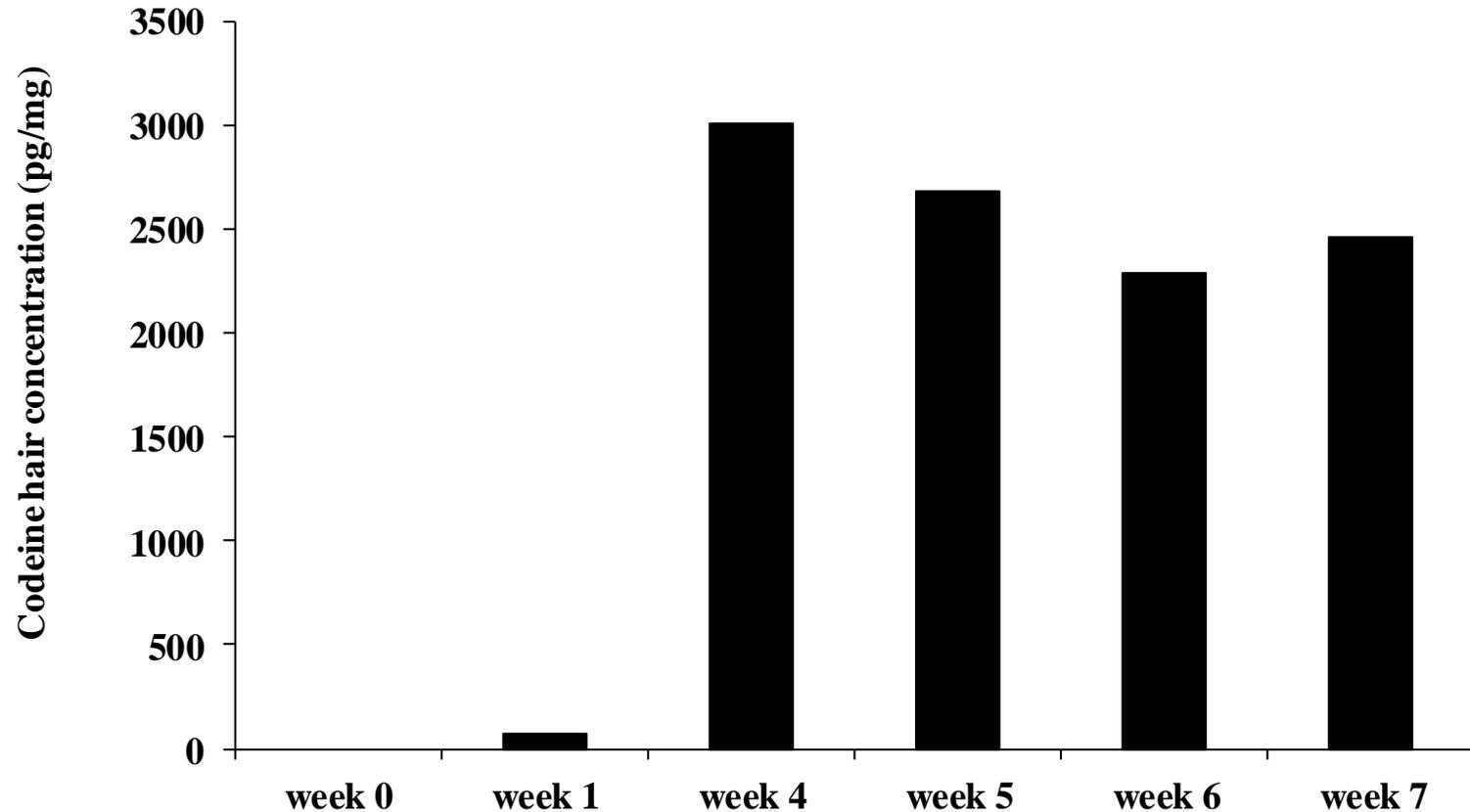
# Quantification de la codéine dans les cheveux par LC/MS

## Courbe d'étalonnage



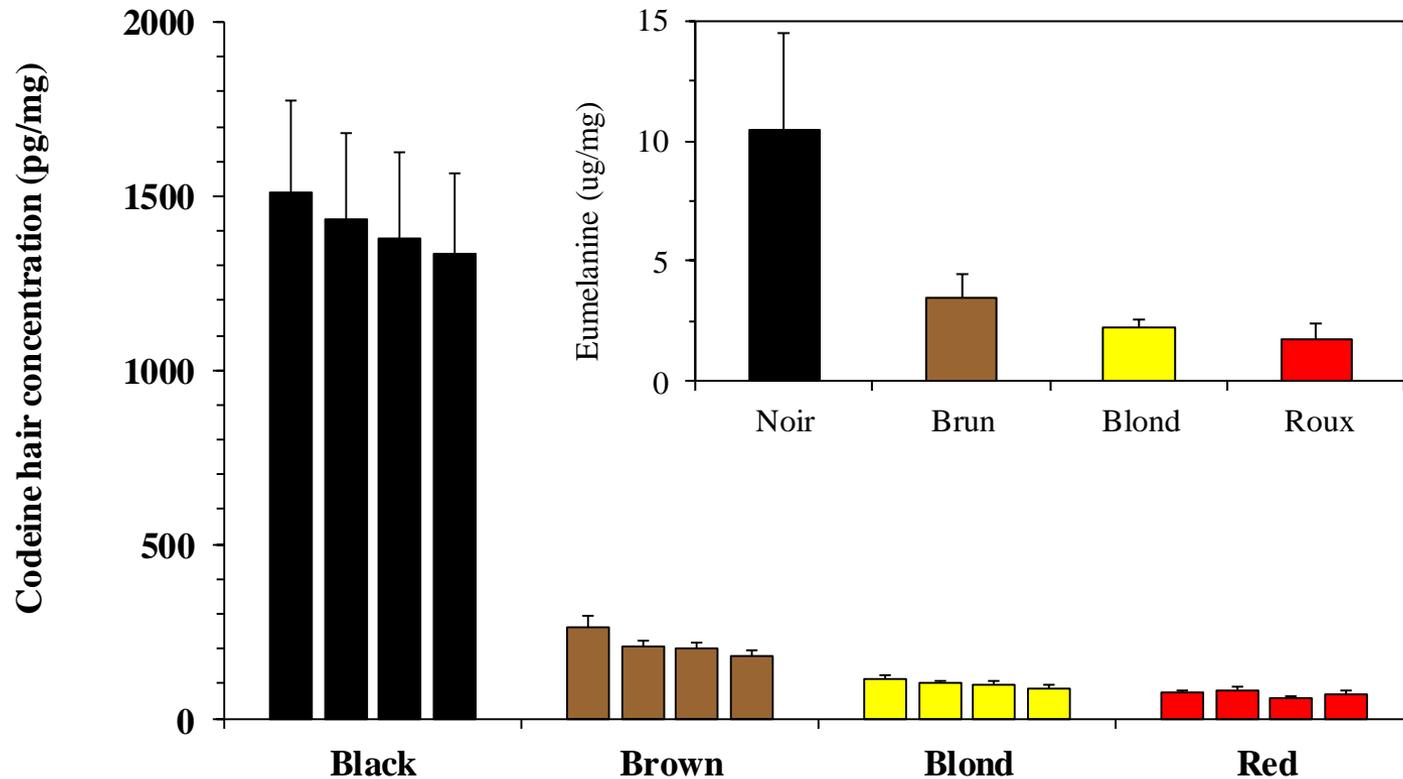
Representative standard curve for liquid chromatographic-mass spectrometric (API-ES) quantitation of codeine prepared from fortified hair standards.

## Dosage de la codéine dans les cheveux



Concentration of codeine in hair (segment 1 : 0 to 3 cm) after oral dose of codeine (30 mg 3 times a day for 5 days plus 30 mg on day 7). Subject number 4 : male with black hair.

**Concentration of codeine and eumelanin in black, brown, blond and red hair after oral dose of codeine. Hair were obtained by cutting at week 4, 5, 6 and 7.**



Black (n=16), brown (n=11), blond (n=8) and red (n=6) hair (segment 1 : 0 to 3 cm).  
Oral dose of codeine : 30 mg 3 times a day for 5 days plus 30 mg on day 7.

## Cas de soumission chimique

### Brève description du cas :

Une femme, de retour d'un séjour de 3 semaines à l'étranger, a l'impression d'avoir été droguée à plusieurs reprises lors de son voyage (sommolence, fatigue, ...).

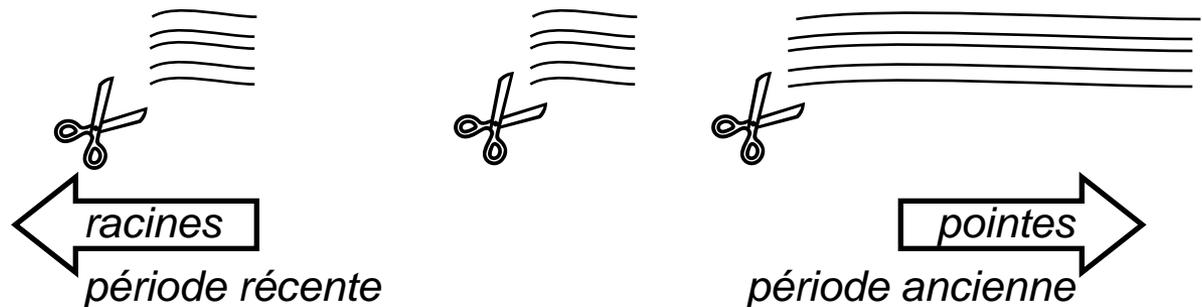
Elle indique une consommation régulière de clorzébate (Tranxilium®), selon un traitement médical établi depuis plusieurs semaines.

Un prélèvement de cheveux est effectué.

## Résultats (LC-MS/MS)

### Cheveux

	segment 1 (0 – 1 cm)	segment 2 (1 – 2 cm)	segment 3 (2 – 7 cm)
Nordiazépam (ng/mg)	0.45	0.86	0.36
Oxazépam (ng/mg)	0.03	0.18	0.04
Bromazépam (ng/mg)	0.71	non détecté	non détecté



## Le bromazépam

Le bromazépam, substance active du Lexotanil<sup>®</sup>, est une benzodiazépine utilisée pour le traitement d'états d'anxiété et de tension.



**Posologie usuelle :**

**1,5 – 12 mg**

**Demi-vie d'élimination :**

**env. 20 h**

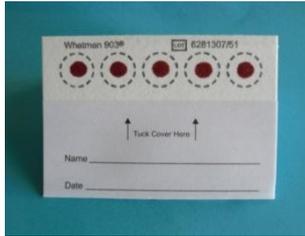
**Concentrations thérapeutiques :**

**50 – 200 µg/l**

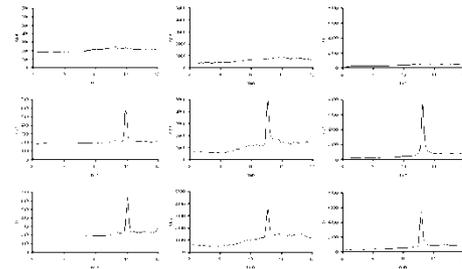


# Et demain ...

## - L'analyse d'échantillon de spot de sang séché



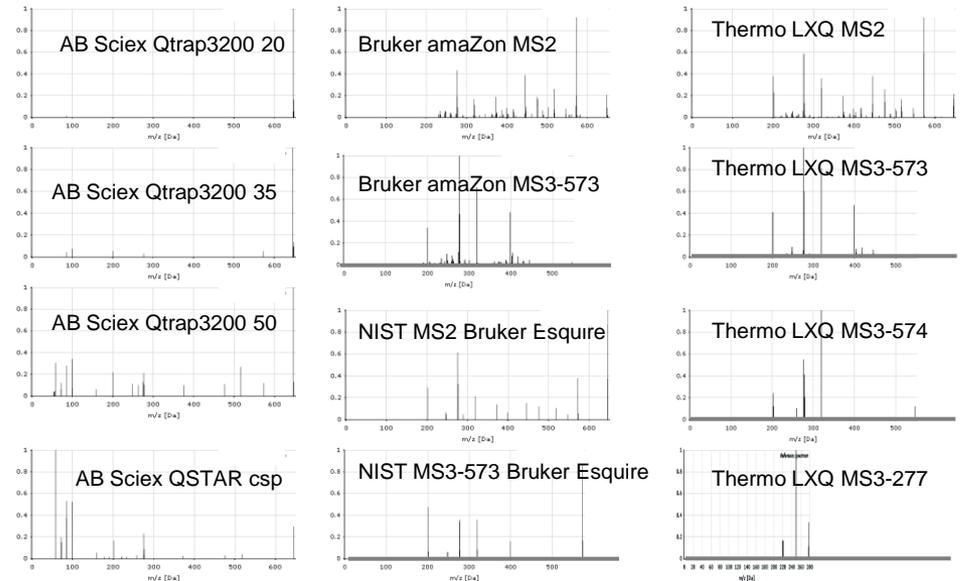
saquinavir    imipramine    vérapamil



## - La recherche qualitative par LC-MS/MS



amiodarone



# Message

- La spectrométrie de masse est aujourd'hui un outil indispensable en toxicologie forensique
- La spectrométrie de masse est utilisée en qualitatif comme en quantitatif
- Les nouveaux instruments, les couplages et le traitement des données permettront à terme de diminuer le volume d'échantillon, le temps d'analyses, ainsi que d'améliorer la sensibilité des procédures

## **Merci à l'équipe de l'UTCF :**

Angélique Chevalley, Magali Dovat Sabatella, Marie Fabritius, Cinzia Forney, Christian Giroud, Annette Jordan, Hicham Kharbouche, Catherine Meylan Bohnenblust, Joëlle Müller, Sara Petter, Filomena Rocha Cunha, Sophie Seydoux, Frank Sporkert, Joël Stauber, Vincent Varlet, Julien Déglon, Melek Donmez-Altun, Françoise Iatropoulos Jollien, Estelle Lauer, Olivier Plaut, Christian Staub, Aurélien Thomas, François Versace, Max Villa, Christèle Widmer, Federica Zbinden.



**Merci de votre attention**

**Dr Marc Augsburger**  
**CURML – UTCF**  
**Rue du Bugnon 21**  
**1011 Lausanne**

**Marc.Augsburger@chuv.ch**  
**Tél. direct : 021 314 70 85**  
**Tél. secrétariat : 021 314 73 38**