

Chimie et toxicologie médico-légale

De la détection de l'arsenic à celle de la soumission chimique

Nathalie Milan et Ericka Disa

Résumé

La toxicologie, mariage entre la chimie et la médecine, a été fondée au XIX^e siècle par le médecin chimiste espagnol Mathieu Joseph Bonaventure Orfila. C'est également lui qui rattacha à cette discipline la notion médico-légale afin de souligner l'implication de la toxicologie dans les cas de morts suspectes. À partir du XVIII^e siècle, et tout au long des siècles suivants, de nombreux chimistes, de part leurs travaux et leurs inventions appliquées aux recherches toxicologiques, ont permis un véritable essor de la toxicologie médico-légale. La preuve de la mort par empoisonnement étant, à partir de cet instant, soutenue par des démonstrations chimiques. Parallèlement à cette évolution, de nouvelles molécules de synthèse ont également fait leur apparition, notamment au siècle dernier. Parmi celles-ci, les benzodiazépines, largement impliquées dans des affaires judiciaires à caractère médico-légale, de la sécurité routière aux actes d'homicide, d'intoxications et principalement de soumission chimique. Afin de détecter ces molécules, souvent à l'échelle du picogramme, de nouvelles techniques chromatographiques ont été mises au point, augmentant considérablement les performances de la chimie analytique qui devient ainsi un outil hors pair en matière de détection de traces pour la toxicologie.

Mots-clés

Poisons, intoxications, détection, benzodiazépines, soumission chimique.

Abstract

Chemistry and forensic toxicology

Toxicology, alliance of chemistry and medicine, was founded in the 19th century by Mathieu Joseph Bonaventure Orfila, a Spanish chemist. He tied this discipline to the notion of forensic in order to emphasize toxicology's implication in suspicious death cases. From the 18th century and through the next centuries, lot of chemists allowed forensic toxicology to bloom with their inventions and works applied on toxicology researches. Death evidence in poisoning cases was, from this time, supported by chemical demonstrations. Moreover new molecules synthesized by pharmaceutical industries were born, particularly during the last century. Among them, we can find the benzodiazepines, widely implicated in legal cases, road safety, homicide, poisoning, but mainly found in drug facilitated crimes. In order to detect these molecules, often at a picogram rate, new devices in chromatography and spectroscopy were applied, increasing considerably analytical chemistry's performances which become an excellent tool for signs detection in toxicology.

Keywords

Poison, poisoning, detection, benzodiazepine, drug facilitated crimes.

La toxicologie, du grec « *toxikon* », poison recouvrant les flèches, et « *logos* », science, est la science des poisons qui étudie les effets des xénobiotiques* sur l'organisme. Cette science multidisciplinaire s'intéresse aux toxiques : leur origine, leurs propriétés physiques, chimiques ou biolo-

giques, leurs biotransformations, leurs mécanismes d'action sur les organismes vivants, leur détection et leur quantification, leurs actions nocives et les moyens de les combattre. La toxicologie médico-légale s'est développée essentiellement grâce aux avancées de la chimie et est actuellement en

Glossaire

Les mots suivis d'un astérisque* dans le texte sont définis ci-dessous.

Alcaloïdes : molécules organiques alcalines d'origine naturelle.

Amnésie antérograde, appelée également amnésie de fixation : incapacité à mémoriser des faits nouveaux ; elle est relative à un déficit des processus d'acquisition.

Antalgiques : médicaments destinés à réduire la douleur.

Anticonvulsivants : médicaments indiqués principalement dans le traitement pharmacologique de l'épilepsie et pour traiter des convulsions.

Anxiolytiques : médicaments utilisés contre l'anxiété.

Hypnotiques (ou somnifères) : classe de médicaments ayant la propriété d'induire le sommeil.

Myorelaxant : substance qui a pour effet de décontracter les muscles.

Psychotrope : substance qui agit principalement sur l'état du système nerveux central en induisant des modifications de la perception, des sensations, de l'humeur, de la conscience ou d'autres fonctions comportementales et physiologiques.

Xénobiotiques : substances étrangères à l'organisme.

mesure de répondre à de nombreuses questions posées par la justice en matière d'empoisonnement, grâce à des outils technologiques performants. Sa principale mission est de mettre en évidence des substances ayant pu jouer un rôle direct ou indirect dans la cause de la mort ou ayant pu modifier le comportement d'un individu.

Les poisons dans l'histoire et la naissance de la toxicologie

La connaissance des poisons est aussi ancienne que celle du crime, difficile donc de fixer l'époque exacte de leurs premières utilisations, la pratique de l'empoisonnement criminel remontant à la plus haute Antiquité. Les ouvrages les plus anciens connus sont ceux de Nicandre de Colophon : « *Theriaka* » et « *Alexipharmaka* », qui traitent des animaux vénéneux, des poisons et des antidotes (204 à 138 avant l'ère chrétienne). Il s'agit alors surtout de poisons naturels (animaux, végétaux et minéraux) tels que les batrachotoxines des phyllobates (grenouilles jaunes venimeuses), l'aconit, l'opium, la ciguë, l'arsenic...

Le premier pas dans l'étude des toxiques est apporté par Paracelse, alchimiste et médecin suisse considéré comme le précurseur de la toxicologie. Il sort l'Occident de l'obscurantisme des poisons au XVI^e siècle en affirmant dès 1528 : « *Tout est poison, rien n'est poison, seule la dose fait le poison* » (*sola dosis facit venenum*), citation toujours essentielle en toxicologie pour l'interprétation des travaux d'expertise. Il décrira également l'arsenic comme surpassant tous les poisons connus. D'ailleurs au XVII^e siècle, les poisons les plus utilisés en France étaient l'arsenic et le sublimé corrosif (HgCl₂ bichlorure de mercure).

En 1672, à la mort d'un officier de cavalerie, Godin de Sainte-Croix, on découvrit dans ses papiers des pièces et des fioles accusant sa maîtresse, Marie-Madeleine d'Aubray, marquise de Brinvilliers, d'avoir empoisonné son propre père, ses deux frères et sa sœur pour s'approprier leur part d'héritage. La marquise de Brinvilliers fut jugée et exécutée en 1676. C'est après cette affaire qu'éclata la célèbre « affaire des poisons » : entre 1672 et 1680, une série impressionnante de scandales et d'empoisonnements qui secoua Paris et la Cour, mettant en cause la favorite du roi, Madame de Montespan, et contraignant Louis XIV à réglementer le commerce des substances vénéneuses en 1682 [1]. C'est sans conteste la plus grande affaire judiciaire de l'ancien régime.

À cette époque, les connaissances en chimie étaient très rudimentaires comme en témoigne l'extrait du rapport d'expertise (reproduit par Jules Ogier [2]) de Guy Simon, apothicaire et expert lors de l'affaire des poisons, qui analysa le contenu des fioles trouvées dans la cassette de Godin de Sainte-Croix (figure 1).

Au XVIII^e siècle, l'avènement de la chimie expérimentale commence à s'introduire dans l'étude des poisons. Les réactions chimiques commencent à être expliquées puis appliquées timidement à la toxicologie pratique. Le crime

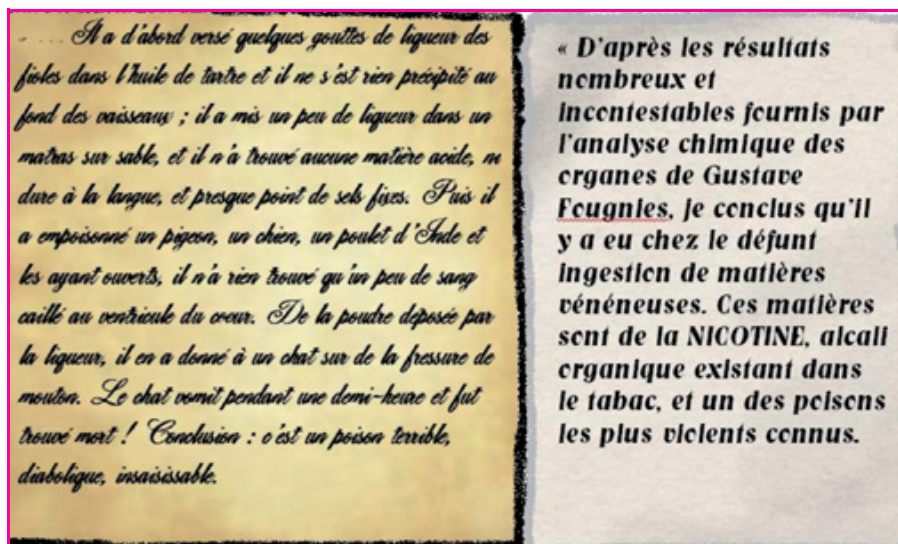


Figure 1 - À gauche : extrait du rapport d'expertise de Guy Simon en 1672, apothicaire chargé d'expertiser les substances retrouvées dans les fioles de Godin de Sainte-Croix. Ce rapport montre l'état rudimentaire des connaissances chimiques à cette époque [2] ; à droite : réponse du chimiste Stas faite lors du procès concernant l'empoisonnement de Gustave Fougny par les époux Bocarné en 1851 [7].

d'empoisonnement semble pourtant moins présent au XVIII^e siècle, mais ressurgit en force au XIX^e siècle, le poison le plus utilisé étant toujours l'arsenic, décrit comme « poison des rois et roi des poisons ».

La recrudescence des crimes d'empoisonnement utilisant l'arsenic, toxique invisible, insipide et inodore, met les médecins en échec car ils sont dans l'incapacité de l'identifier lors d'une autopsie, à la différence du sublimé corrosif qui provoque des symptômes et lésions caractéristiques (lésions du tube digestif). La médecine, alors science des poisons, a besoin d'une science capable de mettre en évidence ce qui échappe à son œil expert et qu'elle ne peut pas identifier lors de l'examen des cadavres : la chimie s'impose et va alors acquérir une place considérable dans la détection des poisons.

Dès le début du XIX^e siècle, il y a une véritable éclosion de la toxicologie analytique grâce aux avancées de la chimie analytique. Un homme en est à l'origine : Mathieu Joseph Bonaventure Orfila (figure 2), médecin chimiste qui publie le

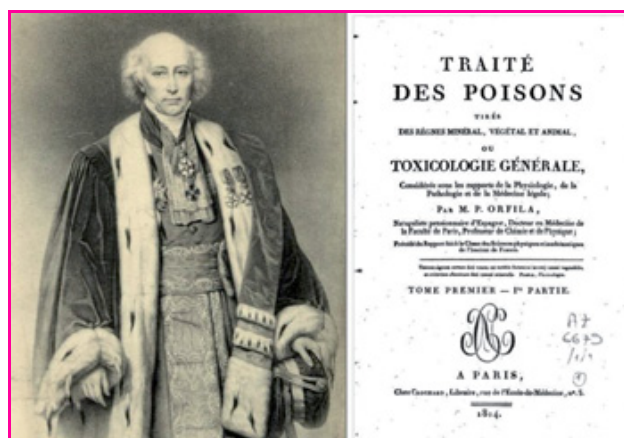


Figure 2 - Mathieu Joseph Bonaventure Orfila (1787-1853), pionnier de la toxicologie médico-légale. En 1814, il publie son « *Traité des poisons* », la principale œuvre de toxicologie de l'époque.

« *Traité des poisons* » en 1814 [3], principale œuvre de toxicologie à l'époque. Son mérite est de fonder son jugement sur la démonstration chimique de l'existence du poison dans le cadavre. C'est alors que naissent les prémises des premières techniques toxicologiques. Orfila, qui est à la fois médecin et chimiste de formation, va créer une nouvelle science grâce à l'alliance de ces deux disciplines : la toxicologie. Il est le premier à appliquer la chimie à la médecine.

En 1826, il met en garde les empoisonneurs qu'ils seront démasqués par les techniques chimiques en écrivant : « *Révolté du crime odieux de l'homicide, le chimiste perfectionne les procédés propres à constater l'empoisonnement, afin de mettre le forfait dans tout son jour, et d'éclairer le magistrat qui doit punir le coupable* » [3].

La chimie va rapidement apporter son concours à la justice grâce à un chimiste anglais, James Marsh (1794-1846), qui développe le premier appareil capable de détecter l'arsenic à faible dose dans les prélèvements biologiques de cadavre [4]. En 1832, il est le premier à prouver un empoisonnement à l'arsenic grâce à « l'appareil de Marsh » (figure 3) lors d'un procès concernant une mort par empoisonnement en Angleterre. Orfila adopte rapidement l'appareil de Marsh pour détecter des traces d'arsenic dans le sang et écrit alors : « *désormais le crime sera poursuivi avec succès jusque dans son dernier refuge* » [5]. La chimie va ainsi participer au combat contre le crime et devenir désormais le principal pilier de la toxicologie.

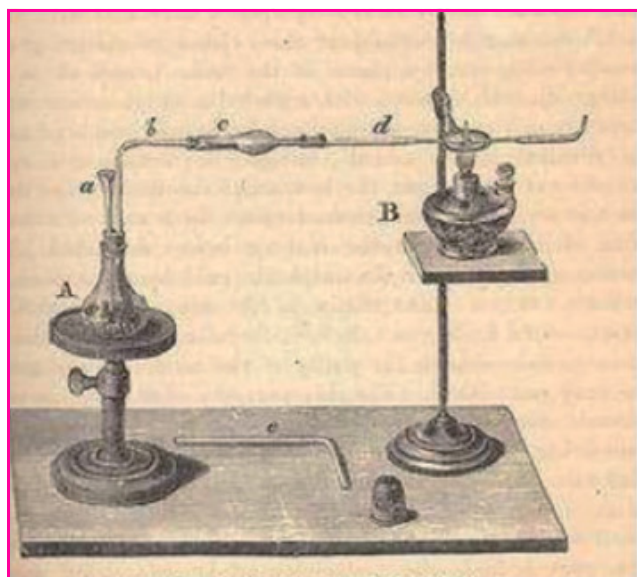


Figure 3 - Appareil de Marsh.

Principe de fonctionnement : c'est un appareil à hydrogène alimenté par du zinc et de l'acide sulfurique. En présence de substances arsenicales, il y a formation d'hydrogène arsénié (AsH_3), l'arsenic est alors libéré avec l'hydrogène et mis en évidence par action de la chaleur (décomposition à partir de $300\text{ }^\circ\text{C}$) : $\text{AsH}_3(\text{g}) \rightarrow \text{As}(\text{s}) + 3/2 \text{H}_2(\text{g})$. L'arsenic libéré se condense sous forme d'anneau métallique au-delà des parties chauffées d'un tube abducteur, la longueur du dépôt dépend de la quantité d'arsenic.

Un autre chimiste va avoir une grande importance dans l'histoire de la toxicologie : le belge Jean Servais Stas (1813-1891) qui va imaginer au cours d'une affaire judiciaire la méthode d'extraction des alcaloïdes* à laquelle son nom est resté attaché. Cette méthode est encore utilisée aujourd'hui, avec quelques modifications apportées par les chimistes Otto et Ogier [6]. Elle permet l'extraction de tous les toxiques organiques non volatils par une digestion alcool-tartrique

des viscères, suivie d'extractions étherées et chloroformique en milieu acide et alcalin. C'est au cours de l'affaire Bocarmé jugée à Mons en 1851 [7], que naît cette méthode : le chimiste a extrait et caractérisé la nicotine par ses propriétés physiques, chimiques et physiologiques. Le travail de Stas dans cette affaire a été reconnu comme un modèle de précision et le rapport qu'il livre alors aux autorités judiciaires démontre la formidable évolution des techniques d'analyse chimique (figure 1).

Dans la seconde moitié du XIX^e siècle, et tout au long du XX^e, les perfectionnements des techniques analytiques s'enchaînent et la chimie ne cesse de faire progresser l'analyse toxicologique. Il est impossible d'être exhaustif compte tenu du nombre impressionnant de techniques mises en place et du nombre d'ouvrages consacrés à la toxicologie et aux techniques de chimie analytique. Pour ne citer que quelques techniques importantes, vers 1840, Frésenius et Babo mettent en place les méthodes d'isolement des toxiques minéraux. En 1902, Denigès met au point la cyanoargentimétrie, ou méthode de Liebig-Denigès, qui permet le dosage de l'acide cyanhydrique. Il décrit aussi divers réactifs de laboratoire utiles pour l'analyse organique : le réactif méthylglyoxalique, le réactif au sulfate mercurique acide (avec la méthode chronométrique), le réactif hydrostrychnique de Malaquin-Denigès, le réactif sulfomolybdique, et la fameuse méthode de destruction nitrosulfurique [8]. Les ouvrages d'experts chimistes se succèdent également. Citons parmi eux le « *Traité de chimie toxicologique* », dont une 1^{ère} édition est rédigée en 1898 par Jules Ogier, directeur du laboratoire de toxicologie de la Préfecture de Police de Paris. Une seconde édition voit le jour 26 ans plus tard avec Émile Khon Abrest, directeur qui lui succède et écrit que désormais l'évolution des techniques permet de détecter un plus grand nombre de toxiques, car selon les statistiques du laboratoire de toxicologie en 1922, « *pour un sixième seulement des affaires l'analyse chimique n'a pas expliqué les causes de la mort* » [2].

Cette évolution est, dans la première moitié du XX^e siècle, essentiellement due à la mise en place de réactions chimiques de plus en plus spécifiques pour la caractérisation des substances organiques, des méthodes spectrométriques et des méthodes titrimétriques de dosage. La méthode de dosage de l'alcool par distillation de Cordebar en 1954 est la première méthode inscrite au *Journal Officiel* depuis 1955, et reste toujours une des deux méthodes officielles de dosage de l'alcoolémie malgré ses imperfections [9-10].

La fin du XX^e siècle marque une formidable avancée de la toxicologie analytique avec les méthodes chromatographiques, spectroscopiques et spectrométriques qui vont permettre au toxicologue de détecter des traces infimes de toxiques dans les prélèvements biologiques.

Les poisons du XX^e siècle, siècle des médicaments et de la chimie de synthèse

L'homme s'est depuis toujours tourné vers la nature pour soigner ses maux : il a extrait l'opium du pavot pour soulager la douleur et la digitaline contenue dans les feuilles de la digitale pour contrer l'insuffisance cardiaque. Toutefois, ce n'est qu'à la fin du XIX^e siècle qu'apparaît la chimie de synthèse à but thérapeutique. Dès 1885, l'acétophénétidine, antalgique* dont est dérivé le paracétamol, est le premier médicament de synthèse commercialisé. Un deuxième produit pharmaceutique important, mis sur le marché en 1897, est l'acide

acétylsalicylique (mis au point par Hoffmann), vendu sous le nom d'aspirine (« A » pour acétyl, « spir » pour acide de la spirée et « ine » pour désinence chimique), traitement antalgique efficace contre la fièvre et les douleurs rhumatismales.

De nos jours, plus de 20 000 substances toxiques, naturelles ou de synthèse, licites ou illicites, sont répertoriées. Toutes ces substances ne pouvant être développées de manière exhaustive, un choix a été fait pour la rédaction de cet article. Les psychotropes* occupent une place prépondérante en toxicologie médico-légale, représentant environ 90 % des médicaments retrouvés dans les cas d'intoxications volontaires [11]. Les benzodiazépines sont de très loin les psychotropes les plus souvent rencontrés et occupent à elles seules les principales missions d'un laboratoire de toxicologie médico-légale. Elles sont fréquemment identifiées dans le cadre d'intoxications aiguës (isolée ou polymédicamenteuse), de dépendance et toxicomanie, de troubles mnésiques et de réactions paradoxales. Elles sont donc présentes dans les situations de mort suspecte de manière directe ou indirecte, de soumission chimique, d'enfants chimiquement battus, de médecine du travail (perte de la vigilance) et lors des passages à l'acte criminel (par action désinhibitrice). Retraçons succinctement l'histoire mouvementée des benzodiazépines de 1958 à nos jours.

La découverte des benzodiazépines due au hasard et à la persévérance d'un chimiste

Jusqu'au milieu du XX^e siècle, le fonctionnement des neurotransmetteurs et des neuromédiateurs reste pratiquement inconnu, et si l'homme a réussi à soigner ses douleurs physiques, il ne sait pas encore guérir ses douleurs morales, hormis avec des substances telles que l'alcool et l'opium. C'est en 1950 que la chlorpromazine, premier psychotrope et prototype des neuroleptiques, est synthétisée dans les laboratoires Rhône-Poulenc, et est mise à la disposition des cliniciens l'année suivante. Les laboratoires se sont alors lancés dans la recherche d'autres molécules psychotropes. C'est dans ce contexte que les laboratoires Roche vont demander à Léo Sternbach, un chimiste belge exilé aux États-Unis, de travailler sur ce projet. Léo Sternbach travaille sur l'étude des quinazolines 3-oxyde, supposant ces dérivés doués d'action thérapeutique, mais aucune ne possède les effets recherchés. Randall, pharmacologue chez Roche-Nutley, poursuit son travail et s'aperçoit qu'une seule des molécules synthétisées par Sternbach possède des effets tout à fait inattendus (hypnotiques* et sédatifs) alors que toutes les autres sont pharmacologiquement inertes [12]. Sternbach découvre que cette molécule n'est pas une quinazoline 3-oxyde comme les autres mais qu'il s'agit d'une structure benzo (un cycle benzène)-diazépine (deux atomes d'azote)-azépine (hétérocycle à sept chaînons). Il comprend plus tard que la formation de ce produit est due à l'action d'une amine primaire sur le précurseur et provoque une réaction différente et inattendue de l'hétérocycle. Le chlordiazépoxyde, chef de file des benzodiazépines, est ainsi synthétisé en 1958, et commercialisé par les laboratoires Roche en 1960 sous le nom de Librium® (« se sentir libre » en latin) (figure 4). Rapidement, en 1963, sera synthétisé le diazépam, molécule qui perd sa chaîne latérale et sa fonction N-oxyde : le Valium® est né (« être vaillant » en latin) [13]. Il va connaître un succès considérable, et c'est à ce jour encore le médicament le plus vendu au monde, plus que n'importe quel autre médicament dans l'histoire, atteignant le milliard de dollars de chiffre d'affaires entre 1963 et la fin des années 70.

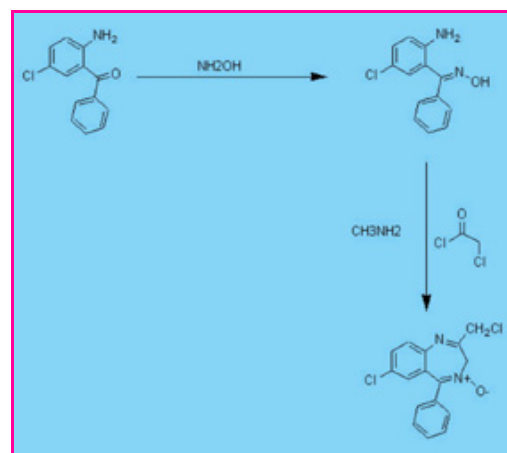


Figure 4 - Synthèse du chlordiazépoxyde.

L'action du chlorure d'acide chloracétique à de l'hydroxylamine mène à l'obtention d'un dérivé quinazoline, puis par action de la méthylamine on synthétise le 2-méthylamino-7 chloro 5-phényl-3H 1,4 benzodiazépine (chlordiazépoxyde).

Le Valium® fait l'objet de campagnes de publicité comme un produit de consommation courante ; il fut d'ailleurs popularisé par un tube des Rolling Stones en 1966 : « *Mothers Little Helper* ». Les benzodiazépines marquent un tournant dans la prise en charge des états anxieux et phobiques comme étant une référence. L'engouement pour le Valium® va provoquer une véritable crise dans les années 1970 atteignant toutes les classes de la population, les femmes au foyer étant particulièrement visées. Toutes les benzodiazépines ont une action sédatrice, anxiolytique*, myorelaxante* et anticonvulsivante*. Ces molécules ont un grand avantage en thérapeutique car elles présentent beaucoup moins d'effets secondaires que les barbituriques (induction d'une dépendance, avec syndrome de sevrage et phénomène d'accoutumance, interactions médicamenteuses nombreuses et dangereuses ; le surdosage entraîne un coma et une détresse respiratoire pouvant aboutir à la mort).

La relation entre la structure chimique des benzodiazépines et leur activité [11]

Les benzodiazépines ont une importante analogie structurale et rapidement les chimistes découvrent que cette structure permet de nombreuses substitutions et permutations, et qu'il existe une relation entre la structure chimique et l'activité des différentes benzodiazépines : les diverses substitutions sur les cycles A, B et C et l'introduction de cycles supplémentaires (figure 5) permettent de moduler l'activité des benzodiazépines.

Toutes les benzodiazépines sont substituées en 7, cette position est la plus favorable à leur activité. Plus le substituant est électronégatif, plus la molécule est douée de propriétés hypnotiques. La substitution d'un hydrogène par un chlore ou un brome (exemple : le bromazépam) confère à la benzodiazépine une activité anxiolytique plus puissante. De ce fait, la substitution en 7 du cycle benzénique conditionne la puissance et la nature de l'activité des benzodiazépines. L'alkylation de l'azote en 1 augmente l'activité hypnotique, anxiolytique, anticonvulsivante ou myorelaxante selon la molécule. L'adjonction de cycles supplémentaires est à l'origine de l'apparition des benzodiazépines de seconde génération douées de propriétés hypnotiques, les triazolo-benzodiazépines (estazolam : Nuctalon® et triazolam : Halcion®) et les imidazo-benzodiazépines (loprazolam : Havlane®). Un

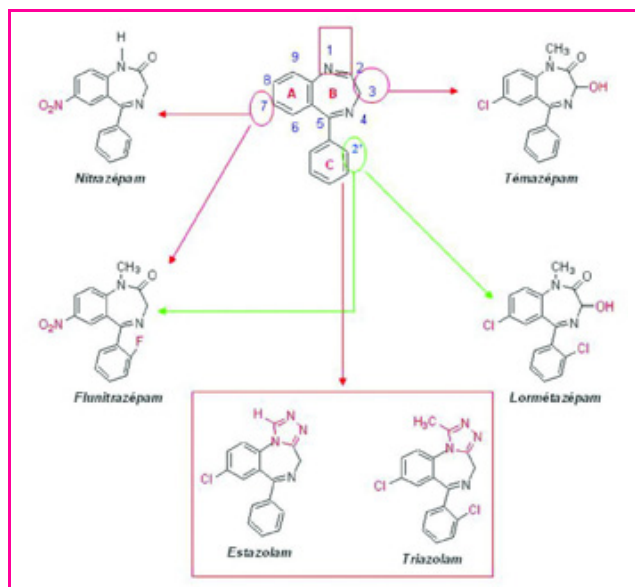


Figure 5 - Exemple de métabolisme de quelques benzodiazépines.

cycle benzénique ou un hétérocycle est indispensable à l'activité de la molécule ; plus le substituant en 2' (ortho) est électroattracteur, plus le pouvoir hypnotique de la molécule est important. La substitution d'un hydrogène par un fluor sur le cycle benzodiazépine confère aux benzodiazépines une activité hypnotique prépondérante (flunitrazépam : Rohypnol®).

Métabolisme des benzodiazépines [11]

Dans le sang, les benzodiazépines se lient massivement aux protéines plasmatiques (environ 80 %). Elles sont distribuées dans tous les tissus, principalement dans le foie et dans le système nerveux central. Elles traversent également la barrière placentaire. L'élimination se fait de façon exclusive par biotransformation hépatique puis excrétion urinaire. Les modifications métaboliques principales concernent l'élimination des substituants sur le cycle B (désalkylation oxydative en 1), l'hydroxylation en 3 et une conjugaison essentiellement à l'acide glucuronique qui inactivent les molécules. Certaines molécules sont transformées en métabolites actifs (nordazépam, oxazépam, témazépam), c'est le cas du prazépam, du clorazépate, du chlordiazépoxyde et du diazépam (figure 6). Ces métabolites participent à l'effet thérapeutique de la substance mère surtout lorsque la quantité formée est importante et quand l'élimination est relativement lente. En revanche, les composés conjugués sont inactifs.

C'est cette particularité à se transformer en métabolites actifs (cas du diazépam), et de ce fait à provoquer des effets cumulatifs, qui a poussé les laboratoires pharmaceutiques à synthétiser de nouvelles substances qui n'en auraient pas. Dans cette optique, les laboratoires synthétisent des molécules N-déméthylées et porteuses d'une fonction alcool (par exemple l'oxazépam : Seresta®), qui vont être rapidement glucuroconjuguées dans le foie, facilitant l'élimination dans les urines.

On dénombre actuellement en France vingt-deux benzodiazépines disposant d'une AMM (autorisation de mise sur le marché), notre pays détenant par ailleurs le record mondial de prescriptions de cette classe de psychotropes. Les benzodiazépines sont inscrites sur la liste IV des substances

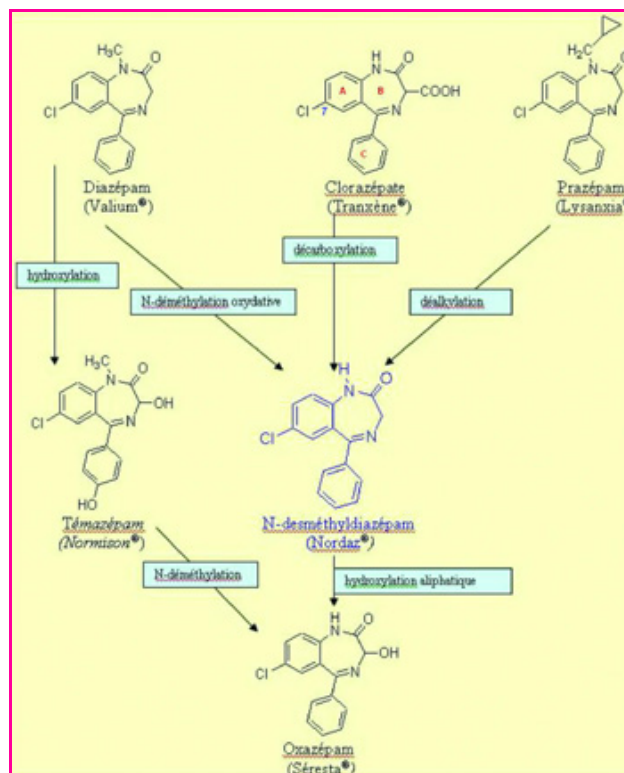


Figure 6 - Relation structure/activité des benzodiazépines, quelques substitutions possibles sur la structure de base.

psychotropes et placées sous contrôle international [14]. Elles ne peuvent donc être délivrées que sur prescription médicale. Cependant, il reste très facile de s'en faire prescrire du fait de leur efficacité reconnue, de leurs propriétés pharmacologiques, d'une réputation de faible toxicité lorsqu'elles sont utilisées seules et d'un faible coût.

Dégradation, transformation et redistribution post mortem des benzodiazépines [15]

Lors des expertises toxicologiques concernant la recherche des causes de la mort, il s'agit pour l'expert toxicologue de déterminer si la concentration qu'il mesure dans le sang de la victime correspond à la teneur réelle au moment du décès. En effet, les concentrations des benzodiazépines, comme pour de nombreux autres toxiques, peuvent subir des variations dues à des processus de dégradation, de redistribution et de transformation *post mortem*. À titre d'exemple, si l'on considère le métabolisme des nitrobenzodiazépines (clonazépam, flunitrazépam et nitrazépam) (figure 7), toutes ces substances se dégradent en métabolite 7-amino correspondant. Jusque là, le mécanisme étant connu, cela peut paraître simple car la présence d'une quantité de métabolites plus importante que la substance mère signifierait que le produit a été administré plusieurs heures avant, et n'est pas directement responsable de la mort. Cependant, une telle interprétation négligerait la dégradation de ces molécules dans les prélèvements autopsiques et leur transformation *post mortem* qui peuvent induire en erreur l'interprétation du toxicologue. En effet, pour ces molécules, il y a une diminution de la concentration de la molécule mère entre le sang prélevé lors du décès et celui du prélèvement autopsique : les nitrobenzodiazépines se transformeraient

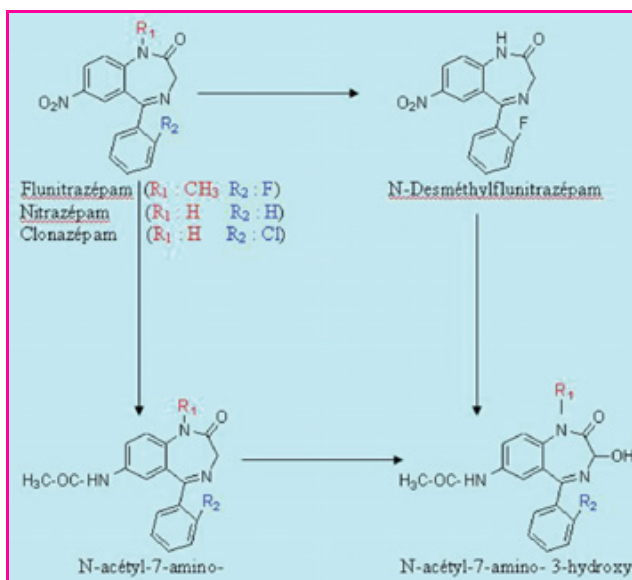


Figure 7 - Métabolisme des nitrobenzodiazépines.

en métabolite 7-amino correspondant pendant l'intervalle *post mortem* (entre le décès et le prélèvement des échantillons lors de l'autopsie). De plus, les nitrobenzodiazépines sont des molécules très instables dans les échantillons d'autopsie. Il a été observé par certains auteurs une disparition presque totale du flunitrazépam en un jour si l'échantillon est conservé à température ambiante. Cette dégradation est due à des bactéries réductrices présentes dans le prélèvement qui provoquent une transformation des nitrobenzodiazépines en métabolite 7-amino correspondant. Cette réaction bactérienne peut être inhibée en congelant de suite le prélèvement.

En somme, pour s'assurer le maximum de fiabilité, il est indispensable d'effectuer un prélèvement de sang périphérique rapidement après le décès, de conserver les prélèvements à - 20 °C et de les analyser très rapidement. Or il est difficile pour le toxicologue de maîtriser toute cette chaîne car souvent la victime ne va pas être retrouvée immédiatement, mais plusieurs heures, voire quelques jours après son décès.

Benzodiazépines et intoxications médicamenteuses

Les benzodiazépines sont en France la première cause d'intoxication aiguë chez l'adulte. Au sein du laboratoire de toxicologie de Paris (Institut National de Police Scientifique), les benzodiazépines sont toujours fréquemment détectées dans les expertises réalisées dans le cadre de mort suspecte (art. 74 du code de procédure pénale). Entre 2006 et 2008,

elles ont été détectées dans 32 % des affaires de mort suspecte, le bromazépam (figure 8) étant la molécule la plus fréquemment rencontrée (7 % des cas à dose toxique).

La mort est rarement due à l'action d'une benzodiazépine seule et est le plus souvent provoquée par l'association de la benzodiazépine avec l'alcool ou d'autres médicaments

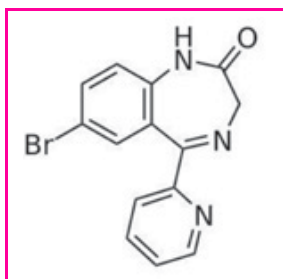


Figure 8 - Le bromazépam.

(figure 9). Notre propre expérience de 1997 à 2008 nous a conduits à détecter le bromazépam dans 122 décès médico-légaux. Il n'était jamais seul et des teneurs toxiques nettement supérieures aux fourchettes thérapeutiques (> 200 ng/mL) ont été trouvées dans seulement 38 cas dont 14 entre 1,2 et 5,9 µg/mL. Dans les 84 autres cas, les concentrations étaient thérapeutiques.

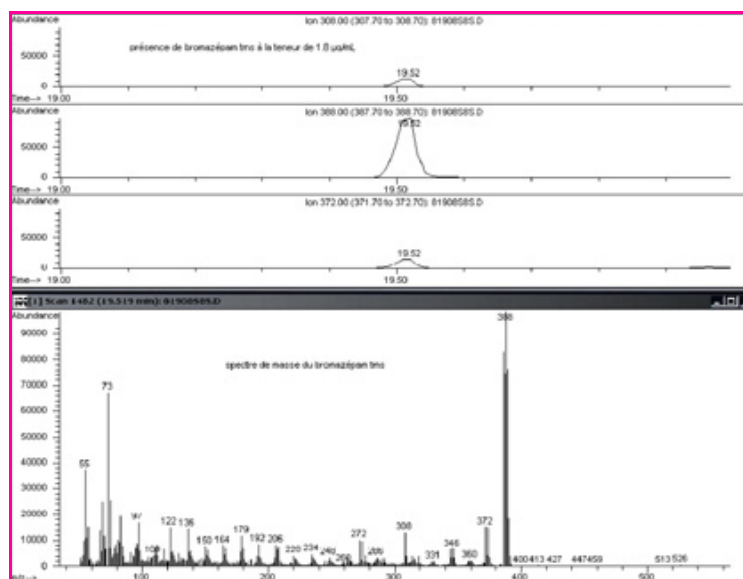


Figure 9 - Chromatogramme (CPG/SM) et spectre de masse d'un extrait sanguin prélevé chez une femme de 47 ans décédée d'une intoxication aiguë au bromazépam associée à une alcoolémie de 1,8 g/L.

Les techniques chromatographiques actuelles telles que la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, ou la chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrettes de diodes ou à la spectrométrie de masse, ne posent aucun problème pour identifier des intoxications aux benzodiazépines.

Benzodiazépines, réactions paradoxales et passage à l'acte criminel [16]

Les benzodiazépines sont connues pour leur potentiel désinhibiteur et favorisant des réactions paradoxales avec survenue d'états d'excitation, d'irritabilité, d'agressivité extrême pouvant entraîner un passage vers un acte criminel. Ces épisodes s'accompagnent souvent d'une amnésie antérograde* totale ou quasi totale. Si certaines molécules sont plus fréquemment concernées (flunitrazépam, clonazépate, diazépam ou alprazolam), toutes peuvent présenter cette potentialité en fonction de leurs propriétés pharmacologiques, des produits associés et du contexte psychologique. Elles peuvent à la fois causer ou aggraver la dépression d'un patient dépressif possiblement en réduisant la production cérébrale des neurotransmetteurs tels que la sérotonine et la norépinéphrine.

Pour exemple, une affaire judiciaire en 2006 nous a amené à analyser le prélèvement sanguin d'un homme qui avait tué un ami suite à un coup de folie qu'il n'a pas su expliquer lors de son procès ; de plus il n'avait aucun souvenir du meurtre qu'il avait commis. L'examen toxicologique sur le prélèvement sanguin du coupable mis en cause réalisé deux heures après les faits a révélé la présence d'éthanol (2,5 g/L), de diazépam (1,6 µg/mL), de nordazépam (0,75 µg/mL) et d'oxazépam (0,03 µg/mL).

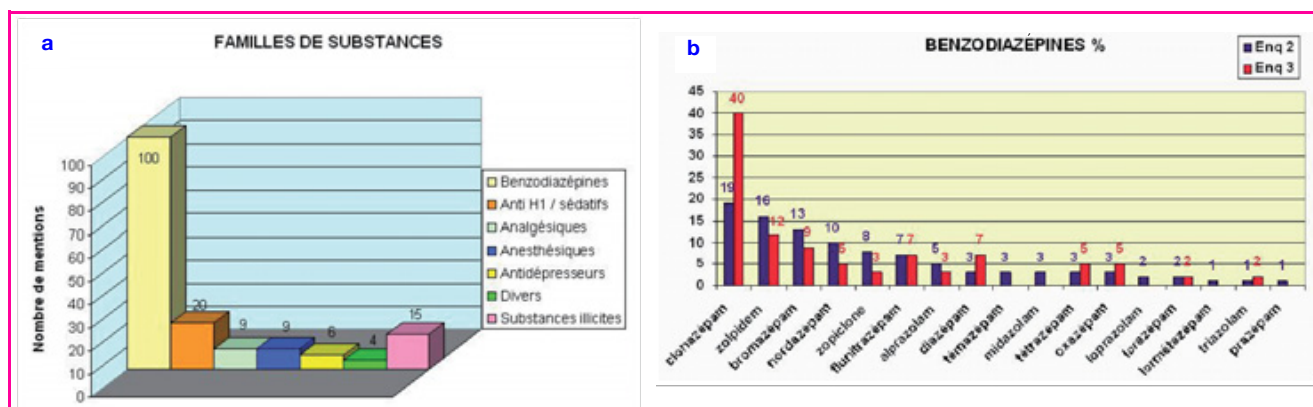


Figure 10 - CEIP de Paris, Résultats de l'enquête sur la soumission chimique 2003-2005 (a) et 2007 (b), Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé.

Pour l'enquête (a), on dénombre 100 mentions d'identification de benzodiazépines chez 82 victimes [17].

Pour l'enquête (b), comme en 2006 (« enquête 2 »), les benzodiazépines sont les substances les plus souvent identifiées, avec une prédominance pour le clonazépam [18].

Benzodiazépines et soumission chimique

La soumission chimique, agression en nette croissance ces dernières années, peut être considérée comme le crime d'empoisonnement du XXI^e siècle car il relève souvent de la cour d'assises.

Le terme de « soumission chimique » apparaît en 1983 et se définit comme « l'administration à des fins criminelles ou délictuelles d'un ou de plusieurs produits psychoactifs à l'insu de la victime ou sous la menace. » Les substances recherchées par l'agresseur doivent être douées de propriétés sédatives, être solubles, à demi-vie courte et facilement accessibles. La soumission chimique fait intervenir l'agresseur, la victime et la substance psychoactive. L'agresseur peut éventuellement créer un environnement psychologique favorable à son acte. Sous l'effet chimique, les différentes capacités cognitives de la victime (sa mémoire, ses capacités d'éveil, d'attention et de réponse à une agression) vont être perturbées. Le GHB (acide gamma hydroxy butyrique ou acide 4-hydroxybutanoïque), communément appelé « drogue du viol », est la substance la plus souvent associée à la soumission chimique selon les médias. Cependant, les analyses toxicologiques médico-légales montrent qu'en fait ces agressions sexuelles ne sont liées que très rarement à l'utilisation du GHB. En effet, les benzodiazépines sont les substances les plus fréquemment rencontrées dans les cas de soumission chimique [17] (figure 10a), car elles possèdent des effets prisés chez les agresseurs : elles ont une action rapide et à faible dose, sont inodores et incolores, et de plus elles provoquent amnésie antérograde, sédation et effet hypnotique. Par ailleurs, ces molécules, contrairement au GHB, n'étant pas classées comme stupéfiants, il n'est pas interdit de se déplacer en leur possession et il est très facile de s'en faire prescrire ou d'en trouver dans son entourage. Le clonazépam (principe actif de la spécialité Rivotril[®]) est la substance la plus fréquemment identifiée dans les cas de soumission chimique [18] (figure 10b). Ceci peut être dû au fait que cette benzodiazépine existe sous forme buvable ou qu'elle se dégrade rapidement comme toutes les nitrobenzodiazépines.

Dans les cas de soumission chimique aux benzodiazépines, le toxicologue va se trouver confronté à divers problèmes : d'une part les victimes portent souvent plainte longtemps après les faits (plusieurs jours, voire plusieurs mois

dans certains cas) et la substance a disparu des prélèvements biologiques tels que le sang ou l'urine ; d'autre part les analyses médico-légales sur le sang et l'urine sont dans l'impossibilité de faire clairement la part entre les produits ajoutés subrepticement aux boissons et l'utilisation délibérée ou sur prescription de benzodiazépines.

Afin de résoudre ce problème, l'expert a recours à une autre matrice biologique : le cheveu. En effet, l'analyse des cheveux pourra d'une part différencier une utilisation à long terme d'une ingestion unique, et permettra d'autre part de révéler la présence d'une substance plusieurs mois après les faits.

Ces dernières années, les cheveux sont devenus une matrice biologique d'un intérêt majeur dans l'expertise toxicologique [19]. La présence des xénobiotiques* s'y expliquerait par une diffusion interne des substances du sang vers les cellules en croissance des bulbes et une diffusion externe à partir des sécrétions sébacées [20]. Les toxiques vont se trouver piégés dans les cellules en croissance et avancer le long du cheveu au fur et à mesure de sa croissance (figure 11). Le cheveu présente plusieurs intérêts pour le toxicologue : ce milieu est reconnu par la justice, le prélèvement est non invasif et un deuxième prélèvement est toujours possible. Il permet de détecter des substances longtemps après les faits et de distinguer une exposition unique d'une exposition chronique. L'analyse des cheveux est également utilisée pour la restitution du permis de conduire dans le cadre de la criminalité routière.

Il est cependant nécessaire que le laboratoire de toxicologie soit équipé de techniques ultraperformantes et très sensibles, telles que la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CPG/SM/SM) ou la chromatographie liquide haute performance



Figure 11 - Incorporation des xénobiotiques dans le cheveu. © 2008 Psychemedics Corporation.

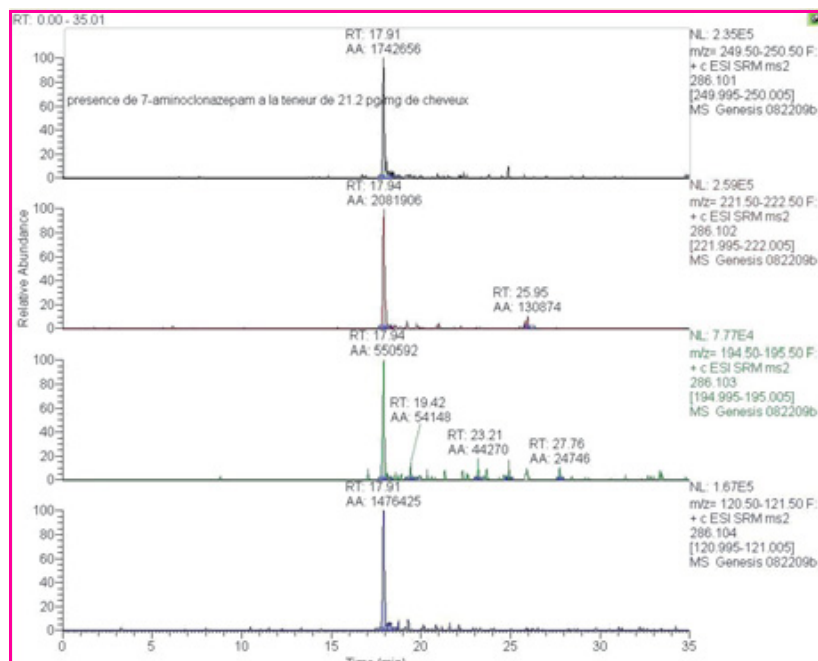


Figure 12 - Chromatogramme d'un extrait capillaire d'une jeune femme de 18 ans victime de violence sexuelle. Le 7-aminoclonazépam a été identifié sur un seul segment correspondant à la date des faits.

couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CLHP/SM/SM) [21], car il s'agit dans ce cas de détecter des picogrammes de substances par milligramme de cheveux (figure 12).

Une autre difficulté que l'on peut considérer dans le cadre de la soumission chimique concerne le GHB qui pose des problèmes car c'est une substance endogène, c'est-à-dire naturellement présente dans l'organisme, et qui disparaît très vite des prélèvements sanguins et urinaires pour atteindre des taux physiologiques au bout de 4-5 heures. Dans ce cas, il n'est donc plus question de chercher à descendre très bas en quantification, mais de pouvoir contrer les criminels en détectant ces substances qui se dégradent rapidement : se fixer des seuils endogènes (cependant, il n'existe pas encore de consensus parfait sur ce point dans la communauté des experts toxicologues), et trouver de nouvelles techniques. Récemment, de nouvelles études ont montré la possibilité de distinguer le GHB endogène du GHB exogène par une mesure du rapport isotopique $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ par une technique de spectrométrie de masse de rapport isotopique couplée à la chromatographie gazeuse (CPG/IRMS) [22], technique encore inexistante dans la plupart des laboratoires de toxicologie. Ce couplage offre une belle perspective d'avenir.

Actuellement, l'expert toxicologue doit être en mesure de pouvoir détecter à des doses infimes, une multitude de substances potentiellement toxiques. Plus que jamais la citation de Paracelse s'applique car toutes les substances, qu'elles soient licites ou illicites, naturelles ou de synthèse, peuvent être la cause directe ou indirecte des intoxications. Les intoxications actuelles sont complexes, bien loin des simples arsenic et cyanure, et il faut tenir compte d'interactions, d'effets paradoxaux, de dégradation, de redistribution *post mortem*, de dose, le tout avec des substances ayant des propriétés physico-chimiques très différentes. Le toxicologue doit plus que jamais avoir des connaissances multidisciplinaires en chimie, biochimie, pharmacologie,

pharmacocinétique et médecine légale et être équipé de techniques analytiques extrêmement sophistiquées.

Les techniques d'analyse actuelles indispensables en toxicologie médico-légale

Actuellement, l'expert toxicologue doit disposer d'un parc analytique performant afin de détecter toutes les molécules impliquées dans les affaires judiciaires. Pour être le plus exhaustif possible dans ses analyses, les techniques analytiques suivantes sont requises :

- chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse avec introduction par espace de tête (ETS/CPG/SM) pour les substances volatiles comme certains anesthésiques volatils, l'hydrate de chloral ;
- chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) pour les stupéfiants ou les médicaments dans le sang et les urines ;
- chromatographie en phase liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP/SM) pour les hypnotiques comme le zolpidem, la zopiclone et les benzodiazépines ou le LSD dans le sang et les urines ;
- chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CPG/SM/SM) pour le GHB et les cannabinoïdes dans les cheveux ;
- chromatographie en phase liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CLHP/SM/SM) pour les analyses de psychotropes dans les cheveux, le sang et les urines lorsque le prélèvement est tardif ;
- plasma à couplage inductif couplé à la spectrométrie de masse (ICP/SM) pour l'analyse rapide de la quasi totalité des éléments du tableau périodique (dont les plus toxiques : thallium, arsenic, lithium, mercure...) avec des limites de détection extrêmement faibles.

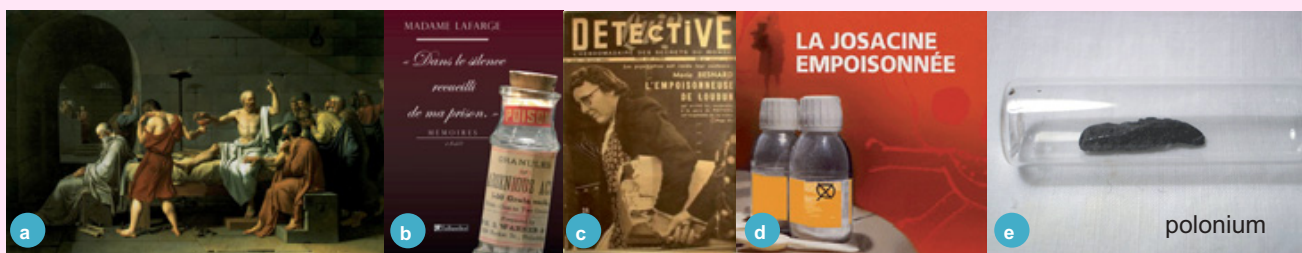
Conclusion

Dans les années 1950, on mesurait des milligrammes de toxiques dans les prélèvements biologiques ; puis grâce aux prouesses technologiques de la chimie analytique, on est progressivement descendu du microgramme au nanogramme puis au picogramme en pratique presque courante. Les progrès de la chimie analytique ont grandement profité depuis une vingtaine d'années à la toxicologie médico-légale, à la fois dans le cadre de la recherche des causes de la mort et dans celui très délicat de la soumission chimique.

En 1925, Edmond Locard, alors chef du Laboratoire de police technique de Lyon, précisait : « Vers 1840, on empoisonnait encore beaucoup. De nos jours, ce crime est beaucoup plus rare. Peut-être faut-il admettre que les progrès de la toxicologie en sont la cause, mais c'est une mode qui a passé quitte à revenir » [23]. Nous pouvons constater qu'il était bien avisé car effectivement ce crime revient, certes sous une autre forme (voir encadré), mais la soumission chimique peut véritablement être considérée comme le crime d'empoisonnement moderne et elle pousse l'expert toxicologue à s'équiper de technologies ultrasensibles afin de rechercher l'indétectable [24].

Quelques empoisonnements et empoisonneurs célèbres

- 399 avant J.-C. :** Socrate condamné à mort a bu une décoction à base de ciguë (a)
- 1450 :** Agnès Sorel meurt d'un empoisonnement au mercure
- 1666 :** La marquise de Brinvilliers empoisonne son père, ses frères et sa sœur (vraisemblablement à la poudre de Succession : mélange d'arsenic et de sublimé corrosif)
- 1672-1680 :** Catherine Deshayes, dite La Voisin, est mêlée à l'affaire des poisons. Elle aurait agi pour le compte de Mme de Montespan
- 1840 :** Marie Lafarge est accusée d'avoir empoisonné son époux à l'arsenic. Condamnée en 1840 aux travaux forcés à perpétuité, elle fut libérée mais cette affaire demeure une énigme judiciaire (b)
- 1851 :** Hélène Jegado est condamnée à mort à Rennes pour trois meurtres et trois tentatives. Elle était soupçonnée de 36 empoisonnements à l'arsenic
- 1902 :** Mort d'Émile Zola, intoxiqué au monoxyde de carbone. Accident ou meurtre ? Sa mort n'a cessé de soulever des controverses
- 1916 :** Empoisonnement raté de Raspoutine, le cyanure avait été incorporé dans une pâte à gâteau qui fut cuite : la chaleur entraîna une réaction chimique de complexation entre le cyanure et le sucre qui le rendit inactif pendant quelques temps et ralentit fortement son effet
- 1949 :** Marie Besnard, surnommée « La bonne dame de Loudun », est accusée d'avoir empoisonné douze personnes à l'arsenic dans un but purement successoral et financier (c)
- 1954 :** Alan Mathison Turing, mathématicien britannique, meurt empoisonné en mangeant une pomme au cyanure (suicide)
- 1978 :** Georgi Markov, dissident bulgare, meurt à Londres victime de la technique du « parapluie bulgare » : une intoxication à la ricine
- 1994 :** « L'affaire de la Josacine empoisonnée » : empoisonnement au cyanure d'Émilie Tanay, 8 ans (d)
- 2003 :** Premier procès mettant en cause le GHB ou « drogue du viol » au tribunal correctionnel de Bobigny
- 2004 :** Munir Said Thalib, défenseur indonésien des droits de l'homme, meurt d'une intoxication à l'arsenic
- 2004 :** Viktor Iouchtchenko, futur président de la République d'Ukraine, est victime d'un empoisonnement à la dioxine pendant les élections présidentielles
- 2006 :** Alexandre Litvinenko, ex-espion russe émigré en Angleterre, meurt d'un empoisonnement au polonium 210 (e)



Références

- [1] Fleury J., *L'affaire des poisons de 1679-1682 à l'origine de la réglementation relative aux substances vénéneuses*, Histoire de la pharmacie - Paris XI, **2005** (téléchargeable librement sur www.ordre.pharmacien.fr/upload/Syntheses/185.pdf).
- [2] Ogier J., Kohn Abrest E., *Traité de chimie toxicologique*, 2^e éd., Gaston Doin, Paris, **1924**.
- [3] Orfila M., *Traité des poisons tirés des règnes minéral, végétal et animal ou toxicologie générale considérée sous les rapports de la physiologie, de la pathologie et de la médecine générale*, Crochard, Paris, **1814**.
- [4] Marsh J., Account of a method of separating small quantities of arsenic from substances with which it may be mixed, *The Edinburgh Philosophical Journal*, **1836**, 21, p. 229.
- [5] Orfila M., *Mémoires sur l'empoisonnement*, Crochard, Paris, **1840**, p. 375-567.
- [6] Khon Abrest E., *Précis de toxicologie*, Gaston Doin, Paris, **1948**, p. 293-304.
- [7] Haquin R., Stéphany P., *Les grands dossiers criminels en Belgique*, Éditions Racine, **2005**.
- [8] Devaux G., Georges Denigès (1859-1951). Quelques aspects de son œuvre en chimie analytique, *RHP*, **2002**, L, 336, p. 717-72.
- [9] Beljean-Leymarie M., Dubost J.-P., Galliot-Guilley M., *Chimie analytique - Chimie des solutions*, **2006**, Masson, p. 90.
- [10] Ricordel I., Pailler P.M., Baquet C., Warnet J.M., Le point analytique en matière d'alcoolémie, *Bulletin de la Société Française d'Alcoolologie*, **1990**, 12(3), p. 114.
- [11] Tracqui A., Ludes B., Médicaments psychotropes, in *Pharmacologie médico-légale*, P. Kintz (ed.), Elsevier, **1998**, p. 234-241.
- [12] Sternbach L., The benzodiazepine story, *J. Med. Chem.*, **1979**, 22, p. 1.
- [13] Depovere P., *La fabuleuse histoire des bâtisseurs de la chimie moderne*, De Boeck Université, **2008**, p. 81-83.
- [14] *Liste des substances psychotropes placées sous contrôle international*, 23^e éd., Organe International de Contrôle des Stupéfiants, **2003**, www.incb.org
- [15] Pépin G., Dubourvieux N., Gaillard Y., Difficulté d'interprétation des taux des benzodiazépines et molécules apparentées dans le sang de cadavre prélevé à l'autopsie : étude de leur dégradation *in vitro* après conservation pendant 6 mois à différentes températures, *Journal de Médecine Légale Droit Médical*, **1998**, 41(5), p. 341.
- [16] Michel L., Lang J.-P., Benzodiazépines et passage à l'acte criminel, *L'encéphale*, **2003**, 29(6), p. 479.
- [17] *Soumission chimique - Résultats de l'enquête nationale 2003-2005*, Centre d'Évaluation et d'Information sur la Pharmacodépendance de Paris - Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, juin **2005**.
- [18] *Soumission chimique - Résultats de l'enquête nationale 2007*, Centre d'Évaluation et d'Information sur la Pharmacodépendance de Paris - Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, nov. **2008**.
- [19] Kintz P., Villain M., Cirimele V., Hair and drug-facilitated crimes, *Bulletin of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT)*, **2005**, XXXV(2), p. 42.
- [20] Cirimele V., Incorporation des xénobiotiques dans les cheveux, *Revue Françaises des Laboratoires*, **1996**, 282, p. 31.
- [21] Villain M., Cirimele V., Kintz P., Soumission chimique. Recherche de benzodiazépines et hypnotiques dans les cheveux par LC-MS/MS, *Annales de Toxicologie Analytique*, **2005**, XVII(1), p. 33.
- [22] Saudan C., Augsburg M., Mangin P., Sauguy M., Carbon isotopic ratio analysis by GC/IRMS for the detection of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) administration to humans, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2007**, 21, p. 3956.
- [23] Locard E., *Le crime et les criminels*, La Renaissance du Livre, Paris, **1925**, p. 234-238.
- [24] Kintz P., Soumission chimique, à la recherche de l'indélectable, *Spectra Biologie*, **2006**, 156, p. 42.



N. Milan

Nathalie Milan (auteur correspondant) est chef de la section toxicologie et **Ericka Disa** est ingénieur en toxicologie au Laboratoire de Toxicologie de Paris de l'INPS*.



E. Disa

* Laboratoire de Toxicologie de Paris, Institut National de Police Scientifique, 2 place Mazas, F-75012 Paris.
Courriels : nathalie.milan@interieur.gouv.fr,
ericka.disa@interieur.gouv.fr