

Toxicologie médico-légale

Introduction :

Mort par overdose ou par empoisonnement ? Conduite automobile sous l'emprise de l'alcool ou de stupéfiants ? Soumission médicamenteuse au cours de viols ? Inhalation de gaz au cours d'un incendie ?

La toxicologie, revêt une importance capitale, en médecine légale notamment. Cette science, consacrée à l'étude des poisons ou toxines, a fait des progrès considérables avec l'introduction de techniques tels que la spectrométrie de masse ou de la chromatographie en phase gazeuse.

Avant tout, un examen toxicologique peut être pratiqué pour rechercher les causes toxiques de la mort, à partir des prélèvements biologiques réalisés par le médecin légiste au cours de l'autopsie, et à partir des poudres, des liquides voire des aliments prélevés. Les analyses toxicologiques consistent à rechercher des traces de poisons mortels, de toxiques divers, de produits stupéfiants responsables de l'intoxication criminelle présumée d'une victime. Présentée comme l'examen complémentaire ayant le meilleur rendement diagnostique après une autopsie, la toxicologie médico-légale (en particulier dans le cadre de la recherche des causes de la mort) a bénéficié ces dernières années des progrès immenses de la science analytique.

Si dans les cas de mort violente (traumatique ou instrumentale) l'autopsie est la plupart du temps diagnostique, il n'en n'est pas de même en cas de mort toxique où en général, un syndrome asphyxique (ou plutôt agonique) non spécifique est le seul élément probant.

De même, l'accroissement de demandes d'expertises toxicologiques chez le vivant (conduite automobile sous influence, dopage, soumission chimique ...) rend nécessaire une démarche constante vers l'amélioration du rendu des résultats et donc de leur interprétation en tenant compte de l'ensemble des données médico-légales.

Plan :

I) principe

a) utilisation de la toxicologie pour déterminer la cause de la mort

1) Prélèvements

2) Analyses

b) autre utilisation de la toxicologie

II) méthode

a) techniques chromatographiques

1) la chromatographie sur couche mince

2) la chromatographie en phase gazeuse

3) la chromatographie en phase liquide

b) techniques spectrométriques

c) quels matériels pour quelles analyses ?

III) limites

a) qualité de l'échantillon

b) performance des équipements analytiques

Conclusion :

L'analyse toxicologique ne peut pas se suffire à elle seule, mais repose sur une base associant anamnèse, constatations cliniques ou autopsiques et savoir-faire de laboratoire. Elle comprend un arsenal de techniques sophistiquées, consistant à rechercher des traces de poisons mortels, de toxiques divers de produits stupéfiants responsables de l'intoxication criminelle présumée d'une victime et cela dans des cas d'agression sexuelle, de meurtre, de mort suspecte, ou de conduite en état d'ivresse. Cette science occupe une place capitale dans la médecine légale et joue un rôle très important au sein de la police scientifique, les techniques évoluant chaque jours...

I) Principe

a) Utilisation de la toxicologie pour déterminer la cause de la mort

1) Prélèvements

La pratique de l'expertise médico-légale nous a permis de distinguer 2 types de prélèvements à visée toxicologique, des prélèvements obligatoires et facultatifs (à recueillir lorsque certains prélèvements obligatoires sont manquants ou qu'il peut y avoir un intérêt scientifique).

Les principaux prélèvements biologiques toxicologiques ou autopsiques sont récapitulés dans le tableau ci-après.

Tableau 1- les divers types de prélèvements

Liquides biologiques		Phanères et éléments pileux	Viscères
Sang	Liquide Tache	Cheveux	Poumons
Sécrétion spermatique	Liquide Tache	Cils	Cœur
Sécrétion vaginale	Liquide Tache	Sourcils	Reins
Salive	Liquide Tache	Poils de barbe	Rate
Sueur	Liquide Tache	Poils du corps	Foie
Urine	Liquide Tache	Poils du pubis	Estomac
Contenu gastrique	Liquide	Ongles	Intestins
Humeur vitrée	Gel	Dent (émail, dentine)	Tissus foetus

Les prélèvements obligatoires sont au nombre de sept :

- sang cardiaque
- sang périphérique
- urines
- humeur vitrée
- cheveux
- contenu gastrique
- poumon

En cas de levée de corps, seuls les 5 premiers prélèvements sont disponibles.

Les prélèvements alternatifs sont la bile, les viscères, les écouvillons naso-pharyngés et les liquides de putréfaction. En 2003, l'intérêt toxicologique des larves d'insectes a considérablement diminué.

Sang

Le sang est la matrice biologique la plus importante pour le toxicologue. Les résultats quantitatifs pourront permettre une interprétation quand au niveau d'imprégnation du sujet pour un xénobiotique donné et donc d'apprécier son imputabilité sur la survenue du décès. En absence de sang, le toxicologue ne devrait pas conclure sur le rôle de tel ou tel produit. Du

fait de la redistribution post-mortem, il est impératif de recueillir du sang cardiaque (disponible en grande quantité pour les analyses qualitatives) et du sang périphérique (seuls quelques millilitres sont disponibles pour les dosages quantitatifs sur lesquels portera l'interprétation). En pratique, le prélèvement fémoral apparaît comme le plus facile et le plus productif.

De façon générale, les échantillons de sang seront stockés dans des tubes secs et surtout étanches.

Urines

L'urine est généralement présente en quantité importante. La vessie se comportant comme un réservoir, les informations obtenues par analyse d'urines sont du type incrémental, sans aucune corrélation avec une éventuelle toxicité des produits identifiés (fenêtre de détection de l'ordre de 2 à 5 jours après l'exposition).

Le prélèvement (2 fois 30-50 ml) doit être fait par ponction vésicale à la seringue, puis recueilli dans un flacon étanche, de préférence en plastique, sans conservateur.

Humeur vitrée

Après la mort, le vitré se liquéfie rapidement et peut être prélevé à la seringue pendant 2 à 4 jours. Ce milieu présente un double intérêt en médecine légale : estimation du délai post mortem par analyse du K⁺ et confirmation de l'alcoolémie, liée à un grand pouvoir discriminatoire (pas ou très peu de formation post-mortem d'éthanol dans le vitré).

Le prélèvement de 1 à 2 ml se conserve dans des tubes Eppendorff.

Cheveux

La fenêtre de détection des xénobiotiques a pu être complètement modifiée par l'introduction du cheveu dans l'arsenal analytique. Ce tissu possède la propriété unique d'être le marqueur des expositions répétées ou chroniques, permettant en outre d'établir le profil de consommation à long terme et son évolution. Dans la pratique, l'analyse sanguine ou urinaire et l'analyse des cheveux s'avèrent plutôt complémentaires, le sang ou les urines permettant de caractériser un usage ponctuel et les cheveux une exposition cumulée.

Les cheveux sont généralement prélevés en vertex postérieur. Une mèche de 80 cheveux (diamètre d'un crayon à papier) est suffisante. Les mèches doivent être prélevées le plus près de la peau, coupée au ciseau (ne pas arracher) et orientée racine extrémité au moyen d'une cordelette, fixée 1 cm au dessus du niveau de la racine. La conservation est aisée; elle s'effectue en tube sec ou dans une enveloppe, à température ambiante.

Contenu gastrique

Ce milieu permet d'objectiver la voie d'introduction du toxique dans l'organisme. Des concentrations massives dans le contenu gastrique sont très en faveur d'une administration orale. Des concentrations importantes peuvent également s'observer lors d'une administration intra-nasale (héroïne, cocaïne ...). L'analyse du contenu gastrique permet parfois de retrouver des fragments de médicament(s) ou de débris de végétaux. Le prélèvement est à faire à la louche ou à la cuillère. Un volume de 30 à 50 ml est recueilli sur flacon plastique sec, sans conservateur. Le volume total du contenu gastrique est à noter, ainsi que toute odeur particulière. L'analyse des débris alimentaires afin d'estimer le délai post-mortem est particulièrement hasardeuse.

Poumon

En cas de décès rapide par inhalation de substance volatile (gaz lacrymogène, gaz suffocant...), la distribution du xénobiotique dans la circulation sanguine peut être incomplète. Dans ces conditions, le tissu pulmonaire, qui est la voie d'introduction du toxique volatil dans l'organisme, apparaît comme très enrichi et permet alors d'évaluer l'incidence de l'exposition sur la survenue du décès.

Quelle que soit la nature des prélèvements, ils doivent faire l'objet d'un protocole particulier concernant : l'étiquetage, les conditions de conservation et, éventuellement, la destruction. Il convient, et surtout dans le cadre des affaires criminelles, de faire les prélèvements en double (éventuelle contre-expertise). Même si ce n'est pas la règle en pratique, ces échantillons devraient être scellés, puis immédiatement conservés au froid (+ 4 °C ou - 20 °C), à l'exclusion des cheveux qui seront conservés au sec, à température ambiante.

2) Analyses

Les analyses toxicologiques consistent à rechercher des traces de poisons mortels, de toxiques divers, de produits stupéfiants responsables de l'intoxication criminelle présumée d'une victime. Depuis quelques années, certains laboratoires de toxicologie sont agréés pour le dépistage des substances dopantes utilisées par les sportifs de haut niveau.

Les poisons et les gaz mortels

Les poisons dits mortels sont ceux dont l'administration est capable d'interrompre rapidement les fonctions vitales conduisant à la mort, et dont voici trois classiques :

-La strychnine.

La strychnine est un des alcaloïdes végétaux tiré de la noix vomique avec la brucine. C'est un poison très violent qui possède une action rapide en provoquant des crises rappelant celles du tétanos. D'un goût amer, sa présence est parfois difficilement décelable lorsqu'il est absorbé sous formes de sels : arséniate, sulfate et nitrate de strychnine. Ce produit est utilisé à très faible dose par certains sportifs qui, par son effet sur le système nerveux central, provoque un recul de la sensation de fatigue.

-L'arsenic.

L'arsenic est un corps simple que l'on trouve dans la nature à l'état natif ou combiné à du soufre. C'est en général l'anhydride arsénieux (mort-aux-rats) qui est à l'origine des empoisonnement criminels. La dose létale 50 est de 0.6 mg/ kg de poids vif. Inodore et sans saveur, l'action toxique est progressive, elle commence par des troubles gastro-intestinaux accompagnés de vomissements colorés, diarrhée séreuse, céphalée, et enfin vient la mort. L'arsenic n'est pas éliminé et se concentre dans les phanères (cheveux). Sa détection analytique ne pose aucun problème, par voie chimique mais surtout par chromatographie gazeuse.

-Le cyanure.

L'acide cyanhydrique pur est le type du poison foudroyant, qu'il soit inhalé par voie respiratoire ou absorbé par voie digestive, cas des cyanure alcalins : cyanure de sodium mais surtout cyanure de potassium (cas des intoxications criminelles). Les cyanures ont une action rapide car ils se transforment dans l'estomac en acide cyanhydrique au contact de l'acide chlorhydrique du suc gastrique. L'intoxication par le cyanure peut être décelée immédiatement après la mort par l'odeur d'amande amère qui se dégage et par l'apparition des taches roses sur la peau. Le diagnostic peut être confirmé par une analyse par spectrométrie de masse. Enfin, sur le plan histologique, des traces persistent dans la rate.

-Les gaz mortels.

Il existe de nombreuses intoxications par des gaz mortels. La plus répandue est l'intoxication par l'oxyde de carbone (CO) ou intoxication oxycarbonée. Elle est généralement d'origine accidentelle ou volontaire (tentative de suicide) mais elle peut également provenir d'un acte de malveillance. L'intoxication oxycarbonée est due à l'inhalation plus ou moins prolongée de monoxyde de carbone (CO), gaz inodore dont la toxicité réside dans le fait que l'hémoglobine

(chromoprotéine ferreuse) est capable de fixer une molécule gramme d'oxyde de carbone par atome de fer, ce qui représente une affinité d'environ 230 fois supérieure à celle de l'oxygène. Il se forme un composé stable, la carboxyhémoglobine, qui bloque le transport de l'oxygène sanguin.

D'une manière générale, la gravité de l'intoxication par gaz ou vapeurs nocives est fonction de la concentration dans l'air et de la durée d'inhalation dont voici quelques exemples :

Tableau 2 - Toxicité chez l'homme de quelques gaz et vapeurs

<i>Gaz et vapeurs</i>	<i>Mortel</i> <i>par</i> <i>respiration de</i> <i>5 à 10 minutes</i>		<i>Dangereux</i> <i>par</i> <i>respiration</i> <i>de 1/2 à 1</i> <i>heure</i>		<i>Supportable</i> <i>par respiration</i> <i>de 1/2 à 1 heure</i>	
	<i>en ml/m</i>	<i>en mg/l</i>	<i>en ml/m</i>	<i>en mg/l</i>	<i>en ml/m</i>	<i>en mg/l</i>
-Oxychlorure de carbone	50	0.2	25	0.1	1	0.004
-Chlore	1 000	3.0	50	0.17	5	0.017
-Hydrogène arsénié	300	1.0	60	0.2	20	0.066
-Acide cyanhydrique	200	0.2	100	0.1	50	0.05
-Hydrogène phosphoré	1 000	1.5	400	0.6	100	0.15
-Sulfure de carbone	3 300	10.0	1 000	3.0	500	1.5
-Anhydre sulfureux	3 000	9.0	400	1.2	100	0.3
-Oxyde de carbone	5 000	6.0	2 000	2.4	1 000	1.2
-Benzène	20 000	66	7 500	25	3 000	10
-Chloroforme	25 000	115	15 000	75	5 000	25
-Essence de pétrole	30 000	120	20 000	80	15 000	60
-Tétrachlorure de carbone	50 000	350	25 000	175	10 000	70
-Acétylène	500 000	550	250 000	275	100 000	110
-Anhydride carbonique	900 00	165	50 000	92	30 000	55

Les concentrations figurant dans la première colonne (effet mortel) correspondent à une intoxication aigue alors que les autres colonnes (effet dangereux ; effet supportable) correspondent à une intoxication chronique.

Les toxiques

Les principaux toxiques peuvent être répertoriés de la manière suivante :

- 1) le tabac ;
- 2) l'alcool ;
- 3) les métaux lourds (plomb, mercure , manganèse, etc.) ;
- 4) les médicaments ;
 - les sédatifs :
 - a) neuroleptiques (phénothiazines et butyrophénones) ;
 - b) tranquillisants (méprobamate et benzodiazépines) ;
 - c) hypnotiques (barbituriques et autres)
 - les stimulants :
 - a) les antidépresseurs (imipraminiques et IMAO*)
 - b) les psychostimulants (amphétamines)
- 5) Les drogues
 - drogues hallucinogènes ou perturbateurs (cannabis...) ;
 - drogues sédatives (opium, morphine, héroïne) ;
 - drogues stimulantes (cocaine, crak)
 - les ecstasy (amphétamines et dérivés) ;
 - les drogues inhalables (éther, protoxyde d'azote, solvants organiques, poppers, etc.)

A partir des analyses toxicologiques réalisées à l'aide d'un matériel très sophistiqué, le médecin légiste peut déterminer la cause de la mort.

Les produits dopants

Sur le plan général, on parle de conduite dopante lorsqu'un individu consomme certains produits pour affronter un obstacle réel ou ressenti, pour améliorer ses performances physiques ou intellectuelles (compétition sportive, examen, entretien d'embauche, prise de parole en public, etc.). Dans le monde sportif, cette pratique s'appelle le dopage.

Le dopage permet à l'organisme de surpasser temporairement ses possibilités en masquant la fatigue.

Les substance utilisées sont évidemment des stimulants : alcool, éther, amphétamines, qui sont de plus en plus supplantés par divers hormones en passant par le cannabis et la cocaïne.

Nous nous limiterons aux produits dopants les plus utilisés par les sportifs.

TABLEAU 8.3. — Nature des produits dopants en fonction des effets recherchés sur l'organisme

<i>Produits dopants</i>	<i>Effets recherchés</i>
Érythropoïétine (EPO), glucocorticoïdes, cytokines, fluorocarbures, hémoglobine réticulée.	Accroissement du potentiel aérobie (oxygénation des muscles)
Nandrolone, dihydrotestostérone (DHT) Testostérone, hormone de croissance (GH) Facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH) Bêtastimulants (clenbutérol, salmétérol, salbutamol)	Accroissement de la force et de la puissance musculaires
Antalgiques (morphine, cocaïne, paracétamol, corticoïdes) Analeptiques cardiorespiratoires (trinitrine) Stimulants du système nerveux central (strychnine, nicotine, arsenic, éther, alcool, amphétamines, caféine, corticoïdes, cocaïne, morphine)	Recul de la sensation de fatigue
Nandrolone, testostérone, hormone de croissance, diurétiques (sports à catégories de poids)	Modifications morphologiques
Amphétamines, cannabis, bêtabloquants	Lutte anti-stress
Diurétiques, sérum physiologique, probénicide, épitestostérone	Produits masquants

La soumission chimique

Depuis quelques années, est apparu l'usage criminel de produits pharmaceutiques psycho-actifs.

Les molécules figurant dans le tableau ci-après présentent des propriétés qui lèvent les inhibitions. De ce fait les victimes peuvent signer des chèques, communiquer leur numéro confidentiel de carte bancaire ou participer à des actes sexuels en paraissant parfaitement consentantes aux yeux d'éventuels témoins, et sans garder aucun souvenir. Ces produits sont incorporés soit dans les boissons (café, sodas, bières, alcools et spiritueux divers), soit dans des aliments (pâtisseries, friandises...). Les nutriments sont donc absorbés volontairement par la victime, mais la prise de produits, mais la prise de produits psycho-actifs est faite à son insu.

La parade serait d'ajouter un colorant dans les produits pharmaceutiques visés pour les rendre détectables lorsqu'ils sont dissous dans une boisson quelconque.

La soumission chimique peut être définie comme l'administration de substances psycho-actives à une personne à des fins délictueuses ou criminelles.

Trois prélèvements doivent être réalisés de façon systématique :

- du sang veineux,
- des urines,
- des cheveux, orientés, en double et coupés au raz du cuir chevelu en occipital, de la taille d'un crayon à papier.

b)Autre utilisation de la toxicologie

La toxicologie peut également aider à identifier un corps. En effet, les drogues (dont le tabac et l'alcool) "imprègnent" le corps et y laissent des traces qui peuvent être détectées dans les organes, les cheveux et les dents. Si l'on sait que la victime était un fumeur qui consommait également des barbituriques (on peut même savoir précisément quels barbituriques), cela peut resserrer les recherches concernant son identité.

II)Méthode

La décennie écoulée a vu la mise en place sur le marché de systèmes analytiques de plus en plus performants. Compte tenu des spécificités de chaque situation médico-légale, l'expert judiciaire se doit de disposer d'un parc analytique important. Après avoir déterminé si le produit appartient à la catégorie acide ou basique, on procède à différents examens. A cette fin, on utilise des techniques sophistiquées qui permettent au toxicologue d'analyser les prélèvements effectués *ante mortem* et *post mortem* notamment les techniques suivantes.

a)Techniques chromatographiques

Le terme général de chromatographie regroupe un ensemble de techniques destinées à identifier, à purifier, à séparer les constituants d'un mélange. Il existe trois principaux type de chromatographie.

1)La chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince permet d'identifier 90 % des poisons connus. Par ailleurs, cette méthode sépare et identifie les différents constituants d'un mélange. Cette technique a presque totalement remplacé la chromatographie sur papier en raison de ses performances plus élevées.

Principe :

Le mot « chromatographie » provient du grec « khroma » qui signifie couleur.

Le procédé consiste à faire migrer à travers une **phase stationnaire**, solide ou liquide, une **phase mobile**, liquide ou gazeuse.

La **phase stationnaire**, appelé **absorbant**, est constituée d'un solide finement pulvérisé, qui a les propriétés d'absorber plus ou moins en surface les composés que l'on chromatographie.

La **phase mobile** appelée éluant est un liquide ou mélange de liquides.

L'éluant circule à travers la phase stationnaire par gravité, par capillarité ou par diffusion et entraîne plus ou moins les substances que l'on chromatographie.

But :

Réalisation d'une chromatographie d'un mélange pour identifier les constituants de ce mélange par comparaison à l'élution simultanée de témoins.

Méthode :

La CCM consiste à déposer une très petite quantité des solutions de mélange à chromatographier que l'on veut comparer, en un point situé au bas de la couche et à placer cette dernière dans un récipient clos dont le fond est couvert du solvant servant d'éluant.

Le mode opératoire comporte plusieurs étapes :

-*La réalisation de micro prélèvements* : il s'agit des prélèvements de morceaux de papier supportant les mélanges que l'on désire comparer, ainsi que d'un morceau de papier vierge faisant office de témoin. Ce témoin papier sert à mettre en évidence l'éventuelle interaction entre le papier et le solvant.

-*L'extraction* : chaque prélèvement est ensuite placé dans un microtube à essai, dans lequel est ajouté un système de solvants approprié, et destiné à extraire le mélange du papier.

-*Le dépôt* : 10 microlitres des solutions d'extraction du témoin papier et de chaque échantillon sont déposés sur une plaque chromatographique en gel de silice. Pour ce faire, on utilise un appareil automatique.(CAMAG Linornat II)

-*L'élution* : la plaque chromatographique est ensuite placée dans une cuve de développement, dans laquelle on a introduit préalablement un système de solvants qui va permettre la

séparation et la migration des constituants des mélanges. La cuve doit être saturée en vapeurs de solvants.

L'éluant monte par capillarité, dépassant l'échantillon et faisant migrer les composants à des vitesses différentes selon leurs affinités pour l'absorbant et l'éluant : elles forment des zones séparées ou « spots ». Cette séparation peut être provoquée par des phénomènes d'absorption, de partage, d'échange d'ions ou encore par une combinaison de ces possibilités.

- Si le chromatogramme issu d'un dépôt contient n taches, c'est que le dépôt contenait n espèces chimiques différentes.
- Si les chromatogrammes issus de deux dépôts présentent chacun une tache à la même position c'est qu'ils contiennent la même substance

-L'observation et l'étude de la plaque : une fois sèche, la plaque va être étudiée.

Les divers composants du dépôt initial forment le chromatogramme et peuvent être détectés de diverses manières comme la révélation.

Chaque constituant séparé qui apparaît sous la forme d'un spot sur la plaque de gel de silice peut être défini de la façon suivante :

-La valeur rapport frontal noté R_f qui représente la distance parcourue par le constituant depuis le point du dépôt initial du mélange, par rapport à la distance parcourue par le front du solvant depuis ce même point de dépôt.

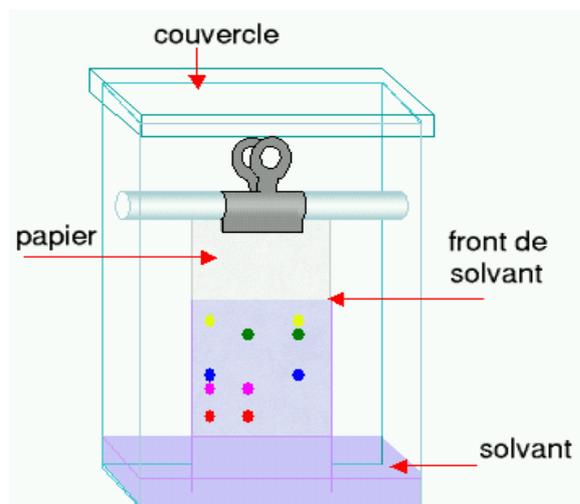


Figure1 : schéma d'une chromatographie sur couche mince

Dans des conditions expérimentales identiques, un même composé montera toujours à une hauteur proportionnelle à la distance parcourue par le front de l'éluant.

Les distances d et D sont exprimées dans la même unité. R_f n'a pas d'unité.

Le rapport frontal rend compte de la manière dont a migré l'espèce considérée.

Pour une espèce donnée le rapport frontal dépend de la nature de l'éluant et de la nature de la phase fixe.

(d distance parcourue par le composé)

$$R_f = d/D$$

(D distance parcourue par le solvant)

C'est une constante comprise entre 0 et 1, caractéristiques pour chacune des substances.

Les R_f sont utilisés à des fins comparatives qualitatives. Si les témoins placés à côté de l'échantillon ont été bien choisis, les taches ayant parcouru la même distance ont de grandes chances d'être de même nature que les constituants de l'échantillon.

-L'enregistrement des spectres de réflectance du chromatogramme obtenu dans le visible ou l'ultraviolet et des spectres d'absorption de chaque spot

Ainsi la chromatographie permet :

- de déterminer le nombre d'espèces composant un échantillon testé
- d'identifier des espèces contenues dans l'échantillon en comparant les rapports frontaux avec la littérature ou avec d'autres échantillons analysés.

[2\)La chromatographie en phase gazeuse](#)

La **chromatographie en phase gazeuse (CPG)** est, comme toutes les techniques de chromatographie, une technique qui permet de séparer des molécules d'un mélange éventuellement très complexe de nature et de volatilité très diverses. Elle s'applique principalement aux composés gazeux.

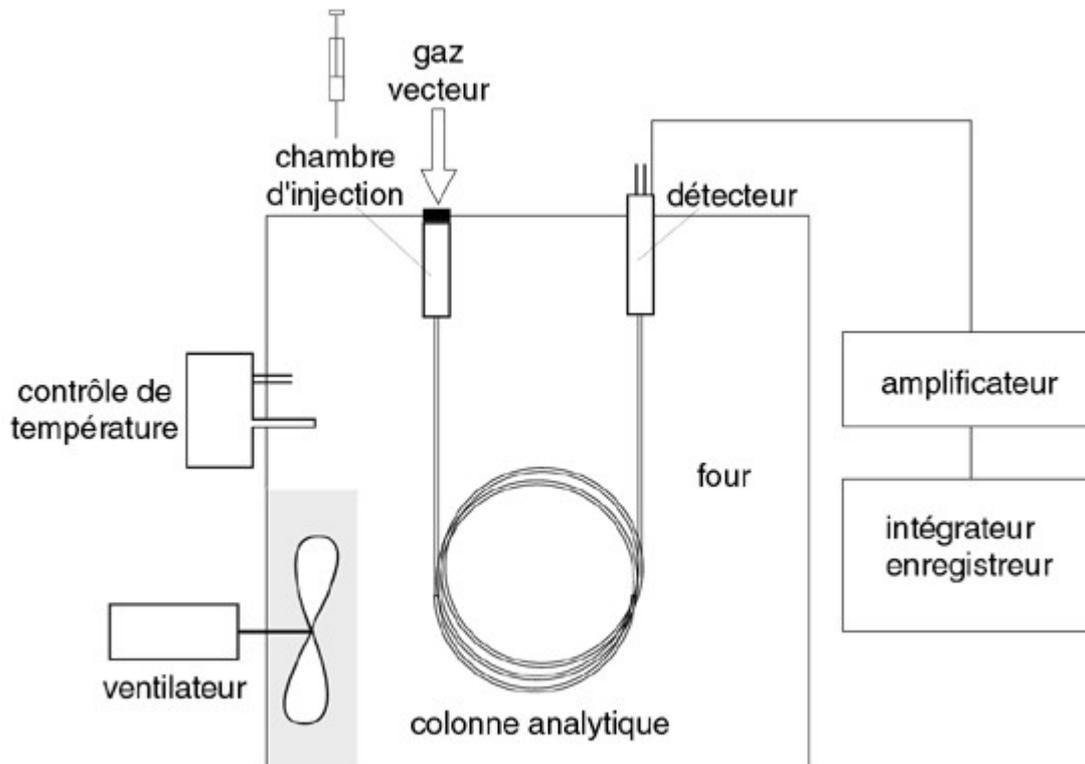


Figure 2 : schéma d'un chromatographe en phase gazeuse.

Les appareils de chromatographie gazeuse sont appelés **chromatographes**. Ils sont principalement composés :

- d'un **four** ;
- d'un **système d'injection**, qui va permettre d'introduire et de rendre volatil l'échantillon à analyser ;
- d'une **colonne** sur laquelle les différentes molécules de l'échantillon injecté vont se séparer suivant leurs affinités avec la phase stationnaire ;
- d'un **système de détection**, qui va permettre de mesurer le signal émis par les différentes molécules et de pouvoir les identifier.

Dans la chromatographie en phase gazeuse, la phase stationnaire est disposée dans une colonne que traverse un courant gazeux (gaz porteur). L'échantillon à analyser est vaporisé, puis introduit dans la colonne. Les constituants du mélange atteignent successivement l'autre extrémité de la colonne, avec un délai lié à la nature de chacun d'eux.

Ils y sont décelés par un détecteur et enregistrés sur un diagramme appelé chromatogramme, où chaque constituant se manifeste sous la forme d'un « pic ». La surface de chaque pic est fonction de la concentration du constituant correspondant dans le mélange initial.

Principe :

L'échantillon (un liquide volatil) est d'abord introduit en tête de colonne par l'intermédiaire d'une microseringue pour se retrouver dans une petite chambre en amont de la colonne appelée *injecteur*. L'injecteur est traversé par le *gaz porteur* et porté à une température appropriée à la volatilité de l'échantillon.

Ensuite, une fois rendus volatils, les différents composés de l'échantillon vont être emportés par le *gaz porteur* à travers la colonne et se détacher les uns des autres en fonction de leur affinité avec la *phase stationnaire*. La phase stationnaire va provoquer un phénomène de ***réretention chromatographique*** avec les différents composés (appelés ***solutés***). Plus le composé a d'affinité avec la phase stationnaire, plus il mettra de temps à sortir de la colonne. La grandeur expérimentale brute est appelée ***temps de réretention***. C'est le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et l'apparition du signal maximum du soluté au détecteur.

Pour favoriser le transport de tous les composés à travers la colonne (***élution***), il faut déterminer la bonne température du four. En général, la température doit être supérieure à la température d'ébullition des composés.

A la sortie de la colonne, les composés rencontrent un organe essentiel qui est appelé *détecteur*. Cet appareil évalue en continu la quantité de chacun des constituants séparés au sein du gaz porteur grâce à la mesure de différentes propriétés physique du mélange gazeux. Le détecteur envoie un signal électronique vers un enregistreur (sorte d'imprimante) qui dessinera les courbes de chaque pic en fonction de leur intensité.

L'ensemble des pics est appelé *chromatogramme*. Le chromatogramme va fournir une série de pics plus ou moins séparés, plus ou moins grands et plus ou moins larges. La surface d'un pic est, suivant la méthode de détection, proportionnelle à la quantité de produit représentée par ce pic. En mesurant la surface de chaque pic et en la rapportant à la surface totale de tous les pics, on détermine le pourcentage de chacun des composants contenus dans le produit.

Actuellement et de plus en plus, les logiciels remplacent avantageusement les enregistreurs papiers pour l'interprétation des signaux envoyés par les détecteurs.

[3\)Chromatographie en phase liquide](#)

Ce type de chromatographie repose sur la séparation de composés dans un liquide (*phase mobile*) qui progresse dans un tube (*colonne*) contenant un matériau appelé *phase stationnaire*, ou sur une surface contenant cette *phase stationnaire*

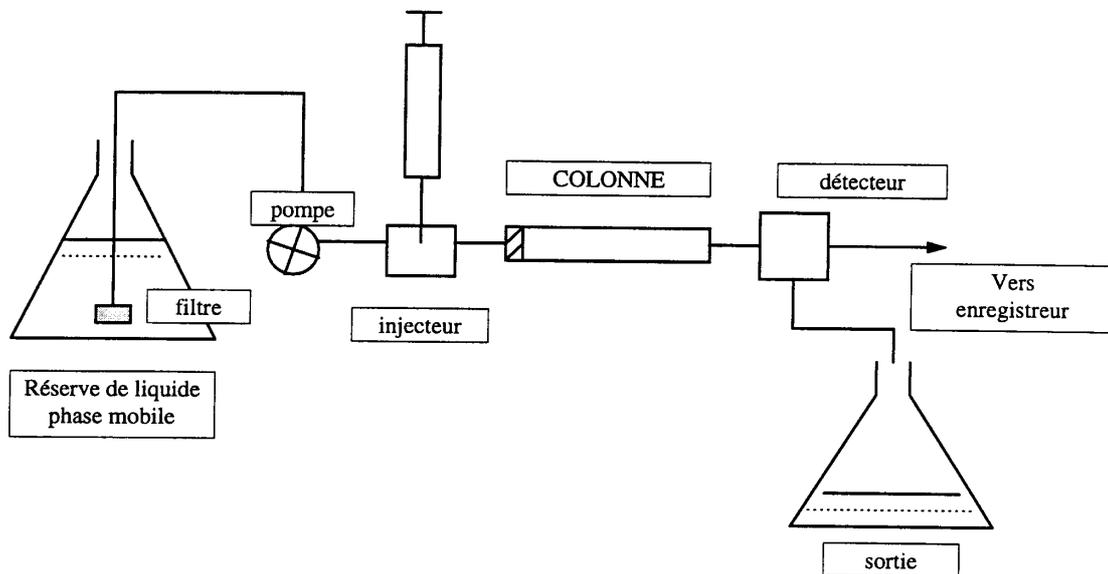


Figure 3 : principe de fonctionnement de l'HPLC

L'analyse LC met en œuvre plusieurs étapes :

- préparation de l'échantillon par l'opérateur
- injection
- séparation chromatographique
- détection

La CPL se présente comme une méthode de séparation complémentaire de la chromatographie en phase gazeuse (CPG) pour l'analyse de solutés peu volatils ou thermodégradables (cas de la majorité des molécules thérapeutiques). Elle se distingue de la CPG par la variété des phases stationnaires et partant des interactions mises en jeu et par une température moins élevée, ce qui accroît la force de ces interactions et augmente la sélectivité.

En revanche, la CPL est une méthode de mise en œuvre plus délicate que la CPG ; de plus, malgré les progrès récents, elle souffre encore de l'absence de détecteurs aussi sensibles et universels que la détection à ionisation de flamme de la CPG.

b) Techniques spectrométriques

Les méthodes spectrales ont permis d'accroître de façon considérable les connaissances de la physique. C'est notamment grâce à ces procédés que la structure de l'atome a été révélée,

que la mécanique quantique s'est développée. La spectrométrie est devenue aujourd'hui un outil d'investigation indispensable aux laboratoires de police scientifique.

D'une manière générale, on définit un spectre comme étant la distribution de l'intensité d'une onde acoustique, électromagnétique ou corpusculaire en fonction de la fréquence variable. Dans notre cas, nous prendrons surtout en compte les spectres des radiations électromagnétiques.

Ces spectres sont caractéristiques des substances qui les produisent. On peut donc définir la nature d'un produit ou d'une substance par la connaissance de son spectre.

La spectrométrie de masse

Figure 4 : Schéma simplifié d'un Spectromètre de Masse



L'échantillon à analyser est décomposé en particules chargées électriquement appelées ions, qui sont ensuite accélérées, triées et placées dans un champ magnétique qui les sépare selon la valeur de leur masse atomique. Elles sont ensuite captées par des collecteurs qui canalisent le courant d'ions vers un récepteur, lequel joue en fait un rôle d'amplificateur par multiplication des électrons. Les impacts reçus sont réduits en impulsions électriques enregistrées graphiquement sous forme d'un spectre.

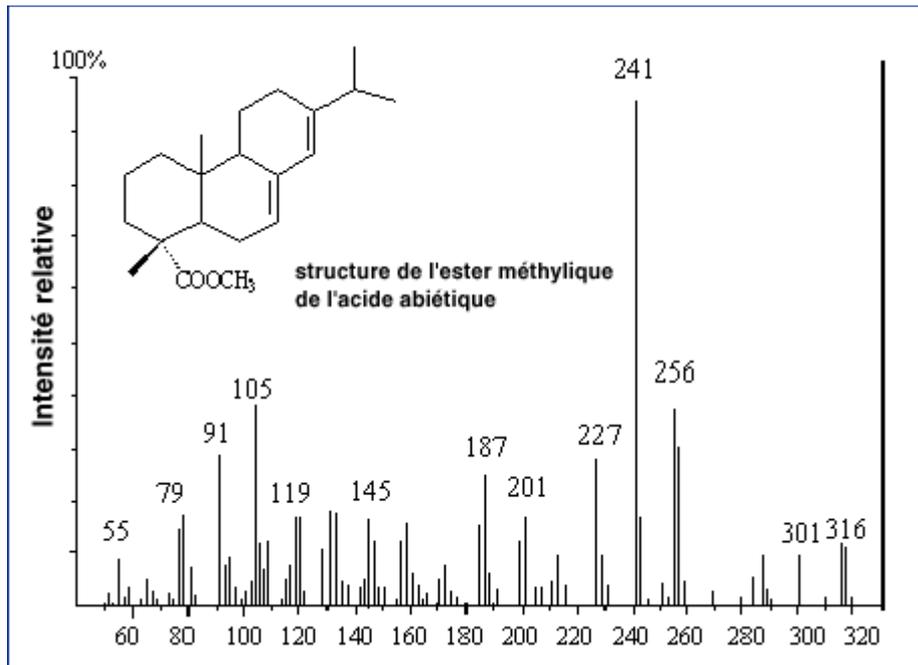


Figure 5 : Exemple d'un spectre de masse

Signalons que cette technique peut être couplée avec un chromatographe en phase gazeuse. En effet, son principe réside dans la phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Prenons comme exemple les prélèvements sanguins, qui sont vaporisés, chargés électriquement puis conduits à travers un champ magnétique. Les différentes substances sont déviées par l'aimant selon leur masse. Elles sont identifiées par un spectre caractéristique.

C) Quels matériels pour quelles analyses ?

Ce tableau détaille le matériel nécessaire à la bonne exécution des investigations toxicologiques en fonction des diverses demandes.

A cette liste, il convient de rajouter un système d'EMIT (*Enzyme Multiplied Immunoassay Technique*), technique qui permet de détecter la grande majorité des drogues et des substances chimiques présentes dans un prélèvement sanguin.

Tableau 4

Situation médico-légale	LC/DAD	GC/MS	LC/MS	GLC/MS/MS
Suivi d'un traitement de substitution		x		

Recherche des causes de la mort	x	x	x	
Conduite automobile	x	x		
Crime ou délit	x	x	x	
Dopage		x	x	x
Soumission chimique		x	x	x

Abréviations

LC/DAD : chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur à barrette de diodes

GC/MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

LC/MS : chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse

GLC/MS/MS : chromatographie en phase gazeuse ou liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem

III) Limites

L'expertise toxicologique se doit d'établir, confirmer ou infirmer le diagnostic d'intoxication, basée sur des critères de qualité.

a) Qualité de l'échantillon

Dès le début de la chaîne de l'analyse, il apparaît évident que la qualité du prélèvement va conditionner celle des résultats. Dans le cadre de l'optimisation des échantillons biologiques, il y a lieu de considérer la nature des échantillons à prélever, leur délai d'acheminement au laboratoire, leur modalité de conservation sur site et les informations indispensables avec la demande.

Les conditions de prélèvement et de conservation des échantillons sont d'une importance primordiale pour obtenir des résultats non contestables lorsqu'il s'agit de rechercher des causes toxiques d'un empoisonnement d'origine criminelle.

Les liquides biologiques et les organes et viscères doivent être conservés à une température de 4°C en chambre froide. Il est parfois nécessaire d'effectuer une congélation à -40°C pour augmenter la durée de conservation. Les phanères, particulièrement les poils divers et les cheveux, sont maintenus à la température ambiante.

Le sang liquide (sang cardiaque ou sang périphérique) doit être déposé dans des flacons spéciaux préalablement traités à l'EDTA comme anticoagulant.

Aucun texte ne prévoit la durée de conservation des prélèvements à l'exception des flacons pour alcoolémie dont la durée de conservation est fixée par décret à 9 mois pour permettre une contre-expertise éventuelle.

b) Performance des équipements analytiques

En parallèle, l'analyste se voit confronter à des difficultés spécifiques comme de disposer d'un matériel adapté à sa mission, de s'informer sur les nouvelles substances, de trouver de la bibliographie et surtout de disposer des substances et de leurs métabolites comme référence.