

Intérêts et limites de l'analyse de la moelle osseuse en toxicologie médicolégale : contribution à l'interprétation quantitative des concentrations médullaires

Nathalie Cartiser

▶ **To cite this version:**

Nathalie Cartiser. Intérêts et limites de l'analyse de la moelle osseuse en toxicologie médicolégale : contribution à l'interprétation quantitative des concentrations médullaires. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10149 . tel-00847114

HAL Id: tel-00847114

https://theses.hal.science/tel-00847114

Submitted on 22 Jul 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 149 - 2011 Année 2011

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE (E.D.I.S.S.)

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 20 Septembre 2011

par

Mlle CARTISER Nathalie Karine

INTERETS ET LIMITES DE L'ANALYSE DE LA MOELLE OSSEUSE EN TOXICOLOGIE MEDICOLEGALE

CONTRIBUTION A L'INTERPRETATION QUANTITATIVE DES CONCENTRATIONS MEDULLAIRES

Directeur de thèse : Pr. GUITTON Jérôme

JURY : Pr. Michel Tod (Président du Jury)
Dr. Marc Augsburger (Rapporteur)
Pr. Michel Lhermitte (Rapporteur)
Dr. Jean-Michel Gaulier (Examinateur)
Dr. Hélène Eysseric (Examinatrice)
Pr. Daniel Malicier (Examinateur)
Pr. Jérôme Guitton (Directeur de thèse)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. A. Bonmartin**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur G. Annat
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur D. Simon
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J-F. Mornex
Secrétaire Général	M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. Etienne
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. Locher
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. Matillon
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur F. Gieres
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. Fleury
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme le Professeur H. Parrot
Département GEP	Directeur : M. N. Siauve
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. Akkouche
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. Goldman
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid
Département Physique	Directeur : Mme S. Fleck
Département Sciences de la Terre	Directeur : Mme le Professeur I. Daniel
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. Collignon
Observatoire de Lyon	Directeur : M. B. Guiderdoni
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1	Directeur : M. P. Fournier
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. Pignault
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. Coulet
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur J-C. Augros
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M. R. Bernard

Intérêts et Limites de l'Analyse de la Moelle Osseuse en Toxicologie Médicolégale

Contribution à l'interprétation quantitative des concentrations médullaires

---

RESUME

L'objectif de cette thèse était de faire le point sur la place de l'analyse de la moelle osseuse (MO) en tant que matrice alternative au sang en toxicologie médicolégale.
Une méthode analytique a été développée et validée pour la quantification du citalopram, du diazepam et ses métabolites (nordazepam, temazepam, oxazepam) dans la MO et 10 autres matrices d'intérêt médicolégal. Cette procédure a été appliquée avec succès dans des cas réels pour l'analyse de matrices dégradées et a permis l'établissement d'une cinétique tissulaire chez l'animal au cours d'une étude pharmacocinétique.
Cette cinétique animale a été intégrée dans une modélisation PBPK afin de prédire chez l'homme la distribution tissulaire du citalopram, du diazepam et son métabolite principal, le nordazepam, après administration orale thérapeutique. Ces simulations donnent des clefs intéressantes pour l'interprétation quantitative des concentrations tissulaires en toxicologie médicolégale.
Une étude a été conduite pour déterminer l'influence du site de prélèvement sur la détermination des concentrations médullaires de caféine et sur la corrélation de ces concentrations avec les dosages sanguins. Elle montre que le site de prélèvement de MO est un paramètre important à prendre en considération dans l'interprétation quantitative des analyses de MO.
L'ensemble de ce travail confirme l'intérêt de la MO en toxicologie médicolégale. Des études expérimentales ont permis d'approfondir les connaissances de cette matrice autour des problématiques du prélèvement, de l'analyse et de la distribution *ante mortem* afin de contribuer à l'interprétation qualitative et quantitative des analyses réalisées sur la MO.

DISCIPLINE
Chimie analytique – Toxicologie médicolégale

MOTS-CLES
Toxicologie médicolégale – Moelle Osseuse – Interprétation – modèle PBPK – distribution tissulaire

---

LABORATOIRE :

Ciblage thérapeutique en Oncologie EA3738
Equipe 2 : Pharmacocinétique et modèles de population
Faculté de médecine Lyon-Sud, Université Lyon 1, BP 12, 69921 Oullins Cedex

Interests and limits of bone marrow analysis in forensic toxicology

Contribution to quantitative interpretation of bone marrow concentrations

---

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the interest of bone marrow (BM) analysis in forensic toxicology, as an alternative matrix to blood.
An analytical method was developed and validated for the quantification of citalopram, diazepam, and its main metabolites (nordazepam, temazepam, oxazepam) in BM and 10 others matrices of forensic interest. This procedure was successfully applied to real cases for putrified sample analyses and to establish a tissue kinetic in rabbit samples for a pharmacokinetic study.
These animal kinetics were implemented in PBPK modeling to predict in human tissue distribution of citalopram, diazepam, and its metabolite, nordazepam, after oral therapeutic administration. These predictions gave some clues to interpret quantitatively tissue concentrations in forensic toxicology.
A study was also performed to examine whether BM sample location may influence *post mortem* BM quantification and correlation between BM and blood concentrations. Caffeine was used as test compound. Sample location was found to be an important parameter to consider in quantitative interpretation of BM analyses.
This work confirmed the interest of BM in forensic toxicology. Experimental studies improved our knowledge on this matrix about the problematic of sample location, analytical procedure and *ante mortem* distribution to contribute to qualitative and quantitative interpretation of BM analyses.

DISCIPLINE
Analytical chemistry – Forensic toxicology

KEYWORDS
Forensic toxicology – Bone Marrow – Interpretation – PBPK – Tissue distribution

Remerciements

Aux membres du Jury,

Je remercie le Pr. Michel Tod de m'avoir fait découvrir la modélisation pharmacocinétique, pour son aide, sa patience et sa confiance. Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance.

Je remercie le Pr. Malicier de l'honneur qu'il me fait en participant à ce jury. Professeur, je vous remercie de m'avoir ouvert les portes de votre Institut et de m'avoir emmenée dans cette grande aventure de la médecine légale. Veuillez trouver ici le témoignage de mon grand respect.

Je remercie le Pr Michel Lhermitte et le Dr. Marc Augsberger pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse et pour votre lecture intéressée et critique de mon manuscrit. Trouvez ici l'expression de ma plus grande estime.

Je remercie les Dr. Jean-Michel Gaulier et Helene Eysseric pour leur participation à ce jury et de leur intérêt que vous portez à ce sujet. Recevez ici le témoignage de ma gratitude.

Je remercie chaleureusement le Pr. Jérôme Guitton de m'avoir fait l'honneur d'assurer la direction de cette thèse. Jérôme, merci pour tes conseils avisés, ta disponibilité, ton soutien sans faille dans les moments difficiles et les moments de réussites. C'est un honneur pour moi d'avoir travaillé avec toi pendant toute la durée de ce travail.

Au laboratoire LAT LUMTOX

Merci d'avoir soutenu ce projet et de la confiance que vous m'avez témoignée en m'en donnant la charge.

Je remercie le Dr. Catherine Le Meur pour m'avoir ouvert chaleureusement les portes du laboratoire LAT LUMTOX, pour son expérience, son soutien, sa disponibilité et surtout sa bonne humeur.

Je remercie vivement toutes les personnes qui ont participé à cette aventure humaine au sein du laboratoire, pour leur soutien, leur aide et leur bonne humeur. Je pense tout particulièrement à José, Annie, Eric, toute l'équipe de La Voulte et de HIAD. Un clin d'œil particulier à Lise et Camille pour les fou-rires qui effacent les moments difficiles, les repas gastronomiques des 4 coins de France, les bouteilles de vins de trop, les recherches Wikipedia, les récits endiablés des épisodes de Desperate Housewife et tout le reste...

Je remercie le Dr. Fabien Bévalot sans qui rien de cette aventure n'aurait jamais eu lieu. Merci de m'avoir confié ce sujet qui te tenait à cœur et de tout ce que tu m'as appris. Merci pour ta disponibilité et ton soutien, pour la patience dont tu as fait preuve jour après jour face à mon entêtement, mes erreurs et mes découragements. Cette réussite est aussi la tienne et j'espère que tu me feras l'honneur de poursuivre cette voie de recherche.

A l'Institut Médicolégal de Lyon

Je remercie tout particulièrement le Dr. Fanton pour sa confiance, son soutien, ses précieux conseils, et son implication tout au long de ce travail de recherche.

Je remercie chaleureusement tous les médecins légistes de m'avoir fait découvrir le monde de la médecine légale.

Je remercie Chantal, pour sa gentillesse, son aide et sa patience face à mes nombreuses étourderies.

Je remercie ceux qui m'ont accueillie en bas, Jean-Louis, André, Jean, les internes, et ceux qui n'y sont plus, pour leur soutien, leur encouragement, leur bonne humeur toute particulière. Merci du fond du cœur. Sans vous, je n'aurais jamais pu franchir les portes de cette salle avec un sourire.

Je dédie cette thèse

A mes parents, pour votre amour sans faille tout au long des années. Merci de m'avoir donné l'opportunité d'aller si loin dans mes études et d'aller au bout de ce qui me plait. Merci de m'avoir épaulée, conseillée, soutenue dans les moments heureux comme les plus difficiles. J'espère continuer à vous rendre fièrs de moi…

A Fred, Sylvie, et les 2 petits bouts de choux qui égayent notre quotidien…

A Manu, ma petite cuillère officielle. Les années ont passé, et la vie a encore tellement à offrir. Je serais là en février…

Aux filles, Hélène, Marie-Anne, Martine et Nathalie, pour ces longues années d'amitié et celles à venir…

A Pascaline, je n'ai pas besoin d'écrire toutes les raisons pour lesquelles je te dédie cette thèse alors en quelques mots: Caverne de la rose d'or, Gewürztraminer, sanglier, élevage de sangsue et procrastination. Le prochain pot de thèse sera le tien!...

A Lucie, Etienne, Eloïse et les autres, pour tous les bons moments ensemble et ce havre de paix où vous m'accueillez toujours. Etienne tu m'as coiffé au poteau!

A Candice, qui par une heureuse rencontre dans le plus improbable des endroits m'a transmis l'envie de faire de la toxicologie médicolégale.

A Marc, pour nos longues discussions aux heures les plus tardives et ton aide précieuse. Tu as gagné le droit de me faire voir un film d'horreur et la moitié de mes gains de la semaine à Euromillion.

A Agnès, Michel, Franck, ma famille, tous les autres et ceux que j'oublie, pour avoir fait de moi ce que je suis.

A celui qui se reconnaitra, pour ton amour.

Cette réussite je la dois à vous tous.

Une charogne

Rappelez-vous l'objet que nous vîmes, mon âme,
Ce beau matin d'été si doux :
Au détour d'un sentier une charogne infâme
Sur un lit semé de cailloux,

Les jambes en l'air, comme une femme lubrique,
Brûlante et suant les poisons,
Ouvrait d'une façon nonchalante et cynique
Son ventre plein d'exhalaisons.

Le soleil rayonnait sur cette pourriture,
Comme afin de la cuire à point,
Et de rendre au centuple à la grande Nature
Tout ce qu'ensemble elle avait joint ;

Et le ciel regardait la carcasse superbe
Comme une fleur s'épanouir.
La puanteur était si forte, que sur l'herbe
Vous crûtes vous évanouir.

Les mouches bourdonnaient sur ce ventre putride,
D'où sortaient de noirs bataillons
De larves, qui coulaient comme un épais liquide
Le long de ces vivants haillons.

Tout cela descendait, montait comme une vague,
Ou s'élançait en pétillant ;
On eût dit que le corps, enflé d'un souffle vague,
Vivait en se multipliant.

Et ce monde rendait une étrange musique,
Comme l'eau courante et le vent,
Ou le grain qu'un vanneur d'un mouvement rythmique
Agite et tourne dans son van.

Les formes s'effaçaient et n'étaient plus qu'un rêve,
Une ébauche lente à venir,
Sur la toile oubliée, et que l'artiste achève
Seulement par le souvenir.

Derrière les rochers une chienne inquiète
Nous regardait d'un œil fâché,
Epiant le moment de reprendre au squelette
Le morceau qu'elle avait lâché.

- Et pourtant vous serez semblable à cette ordure,
A cette horrible infection,
Etoile de mes yeux, soleil de ma nature,
Vous, mon ange et ma passion !

Oui ! telle vous serez, ô la reine des grâces,
Après les derniers sacrements,
Quand vous irez, sous l'herbe et les floraisons grasses,
Moisir parmi les ossements.

Alors, ô ma beauté ! dites à la vermine
Qui vous mangera de baisers,
Que j'ai gardé la forme et l'essence divine
De mes amours décomposés !

Charles Baudelaire

Table des matières

Préambule 12

Partie bibliographique 16

Etat de l'art de l'analyse de la MO en toxicologie médicolégale 17

Partie expérimentale 37

Quantification du citalopram et de quatre benzodiazépines dans onze fluides et tissus d'intérêt médicolégal par GC-MS/MS 38

Modélisation PBPK pour l'évaluation de la distribution tissulaire du citalopram, diazepam et nordazepam. Application potentielle en toxicologie médicolégale 69

1. Introduction 72
2. Matériel et Méthodes 75
   2.1 Etude pharmacocinétique chez l'animal 75
      2.1.1 Matériel 75
      2.1.2 Etude animale 75
      2.1.3 Analyse 76
   2.2 Modèle PBPK 76
      2.2.1 Structure du modèle PBPK 77
      2.2.2 Les 2 étapes de la modélisation 78
         2.2.2.1 Modèle lapin : Identification des coefficients de partage sang/plasma (Kp) 78
         2.2.2.2 Modèle homme : Simulation des cinétiques sanguines et tissulaires 78
      2.2.3 Paramètres du modèles PBPK 78
         2.2.3.1 Description des équations du modèle PBPK 78
         2.2.3.2 Présentation des paramètres et hypothèses initiales 80
         2.2.3.3 Paramètres du modèle chez le lapin 84
         2.2.3.4 Paramètres du modèle chez l'homme 85
         2.2.3.5 Cas particulier du Nordazepam 86
      2.2.4 Etude de sensibilité du modèle 86
3 Résultats et discussion 87
   3.1 Constitution du modèle PBPK 87
      3.1.1 Etude cinétique chez l'animal 87
      3.1.2 Modèle chez le lapin: Estimation des Kp 92
         3.1.2.1 Critères d'adéquation du modèle 92
         3.1.2.2 Estimation des Kp 96

3.1.3 Modèle chez l'homme: simulation des cinétiques tissulaires 97
3.2 Exploitations médicolégales des résultats 101
3.2.1 Cas du citalopram 101
3.2.2 Cas du diazepam et son métabolite principal le nordazepam 104
3.2.3 Etude de population: Analyse de sensibilité 108
4. Conclusion 111

Quantification *post mortem* de la caféine dans la MO: influence du site de prélèvement et corrélation avec le sang 113

Conclusions et Perspectives 120

Références 124

Table des illustrations et tableaux

Figure 1 : Représentation schématique du modèle PBPK..... 77
Figure 2 : Cinétique du citalopram prédite par le modèle et concentrations observées in vivo chez le lapin..... 93
Figure 3 : Cinétique du diazepam prédite par le modèle et concentrations observées in vivo chez le lapin..... 94
Figure 4 : Cinétique du nordazepam an tant que métabolite du diazepam prédite par le modèle et concentrations observées in vivo chez le lapin. 95
Figure 5 : Cinétique du citalopram dans les 8 matrices après administration orale de 50mg de citalopram 98
Figure 6 : Cinétique du diazepam dans les 8 matrices après administration orale de 10mg de diazepam 99
Figure 7 : Cinétique du nordazepam dans les 8 matrices après administration orale de 10mg de diazepam 100
Figure 8 : Simulation de la cinétique sanguine du citalopram pour une administration orale unique de 50 mg de citalopram..... 101
Figure 9: Simulation de la cinétique sanguine du diazepam et du nordazepam après administration orale de 10 mg de diazepam. 104
Figure 10 : Cinétique observée du diazepam et du nordazepam après administration orale ou intraveineuse de 10 mg de diazepam (53) 105
Figure 11 : Sensibilité de la cinétique du citalopram à la fluctuation des paramètres physiologiques de la MO. 110

Tableau 1 : Propriétés physicochimiques, pharmacocinétiques et intérêt médicolégal des 3 molécules étudiées..... 74
Tableau 2 : Paramètres pharmacocinétiques utilisés ou estimés dans le modèle PBPK chez le lapin et l'homme. 82
Tableau 3 : Paramètres physiologiques utilisés dans le modèle PBPK chez le lapin et l'homme..... 83
Tableau 4: Résultats des dosages du citalopram dans les différentes matrices issues de l'expérimentation ainsi que les médianes intégrées dans le modèle PBPK lapin. 89
Tableau 5 : Résultats des dosages du diazepam dans les différentes matrices issues de l'expérimentation ainsi que les médianes intégrées dans le modèle PBPK lapin. 90
Tableau 6 : Résultats des dosages du nordazepam dans les différentes matrices issues de l'expérimentation ainsi que les médianes intégrées dans le modèle PBPK lapin. 91
Tableau 7 : Coefficients de détermination (r^2) entre la cinétique prédite et les points expérimentaux observés pour chaque matrice pour le citalopram, le diazepam et le nordazepam..... 92
Tableau 8 : Coefficients de partage tissu/plasma estimés grâce au modèle PBPK chez le lapin pour le citalopram, le diazepam et le nordazepam..... 96
Tableau 9 : Influence de la fluctutation individuelle ou simultanée du Q_{MO}, V_{MO} et Kp_{MO} sur la détermination et la dispersion des concentrations prédites par le modèle..... 109

Liste des abréviations

GC	Chromatographie en phase gazeuse
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de spéctrométrie de masse
GC-MS/MS	Chromatographie enphase gazeuse couplée à un détecteur de spéctrométrie de masse en tandem
HPLC	Chromatographie en phase liquide haute performance
MO	Moelle osseuse
HV	Humeur vitrée
TA	Tissu adipeux
PBPK	Pharmacocinétique basée sur la physiologie
Kp	Coefficient de partage entre le tissu considéré et le plasma
Fup	Fraction libre plasmatique
Clt	Clairance sanguine totale
fClh	Fraction de clairance hépatique
V	Volume
Q	Débit sanguine
Kabs	Constante d'absorption

Préambule

L'expertise toxicologique médicolégale fait partie des investigations réalisées dans la recherche des causes de la mort. Elle a pour objectif principal de déterminer si des xénobiotiques ont été consommés par la victime (ou administrés à son insu) et, le cas échéant, leur rôle éventuel dans la survenue du décès (intoxication létale, altération de la vigilance…). Elle consiste généralement en une étape de dépistage des molécules puis de quantification des analytes décelés, suivies de l'interprétation des concentrations ainsi mesurées. L'interprétation est souvent la phase la plus complexe de l'expertise puisque ces concentrations sont la résultante de la distribution *ante mortem* et des phénomènes *post mortem* (redistribution, dégradation in corpore…) auxquels viennent s'ajouter les traitements réalisés au cours de la chaine judiciaire: prélèvement, conservation, analyse. Aussi, chacun de ces paramètres doit être pris en compte dans l'interprétation des résultats. Le sang est la matrice de référence et c'est celle qui est la plus décrite dans la littérature: nombreuses techniques analytiques validées, études pharmacocinétiques décrivant les concentrations thérapeutiques, description de cas autopsiques aidant à l'interprétation des résultats *post mortem*… Toutefois, en *post mortem*, le sang peut ne pas être disponible, ou en quantité insuffisante ou encore dégradé. Dans ces circonstances, l'analyse de matrices alternatives peut être très informative. Parmi celles-ci, la moelle osseuse (MO) semble particulièrement intéressante. La MO est un tissu richement vascularisé; ainsi les molécules circulant dans le sang devraient y être retrouvées sous réserve d'utiliser une technique d'analyse validée pour cette matrice. Du fait de sa situation anatomique protégée au sein des os, l'emploi de la MO présente théoriquement un intérêt prépondérant en toxicologie médicolégale. Nous pouvons citer sa protection de la plupart des sources de contaminations et d'agressions extérieures, sa faible exposition a priori aux phénomènes de redistribution *post mortem*, sa disponibilité en cas de putréfaction extrême et dans certains cas de squelettisation, lors de polytraumatisme sévère, ou face à un corps calciné ou exsangue.

Dans le domaine thérapeutique, les connaissances sur les interactions xénobiotiques/MO proviennent essentiellement du domaine de la cancérologie comme cible du traitement (leucémie) ou comme site d'effets indésirables (myelosuppression). En sciences forensiques, la MO est déjà utilisée pour réaliser des analyses génétiques port mortem [1], dans le diagnostic de la noyade par la recherche de diatomées [2-4] et pour établir certaines pathologies en histologie [5-7]. Le premier article traitant de l'analyse de la MO en toxicologie médicolégale, retrouvé dans la littérature, date de 1943 et concerne le dosage de l'éthanol dans la MO de fémurs humains. Depuis, la plupart des données humaines

proviennent d'observations ponctuelles au cours desquelles diverses molécules ont été détectées. Des benzodiazépines et des antidépresseurs [8], la colchicine [9], la morphine et l'héroïne [10] ont été retrouvés dans la MO de cadavres en bon état de conservation. Le paracétamol et le dextropropoxyphène [11] ont été détectés dans la MO de corps putréfiés. Le triazolam [12], le bromisovalum [13], l'amitriptyline [14] et l'amphétamine [15] ont été identifiés sur des cadavres à l'état d'ossement. De rares études à partir de séries autopsiques ont été effectuées uniquement pour l'éthanol [16-18], l'un de ses métabolites, l'éthylglucuronide [19] et le méprobamate [20]. Parallèlement, des expérimentations animales ont été réalisées pour interpréter les concentrations médullaires essentiellement en recherchant une corrélation avec les concentrations sanguines. Cette voie de recherche a été intensivement explorée dans les années 80-90 par l'équipe de Winek et al. à propos d'alcools [16, 17, 21, 22] et de médicaments [23-27]. Si certaines de ces études sur modèle animal montrent une telle corrélation, la question de l'extrapolation de données issues de l'expérimentation standardisée à des cas autopsiques humains reste posée.
L'objectif de cette thèse est d'approfondir les connaissances théoriques et pratiques sur cette matrice afin d'acquérir des clefs pour interpréter, qualitativement et quantitativement, les analyses réalisées sur la moelle osseuse.

Une revue de la bibliographie concernant la MO en toxicologie médicolégale a été réalisée. Celle-ci fait le point sur la physiologie de la MO pour une meilleure connaissance de ses spécificités et des conséquences en tant que matrice d'analyse toxicologique. La revue s'est ensuite intéressée aux « case report », séries autopsiques, expérimentations animales et techniques analytiques spécifiques à la MO en toxicologie médicolégale. L'ensemble des éléments apportés par la littérature a été discuté en fonction des paramètres à prendre en compte lors de l'interprétation: phénomènes *post mortem*, importance du prélèvement, limites analytiques, distribution ante mortem. Notre travail s'inscrit dans ces trois dernières problématiques.

Deux molécules, le citalopram et le diazepam, ont été sélectionnées comme des molécules test afin d'étudier les aspects analytiques et pharmacocinétiques de l'utilisation de la MO comme matrice alternative. Ces deux composés ont été selectionnés sur des critères physicochimiques tels que leur liphophilie et leur basicité, caractères classiquement retrouvés pour les médicaments ; et du fait de leur intérêt médicolégal. Dans le domaine judiciaire, les intoxications, volontaires, accidentelles ou suicidaires, concernent majoritairement les psychotropes. Parmi les familles de psychotropes largement prescrites, ont été choisis un antidépresseur appartenant aux inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine

(citalopram) et une benzodiazépine (diazepam). Ce dernier permettra également d'étudier le métabolisme du fait de sa transformation dans l'organisme en nordazepam et dans une moindre mesure en temazepam et oxazepam.

Dans un premier temps, nous avons développé et validé une méthode d'analyse spécifique du citalopram, du diazepam et de ses 3 métabolites (nordazepam, temazepam, oxazepam). Nous avons développé cette méthode de manière à pouvoir analyser l'ensemble des matrices biologiques recueillies chez le lapin lors de l'étude pharmacocinétique. Au-delà nous souhaitions également pouvoir l'utiliser en pratique courante sur des prélèvements humains lorsque le sang n'est pas disponible. La première application consiste à quantifier les molécules dans huit matrices: le sang, des échantillons lipidiques tels que la MO, le cerveau, le tissu adipeux, des organes tels que le foie, le poumon et le rein, et le muscle squelettique. La technique doit remplir des critères de justesse, répétabilité, sensibilité et sélectivité satisfaisant à l'établissement d'une cinétique sanguine et tissulaire chez l'animal. Pour la deuxième application, la méthode est utilisée au cours d'investigation sur des corps putréfiés, momifiés, calcinés, démembrés, exsangues, à l'état de squelettes… Les matrices diverses prélevées en alternative au sang, qu'il s'agisse de la MO, de foie, de muscle, de liquide de putréfaction etc, ont en commun d'avoir subi des phénomènes *post mortem* intenses. Ainsi, la technique analytique utilisée doit montrer une sélectivité suffisante pour distinguer les molécules des nombreuses interférences liées à la dégradation des prélèvements. En conséquence, la méthode analytique a été optimisée en tenant compte de ces contraintes et validée sur l'ensemble des matrices pour vérifier l'adéquation de la méthode aux exigences requises.

Dans un deuxième temps, la distribution tissulaire humaine du citalopram, du diazepam et de son métabolite principal, le nordazepam, est prédite chez l'homme par une approche pharmacocinétique basée sur la physiologie (PBPK) à partir de données obtenues par expérimentation animale. Cette modélisation pharmacocinétique se base sur une structure et des paramètres physiologiques permettant de reproduire les mécanismes de distribution des médicaments dans l'organisme. Cette méthode de modélisation complexe permet, à partir de données expérimentales animales, de réaliser des extrapolations chez l'homme. C'est cette propriété essentielle que nous avons utilisée au cours de notre étude qui s'est déroulée en deux temps. Des expérimentations animales ont permis d'établir la cinétique des trois molécules dans huit tissus d'intérêt médicolégal et de construire un modèle chez l'animal. Ce dernier a ensuite été transposé chez l'homme pour prédire la cinétique sanguine et tissulaire humaine.

Pour l’étude pharmacocinétique nous avons fait l’hypothèse que la MO était un tissu homogène à l’instar des sept autres matrices étudiées. Ainsi la MO prélevée au niveau du fémur de lapins adultes a été considérée comme représentative de l’ensemble de la MO de l’organisme. Cependant, les données physiologiques indiquent clairement la présence de MO jaune et de MO rouge. Cette composition évolue en fonction d’évènements pathologiques et de manière physiologique en fonction de l’âge et de la localisation dans l’organisme. Ainsi, une troisième étude expérimentale à partir de prélèvements de MO humaine a été menée dans le but d'étudier l'influence du site de prélèvement sur les concentrations médullaires et sur la corrélation de ces concentrations avec les dosages sanguins. Cette étude ne pouvait être réalisée pour le citalopram et le diazepam en raison de la difficulté de constituer une série de cas statistiquement significative de prélèvements autopsiques positifs à l'une de ces deux molécules dans un délai compatible avec la réalisation de la thèse. La caféine a été choisie comme molécule modèle pour sa consommation importante dans la population générale, ce qui permet un recrutement rapide des cas. Les dosages ont été réalisés dans le sang et six sites de MO costale et fémorale sur 21 cas autopsiques.

Une partie finale synthétise l'apport de ces expérimentations sur les connaissances théoriques de la MO et leur intérêt dans l'interprétation des analyses de la MO en toxicologie médicolégale.

Partie bibliographique

L'analyse toxicologique de la MO présente potentiellement de nombreux intérêts rappelés dans la majorité des publications concernant cette matrice [8, 25, 28]: tissu richement vascularisé, protégé par la matrice osseuse des agressions extérieures et de la majorité des phénomènes de redistribution... Au-delà de ces évidences, il apparait essentiel de faire le point des connaissances actuelles et de l'apport des travaux publiés afin de définir de manière objective l'intérêt et les limites de l'utilisation de cette matrice alternative en toxicologie médicolégale.
Une recherche systématique a été réalisée sur Pubmed en utilisant le mot clef "marrow" combiné à "postmortem, post mortem, toxicology, chromatography" et les références citées par chaque article ont été vérifiées afin de recenser l'essentiel de la littérature. A partir des données obtenues, cette revue propose d'aborder, pour la MO, l'ensemble des points à prendre en considération lors de l'interprétation de toute analyse toxicologique: connaissance physiologique de la matrice, techniques d'extraction et d'analyse, pharmacocinétique, évolution *post mortem*...

La MO est un tissu complexe, contenu à l'intérieur des os, richement vascularisé par un réseau de sinusoïde et comprenant de la moelle rouge (hématopoïétiquement active, cellulaire) et de la moelle jaune (inactive, composée essentiellement d'adipocytes). Une des particularités de la MO est sa conversion physiologique de la MO rouge vers la MO jaune suivant un processus déterminé progressif en fonction de l'âge et une conversion inverse lors de certains processus pathologiques. Ces phénomènes résultent en une hétérogénéité de la MO qui se traduit par une composition différente en fonction de la localisation anatomique considérée, de l'âge et des antécédents pathologiques. Ainsi, le site de prélèvement de MO a été proposé comme un paramètre important à considérer en toxicologie médicolégale bien qu'il n'ait pas fait l'objet d'étude spécifique.

Quarante cinq molécules d'intérêt médicolégal ont été mises en évidence dans les prélèvements de MO établissant l'intérêt qualitatif de cette matrice. De par la nature de la MO à la fois lipidique et tissulaire, les techniques de préparation d'échantillon mises en œuvre sont pour la plupart complexes (extraction multiple, étape d'homogénéisation, d'extraction des lipides) et caractéristiques de celles employées pour les matrices difficiles à analyser telles que des échantillons lipidiques ou putréfiés. Les techniques analytiques utilisées, faisant appel majoritairement à la chromatographie, sont rarement validées spécifiquement pour cette

matrice. Cette absence de prise en compte de l'effet matrice ne permet pas de connaitre de manière précise les performances des techniques décrites notamment en terme de limite de quantification. L'interprétation quantitative des résultats, principalement basée sur une recherche de corrélation entre concentrations sanguines et médullaires, est encourageante mais reste essentiellement cantonnée à l'expérimentation sur modèle animal. Les stabilités *in corpore* et *in vitro* ont été ponctuellement étudiées et présentent des résultats variables en fonction de la molécule et des conditions de l'étude. La revue de littérature a par ailleurs montré des lacunes sur la connaissance de la cinétique des xénobiotiques au sein de cette matrice ainsi que sur l'influence de la redistribution *post mortem* ce qui limite la valeur de l'interprétation des résultats d'analyse aussi bien d'un point de vue qualitatif que quantitatif.

Cette revue confirme le fort potentiel de la MO dans le domaine de la toxicologie médicolégale et établit son intérêt dans la détection de nombreux xénobiotiques. Toutefois les données sur la MO restent parcellaires ou issues d'expérimentations standardisées difficilement extrapolables à des cas autopsiques. De nombreux travaux restent à réaliser pour que les résultats obtenus par l'analyse de cette matrice soient interprétables quantitativement et exploitables de manière fiable d'un point de vue judiciaire.

Int J Legal Med
DOI 10.1007/s00414-010-0525-6

State-of-the-art of bone marrow analysis in forensic toxicology: a review

Nathalie Cartiser & Fabien Bévalot & Laurent Fanton & Yvan Gaillard & Jérôme Guitton

Received: 11 June 2010 / Accepted: 20 October 2010
Springer-Verlag 2010

Abstract Although blood is the reference medium in the field of forensic toxicology, alternative matrices are required in case of limited, unavailable or unusable blood samples. The present review investigated the suitability of bone marrow (BM) as an alternative matrix to characterize xenobiotic consumption and its influence on the occurrence of death. Basic data on BM physiology are reported in order to highlight the specificities of this matrix and their analytical and toxicokinetic consequences. A review of case reports, animal and human studies involving BM sample analysis focuses on the various parameters of interpretation of toxicological results: analytic limits, sampling location, pharmacokinetics, blood/BM concentration correlation, stability and postmortem redistribution. Tables summarizing the analytical conditions and quantification of 45 compounds from BM samples provide a useful tool for toxicologists. A specific section devoted to ethanol shows that, despite successful quantification, interpretation is highly dependent on postmortem interval. In conclusion, BM is an interesting alternative matrix, and further experimental data and validated assays are required to confirm its great potential relevance in forensic toxicology.

Keywords Bone marrow . Forensic toxicology . BM physiology

N. Cartiser : J. Guitton
Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1,
ISPB-Faculté de pharmacie, Laboratoire de Toxicologie,
8 avenue Rockefeller,
69373 Lyon cedex 08, France

N. Cartiser : F. Bévalot : Y. Gaillard
Laboratoire LAT LUMTOX,
69008 Lyon, France

F. Bévalot (*) : L. Fanton
Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1,
Institut de Médecine Légale,
8 avenue Rockefeller,
69373 Lyon cedex 08, France
e-mail: f.bevalot@latlumtox.com

J. Guitton
Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon-Sud,
Laboratoire de pharmacologie-toxicologie,
69495 Pierre Bénite, France

Introduction

Although blood is the reference medium in the field of postmortem analytical toxicology, the use of other biological matrices has for decades been described in cases of limited, unavailable or unusable blood samples. Bone marrow (BM) is one such alternative matrix. According to a number of reports [1–3], BM may act as a repository for drugs, by virtue of its rich vascularization, a high lipid content and a bone protection against contamination, that make it potentially suitable for forensic toxicology. BM may therefore be a relevant alternative tissue, especially when remains are skeletonized, bloodless or in extreme putrefaction. BM is already used in forensic science for genetic analysis [4], to estimate postmortem interval [5–8], in the diatom test for diagnosis of drowning [9, 10] and in histopathology to establish certain malignancies postmortem [11–13]. In forensic toxicology, the first report of BM analysis was in 1943, to document the kinetics of alcohol [14]. In the 1980s, Winek et al. [3, 15–24] intensively studied the correlation between blood and BM in both

Published online: 09 November 2010

animal and human models. During the following decade, few toxicological data on BM were published, except for some case reports. Recently, there has been renewed interest in BM, in particular with the work on skeletal remains by the Laurentian University (Ontario, Canada) [25–30].

The main aim of postmortem toxicology analysis is to determine possible consumption of xenobiotics by the victim and its relevance to the occurrence of death. Achieving this objective when only BM is available raises two kinds of question: (1) Can xenobiotics be detected in BM from a pharmacokinetic and analytical point of view? (2) Are drugs levels in BM samples representative of blood concentrations at time of death, i.e., are BM results quantitatively interpretable? The purpose of the present review was to determine whether the international literature provides any answers to these questions, and more generally to present a survey of the published data on BM analysis in forensic toxicology. A systematic PubMed review was performed, using the search term 'marrow' combined with 'toxicology', 'forensic', 'post mortem', 'postmortem' and 'chromatography' and cross-checked with the references in each article retrieved. Basic data on BM physiology are reviewed, to explain the specificities of this matrix and their implications for analytical and toxicokinetic aspects. The various parameters of interpretation (analytical limits, sample collection, pharmacokinetics, stability and postmortem distribution) are then examined.

Physiology

Composition

As of birth, hematopoiesis is essentially confined to BM. One of the largest organs in the body, BM constitutes approximately 4% of total body weight (3,000 and 2,600 g in adult males and females, respectively). It is encased in the medullary cavities of bone, with 15% in trabecular bone [31]. Histologically, BM is a highly organized and complex vascular connective tissue (Fig. 1). Its cellular components include adipocytes, hematopoietic cells (from stem to mature cells) and reticuloendothelial cells, supported by a trabecular framework. On gross examination, BM is red (hematopoietic marrow, Fig. 1a) or yellow (fatty marrow, Fig. 1b) depending on its predominant components. In a middle-aged adult, red marrow comprises 60% hematopoietic cells; chemically, it consists of 40–60% lipids, 30–40% water and 10–20% protein. Yellow marrow is almost entirely composed of adipocytes (95%); chemically, it consists of 80% lipids, 15% water and 5% protein [32]. The proportion of adipocytes and hematopoietic cells can vary diffusely or focally (isolated island), resulting in a normal heterogeneity [31, 33].

Vascularization

BM has a dual blood supply, consisting of a periosteal capillary network and nutrient arteries that penetrate the

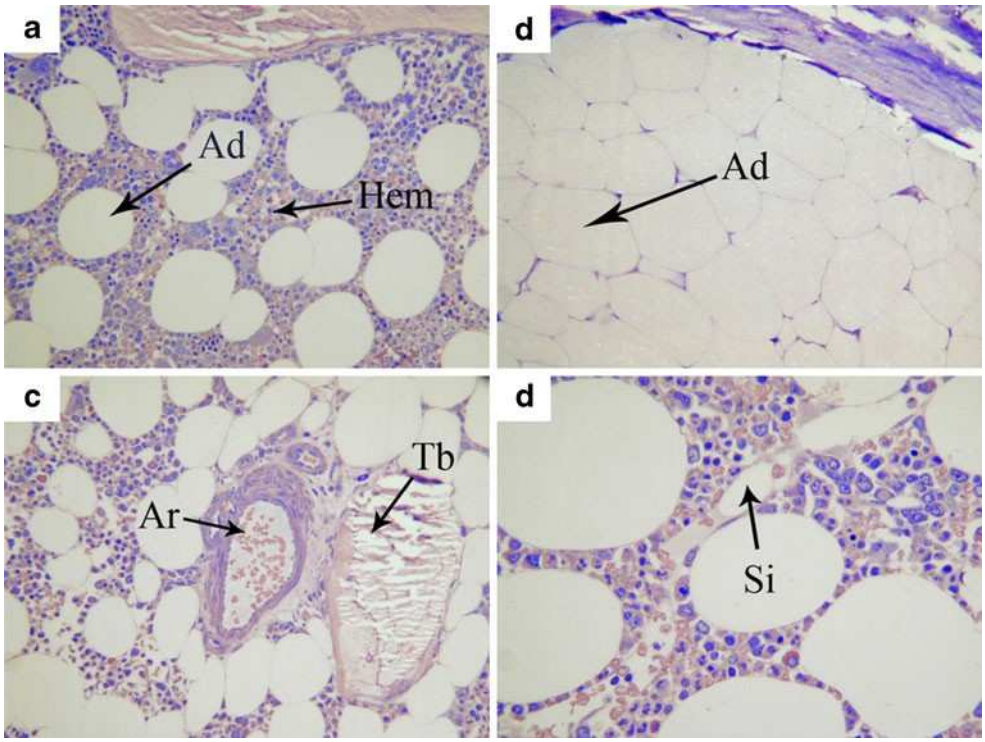


Fig. 1 Hematoxylin –eos i n-stained histologic sections of bone marrow (original magnification ×25).
a Normocellular BM with a cellularly around 40% (Ad adipocyte, Hem hematopoietic cells).
b Fatty BM in an old subject.
c Transversal section of a nutrient arteriole (Ar arteriole, Tb trabecular bone).
d Sinusoïd with intra-sinusoïdal red blood and hematopoietic cells (Si sinusoid)

bone and branch within the medullary tissue (Fig. 1c) [31, 34, 35]. In red marrow, an abundantly ramified network of sinusoids is formed (Fig. 1d). The sinusoids, with discontinuous endothelial cells and a disrupted basal lamina, are highly permeable to protein and mature blood cells. On the other hand, the vascular network of yellow marrow is much less abundant, and is constituted of capillaries [33]. Estimated BM blood flow is approximately 10 ml/min/100 cm^3 in healthy adults [31] and is reduced in older subjects [36].

Age-related involution

The proportion of fatty and cellular components of BM changes with age in a physiological conversion of red to yellow marrow. The transition occurs over the first two decades of life, in a predictable monotonous sequence. During fetal growth, hematopoiesis takes place in all skeletal compartments as in liver and spleen. At birth, splenic and hepatic hematopoiesis has already ceased, and red marrow is present throughout the entire skeleton. After birth, marrow conversion starts in the terminal phalanges and extends in a symmetric centripetal manner in the peripheral skeleton. Additionally, in long bones, marrow conversion occurs in diaphyses and progresses both distally and proximally toward metaphyses (Fig. 2). The adult pattern of marrow distribution is generally achieved by the age of 25 years, when red marrow is localized in the axial skeleton (skull, spine, sternum, clavicles, scapulas, pelvis, ribs) and proximal femora and humeri. From then on, the proportion of fatty cells increases in the remainder of the skeleton, at a speed depending on individual parameters and medical conditions [31, 32, 37]. Studies showed an increase in fat fraction of around 7% per decade [38]. Hematopoietic marrow decreases to around 30% of total BM at 80 years of age [37]. Several mechanisms of red-to-yellow conversion have been studied. Some assume that it is related to thermal conditions [39] or to the proportion of mesenchymal stem cells within the marrow cavities [40]. According to Bigelow and Tavassoli [41], it follows a programmed design defined by the location of adipose and hematopoietic precursor at birth.

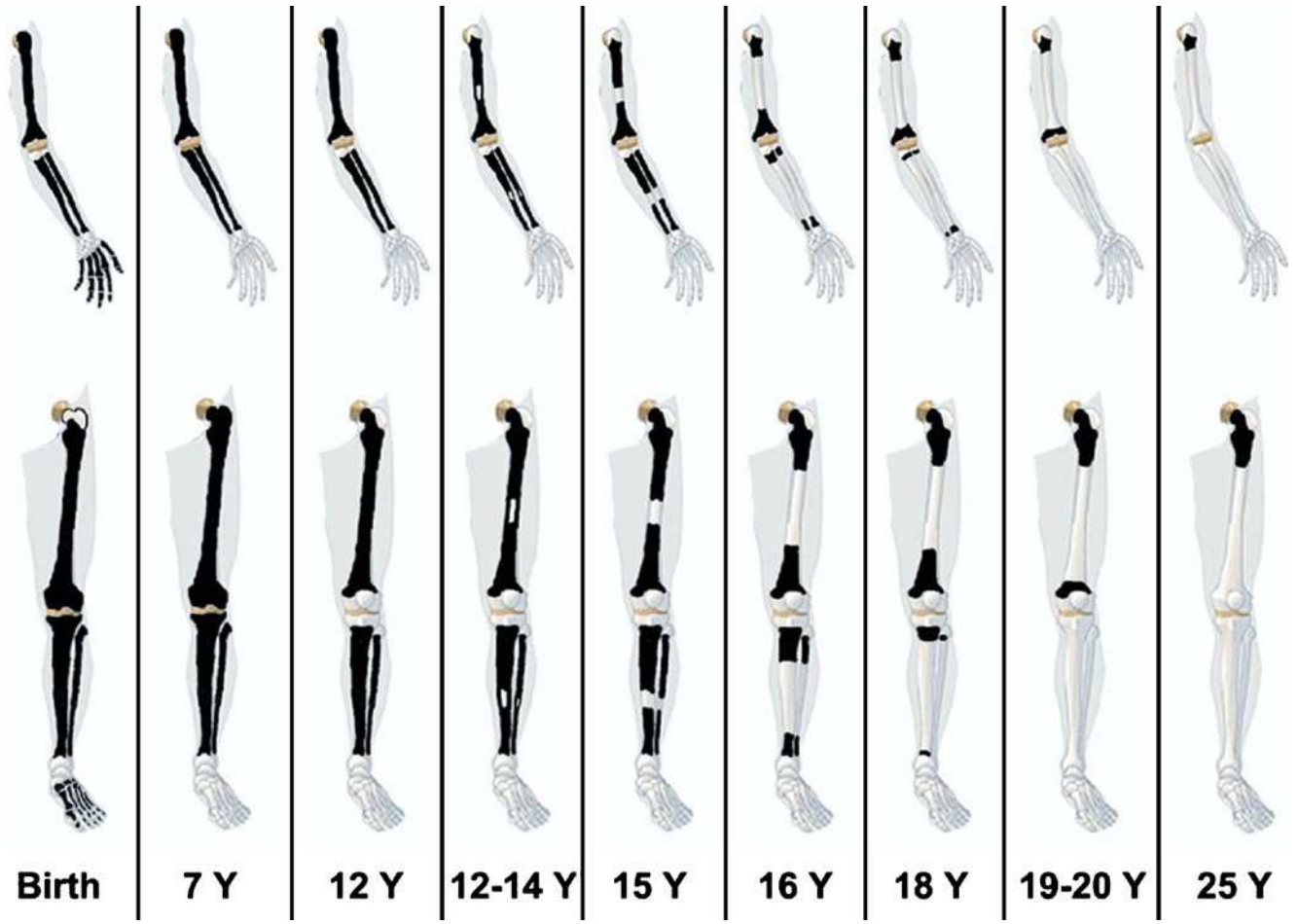


Fig. 2 Diagrammatic representation of the distribution of red marrow (in black) in tubular bones from birth until 25 years. At birth, unossified epiphyses do not contain red marrow. From Blebea et al. [31], with permission

Pathological BM conversion

Various benign or malignant disorders and therapeutic events can alter BM composition. In normal adults, yellow marrow may be reconverted into red marrow to increase blood cell production, in case of hemolytic anemia or certain malignant processes, for example. Reconversion proceeds in exactly the reverse sequence to the initial conversion, and occurs quickly in flat bones since these retain hematopoietic marrow throughout life [32, 37]. Benign BM hyperplasia has been observed under various physiopathological processes of chronic tissue hypoxia, including obesity, long-distance running or heavy smoking, and in chronic disorders resulting in anemia, such as hemoglobinopathy or chronic infection [31–33]. It is characterized by an increase in red marrow within the distal metaphyseal region of long bones. Although not fully established [37, 38], a few studies reported that benign hyperplasia was more frequent in females than males [31, 33, 38, 42], likely due to menstruation and female hormonal specificities. BM fat content increases to compensate for hypocellularity (aplastic anemia, inhibition of hematopoiesis by certain tumors, etc.) or trabecular thinning (osteopenia) [43–45]. In contrast, cancer cell infiltra- tion results in replacement of fatty marrow by cancer cells, increasing the cellular content of BM, with a focal, multifocal or diffuse distribution [43–45]. Angiogenesis, which facilitates malignancy perfusion, has been described in BM [46–48]. In certain specific malignancies, BM necrosis can occur, resulting in loss of myeloid tissue and marrow fat without trabecular destruction [43]. Finally, medical treatment can also modify BM contents: e.g., hematopoietic factor increases red marrow contents while anticancer radiation therapy and chemotherapy increase the proportion of yellow marrow [43, 45].

Postmortem changes of BM

BM is encased either in the medullary cavity of long bones or in the trabecular tissue of cancellous bones [28]. This shield of solid bony tissue provides great mechanical stability. Therefore, as long as bone integrity is preserved, BM can be assumed to be better protected than any other organ sample against maggot infestation and postmortem contamination and damage (trauma, animal predators or fungus, bacteria and parasites) [2, 3, 49]. Once the bone is broken, however, the BM is no longer protected and may even be non-recoverable [26, 50]. Specific local protection seems to delay putrefaction [3]. Roll et al. [11] investigated the histopathology of 225 BM samples from autopsies performed between 12 and 140 h postmortem: they found few autolytic changes in BM specimens, compared to major alterations in other organ samples from the same corpse. A retrospective report of 20 years' experience of exhumation [51] estimated BM histologic preservation to be at least 3 months.

As described above, normal human BM is roughly red or yellow, with a firm gelatinous consistency [2, 3, 21]. With increasing postmortem interval and depending on conservation conditions, BM samples can become dark and lose integrity [3, 21], resulting in a brown oily liquid. They can also become adipocerous by saponification [52, 53] or dry into brownish or yellowish powder [54–56]. Overall, BM has been found suitable for toxicological analysis in human corpses up to 5 years after death [57].

BM analysis

Due to the complexity of BM composition, in particular its high lipid content, as well as variability in sample quality, BM analysis remains complex. Tables 1 and 2 report sampling location, sample pre-treatment methods, analytic assays and findings from publications concerning targeted analysis and screening on BM samples, respectively.

Sample collection and storage

No standardized procedures of BM collection and storage have been proposed. BM can be sampled postmortem from different locations: in the femur after section of the cortical bone [19], squeezed out of the ribs using pliers [49], or by trocar aspiration in vertebral bodies as in vivo [58]. The resulting samples present different properties: femoral BM is fattier than rib BM, while aspirates are in liquid form rich in hematopoietic cells. Few works considered stability during storage. As described later, Winek et al. studied in vitro stability of some drugs at varying temperature [15, 18, 24] as well as the influence of the nature of container (glass or polyethylene) and the use of preservative on ethanol conservation [20]. These investigations showed that BM samples should be analyzed as soon as possible due to concentration variation during storage. Overall, as for classical samples used in toxicology and without specific data on drug stability, storage at low temperature should be privileged. Preservatives, such as sodium fluoride, should be added for certain drugs (e.g., ethanol) even if homogenization in BM lipid may be difficult [20].

Sample preparation

Distinctive features were reported regarding sample preparation, related to the connective and highly lipid contents of BM. One-step preparations were reported only for particular applications involving immunologic assay [1] or headspace injection [58]. Two steps were usually added to

Table 1 Forensic toxicology references on drug analyses in bone marrow: reference and year of publication, species and sampling location, sample pretreatment and analytical assay, experimental or case report or human autopsic series, results of drug concentrations in BM and blood when available

Drugs detected Reference and year	Species Sampling location	Sample pretreatment Analytical assays	Analytical findings
Acetaminophen [65] 1989	Human –	BM macerated in water, LLE (acetone) LC/DAD	Case report BM findings: Acetaminophen 0.5 μg/g Blood findings: –
Acetone [18] 1982	Rabbit Femur	BM homogenized (ultrasonication in an ice bath), centrifugation GC/FID	Experimental report: i.p. injection of 1 to 2 ml/kg of absolute isopropanol BM findings (PMI from 0 to 24 h): Acetone 4.2–13.1 mg% Blood findings (PMI from 0 to 24 h): Acetone 10–45 mg%
Amphetamine Methamphetamine [57] 1986	Human Femur	BM homogenized in ethyl acetate, LLE, TFA derivation GC/FID, GC/MS	Case report BM findings: Amphetamine 0.1 μmol/100 g, Methamphetamine 1 μmol/100 g Blood findings: –
Amphetamine Methamphetamine [69] 1990	Rabbit Bones of extremities	Digestion at basic pH at 70°C, LLE (ethyl ether, dichloromethane), TFA derivation GC/MS	Experimental report: i.v. injection of metamphetamine in a dose of 5 mg/kg BM findings (BM was kept in bone under various conditions: dried or submerged, over a 2-year period): Methamphetamine 0.2–0.52 μmol/100 g, interference on Amphetamine Blood findings (blood was kept stained on gauze over a 2-year period): Methamphetamine: 0.08–0.14 μmol/100 g, Amphetamine: 0.03–0.07 μmol/100 g
Amphetamine Methamphetamine [81] 2000	Human –	– GC/MS	Case report BM findings: Amphetamine + Methamphetamine 0.54 μmol/100 g Blood findings (thermocoagulated blood): Amphetamine + Methamphetamine 1.66 μmol/100 g
Bromisovalum [68] 1996	Human Femur	BM pulverized and homogenized, LLE (ethyl ether) LC/MS	Case report BM findings: Bromisovalum 95.4 μg/g Blood findings: –
Bromisovalum [55] 1997	Human Femur	BM ground into powder GC/MS	Case report: suspected ingestion of maximum 30 g of bromisovalum BM findings: Bromisovalum in left femur 139.7 μg/g, in right femur 36.4 μg/g Blood findings: –
Colchicine [63] 1992	Human –	BM homogenized in phosphate buffer (homogenizer) RIA	Case report: suspected ingestion of 0.7 mg/kg BM findings: Colchicine >600 ng/g Blood findings: –
Desipramine [24] 1990	Rabbit Femur, tibia	BM homogenized in saline buffer (ultrasonication), LLE, lipids removal (hexane/ethanol/water) LC/DAD	Experimental report: administration per os in a dose of 10–20 mg/kg daily for 5 days BM findings: Desipramine 0.745–3.764 μg/g Blood findings: Desipramine 0.023–0.112 μg/ml

Table 1 (continued)

Drugs detected Reference and year	Species Sampling location	Sample pretreatment Analytical assays	Analytical findings
Dextropropoxyphene [65] 1989	Human –	BM macerated in water, LLE (chloroform, ethyl ether) LC/DAD	Case report BM findings: Dextropropoxyphene 1.2 μg/g Blood findings: –
Diazepam [64] 1991	Rat Femur, tibia	BM ground in acidic solution, dilution in phosphate buffer RIA	Experimental report: i.p. injection in a dose of 83 μg/kg BM findings (graphical data): Diazepam 2–5 ng/g Blood findings (graphical data): Diazepam 0.2–7.5 ng/ml
Diazepam [29] 2009	Rat Femur	BM homogenized in saline solution (ultrasonication) ELISA	Experimental report: administration in a dose of 20 mg/kg BM findings: sensitivity of benzodiazepine ELISA test in BM: 100% Blood findings: –
Diazinon [61] 2009	Rabbit Hind and front legs	BM homogenized (homogenizer), LLE (hexane), SPE GC/MS	Experimental report: administration per os in a dose of 2500 mg/kg BM findings: Diazinon 13–118 mg/kg at death, 36–3515 mg/kg after a 1-month period buried Blood findings: Diazinon 0.1–0.8 mg/l at death
Endosulfan [61] 2009	Rabbit Hind and front legs	BM homogenized in sodium sulfate (homogenizer), LLE (ethyl acetate) GC/MS	Experimental report: administration per os at a dose of 100 mg/kg BM findings: Alpha-endosulfan: not detected at death, 0.02–0.3 mg/kg after a 1-month period buried Beta-endosulfan: not detected at death, 0.07–0.9 mg/kg after a 1-month period buried Endosulfan ether: not detected at death, 0.02–0.2 after a 1-month period buried mg/kg Endosulfan sulfate: 0.12–0.15 mg/kg at death, not detected after a 1-month period buried Blood findings: Alpha-endosulfan: not detected at death Beta-endosulfan: not detected at death Endosulfan ether: 0.01–0.02 mg/kg at death Endosulfan sulfate: 0.15–2.77 mg/kg at death
Ethchlorvynol [15] 1981	Rabbit Femur, Tibia	BM homogenized in water (vortex), LLE (anhydrous ether) GC/FID	Experimental report: i.p. injection in a dose of 19.5–80.2 mg/kg BM findings: Ethchlorvynol 0.17–79.90 mg% Blood findings: Ethchlorvynol 0.11–3.32 mg%
Fentanyl [25] 2009	Rat Femur	BM homogenized in saline solution (ultrasonication), dilution in acetate buffer ELISA	Experimental report: i.p. injection in a dose of 15 to 60 μg/kg BM findings: sensitivity of fentanyl ELISA test in BM: 66 to 100% according to administered dose. Blood findings: –

Table 1 (continued)

Drugs detected Reference and year	Species Sampling location	Sample pretreatment Analytical assays	Analytical findings
Fentanyl [26] 2010	Rat Femur	BM homogenized in saline solution (ultrasonication), dilution in acetate buffer ELISA	Experimental report: i.p. injection in a dose of 60 μg/kg BM findings: sensitivity of fentanyl ELISA test in BM: 67 to 100% according to PMI. Blood findings: –
Flurazepam [22] 1982	Rabbit Femur, tibia	BM homogenized in water (ultrasonication), LLE (ethyl ether), lipids removal (hexane/ethanol/water) GC/ECD	Experimental report: i.p. injection in a dose of 5 to 20 mg/kg BM findings: Flurazepam 0.013–8.325 mg% Blood findings: Flurazepam 0.038–0.313 mg%
Isopropanol [18] 1982	Rabbit Femur	BM homogenized (ultrasonication in an ice bath), centrifugation GC/FID	Experimental report: i.p. injection of 1 to 2 ml/kg of absolute isopropanol BM findings (PMI from 0 to 24 h): Isopropanol 30.4–119.9 mg% Blood findings (PMI from 0 to 24 h): Isopropanol 82–218 mg%
Ketamine [27] 2008	Rat Femur	BM homogenized in saline solution (ultrasonication) ELISA, GC/ECD	Experimental report: administration in a dose from 0 to 75 mg/kg BM findings: sensitivity of ketamine ELISA test in BM: 75 to 100% according to administered dose. Blood findings: –
Ketamine [30] 2008	Rat Femur	BM homogenized in saline solution (ultrasonication) ELISA, LC/MSMS	Experimental report: administration in a dose of 75 mg/kg BM findings: sensitivity of ketamine ELISA test in BM: 100% Blood findings: –
Meprobamate [59] 2007	Human Femur	BM homogenized in ammoniac buffer, LLE (chloroform/isopropanol), lipids removal (hexane/ethanol/water) GC/MS	Human autopsic series BM findings: Meprobamate 0–116 μg/g Blood findings: Meprobamate 0.41–372 μg/ml
Methanol [23] 1982	Rabbit Femur, tibia	BM homogenized (ultrasonication in an ice bath), centrifugation GC/FID	Experimental report: i.p. injection in a dose from 0.75 to 1.5 g/kg BM findings (PMI from 0 to 24 h): Methanol 24.4–108.3 mg% Blood findings (PMI from 0 to 24 h): Methanol 67.5–255.7 mg%
Midazolam [62] 2001	Mouse, rat –	BM homogenized in saline solution, centrifugation ELISA	Experimental report: acute administration by i.v. injection of 15 mg/kg, chronic i.v. administration of 300 μg every 16 h for 10 days BM findings: Midazolam successfully detected in BM Blood findings: Midazolam successfully detected in serum
Morphine [50] 2001	Human Femur	BM homogenized in water, LLE (dichloromethane/isopropanol), TMSA derivation FPIA, GC-FID	Case report BM findings: Morphine 195 ng/g Blood findings: –

Table 1 (continued)

Drugs detected Reference and year	Species Sampling location	Sample pretreatment Analytical assays	Analytical findings
Morphine [1] 2006	Rabbit Long bones	BM homogenized CEDIA	Experimental report: administration in a dose from 0.3 to 1.1 mg/kg with 0.1 mg/kg increment BM findings: Morphine 135–1080 ng/mg at death, 102–1108 ng/mg after a 1-week period Buried, 0–592 ng/mg after a 2-week period buried Blood findings: Morphine 106–2350 ng/ml at death
Morphine 6-AM [54] 2007	Mice –	BM homogenized (homogenizer), LLE (chloroforme/isopropanol), BSTFA derivation GC/MS	Experimental report: single lethal dose by i.v. injection of 300 mg/kg 6 BM findings: Morphine 34–220 ng/mg at death, not detected after a 2-month period of conservation in bone; 6-AM 2.4–24 ng/mg at death, 0.3–6.3 ng/mg after a 2-month period of conservation in bone Blood findings: Morphine 10.8–88 ng/ml at death; 6-AM 6.7–57 ng/ml at death Experimental report: chronic administration of 10 to 20 mg/kg of 6-AM daily for 20 days BM findings: Morphine not detected, 6-AM not detected Blood findings: Morphine not detected, 6-AM not detected
Nortriptyline [3] 1993	Rabbit Femur, tibia	BM homogenized in saline solution (ultrasonication), LLE (hexane/alcohol), lipids removal (hexane/ethanol/water) LC/DAD	Experimental report: administration per os in a dose of 20 mg/kg daily for 5 days BM findings (PMI from 0 to 48 h): Nortriptyline 0.835–6.778 μg/g Blood findings: Nortriptyline 0.036–0.227 μg/ml
Paraquat [56] 1997	Rabbit –	BM homogenized in acidic solution, SPE LC/DAD	Experimental report: administration per os of 1.2 g BM findings: Paraquat 1.5–43.3 μg/g after a 3- to 24-month period buried Blood findings: results in term of ratio blood/BM
Pentobarbital [16] 1985	Rabbit Femur	BM homogenized (ultrasonication), LLE (toluene) GC/FID	Experimental report: administration per os of a non lethal dosage (97 to 140 mg/kg) BM findings: Pentobarbital 2.29–3.70 mg% Blood findings: Pentobarbital 2.26–3.20 mg% Experimental report: administration per os of a lethal dosage (234–273 mg/kg) BM findings (PMI from 6 to 12 h): 4.3–6.68 mg% Blood findings (PMI 6 h): 4.66–5.69 mg%
Triazolam [67] 1997	Human Femur	Digestion at basic pH under heat, LLE (tert-butyl methyl ether) GC/MS-NICI	Case report BM findings: Triazolam for victim 1: 0.36 ng/g, victim 2: 0.37 ng/g Blood findings: –

BM bone marrow, BSTFA bis(trimethylsilyl)trifluoacetamide, CEDIA cloned enzyme donor immunoassay, DAD diode array detector, ECD electron capture detector, ELISA enzyme-linked immunosorbent assay, FID flame ionization detector, FPIA fluorescence polarization immunoassay, GC gas chromatography, i.p. intraperitoneal, i.v. intravenous, LC liquid chromatography, LLE liquid–liquid extraction, MS mass spectrometry, NICI negative ion chemical ionization, PMI postmortem interval, RIA radioimmunoassay, SPE solid phase extraction, TFA trifluoroacetic acid, TMSA trimethylsilylacetamide, –not available

Table 2 Forensic toxicology references on screening in bone marrow: reference and year of publication, species and sampling location, sample pretreatment and analytical assay, experimental or case report or human autopsic series, results of drug concentrations in BM and blood when available

Drugs detected Reference and year	Species Sampling location	Sample Pretreatment Analytical assays	Analytical findings
General Unkown Screening [60] 2005	Human Femur	Enzymatic digestion under heat, LLE, lipids removal (hexane/ethanol/water) GC/MS	Human autopsic series BM findings: acetaminophen, amitriptyline, citalopram, cyamémazine, dextropropoxyphen, fluoxetine, meprobamate, norclobazam, nordiazepam, nortriptyline, oxazepam, pentobarbital, sertraline, thiopental, venlafaxine
General Unkown Screening [65] 1989	Human –	BM macerated in water, acidified: LLE (chloroform/diethylether) for acidic drugs, then basified: LLE (diethylether) for basic drugs GC/MS, GC/NPD, TLC, LC/DAD GC/MS, GC/NPD, TLC, LC/DAD	Case report BM findings: paracetamol: 0.5 µg/g, dextropropoxyphène: 1.2 µg/g
General Unkown Screening [66] 1978	Human Vertebrae	BM warmed in ethanol, acidified: LLE (diethylether), basified: LLE (chloroform) GC/FID	Case report BM findings: amitriptyline: 0.07 mg/51.8 g BM
Targeted Screening [2] 2000	Human First study: Femur Second study: Lumbar	BM homogenized (ultrasonication), routine methods used for the analysis of blood drug concentration (not described). GC and LC	Human autopsic series BM findings: amitriptyline 0.56–6.3 mg/kg, nortryptiline 0.2–5.4 mg/kg, doxepin 0.21–0.97 mg/kg, nordoxepin 0.84–0.86 mg/kg, sertraline 0.67 mg/kg, chlorpromazine 0.36 mg/kg, diazepam 0.84–5.6 mg/kg, nordiazepam 0.16–1.9 mg/kg, temazepam 0.2–4.4 mg/kg, oxazepam 0.36–1.6 mg/kg, propoxyphene 0.75–25 mg/kg, methadone 0.56–0.86 mg/kg, oxycodone 1.2 mg/kg, mianserin 0.98 mg/kg, nordoxepin 34 mg/kg, doxepin 2.9 mg/kg, sertraline 1.2 mg/kg, moclobemide 24 mg/kg, thioridazine 2.1–4.8 mg/kg, mesoridazine(metabolite) 1.3 mg/kg, olanzapine 0.98 mg/kg

BM bone marrow, DAD diode array detector, FID flame ionization detector, GC gas chromatography, LC liquid chromatography, LLE liquid–liquid extraction, MS mass spectrometry, NPD nitrogen–phosphorus detector, TLC thin layer chromatography, – not available

conventional pre-treatment protocols: BM dissolution and a lipid removal step. Dissolution is needed to obtain a homogenous liquid suitable for further extraction. Various methods were described involving mechanical techniques (ultrasonication or homogenizer) or agitation, heating, and maceration in extraction medium. Lipid removal can be achieved by an additional hexane wash of the final extract [3, 22, 24, 59, 60] or by multi-step extraction as proposed by Guillot et al. for the quantification of morphine and 6-acetylmorphine (6-AM) [54]. A solid-phase extraction process was successfully applied to BM analysis in other studies [29, 30, 49, 56, 61].

Analytical methods

Several analytical techniques have been described as suitable and relevant for BM analysis. In most cases, forensic analysis of BM uses chromatographic approaches similar to those for other matrices. Chromatographic separation is principally performed by gas chromatography (GC) rather than liquid chromatography (LC). This can be easily explained by the fact that mass spectrometry (MS) is the detection system of choice for toxicological analysis of such complex matrices, and GC/MS systems were in more widespread use than LC/MS systems until a few years ago; recently, however, liquid chromatography tandem mass spectrometry has also been applied to BM [29, 30, 49]. While mass spectrometry remains the main detection system, as reported in Table 1, other detection systems have been used, such as flame ionization detection for volatile molecules (e.g., ethanol, methanol, isopropanol). Various publications highlighted the suitability of immunological assay for qualitative [25–27, 29, 30, 62] and quantitative purposes [1, 50, 63, 64].

Case reports

In at least six case reports [55, 57, 65–68], toxicological findings were restricted to skeletal tissue analysis. They concerned corpses discovered in skeleton state, 7 months to 5 years after their disappearance. The remains consisted of

Table 3 Forensic case reports involving the finding of skeletonized remains upon which bone marrow toxicological analysis was performed: reference and year of publication, sex and age, cause of death accurately known or suspected owing to the circumstances, finding context and length since missing report, analytical findings in bone marrow

Case [ref] year	Sex (age)	Cause of death	Finding context Missing time	Analytical findings in bone marrow
1	Female	Suicide	Natural environment	Paracetamol 0.5 μg/g
[65] 1989	(45)	Intoxication	20 months	Dextropropoxyphene 1.2 μg/g
2	Female	Suicide	Natural environment	Amitriptyline 0.07 mg/51.8 g
[66] 1978	(47)	Intoxication	8 months	
3	n=2	Homicide	Buried	Triazolam
[67] 1997	Male	Buried alive	4 years	First victim 0.36 ng/g, second victim 0.37 ng/g
4	Male	Suicide	Natural environment	Bromisovalum
[55] 1997	(46)	Intoxication	7 months	Femur left 139.7 μg/g, right 36.4 μg/g
5	Male	Suicide	Natural environment	Bromisovalum 95.4 μg/g
[68] 1996		Intoxication	–	
6	Male	Homicide	Buried	Methamphetamine 1 μmol/100 g
[57] 1986	(28)	Strangulation	5 years	Amphetamine 0.1 μmol/100 g

– Not available

bones, sometimes with putrefied adhering tissue, and containing BM in various stages of decomposition. During investigation, toxicological analysis was required to shed light on the circumstances of death or the state of consciousness of the victim at time of death. As only BM was available for analysis, the authors attempted to detect, quantify and interpret the presence of xenobiotics in this matrix. Findings and case contexts are summarized in Table 3.

Acetaminophen and dextropropoxyphen were detected by Bal et al. [65] on skeletal remains found in a forest. The body was attributed to a man who disappeared 20 months previously, leaving a suicide note in his car. He had been prescribed Distalgesic (dextropropoxyphene and paracetamol) and Tranxene (chlorazepate potassium). The authors drew no conclusions regarding possible intoxication, due to lack of data for drug levels in unusual matrices.

In another case, the body of a 47-year-old woman was discovered, virtually skeletonized in a deserted area of her family ranch. By BM identification, Noguchi et al. [66] suggested that amitriptyline was present in antemortem circulation. However, several uncertainties concerning the fate of compounds in BM matrix (e.g., stability, drug distribution) made any quantitative interpretation unreliable. The police conducted a systematic search in the pharmacies of the region and found a prescription for amitriptyline for the presumed decedent.

In a third case, triazolam was detected in two BM samples and in one decomposed muscular fragment from two victims found buried, pointing to antemortem administration [67]. These analytical data were in agreement with statements by the suspects, who confessed they had administered triazolam to sedate the victims before burying them alive. BM triazolam concentrations were similar in both victims (0.36 and 0.37 ng/g), suggesting that both had received similar triazolam doses before death.

Maeda et al. [55] were able to detect bromisovalum in BM after the discovery of a skeleton on a bushy hill slope. Near the remains, three empty medication vials of bromovalerylurea (which would represent a maximum 30 g of bromisovalum) were discovered. Concentrations of 36.4 and 139.7 μg/g were measured in BM from the right and the left femur, respectively. When compared to the lethal concentrations reported in blood (44–114 μg/ml), the higher BM concentration suggested a possible contribution to the fatality. The authors stressed that drug accumulation in BM lipids, previously described by Winek et al. [3, 22], could not be excluded in this case. Moreover, the discrepancy in BM concentration between right and left femurs suggested postmortem redistribution and/or degradation.

Higuchi et al. [68] reported a very similar case of bromisovalum impregnation in BM (95.4 μg/g), suggesting an overdose in the light of the circumstances of death and

the bromisovalum level found in the BM samples compared with previous reports in other matrixes.
Finally, Kojima et al. [57] quantified amphetamine and methamphetamine in the BM of a methamphetamine abuser killed by strangulation and whose corpse lay buried for 5 years. Referring to a published schedule of effects according to amphetamine plus methamphetamine blood level, the authors suggested that the victim was, at the moment of his death, in an intermediate state of intoxication with mental disorder, if not a more severe state, given that some studies showed that amphetamine levels are usually lower in fatty tissue than in blood.
Taken together, these case reports highlight the relevance of analyzing BM tissue as an alternative matrix for xenobiotic detection, up to 5 years after death. Nevertheless, the lack of data about BM pharmacokinetics and postmortem changes limits interpretation of BM findings.

Interpretation

Qualitative approach

At least 45 compounds of forensic interest, including psychoactive and illicit drugs, volatiles, pesticides and herbicides, have been detected either by selective analysis (Table 1) or by targeted and general screening (Table 2). Using the General Unknown Screening approach, Bévalot et al. [60] detected 18 compounds in BM out of 32 identified in human blood. According to the authors, this low detection rate in BM was directly related to the restricted performance of the analytical method, especially in terms of detection limit and non-optimized procedures for certain drug families. McIntyre et al. [2], in two studies comparing drugs detected in blood and in thecorresponding BM, found respectively 45% and 70% concordance; the discrepancy between the two studies may have been due to differences in sampling location (femur vs. rib BM) or time of storage (more than 3 years in the first study). After standardized drug administration to rats, Watterson and colleagues reported the sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) on BM samples for fentanyl, ketamine and diazepam; this sensitiv- ity varied from 66% to 100% depending on the analyte, dose administered, and interval between administration and death [25–27, 29, 30].

Correlation between BM and blood concentrations

Several studies investigated correlations between BM and blood drug concentrations that might enable extrapolation. Such correlations are more or less significant depending on the xenobiotic, as reported in Table 4. Winek et al. demonstrated that extrapolation of blood level from BM level was possible in a rabbit model, for desipramine [24], flurazepam [22], isopropanol [18], methanol [23], nortriptyline [3] and pentobarbital [16].
Discrepancies in pharmacokinetic processes between blood and BM are observed for some compounds. Winek et al. [15] demonstrated that, in rabbits, peak ethchlorvynol blood level occurs 10–30 min after intraperitoneal injection and peak BM level between 15 and 60 min. In rats, diazepam clearance appears to be slower in BM than in blood, resulting in higher and longer BM impregnation [64]. This phenomenon was also reported in rats by Watterson et al. for diazepam [29] and fentanyl [26]: they assumed that accumulation occurred in BM and then in bone, followed by slow redistribution from bone to blood via BM. Benzodiazepine accumulation was also established in human autopsy specimens, where levels in BM were nearly 2.5 times as high as in blood (8.5 times for diazepam specifically) [2].
Where BM/blood correlations prove non-significant, various reasons have been suggested: death occurring before the steady-state was reached as described for heroin overdose by Guillot et al. [54], difference in sampling location, age and BM lipid/water ratio, storage conditions, and postmortem changes as proposed by Winek et al. [15, 18]. The last of these factors is fully described below.

Postmortem changes and stability of xenobiotics in BM

After death, various processes occur in corpses, including postmortem redistribution, degradation or evaporation and neo-formation. These phenomena can affect xenobiotic concentrations compared to at-death levels. Moreover, the toxicologist has to solve analytical problems directly related to the putrefied matrix and the compounds fate during sample storage. Several experimental models have been developed to estimate the impact of postmortem alteration in corpore on xenobiotic levels in BM. Studies have also been conducted to assess in vitro stability in BM samples.
After chronic administration of midazolam for 10 days, mice were sacrificed [62]. Bodies were stored for 21 days under three different conditions: frozen, or buried in sterilized or unsterilized soil (three mice per condition). Midazolam from serum, BM and viscera was quantified by ELISA. Levels were similar in BM samples stored frozen and in sterilized soil but were undetectable in unsterilized soil storage. The authors did not exclude that response based on immunological assay may be decreased due to analytical interference associated with putrefaction.
To study the stability of amphetamine compounds, i.v. methamphetamine was administered to five rabbits [69].

Table 4 Correlation studies between drug concentration in blood or serum and bone marrow: species and number (n) of subjects, methodology and correlation coefficient (r)

Drugs studied	Subject	Methodology	r
Acetone [15]	Rabbit (n=25)	Sacrifice 1 h after dosing (1–2 ml/kg of absolute isopropanol), sample collection 0 to 24 h after sacrifice	
		Blood versus observed BM levels	0.512
		Blood versus lipid content corrected BM levels	0.580
Desipramine [22]	Rabbit (n=20)	Sacrifice 1.5 h after the last dose (10–20 mg/kg daily for 5 days)	
		Blood versus BM levels	0.919
Diazepam [64]	Rat (n=20)	Sacrifice 1, 2, 4 or 8 after dosing (83 μg/kg)	
		Serum versus BM levels	0.997
Diazepam [47]	Human (n=9)	Autopsy sample	
		Blood versus BM levels	0.68
Ethchlorvynol [12]	Rabbit (n=40)	Sacrifice 5 to 300 min after dosing (20–80 mg/kg)	
		Blood versus BM levels	– (non significant)
Flurazepam [20]	Rabbit (n=24)	Blood versus BM levels	
		Sacrifice 1 h after dosing (5–20 mg/kg, n=12)	0.864
		Sacrifice 3 h after dosing (5–20 mg/kg, n=12)	0.863
		Together (n=24)	0.878
Isopropanol [15]	Rabbit (n=25)	Sacrifice 1 h after dosing (1–2 ml/kg of absolute isopropanol), sample collection 0 to 24 h after sacrifice	
		Blood versus observed BM levels	0.887
		Blood versus lipid content corrected BM levels	0.929
Meprobamate [59]	Human (n=51)	Autopsy sample	
		Blood versus BM levels	0.46
Methanol [21]	Rabbit (n=36)	Sacrifice 1 h after dosing (0.75–1.5 g/kg), sample collection 0 to 24 h after sacrifice	
		Blood versus observed BM levels	0.832
		Blood versus lipid content corrected BM levels	0.888
Morphine [58]	Rabbit (n=9)	Sacrifice 1 h after dosing (0.3–1.1 mg/kg)	
		Blood level versus BM level at death	0.983
		Blood level versus BM level after a 7-day period buried	0.917
		Blood level versus BM level after a 14-day period buried	0.883
Nordiazepam [47]	Human (n=10)	Autopsy sample	
		Blood versus BM levels	0.18
Nortriptyline [19]	Rabbit (n=24)	Sacrifice 1.5 h after the last dose (20 mg/kg daily for 5 days)	
		Sample 0 to 48 h after sacrifice	
		Blood versus BM levels	0.956
Pentobarbital [13]	Rabbit (n=18)	Sacrifice 60 min after dosing (97–143 mg/kg, n=12)	0.934
		Lethal intoxication (234–273 mg/kg), sample collection 6 h after death (n=6)	0.915
		Lethal intoxication (234–273 mg/kg), sample collection 12 h after death (n=6)	0.748
		Together (n=18)	0.950
Temazepam [47]	Human (n=7)	Autopsy sample	
		Blood versus BM levels	0.850

After sacrifice, bone samples were collected and stored for 2 years at room temperature, either in a dry environment or in water. Quantification was undertaken at 3, 6, 12 and 24 months postmortem. Methamphetamine was shown to be stable in samples from the dry environment, while large variability in concentrations was observed in samples stored in water.

Several studies estimated the postmortem behavior of certain herbicides and pesticides in BM. Ito et al. [56] studied the fate of paraquat orally administered to rabbits (n = 3). Animals were buried and samples from various tissues were analyzed regularly over a 2-year period. Paraquat was detectable in BM samples over the entire period, with relatively stable levels throughout the first year. However, these conclusions are to be taken with caution due to the limited population size and the great heterogeneity of results. In another study, 12 rabbits received lethal *per os* doses of diazinon or endosulfan [61]. Each animal acted as its own control: BM from the right tibia and femur were analyzed immediately, then remains were buried for a 1-month period. At exhumation, diazinon concentrations were around 25-fold higher than in samples at the moment of death (mean = 1,783 vs. 71 mg/kg). Undetected in controls, alpha and beta endosulfan isomers were found 1 month later. Conversely, the sulfate metabolite of endosul- fan was detected at death but not 1 month later. The authors impute these phenomena to postmortem biotransformation or redistribution by diffusion and/or vascular transport.

Two studies of opioids showed concordant findings. First, morphine was injected into nine rabbits; BM samples were collected at death, and after 1 and 2 weeks burial [1]. A decrease in morphine concentration of 21% and 38% was observed during respectively the first and second week of inhumation. The authors suggested that this may have been due to back-diffusion from BM to putrefied tissue and soil. During the second week, the process was probably enhanced by increased putrefaction. In the same toxicological field, lethal injections of heroin were administered to 12 mice. Levels of morphine and 6-AM were compared between BM collected immediately after death and frozen until analysis and BM stored for 2 months at room temperature in buried bone. The experiment showed a 71% decrease in 6-AM, while morphine became undetectable [54]. Other metabolites could not be tested, due to lack of BM samples.

Several short-term studies monitored the BM xenobiotic levels in rabbits stored at room temperature for less than 48 h after sacrifice. Such experiments tended to prove the stability of isopropanol [18], methanol [23] and nortripty- line [3] over a 24-h period. Conversely, the concentration of acetone decreased, probably due to its volatility. Pentobar- bital underwent a slight increase between 6 and 12 h postmortem, inducing an increase in the BM/blood ratio and a decrease in the correlation between blood and BM levels [16].

Finally, some studies assessed in vitro stability in BM by reanalyzing samples over time after storage under various conditions. Isopropanol was shown to be stable up to 24 h at both room temperature and +4°C [18]. Other compound samples were also studied: ethchlorvynol (from 0 to 24 h, frozen) [15], acetone (from 0 to 24 h, at +3.5°C or at room temperature) [18], methanol (from 24 h to 21 days, frozen) [23] and desipramine (from 7 to 22 days, frozen) [24]. For each substance, significant reductions (or, in some cases, increases) in BM concentration were reported. The authors suggested that these variations may be related to various processes such as evaporation, degradation, compound release from protein binding sites, or fat distribution heterogeneity in the samples.

Analysis of ethanol in BM

Ethanol has a special place in forensic toxicology due to the high morbidity and mortality associated with its toxicity and widespread consumption. Numerous studies have focused on its quantification in BM in both animal models and human samples (Table 5). In 1943, the first quantifi- cation of ethanol from BM samples was performed in five fresh corpses [70]. Several decades later, again from fresh corpses, correlation was established between blood and BM levels in an animal model [21] and human samples [17, 19]. Greater blood/BM ratio variability was found in rabbits than in humans. According to the authors, this variability could be related to biological differences, postmortem redistribution or varying lipid levels in BM samples from rabbit femurs and human ribs [19]. To avoid the last of these biases, Winek et al. [17] recommended, for the first time, correcting BM concentration taking into account the water content of the sample. This aqueous portion was calculated as the weight difference between BM sample and lipid content; the latter was evaluated by weighting the residue after evaporation of BM ether extract [17]. This correction factor enhanced the correlation and improved estimation of blood level from BM assay. Recently, Maeda et al. [58] also observed an excellent correlation between the levels in blood and BM aspirate collected between 5 and 48 h after death. Aspiration of BM in liquid form from vertebrae, however, is not available in most cases involving elderly victims, death from blood loss or multiple trauma. Overall, BM seems to be a useful alternative matrix for the interpretation of ethanol level when corresponding blood samples are not available in fresh corpses.

Samples from human BM collected up to 9 days after death matched blood results only in terms of presence vs. absence [71]: this lack of correlation led the authors to conclude that BM assay allows detection of ethanol but not assessment of impregnation. In the same study, six femoral

Table 5 Forensic toxicology publications on ethanol and metabolites in bone marrow: reference and year of publication, species and sampling location, experimental or case report or retrospective autopsic study, analytical assay, results in bone marrow and blood

Reference and year	Species Sampling location	Analytical findings
Ethanol		
[70] 1943	Human	Retrospective autopsic study
	–	Analytical assay: Widmark's Method
		BM findings: 0.143–0.804 g‰
		Blood findings: 1.166–4.42 g‰
[71] 1968	Human	Retrospective autopsic study
	Femur	Analytical assay: Widmark's Method
		BM findings: 0–1.77 g‰ at death, 0.06–0.58 g‰ after a 1-year period of conservation in bone
		Blood findings: 0–4 g‰
[16] 1980	Rabbit: femur, tibia	Experimental report: administration to rabbit of 1.5, 2.0, 2.3 g/kg per os
	Human:Ribs	Analytical assay: GC/FID
		BM findings (PMI from 1 to 7 h): 41.5–210.0 mg%
		Blood findings (PMI from 1 to 7 h): 78–333 mg%
		Retrospective autopsic study:
		Analytical assay: GC/FID
		BM findings: 43.5–204.5 mg%
		Blood findings: 117–409 mg%
[17] 1981	Rabbit: hind, front legs	Retrospective autopsic study and Experimental report: administration to rabbit in a dose of 1.5, 2.0, 2.3 g/kg per os
	Human: ribs	Analytical assay: GC/FID
		Evolution of concentrations in BM samples in vitro
[14] 1981	Human: Ribs	Retrospective autopsic study Analytical
		assay: Headspace-GC/FID BM findings:
		22–175 mg%
		Blood findings: 30–394 mg%
[18] 1983	Rabbit	Experimental report: administration to rabbit of 0,1.5, 2.0 g/kg
	Femur, tibia	Analytical assay: GC/FID
		Evolution of postmortem concentration in blood, eye fluid and BM in corpore
[57] 2006	Human	Retrospective autopsic study
	Vertebral aspirate	Analytical assay: Headspace-GC/FID
		BM findings: results in term of correlation and BM/blood concentration ratio
		Blood findings: 0.15–2.74 g‰
Ethylglucuronide		
[48] 2006	Human	Retrospective autopsic study: blood alcohol concentration 0.04–0.337 g%
	Ribs	Analytical assay: LC/MSMS
		BM findings: 0.82–9.36 μg/g
		Blood findings: 0.41–20.46 μg/ml

GC/FID gas chromatography with flame ionization detector, – not available

samples (three ethanol-positive and three negative BMs) were stored at room temperature for 1 year. Contradictory findings were obtained, and it was impossible to determine whether alcohol had been present at time of death. Supporting data were reported by Winek et al. [21] on a control group (n = 30) and ethanol-treated group (n = 60) of rabbits, stored after sacrifice at room temperature for 1 month. Up to 78.3 mg% neo-formation of ethanol was observed at 7 days in the control group; in the ethanol-treated rabbits, ethanol levels decreased gradually with time to a mean loss of 89.3% after a 28-day period of storage. Thus, the estimation of ethanol blood levels at death from BM data is uncertain (46.7% error at 28 days). Similarly, an in vitro study, performed on BM samples stored over 3 months at −6°C under various conditions, reported large variations in ethanol level: either decreases due to collection tube porosity or enzymatic oxidation during the time of analysis at room temperature, or increases caused by yeast and bacterial synthesis [20]. Ethanol neo-formation may lead to false positives in BM as in blood, either in vitro or in corpore.

Ethyl glucuronide is a minor direct metabolite of ethanol, produced by enzymatic conjugation with glucur- onic acid. Since its neo-formation has never as yet been demonstrated postmortem, this compound may constitute a relevant marker of ethanol consumption [49, 72]. Schloegl et al. [49] demonstrated that ethyl glucuronide can be detected in BM, suggesting that BM may be a helpful matrix when classical materials are not available. However, ethyl-glucuronide's stability in BM has yet to be established. Some studies suggested that ethyl glucuronide concentrations in blood and urine decline during putrefaction, long term storage at room temperature or in case of bacterial urinary infection [72–74], while others described a post collection formation of ethyl glucuronide in urine under experimental condition using bacteria [75, 76]. Ethyl sulfate is another non-oxidative metabolite of ethanol. This compound seems to be a promising marker due to its stability [75, 77], even if its bacterial degradation has also been described during standardized degradation test [78]. The simultaneous determination of these both metabolites, in urine and blood, seems to be more relevant than quantification of ethyl glucuronide alone and should help to verify or disprove a postmortem formation of ethanol [76, 79]. However, ethyl sulfate has not yet been investigated in BM.

In conclusion, various processes, including postmortem redistribution, enzymatic degradation, volatility and bacterial neo-formation, hinder interpretation of BM ethanol results.

Discussion and conclusion

In forensic toxicology, although blood is the reference sample for qualitative and quantitative interpretation, various tissues may be available for analysis according to the circumstances of death. In the case of skeletonized remains, severe putrefaction or extreme multiple trauma, BM may be the only alternative tissue for toxicological investigation. It presents several advantages, such as protection against contamination and putrefaction due to its location within bones, rich vascularization and large amount of lipid constituents. The present review gives an overview of case reports and animal and human studies involving BM analysis. This survey investigated the suitability of BM analysis for characterizing xenobiotic consumption and its influence on the occurrence of death, answering two main questions.

The first question was: can xenobiotics be detected in BM from a pharmacokinetic and analytical standpoint? Since BM is highly vascularized by a large sinusoid network, each compound circulating in the blood is assumed to be present in BM. Therefore BM detection of xenobiotics depends essentially on the performance of the analytical method. Nevertheless, the latter can be limited by the sample pre-treatment required for such a complex and fatty matrix. As few full validations have been made of assay sensitivity, negative results must be interpreted with caution. Furthermore, stability is a significant parameter in postmortem toxicology and is even more essential in BM analysis since this matrix comes into its own as an alternative to blood in case of long postmortem interval or aggressive phenomena (bloodless cadaver, fragment of corpse, etc.). In vitro and in corpore stability in BM has been occasionally studied, with varying results depending on drug class and time and condition of conservation, providing some clues for the interpretation of negative BM results.

To the second question—Are the drug levels in BM samples representative of the blood levels at time of death? —the literature does not provide any general answer. Although pharmacokinetic data for BM are limited, specific processes were occasionally described, such as BM accumulation of benzodiazepines and fentanyl. The mechanisms involved in BM drug distribution should therefore be investigated in animal experiments. Correlation between blood and BM concentrations was demonstrated for a wide range of compounds, allowing extrapolation from BM to blood results, which are more easily interpretable. However, the application of these data, mostly obtained on animal models with standardized protocols, to human autopsy cases, subject to uncontrollable and often unknown postmortem conditions, requires further study. When correlation with blood is not established, a statistical approach could be interesting to determine either a toxicity threshold or the likelihood that a drug level, quantified in an alternative matrix, corresponds to overdose rather than therapeutic use [59, 80]. Another aspect to consider for quantitative interpretation is the postmortem changes of BM concentration. Beyond drug stability, postmortem

redistribution of diazinon and endosulfan was shown to involve increase as well as decline in BM levels. Finally, as a result of varying BM composition (i.e. fatty and cellular proportion) in different bones according to age, sampling location was claimed by Winek et al. [15] and McIntyre et al. [2] to be a relevant factor that should be investigated. Likewise, hydrophilic or lipophilic behavior of molecules should be considered: Winek et al showed that blood/BM correlation of water soluble compound, such as methanol [23], ethanol [17], isopropanol and acetone [18], was improved correcting their concentration for water content, whereas other authors described accumulation in BM of lipophilic drugs like diazepam [2, 29, 64].

In conclusion, we consider that BM matrix is of great potential interest in forensic toxicology. Further experimental data and validated analytical assays are required to enable reliable qualitative determination and, eventually, quantitative interpretation from human BM samples.

Acknowledgements
The authors would like to express their gratitude to Dr. Martine French for providing the pictures of histologic sections of bone marrow (Fig. 1).
Figure 2 was reprinted from Seminars in Nuclear Medicine, 37(3), Judy S. Blebea, Mohamed Houseni, Drew A. Torigian, Chengzhong Fan, Ayse Mavi, Ying Zhuge, Tad Iwanaga, Shipra Mishra, Jay Udupa, Jiyuan Zhuang, Rohit Gopal, and Abass Alavi, Structural and Functional Imaging of Normal Bone Marrow and Evaluation of its Age-Related Changes, pages 186, Copyright (2010), with permission from Elsevier.
Nathalie Cartiser is grateful to 'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, Service CIFRE' for the PhD grant.

References

1. Cengiz S, Ulukan O, Ates I, Tugcu H (2006) Determination of morphine in postmortem rabbit bone marrow and comparison with blood morphine concentrations. Forensic Sci Int 156:91–94
2. McIntyre LM, King CV, Boratto M, Drummer OH (2000) Post-mortem drug analyses in bone and bone marrow. Ther Drug Monit 22:79–83
3. Winek CL, Morris EM, Wahba WW (1993) The use of bone marrow in the study of postmortem redistribution of nortriptyline. J Anal Toxicol 17:93–98
4. Frank WE, Llewellyn BE (1999) A time course study on STR profiles derived from human bone, muscle, and bone marrow. J Forensic Sci 44:778–782
5. Dmitrienko Iu A, Kononenko VI, Lakiza BS (1983) Postmortem changes in bone marrow tissue as a criterion of time of death. Sud Med Ekspert 26:19–21
6. Findlay AB (1976) Bone marrow changes in the post mortem interval. J Forensic Sci Soc 16:213–218
7. Hao LG, Deng SX, Zhao XC (2007) Recent advancement in relationship between DNA degradation and postmortem interval. Fa Yi Xue Za Zhi 23:145–147
8. Luo GH, Chen YC, Cheng JD, Wang JF, Gao CL (2006) Relationship between DNA degradation and postmortem interval of corrupt corpse. Fa Yi Xue Za Zhi 22:7–9
9. Gruspier KL, Pollanen MS (2000) Limbs found in water: investigation using anthropological analysis and the diatom test. Forensic Sci Int 112:1–9
10. Pollanen MS (1997) The diagnostic value of the diatom test for drowning: II. J Forensic Sci 42:286–290
11. Roll P, Beham A, Beham-Schmid C (2009) Post-mortemhistopathological investigations of the bone marrow in forensic medicine: an important issue for both the forensic and clinical pathologist. Forensic Sci Int 186:e17–e20
12. Sakai K, Takatsu A, Shigeta A, Abe S, Ikegami M, Takagi K (2007) Sudden death due to undiagnosed acute promyelocytic leukemia: a case report. Int J Leg Med 121:311–314
13. Umezawa A, Yamada T, Ogawa Y, Kuramochi S, Watanabe Y (1990) Postmortem diagnosis of acute megakaryocytic leukemia. Usefulness of immunohistochemistry and tissue hemogram. Acta Pathol Jpn 40:693–698
14. Casier H, Thomas F, Delaunois AL (1943) La répartition de l'alcool chez l'homme et les animaux au cours de l'intoxication éthylique. Arch Int Pharmacodyn 69:186–204
15. Winek CL, Cibulas W Jr, Wahba WW (1981) A comparative study of ethchlorvynol levels in blood versus bone marrow. Forensic Sci Int 17:197–202
16. Winek CL, Costantino AG, Wahba WW, Collom WD (1985) Blood versus bone marrow pentobarbital concentrations. Forensic Sci Int 27:15–24
17. Winek CL, Esposito FM (1981) Comparative study of ethanol levels in blood versus bone marrow, vitreous humor, bile and urine. Forensic Sci Int 17:27–36
18. Winek CL, Janssen JK (1982) Blood versus bone marrow isopropanol concentrations in rabbits. Forensic Sci Int 20:11–20
19. Winek CL, Jones T (1980) Blood versus bone marrow ethanol concentrations in rabbits and humans. Forensic Sci Int 16:101–109
20. Winek CL, Luhanik JM (1981) A storage study of ethanol in rabbit and human bone marrow. Forensic Sci Int 17:191–196
21. Winek CL, Matejczyk RJ, Buddie EG (1983) Blood, bone marrow and eye fluid ethanol concentrations in putrefied rabbits. Forensic Sci Int 22:151–159
22. Winek CL, Pluskota M, Wahba WW (1982) Plasma versus bone marrow flurazepam concentration in rabbits. Forensic Sci Int 19:155–163
23. Winek CL, Susa D (1982) Blood versus bone marrow methanol concentrations in rabbits. Forensic Sci Int 19:165–175
24. Winek CL, Westwood SE, Wahba WW (1990) Plasma versus bone marrow desipramine: a comparative study. Forensic Sci Int 48:49–57
25. Lafreniere NM, Watterson JH (2009) Detection of acute fentanyl exposure in fresh and decomposed skeletal tissues. Forensic Sci Int 185:100–106
26. Lafreniere NM, Watterson JH (2010) Detection of acute fentanyl exposure in fresh and decomposed skeletal tissues: Part II. The effect of dose-death interval. Forensic Sci Int 194:60–66
27. Vandenboer TC, Grummett SA, Watterson JH (2008) Utility of immunoassay in drug screening in skeletal tissues: sampling considerations in detection of ketamine exposure in femoral bone and bone marrow following acute administration using ELISA. J Forensic Sci 53:1474–1482
28. Watterson J (2006) Challenges in forensic toxicology of skeletonized human remains. Analyst 131:961–965
29. Watterson JH, Botman JE (2009) Detection of acute diazepam exposure in bone and marrow: influence of tissue type and the dose-death interval on sensitivity of detection by ELISA with liquid chromatography tandem mass spectrometry confirmation. J Forensic Sci 54:708–714
30. Watterson JH, Vandenboer TC (2008) Effects of tissue type and the dose-death interval on the detection of acute ketamine

exposure in bone and marrow with solid-phase extraction and ELISA with liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmation. J Anal Toxicol 32:631–638
31. Blebea JS, Houseni M, Torigian DA, Fan C, Mavi A, Zhuge Y et al (2007) Structural and functional imaging of normal bone marrow and evaluation of its age-related changes. Semin Nucl Med 37:185–194
32. Hwang S, Panicek DM (2007) Magnetic resonance imaging of bone marrow in oncology, Part 1. Skeletal Radiol 36:913–920
33. Vande Berg BC, Malghem J, Lecouvet FE, Maldague B (2001) Normal bone marrow: dynamic aspects in magnetic resonance imaging. J Radiol 82:127–135
34. Derrickson B, Tortora GJ (2007) Principes d'anatomie et de physiologie. De Boeck, Bruxelles
35. Kierszenbaum AL (2006) Histologie et Biologie Cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique. De Boeck, Bruxelles
36. Griffith JF, Yeung DK, Antonio GE, Lee FK, Hong AW, Wong SY et al (2005) Vertebral bone mineral density, marrow perfusion, and fat content in healthy men and men with osteoporosis: dynamic contrast-enhanced MR imaging and MR spectroscopy. Radiology 236:945–951
37. Fan C, Hernandez-Pampaloni M, Houseni M, Chamroonrat W, Basu S, Kumar R et al (2007) Age-related changes in the metabolic activity and distribution of the red marrow as demonstrated by 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose-positron emis- sion tomography. Mol Imaging Biol 9:300–307
38. Liney GP, Bernard CP, Manton DJ, Turnbull LW, Langton CM (2007) Age, gender, and skeletal variation in bone marrow composition: a preliminary study at 3.0 Tesla. J Magn Reson Imaging 26:787–793
39. Maniatis A, Tavassoli M, Crosby WH (1971) Factors affecting the conversion of yellow to red marrow. Blood 37:581–586
40. Gurevitch O, Slavin S, Feldman AG (2007) Conversion of red bone marrow into yellow—cause and mechanisms. Med Hypotheses 69:531–536
41. Bigelow CL, Tavassoli M (1984) Fatty involution of bone marrow in rabbits. Acta Anat Basel 118:60–64
42. Chen WT, Shih TT, Chen RC, Lo SY, Chou CT, Lee JM et al (2001) Vertebral bone marrow perfusion evaluated with dynamic contrast-enhanced MR imaging: significance of aging and sex. Radiology 220:213–218
43. Hwang S, Panicek DM (2007) Magnetic resonance imaging of bone marrow in oncology, Part 2. Skeletal Radiol 36:1017–1027
44. Rosen BR, Fleming DM, Kushner DC, Zaner KS, Buxton RB, Bennet WP et al (1988) Hematologic bone marrow disorders: quantitative chemical shift MR imaging. Radiology 169:799–804
45. Daldrup-Link HE, Henning T, Link TM (2007) MR imaging of therapy-induced changes of bone marrow. Eur Radiol 17:743–761
46. Aguayo A, Giles F, Albitar M (2003) Vascularity, angiogenesis and angiogenic factors in leukemias and myelodysplastic syn- dromes. Leuk Lymphoma 44:213–222
47. Panteli K, Zagorianakou N, Agnantis NJ, Bourantas KL, Bai M (2005) Clinical correlation of bone marrow microvessel density in essential thrombocythemia. Acta Haematol 114:99–103
48. Zetterberg E, Lundberg LG, Palmblad J (2004) Characterization of blood vessels in bone marrow from patients with chronic myeloid leukemia and polycythemia vera. Scand J Clin Lab Invest 64:641–647
49. Schloegl H, Rost T, Schmidt W, Wurst FM, Weinmann W (2006) Distribution of ethyl glucuronide in rib bone marrow, other tissues and body liquids as proof of alcohol consumption before death. Forensic Sci Int 156:213–218
50. Raikos N, Tsoukali H, Njau SN (2001) Determination of opiates in postmortem bone and bone marrow. Forensic Sci Int 123:140–141
51. Grellner W, Glenewinkel F (1997) Exhumations: synopsis of morphological and toxicological findings in relation to the postmortem interval. Survey on a 20-year period and review of the literature. Forensic Sci Int 90:139–591
52. Rothschild MA, Schmidt V, Schneider V (1996) Adipocere—problems in estimating the length of time since death. Med Law 15:329–335
53. William D, Haglund MHS (eds) (1997) Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains. CRC Press
54. Guillot E, de Mazancourt P, Durigon M, Alvarez JC (2007) Morphine and 6-acetylmorphine concentrations in blood, brain, spinal cord, bone marrow and bone after lethal acute or chronic diacetylmorphine administration to mice. Forensic Sci Int 166:139–144
55. Maeda H, Oritani S, Nagai K, Tanaka T, Tanaka N (1997) Detection of bromisovalum from the bone marrow of skeletonized human remains: a case report with a comparison between gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and high- performance liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). Med Sci Law 37:248–253
56. Ito S, Kudo K, Imamura T, Jitsufuchi N, Kimura K (1997) Detection of drugs and poisons in postmortem tissues—determination of paraquat in tissues of rabbits buried underground. Nihon Hoigaku Zasshi 51:83–88
57. Kojima T, Okamoto I, Miyazaki T, Chikasue F, Yashiki M, Nakamura K (1986) Detection of methamphetamine and amphetamine in a skeletonized body buried for 5 years. Forensic Sci Int 31:93–102
58. Maeda H, Zhu BL, Ishikawa T, Oritani S, Michiue T, Li DR et al (2006) Evaluation of post-mortem ethanol concentrations in pericardial fluid and bone marrow aspirate. Forensic Sci Int 161:141–143
59. Bévalot F, Dujourdy L, Fanton L, Cartiser N, Magné L, Besacier F et al (2008) Statistic interpretation of meprobamate concen- trations in bone marrow, vitreous and bile. Proceedings of International Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists, February 18–23, Washington, United States of America. Abstract K59, p 431
60. Bévalot F, Fanton L, Le Meur C, Malicier D (2005) Analysis of bone marrow in post mortem toxicology. Proceedings of XVII International Congress of the International Association of Forensic Sciences, August 21–26, Hong Kong, China. Abstract A0847, p 246
61. Akcan R, Hilal A, Daglioglu N, Cekin N, Gulmen MK (2009) Determination of pesticides in postmortem blood and bone marrow of pesticide treated rabbits. Forensic Sci Int 189:82–87
62. Gorczynski LY, Melbye FJ (2001) Detection of benzodiazepines in different tissues, including bone, using a quantitative ELISA assay. J Forensic Sci 46:916–918
63. Rochdi M, Sabouraud A, Baud FJ, Bismuth C, Scherrmann JM (1992) Toxicokinetics of colchicine in humans: analysis of tissue, plasma and urine data in ten cases. Hum Exp Toxicol 11:510–516
64. Takatori T, Tomii S, Terazawa K, Nagao M, Kanamori M, Tomaru Y (1991) A comparative study of diazepam levels in bone marrow versus serum, saliva and brain tissue. Int J Leg Med 104:185–188
65. Bal TS, Hewitt RW, Hiscutt AA, Johnson B (1989) Analysis of bone marrow and decomposed body tissue for the presence of paracetamol and dextropropoxyphene. J Forensic Sci Soc 29:219–223
66. Noguchi TT, Nakamura GR, Griesemer EC (1978) Drug analyses of skeletonizing remains. J Forensic Sci 23:490–492
67. Kudo K, Sugie H, Syoui N, Kurihara K, Jitsufuchi N, Imamura T et al (1997) Detection of triazolam in skeletal remains buried for 4 years. Int J Leg Med 110:281–283
68. Higuchi T, Kogawa H, Satoh M, Tatsuno M, Tsuchihashi H (1996) Application of high-performance liquid chromatography/mass spectrometry to drug screening. Am J Forensic Med Pathol 17:21–23
69. Nagata T, Kimura K, Hara K, Kudo K (1990) Methamphetamine and amphetamine concentrations in postmortem rabbit tissues. Forensic Sci Int 48:39–47

70. Casier HT, Delaunois AL (1943) La répartition de l'alcool chez l'homme et les animaux au cours de l'intoxication éthylique. Arch Int Pharmacodyn 69:186
71. Isokoski M, Alha A, Laiho K (1968) Bone marrow alcohol content in cadavers. J Forensic Med 15:9–11
72. Hoiseth G, Karinen R, Johnsen L, Normann PT, Christophersen AS, Morland J (2008) Disappearance of ethyl glucuronide during heavy putrefaction. Forensic Sci Int 176:147–151
73. Helander A, Dahl H (2005) Urinary tract infection: a risk factor for false-negative urinary ethyl glucuronide but not ethyl sulfate in the detection of recent alcohol consumption. Clin Chem 51:1728–1730
74. Schloegl H, Dresen S, Spaczynski K, Stoertzel M, Wurst FM, Weinmann W (2006) Stability of ethyl glucuronide in urine, post-mortem tissue and blood samples. Int J Leg Med 120:83–88
75. Helander A, Hagelberg CA, Beck O, Petrini B (2009) Unreliable alcohol testing in a shipping safety programme. Forensic Sci Int 189:e45–e47
76. Helander A, Olsson I, Dahl H (2007) Postcollection synthesis of ethyl glucuronide by bacteria in urine may cause false identification of alcohol consumption. Clin Chem 53:1855–1857
77. Baranowski S, Serr A, Thierauf A, Weinmann W, Grosse Perdekamp M, Wurst FM et al (2008) In vitro study of bacterial degradation of ethyl glucuronide and ethyl sulphate. Int J Leg Med 122:389–893
78. Halter CC, Laengin A, Al-Ahmad A, Wurst FM, Weinmann W, Kuemmerer K (2009) Assessment of the stability of the ethanol metabolite ethyl sulfate in standardised degradation tests. Forensic Sci Int 186:52–55
79. Hoiseth G, Karinen R, Christophersen A, Morland J Practical use of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in postmortem cases as markers of antemortem alcohol ingestion. Int J Legal Med 124:143–148
80. Fanton L, Bevalot F, Gustin MP, Paultre CZ, Le Meur C, Malicier D (2009) Interpretation of drug concentrations in an alternative matrix: the case of meprobamate in bile. Int J Leg Med 123:97–102
81. Sato Y, Kondo T, Takayasu T, Ohshima T (2000) Detection of methamphetamine in a severely burned cadaver—a case report. Nihon Hoigaku Zasshi 54:420–424

Partie expérimentale

Quantification du citalopram et de quatre benzodiazépines dans onze fluides et tissus d'intérêt médicolégal par GC-MS/MS

Une technique analytique a été développée et validée pour la quantification des molécules d'étude, le citalopram (R+S), le diazepam et ses trois métabolites (nordazepam, temazepam, oxazepam). Le prérequis est l'application double de cette méthode: d'une part pour l'étude pharmacocinétique animale incluse dans le projet de thèse, d'autre part pour la pratique courante sur des cas médicolégaux pour lesquels l'analyse de matrices alternatives au sang, éventuellement dégradées par diverses phénomènes *post mortem*, est nécessaire. La technique a été développée pour l'analyse de 11 matrices d'intérêt médicolégal et/ou pharmacocinétique: des fluides biologiques (humeur vitrée (HV), urine et bile), des tissus (sang, MO, tissu adipeux et muscle squelettique) et des organes (poumon, foie, rein, cerveau). Les critères de justesse, de répétabilité, de sensibilité et de sélectivité devaient satisfaire à l'établissement d'une cinétique sanguine et tissulaire chez l'animal. La sélectivité a été un des paramètres qui a été privilégié afin de distinguer les molécules des nombreuses interférences liées à la dégradation des prélèvements ou à la nature lipidique des matrices. Ainsi, la méthode analytique a été optimisée en tenant compte de ces contraintes et validée sur l'ensemble des matrices pour vérifier l'adéquation de la méthode aux exigences requises.

Cette technique consiste en une extraction liquide/liquide en trois étapes, d'une dérivation en ligne (sylilation), et d'une analyse par chromatographie gazeuse couplée à une détection en spectrométrie de masse en tandem. Des matrices blanches de lapin ont été utilisées lors du développement et de la validation de la méthode. Elles ont été préférées aux prélèvements humains au vu de la difficulté d'écarter formellement la consommation des xénobiotiques analysés et pour être directement applicables lors de l'étude pharmacocinétique entreprise chez le lapin.

Une validation complète a été réalisée sur la MO, matrice d'intérêt qui est, d'après notre expérience, une des plus complexes à analyser de par sa structure tissulaire combinée à un riche contenu lipidique. La linéarité a été validée sur l'ensemble de la gamme de calibration. La sélectivité a été vérifiée par l'analyse d'échantillons blancs. Les limites de quantification ont été mesurées à 1ng/g pour le nordazepam, 10ng/g pour le diazepam, le temazepam et l'oxazepam, 5ng/g pour le citalopram. Une procédure de dilution a été validée pour la quantification d'échantillons initialement trouvés en dehors de la gamme de calibration. A bas et haut niveau de concentrations, la technique a montré une justesse satisfaisante comprise

entre 88.9% et 109.4% ainsi qu'une répétabilité et une fidélité intermédiaire acceptable (inférieure respectivement à 12% et 12.6%). La stabilité des échantillons dérivés sur le passeur d'échantillons a été vérifiée sur 72h.

Comme les matrices proviennent de la même espèce, une validation partielle a été réalisée sur les 10 autres matrices afin de s'assurer que la technique remplit les critères de validation sur l'ensemble des échantillons. La base de cette validation partielle s'appuie sur les recommandations internationales. Cette validation comporte la vérification de la linéarité de la gamme de validation sur chaque matrice, des limites de quantifications, de la sélectivité, ainsi que l'évaluation de la justesse de la répétabilité et du rendement d'extraction. L'ensemble des matrices remplit les critères de validation communément acceptés [29, 30].

Les performances de la technique analytique développée ont permis de l'appliquer à des cas réels issus d'une part de l'expérimentation animale et d'autre part à des cas autopsiques pour lesquels les prélèvements étaient dégradés par la putréfaction.

Expéditeur: "Journal of Chromatography B" <chromb@elsevier.com>
Date: jeudi 18 août 2011 13:57
Destinataire: f.bevalot@latlumtox.com
Objet: Manuscript JCB-11-624

Ref.: JCB-11-624R1

Title: Gas chromatography-tandem mass spectrometry assay for the quantification of four benzodiazepines and citalopram in eleven postmortem rabbit fluids and tissues, with application to animal and human samples.

Corresponding Author: Dr Fabien Bévalot

Dear Dr Bévalot,

I am pleased to inform you that your paper has now been **accepted for publication in Journal of Chromatography B**. The manuscript will be prepared for press and proofs will be sent to you in due course.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,
Basil Nyaku
Journal Manager
on behalf of
Mr Paul James Taylor
Editor
Journal of Chromatography B

Editors Comments:

Dear Dr Bevalot,
Thank you for resubmitting your manuscript to Journal of Chromatography B.
The Reviewers' comments have been adequately addressed and your paper is now suitable for publication.

Gas-chromatography-tandem mass spectrometry assay for the quantification of four benzodiazepines and citalopram in eleven postmortem rabbit fluids and tissues, with application to animal and human samples.

(Revised manuscript)

N. Cartiser[a,b], F. Bévalot[b,c,], C. Le Meur[b,c], Y. Gaillard[b], D. Malicier[c], N. Hubert[d], J. Guitton[a,e]*

[a] Laboratoire de Toxicologie, ISPB-Faculté de Pharmacie, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 8 Avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex 08, France.

[b] Laboratoire LAT LUMTOX, 98 Avenue des Frères Lumière, 69008 Lyon, France

[c] Institut de Médecine Légale, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 8 Avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex 08, France.

[d] Service de médecine légale et de victimologie, Hôpital Saint Jacques, Centre hospitalo-universitaire de Besançon, 25030 Besançon cedex, France.

[e] Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Hospices Civils de Lyon, 165 Chemin Grand Revoyet, 69495 Pierre Bénite Cedex, France.

** Corresponding author. Tel.: +33 4 78 76 67 15; fax: +33 4 78 76 6719 ; E-mail address: f.bevalot@latlumtox.com ; F. Bévalot Laboratoire LAT LUMTOX, 98 Avenue des Frères Lumière, 69008 Lyon, France*

Abstract

Pharmacokinetic studies and postmortem toxicological investigations require a validated analytical technique to quantify drugs on a large number of matrices. Three-step liquid/liquid extraction with online derivatization (silylation) ahead of analysis by gas chromatography-tandem mass spectrometry was developed and validated on rabbit specimens in order to quantify citalopram and 4 benzodiazepines (diazepam, nordazepam, oxazepam and temazepam) in 11 biological matrices (blood, urine, bile, vitreous humor, liver, kidney, skeletal muscle, brain, adipose tissue , bone marrow (BM) and lung). Since the 11 biological matrices came from the same animal species, full validation was performed on 1 matrix, bone marrow (considered the most complex), while the other 10 underwent partial validation. Due to non-negligible matrix effects, calibration curves were performed on each matrix. Within-day and between-day precision (less than 12.0% and 12.6%, respectively) and accuracy (from 88.9% to 106.4%) were acceptable on BM at both low and high concentrations. Assessment on the other matrices confirmed accuracy and within-day precision (less than 12%, and generally between 85.1% and 114.5%, respectively). The lower limit of quantification of the method was 1 ng/g for nordazepam, 5 ng/g for citalopram and 10 ng/g for oxazepam, diazepam and temazepam. The combination of 3-step extraction and MS/MS detection provided good selectivity in all matrices, including the most lipid-rich. Application to real-case samples showed that the method was sensitive enough to describe distribution patterns in an animal experiment, and specific enough to detect molecules in highly putrefied samples from human postmortem cases.

Keywords

Benzodiazepine – Validation - Citalopram - GC-MS/MS – Postmortem – Tissues

1 Introduction

Benzodiazepines are widely used for their anxiolytic, hypnotic, anticonvulsive and muscle-relaxant properties and also commonly used as drug of abuse [1]. Diazepam has been on the market for almost 5 decades [2] and remains one of the most frequently prescribed anxiolytic drugs [3]. Diazepam metabolism (fig. 1) leads to nordazepam, oxazepam and temazepam formation [4]. These 3 pharmacologically active compounds are also marketed as drugs. Citalopram is an extensively prescribed antidepressant belonging to the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) class [5].

In most cases, and especially in living victims, blood is the most relevant matrix for analyzing and determining whether a drug is at a therapeutic or a toxic level in the organism. In forensic investigation, lack of blood and availability of various alternative matrices and postmortem redistribution and degradation of samples due to putrefaction complicate the analytical process and interpretation of results [6]. A thorough study of citalopram, diazepam and metabolite distribution in the whole body may allow a pharmacokinetic model to be developed and help interpretation when blood samples are not available or postmortem redistribution is suspected. A fully validated assay from various tissue and fluid samples is critical for pharmacokinetic studies and human postmortem specimen analysis.

A review of the literature failed to retrieve any methods for quantifying these compounds that were validated on each of the various matrices. For citalopram, a lot of validated methods were published in blood, plasma, urine and hair mainly by liquid chromatography (LC) coupled either with ultraviolet (UV), fluorescence (FLD), mass spectrometry (MS) or tandem mass spectrometry (MS/MS) detection [7]. Brain tissue was also studied to allow quantification in the site of action of citalopram [8-11]. Some case reports provided data from other biological fluids and tissues, but validation was either not presented [7, 12-14] or was performed on blood samples alone [15-17].Concerning benzodiazepines presented in our study, Mercolini et al. [18] published a fully validated method on blood and brain tissue to quantify diazepam and its 3 main metabolites, but the UV detection method used excluded application of this assay to putrefied postmortem samples. Heinig et al. [19] published an interesting method to quantify 7 drugs, including oxazepam, from 11 matrices. However, human plasma was used for the standard calibration preparation, with only quality controls prepared from the various tissues; no biological liquids of forensic interest in human postmortem cases (vitreous humor (VH), urine or bile) were tested. Kudo et al. used a method to quantify diazepam and nordazepam in skeletal muscle and liver by GC-MS [20], but validation was performed on blood. Other benzodiazepines have also been quantified in various tissues for case reports or pharmacokinetic studies. Excepted one study of bromazepam [21] that included a fully

validated assay on a large number of matrices; in other published studies, analytical validation was either lacking [22-25] or performed on blood samples [26, 27] or on part of the studied matrices [28]. The aim of the present study was to describe a validated assay allowing quantification of citalopram and 4 benzodiazepines (diazepam, temazepam, oxazepam and nordazepam) in 11 media commonly used in forensic toxicology: blood, urine, bile, VH, liver, kidney, skeletal muscle, brain, adipose tissue (AT), lung and bone marrow (BM). Two main metabolites are described for citalopram: desmethylcitalopram and didesmethylcitalopram. Bezchlibnyk-Butler et al [5] reported that these metabolites do not appear to play a major role in the clinical action of citalopram. They represent 30 to 50 % and 5 to 10% of citalopram doses, respectively but enter the brain less readily than citalopram. They display at least 4 times and 13 times less therapeutic activity than citalopram, respectively. Most of the table of interpretation of drug concentrations used in forensic toxicology analysis did not interpret metabolites quantifications [29-32] although it could be potentially informative on the intake of citalopram. Due to their less therapeutic and forensic interest, citalopram metabolites are not studied in this work. The option of using human postmortem samples as blank biological matrices for development and validation was discarded for ethical reasons and because consumption of study drugs by the victim can never be formally ruled out. An animal model was therefore used to provide blank matrices. Rabbit was selected, as it allows sufficient quantities of each sample type to be taken, unlike the smaller laboratory animals frequently used. As the 11 matrices were collected from the same animal species, full validation was not mandatory for each. Indeed, partial validations can be undertaken for modifications of validated bioanalytical methods that do not require full revalidation such as instrument changes, transfers between laboratories, change in species within matrix or changes in matrix within a species. Depending of the extent of the change, partial validation can range from as little as one intra-assay accuracy and precision determination to a nearly full validation [33, 34]. A full validation was conducted on BM, considered the most complex matrix due to a combined connective structure and high lipid content. A partial validation was performed on the other matrices comprising linearity evaluation on the calibration range, within-day precision and accuracy test, selectivity check, recovery test estimation and LOQ determination. The calibration range was set according to the respective drugs, based on preliminary experiments (data not shown) in our laboratory involving therapeutic doses of diazepam and citalopram administrated to rabbits. The calibration range was chosen to cover the most of the concentrations retrieved in the various matrices sampled after euthanasia. As some concentrations in specific tissues cannot be included in an acceptable calibration range, a procedure of dilution was validated. Finally, the assay thus developed was applied to real samples from kinetic animal experiments and human autopsy.

2 Materials and Methods

2.1 Chemicals and solutions

Individual stock solutions (certified at a concentration of 1 mg/ml in methanol) of nordazepam, nordazepam-d5, diazepam, diazepam-d5, oxazepam, oxazepam-d5, temazepam, temazepam-d5 and citalopram hydrobromide, and citalopram-d6 in powder form (reconstituted in methanol at 1 mg/ml) and N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 1% Trimethylchlorosilane (BSFTA/TMCS) were purchased from LGC Promochem (Molsheim, France), and stored at -20°C. Water, tert-butyl-methyl-ether and n-heptane, all in HPLC grade, were obtained from VWR (Fontenay sous Bois, France). Sodium Hydroxide (1 M), hydrochloric acid (1 M) and di-sodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4) were supplied by Merck (Fontenay sous Bois, France).

Deuterated analogs were used as internal standards (IS). A mixture of the 5 labeled ISs was prepared daily by dilution in methanol to reach the following final concentrations in fluid (ng/ml) and tissue (ng/g): nordazepam-d5 25 ng/ml(/g); diazepam-d5, oxazepam-d5 and temazepam-d5: 400 ng/ml(/g); and citalopram-d6: 200 ng/ml(/g). For both calibration standards and quality controls, working solutions containing the 5 study compounds were prepared daily by appropriate dilution in methanol.

2.2 Sample preparation

For tissues, 200 ± 5 mg (lung, kidney, liver and BM), 500 ± 10 mg (AT, brain) or 1000 ± 10 mg (muscle) were ground thinly with scissors and homogenized in 1 ml Na_2HPO_4 buffer (pH 8.4, 0.25M). For biological fluids, 1 ml (blood) or 200 µL (bile, urine and VH) were simply mixed with 1ml Na_2HPO_4 buffer. IS were adjoined by addition of the appropriate volume (20 µL, 50 µL or 100 µL) of the IS solution containing 0.25 µg/ml of nordazepam-d5, 4 µg/ml of diazepam-d5, oxazepam-d5 and temazepam-d5, and 2 µg/ml of citalopram-d6. In all cases, 5 ml tert-butyl-methyl-ether/n-heptane (67:33, v/v) was then added and the mixture was agitated for 20 min. After centrifugation (10 min at 1,400 g), the upper organic layer was saved and added to 2.5 ml hydrochloric acid (0.2M). After mechanical shaking for 10 min, centrifugation (10 min at 1,400 g) was carried out. The lower aqueous layer was saved; neutralized by 0.5ml sodium hydroxide (1N) and set at pH 8.4 by addition of 1 ml Na_2HPO_4 buffer. Finally, 5 ml tert-butyl-methyl-ether was added, and the samples were agitated (10 min) and centrifuged (10 min at 1,400 g). The upper organic layer was saved and evaporated to dryness at 50°C under air stream. The residue was reconstituted in 100 µL tert-butyl-methyl-ether, transferred to a gas chromatography vial, and again evaporated to dryness. Automated on-line derivatization was performed on 7693A autosampler with 20µL BSTFA/TMCS for 20 min at 80°C. Two µL of derivatized extract was injected into the GC/MSMS system.

2.3 GC-MS/MS

2.3.1 Gas Chromatography

Gas chromatography (GC) was carried out on a 7890A GC system (Agilent, Santa Clara, CA, USA) equipped with a 7693A autosampler (Agilent). Compounds were separated on an HP-5MS capillary column (30 m length x 0.250 mm I.D. x 0.25 µm film thickness). The carrier gas was helium, at a constant flow of 1 ml/min. Injection was performed in splitless mode at an injection temperature of 260°C. The transfer line was held at 310°C. The initial oven temperature of 120°C was maintained for 1 min, and subsequently increased at a rate of 50 °C/min to 280°C and held for 4 min, and then finally increased at a rate of 50 °C/min to 300°C and held for 3min.

2.3.2 Tandem mass spectrometric conditions

GC-MS/MS analyses were acquired using a 7000 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) in positive electronic ionization (EI) mode. Ion source temperature was set at 230°C and ionization energy at 70 eV. The collision gas was nitrogen (flow-rate, 1.5 ml/min) with helium quench (flow-rate, 2.25 ml/min) Acquisition was performed in selected reaction monitoring (SRM) mode. Transitions were chosen for selectivity and abundance to maximize signal-to-noise ratio in matrix extracts. One transition per compound was used as quantifier, and 2 as qualifiers.

2.3.3 Acceptance criteria for compounds identification

The criteria for identification of compounds were set as follows: for chromatography, the observed retention time differ by no more than ± 0.1 min in absolute from that of the highest calibration standard prepared and analyzed contemporaneously; for mass spectrometry, the qualifier ions ratios differ by no more than 25% from that of the highest calibration standard prepared and analyzed contemporaneously; the standard consisted in standard. These criteria of identification were automatically followed by the Mass Hunter workstation software for quantitative analysis for QQQ (version B.04.00, Agilent technologies).

2.4 Specimens

2.4.1 Validation specimens

Blank samples of rabbit biological fluids (blood, urine, bile and VH) and tissues (lung, kidney, liver, brain, BM, AT and muscle) were pooled and used for development and validation. They were obtained from animal experiments performed in strict accordance with established guidelines for animal care and with the approval of the Animal Ethics Committee, Lyon, France (n° BH 2008-14).

2.4.2 Application specimens

Application specimens were obtained from animal experiments and human autopsies. In the former case, with approval from the Animal Ethics Committee, Lyon, France (n° BH 2008-14), adult rabbits were injected intravenously with diazepam and citalopram at 1.1 and 2.8 mg/kg respectively. Euthanasia was performed 4h after injection by heart-blood withdrawal after deep ketamine anesthesia. Immediately after death, tissues and fluids were collected and stored at -20°C until analysis.

For human autopsy samples, the putrefaction impact on chromatographic performance was tested on putrefied human specimens (kidney, liver, lung, brain, BM and muscle) from forensic autopsies of drowning victims. In the first experiment, the victim was not known to be under any psychiatric treatment and toxicological screening results on putrefied blood did not show any of the 5 compounds of interest. Analyses were performed blank and by spiking at low quality control (QC) level (nordazepam 3 ng/ml(/g), citalopram 15 ng/ml(/g), and diazepam, oxazepam and temazepam 30 ng/ml(/g)). For the second experiment, the method was applied during toxicological investigation of a victim known to have been treated with prazepam.

2.5 Validation procedure

BM underwent full validation over a 3-day period, comprising linearity check, within-day and between-day accuracy and precision test, evaluation of limits of quantification (LOQ), selectivity, estimation of extraction recovery and assessment of the dilution procedure for extended concentration ranges and of auto-sampler stability. One-day partial validation was undertaken for the other 10 matrices, comprising linearity evaluation on the calibration range, within-day precision and accuracy test, selectivity check, recovery test estimation and LOQ determination.

2.5.1 Linearity

Calibration curves (5 standards) were prepared in each matrix at concentrations ranging from 1 to 200 ng/ml(/g) for nordazepam, 10-2,000 ng/ml(/g) for diazepam, oxazepam and temazepam and 5-1,000 ng/ml(/g) for citalopram. For fluid samples, the high point of the calibration range was obtained by spiking matrix with an appropriate dilution of working solution containing the 5 compounds; the other calibration points were prepared by serial dilution using the corresponding matrix as diluent. For tissue samples, due to the difficulties of solid matrix homogenization, the procedure was modified as follows: Na_2HPO_4 buffer was spiked with an appropriate dilution of working solution to obtain the highest calibration point, then serial dilution in buffer was performed; 1 ml of spiked buffer was added to a fixed amount of blank matrix. Calibration curves were

established by linear least-squares regression, using Mass Hunter workstation software for quantitative analysis for QQQ (version B.04.00, Agilent technologies), by plotting relative response (analyte/IS, in area) as a function of analyte concentration. The best-fitting calibration model for each molecule was chosen using the fully validated BM results. Linear and quadratic curves were tested to minimize percentage residual and maximize the determination coefficient (r^2) calculated by the software. 1/[concentration] or 1/[concentration]^2 weighting factors were applied. The best BM model was then implemented on the other matrices; it was checked that percentage residue and r^2 were <10% and >0.95, respectively. Assay linearity was tested by analysis of variance. The significance of the slope and the validity of the linear calibration curves were tested using the Fisher-Snedecor *F*-test ($p<0.05$).

2.5.2 Within-day and between-days accuracy and precision

Full validation (on BM): Within-day accuracy and precision were tested on 5 repeated determinations at low (midpoint of the lowest 2 calibration points) and high concentrations (midpoint of the highest 2 calibration points). The procedure was repeated on 3 different days to determine between-day precision. Accuracy was measured as relative percentage deviation from nominal concentration. Precision was assessed by within-run (WRP) and between-runs precision (BRP), using Statview software for Windows, version 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Briefly, within-run precision was determined as $WRP = 100 \times (\sqrt{MS_{wit}} / GM)$, and between-runs precision as $BRP = 100 \times (\sqrt{(MS_{bet} - MS_{wit})/n} / GM)$, where MS_{wit}, MS_{bet}, n and GM are the within-groups mean square, between-groups mean square, number of replicate observations within each run and the grand mean, respectively.

Partial validation: In the same way, within-day accuracy and precision were tested on 5 repeated determinations in each matrix at low (midpoint of the lowest 2 calibration points) and high concentrations (midpoint of the highest 2 calibration points). Accuracy and precision were measured as relative percentage deviation from nominal concentration and relative standard deviation (RSD), respectively.

2.5.3 Limits of quantification and assessment for extended concentration range

The LOQ corresponded to the concentration of the lowest calibration standard. At that point, accuracy and precision were checked as being acceptable (<20%) on 5 repeated determinations.

The upper limit of quantification was chosen as the concentration of the highest calibration standard. However, the dilution procedure for concentrations over the range as a whole was validated allowing

that, from our experiences, higher concentrations may be present in some matrices. For this purpose, 1/10th dilution was tested on 5 replicates to quantify BM overloaded with nordazepam at 1 µg/g, diazepam, oxazepam, temazepam at 10 µg/g and citalopram at 5 µg/g. In this case, the extraction procedure described above was modified: ISs were added at 10-fold the classic concentration and only 500 µL (rather than 5 ml) tert-butyl-methyl-ether/n-heptane (67:33, v/v) was saved at the first step. The following steps of the extraction remained unchanged.

2.5.4 Validation of other parameters

Selectivity was tested by analyzing 6 blank samples of each matrix. Extraction efficiency was evaluated for each matrix at QC levels, by comparing the mean peak areas from samples obtained through the extraction procedure (analytes added before the extraction step: n=5, QC samples) with those obtained from blank matrix which underwent the extraction procedure and overloaded before the derivatization step (n=3). Auto-sampler stability at 25°C was tested by reanalyzing sample extracts 72h after their creation.

3 Results and Discussion

3.1 Sample preparation

A 3-step extraction procedure with back-extraction in acid was performed as described previously for some benzodiazepines in complex tissues [20, 21] with optimization. The first step used Na_2HPO_4 buffer at pH 8.4 and tert-butyl-methyl-ether/n-heptane (67:33, v/v). Secondly, a derivatization step was added to improve compound stability and obtain spectra with more structural information [35]. Temperature and time conditions for derivatization were optimized at 80°C for 20min. Derivatization was online rather than manual, as this was time-saving in sample preparation and avoided the waiting time for silylated derivatives on the autosampler

3.2 GC/MS/MS conditions

Total method run-time was 11.6 min. Corresponding retention times are presented in Table 1. The 20 minutes between two injections was conditioned by the length of the online derivatization. The chromatogram peaks of all compounds were totally resolute. Five SRM windows (1 per analyte) were created, to enhance sensitivity. Dealing with some complex matrices (such as lipidic ones) and putrefied samples, 3 transitions were chosen per molecules as well as their labeled analogues (1 quantifier, 2 qualifiers), after a preliminary selection, by comparing signal-to-noise ratios in various BM samples. The one providing the best signal-to-noise ratio on BM extracts was chosen for quantification purposes. During the method development, smaller ionization energies were tested in particular to avoid the fragmentation of citalopram in small non specific ions (e.g. m/z = 58). However, no improvement of signal-to-noise ratio was observed in matrices (results not shown) and we conserved the classical ionization energy of 70 eV. Table 1 summarizes the SMR parameters (transitions and collision energy) used for analysis of the 5 compounds and their deuterated equivalents.

3.3 Validation procedure

For a protocol intended to be applied to 11 matrices, the choice of validation protocol is challenging due to the need to take account of possible matrix effects while limiting resort to blank matrices provided by animal sacrifice. Quantification in fluids and tissues using blood calibration standards was tested, but the results failed to meet validation criteria despite the used of labeled ISs for each molecule (data not shown). Since all specimens came from a single species, full validation was performed on the most complex matrix, which our experience showed to be BM, with partial 1-day validation for the other 10. Calibration range linearity, LOQ determination, selectivity, extraction

performance assessment, accuracy and precision were checked for each matrix. Between-days precision, extended concentration range dilution procedure and autosampler stability were evaluated only on BM. Since a few blank matrices (such as VH, kidney, BM and bile) were available in limited quantities, 2 quality controls rather than the 3 generally recommended [33, 34] were performed, focused on the extremities of the calibration range.

3.3.1 Linearity

The calibration curves were constructed by linear least-squares regression by plotting relative response (analyte/IS, in area) according to analyte concentration. The best fitting calibration model for each molecule between the linear and quadratic curves as well as the weighting factor were chosen using the fully validated BM results. Linear regression determination coefficients (r^2) were ≥0.991 for all compounds in this matrix. Calibration curves on the 3 days and the calibration model are presented in Table 2. For all concentrations, between-days precision was generally less than 10% (10.6% for nordazepam at 5 ng/g, and 11.4% for temazepam at 10 ng/g). Accuracy ranged from 89.2% to 107.7%, except for nordazepam at 200 ng/g (113.0%) and temazepam at 10ng/g (121.5%).
For the others matrices, the best fitting model was searched. In most cases, it was the same as BM. When it was different, the BM calibration model and the best fitting model were compared and it appeared that using BM model did not have consequence on the acceptation criteria in term of precision or accuracy. Therefore the calibration model chosen for BM was then applied to the other 10 matrices. Maximum percentage residual calculated by the software during linear regression appeared to be less than 5% for all compounds in each matrix. Linear regression determination coefficients (r^2) were ≥0.990 except, for nordazepam in urine (0.985), citalopram in VH (0.981) and in urine (0.983) and temazepam in AT (0.984).

3.3.2 Within-day and between-days accuracy and precision

Within-day and between-days accuracy and precision were examined on BM at low and high levels. Results are presented in Table 3. Assay accuracy was in the range of 88.9-102.0% at low level and 99.9-106.4% at high level for the 5 compounds. Despite the applied weighting factor, the low concentrations were slightly underestimated while high concentrations were assessed more accurately. Within-day and between-days precision were less than 12.0% (oxazepam, low QC) and 12.6% (oxazepam, low QC), respectively. This method was then applied to the other 10 matrices. Five replicates at low and high levels were analyzed; a calibration curve performed the same day in the corresponding matrix enabled quantification. Table 4 reports results for accuracy and within-day precision for both QCs. At low level, accuracy was in the range of 85.1-112.3%; only oxazepam in

liver and kidney was below the 85% cut-off (82.65 and 81.4% respectively). Precision was below 9.9%; except for nordazepam in lung (11.3%) and diazepam in blood (12%). At high level, accuracy ranged from 88.25 to 114.55 and precision was less than 7.2%. Finally, the accuracy and precision of this method for the 5 compounds in the 11 matrices, except for oxazepam in liver and kidney, were in line with commonly accepted validation guidelines for both QC levels [33, 34] (between 85-115% and ±15%; respectively).

3.3.3 Limits of quantification

The LOQ corresponded to the concentration of the lowest calibration standard. At that point, accuracy and precision were determined on 5 repeated runs. Results for BM are shown in Table 3 and for the other matrices in Table 4. Precision was within 20% and accuracy between 80% and 120%, as generally recommended, except for oxazepam in liver and kidney and diazepam in liver, for which accuracy at the LOQ level was slightly above 20% but still below 25%. Taken in consideration the finality of the method, use in pharmacokinetic study on tissue distribution as well as damaged sample analysis in a context of toxicological evidence, this slight deviation of the LOQ criteria for few analytes in few matrices was considered acceptable. Thus, the LOQ of the method were evaluated at 1 ng/g for nordazepam, 5 ng/g for citalopram and 10 ng/g for oxazepam, diazepam and temazepam. Some published method reported lower LOQ (e.g. 0.5 ng/ml for citalopram [36, 37], 0.04 ng/ml for diazepam and 0.1 ng/ml for nordazepam, oxazepam, and temazepam [38]. However, most of these assays displaying such sensitivity were dedicated to one or few matrices especially biological fluids like plasma, blood, urine, oral and cerebrospinal fluid [7, 39].

3.3.4 Assessment for extended concentration range

Given the wide range of concentrations to be expected, from therapeutic to toxic dose and according to the matrix, sample dilutions beyond the calibration range were essential in developing the extraction process. This was, however, a critical step as far as the tissue samples were concerned, due to the limits of the solid tissue homogenization process and the difficulty of obtaining blank matrices ensuring sample dilution. Moreover, decreasing the sample raises the question of the representativeness of very small pieces of organ. Dilutions were therefore performed using the same initial sampling quantity, by collecting a fraction of the organic layer at the end of the first extraction step. To validate the dilution protocol for samples initially quantified as out of the calibration range, a 1/10th dilution was tested to quantify BM overloaded with nordazepam at 1 µg/g, diazepam, oxazepam, temazepam at 10 µg/g and citalopram at 5 µg/g. Accuracy and precision are presented for

each compound in Table 3. The effectiveness of the dilution process was confirmed, since accuracy ranged from 86.1% to 108.4% and precision was less than 10.9%.

3.3.5 Extraction efficacy

Extraction recovery was estimated at low and high QC levels in each matrix by comparing the peak area of the QC samples with that of extracted blank matrix spiked before the derivatization step. Extraction recovery is reported in Table 3 for BM and in Table 4 for the other specimens. Few variations were observed according to matrix, except that extraction recovery in muscle was generally lower than in other matrices (e.g., 26% in muscle versus around 50% in other matrices for nordazepam at high QC level). This may be due to the particular fibrous structure of muscle tissue. In case higher sensitivity should be required, a different tissue homogenization technique to disrupt muscular structure should be tested. Recovery was comparable at low and high levels, except for citalopram (mean extraction recovery 74% at low vs. 55% at high QC level). Extraction efficacy varied greatly from one compound to another, with the lowest rates being observed for oxazepam and temazepam. Overall, although the extraction recovery values of this method were somewhat low, the detection limit proved sensitive enough to detect the 5 compounds in our applications. The method was intended for pharmacokinetic studies and forensic applications when blood was not available (putrefaction process, charred body, etc.) and a single protocol was developed to analyze all types of sample, whether fluid or tissue, including putrefied and damaged specimens. A 3-step extraction procedure with back-extraction in acid was performed. This time- and solvent-consuming protocol was preferred to a single extraction, so as to limit chromatographic interference due to putrefied material and certain complex and lipid-rich tissue such as brain, AT or BM. The focus was on selectivity, so long as sensitivity, however reduced, remained sufficient for the purposes of the intended applications.

No chromatographic interference was observed in any of the 6 blank specimens of each matrix at corresponding retention times and for the 3 transitions. The combination of 3-step extraction and MS/MS detection achieved good selectivity in all matrices, even the most lipid-rich. Selectivity was also tested, with the same good results, on putrefied human specimens (see 3.4 Application, below).

3.3.6 Autosampler stability

Autosampler stability was checked by reinjection of the low and high QC BM extracts 72h later. Immediate injection of derivative compounds is always preferable, but conservation for 72h did not significantly alter results, with accuracy ranging from 83.6% to 111.5% and precision less than 13.9%. Autosampler stability was the only stability parameter to be tested, because of the

derivatization procedure and since the in vivo and in vitro stability of these common drugs was already described [40-44].

3.4 Application

The effectiveness of the proposed method was tested by analyzing real cases: rabbit specimens from an animal experiment, and human post-mortem specimens from putrefied bodies.

3.4.1 Animal experiment

Samples from rabbit euthanatized 4 hours after being injected with citalopram (1.1 mg/kg) and diazepam (2.8 mg/kg) were analyzed. Fig. 2 shows the distribution pattern of diazepam, nordazepam, temazepam and citalopram. The assay quantified citalopram, diazepam and nordazepam in the 11 matrices: analyte concentrations were in the linearity range of calibration, except for temazepam, which was below the LOQ in some tissues, and citalopram, which showed exceptionally high concentrations in some specimens. Dilution was then performed for bile, lung and kidney samples to confirm citalopram concentrations. Oxazepam, a minor metabolite of diazepam rarely detected after a single therapeutic injection [45], was below the LOQ in all matrices except liver (11.3 ng/g), where metabolism takes place. As expected, concentration variability according to tissues was wide. For citalopram, the most obvious observation concerned the distribution in lung tissue: 5,550ng/g, versus 80ng/ml in heart blood. In humans, Boer described the phenomenon of pulmonary processing of drugs, and especially basic ones, resulting in considerable rapid accumulation in lung [46]. In the present case of rabbit, the second highest concentrations of citalopram were in bile (2,500ng/g) and kidney (2,620ng/g). Numerous case reports provide a total of 27 human citalopram bile concentrations, all strictly higher than in blood [13, 16, 17]. In contrast, only 8 kidney concentrations were reported for humans: while higher than in blood, they were not as high as in the present rabbit case [13, 15]. Citalopram brain tissue concentrations were widely investigated in human and animal studies [9-11] and generally found to be higher than in blood, as in the present rabbit case (brain concentration, 880ng/g). Finally, the lowest concentration of citalopram observed in the present study was in VH, in agreement with human data where VH citalopram concentrations were generally half those of blood [15-17]. The diazepam and citalopram distribution patterns differed greatly. The greatest diazepam concentrations were observed for BM (1,140ng/g) and AT (405ng/g), which may be explained by diazepam's lipophilicity. BM concentrations were previously reported to be higher than in blood in animal models [47, 48] and human postmortem specimens [49]. The present liver and bile concentrations were high, as in some case reports for others benzodiazepines [23, 24]. Study

of diazepam metabolites showed that, in rabbit as in humans [45], nordazepam was quantitatively the main metabolite followed by temazepam and then oxazepam, the latter being quantified only in liver.

3.4.2 Putrefied human specimens

Kidney, muscle, brain, BM, lung and liver, from a putrefied victim not known to be under any psychiatric treatment, were analyzed blank and spiked at low QC level. An example of chromatograms obtained from BM specimen is shown in fig. 3. For all matrices, no interference was observed on blank sample chromatograms. Moreover, the multi-step procedure of extraction allowed compounds to be quantified at low levels in all putrefied tissues.

The assay was also applied to postmortem tissue in the context of toxicological forensic evidence. The cause of death of a putrefied body found in a lake was diagnosed, on the basis of observation and diatom analysis, as submersion while alive; information obtained from the family indicated that the victim was being treated with various drugs, including prazepam. According to the metabolism of prazepam (fig. 1), nordazepam and oxazepam were quantified in cardiac blood and in 5 other tissues available. Results are presented in Table 5 and were consistent with an intake of prazepam by the victim before death. The sensitivity of the assay allowed both metabolites to be quantified.

4 Conclusions

A 3-step liquid/liquid extraction protocol with online derivatization prior to GC-MS/MS analysis was developed to quantify 4 benzodiazepines (diazepam, nordazepam, oxazepam and temazepam) and citalopram in 11 biological matrices (blood, urine, bile, vitreous humor, liver, kidney, skeletal muscle, brain, adipose tissue, lung and bone marrow). The procedure provided good accuracy and reproducibility. Application to real case samples showed that the method was sensitive enough to describe the distribution pattern of the molecules in an animal experiment, and specific enough to detect molecules in highly putrefied samples from human postmortem cases. The method may therefore be useful for whole-body distribution studies in animal experiments and for human postmortem toxicology investigations when analyses of alternative matrices are required to improve reliability of interpretation (e.g., in case of postmortem redistribution, lack of blood).

5 Acknowledgments

Nathalie Cartiser is grateful to the *Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, Service CIFRE* for her PhD grant.

6 References

[1] V. Pradel, C. Delga, F. Rouby, J. Micallef, M. Lapeyre-Mestre, CNS Drugs. 24 (2010) 611-620.

[2] K.P. Marshall, Z. Georgievskava, I. Georgievsky, Res. Social. Adm. Pharm. 5 (2009) 94-107.

[3] S.A. Hollingworth, D.J. Siskind, Pharmacoepidemiol. Drug Saf. 19 (2010) 280-288.

[4] R. Mandrioli, L. Mercolini, M.A. Raggi, Curr. Drug Metab. 11 (2010) 815-829.

[5] B. Jonasson, T. Saldeen, Forensic Sci. Int. 126 (2002) 1-6.

[6] G. Skopp, Forensic Sci. Int. 142 (2004) 75-100.

[7] N. Unceta, M.A. Goicolea, R.J. Barrio, Biomed. Chromatogr. 25 (2011) 238-257.

[8] X. Liu, K. Van Natta, H. Yeo, O. Vilenski, P.E. Weller, P.D. Worboys, M. Monshouwer, Drug Metab. Dispos. 37 (2009) 787-793.

[9] N. Unceta, A. Ugarte, A. Sanchez, A. Gomez-Caballero, M.A. Goicolea, R.J. Barrio, J. Pharm. Biomed. Anal. 51 (2010) 178-185.

[10] N.S. Wang, B. Lemmer, J. Chromatogr. 488 (1989) 492-497.

[11] S.M. Wille, E.A. De Letter, M.H. Piette, L.K. Van Overschelde, C.H. Van Peteghem, W.E. Lambert, Int. J. Legal Med. 123 (2009) 451-458.

[12] K. Fu, R.J. Konrad, R.W. Hardy, R.M. Brissie, C.A. Robinson, J. Anal. Toxicol. 24 (2000) 648-650.

[13] B. Levine, X. Zhang, J.E. Smialek, G.W. Kunsman, M.E. Frontz, J. Anal. Toxicol. 25 (2001) 641-644.

[14] D. Luchini, G. Morabito, F. Centini, Am. J. Forensic Med. Pathol. 26 (2005) 352-354.

[15] E.L. Horak, A.J. Jenkins, J. Forensic Sci. 50 (2005) 679-681.

[16] N. Anastos, I.M. McIntyre, M.J. Lynch, O.H. Drummer, J. Forensic Sci. 47 (2002) 882-884.

[17] A.J. Jenkins, K. Gubanich, J. Forensic Sci. 47 (2002) 159-164.

[18] L. Mercolini, R. Mandrioli, C. Iannello, F. Matrisciano, F. Nicoletti, M.A. Raggi, Talanta. 80 (2009) 279-285.

[19] K. Heinig, F. Bucheli, J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 769 (2002) 9-26.

[20] K. Kudo, T. Nagata, K. Kimura, T. Imamura, M. Noda, J. Chromatogr. 431 (1988) 353-359.

[21] X.X. Zhang, K. Kudo, T. Imamura, N. Jitsufuchi, T. Nagata, J. Chromatogr. B Biomed. Appl. 677 (1996) 111-116.

[22] F. Moriya, Y. Hashimoto, Forensic Sci. Int. 131 (2003) 108-112.

[23] A.J. Jenkins, B. Levine, J.L. Locke, J.E. Smialek, J. Anal. Toxicol. 21 (1997) 218-220.

[24] F. Moriya, Y. Hashimoto, Leg. Med. (Tokyo). 5 Suppl 1 (2003) S91-95.

[25] H. Shiota, M. Nakashima, H. Terazono, H. Sasaki, K. Nishida, J. Nakamura, K. Taniyama, Leg. Med. (Tokyo). 6 (2004) 224-232.
[26] K. Kudo, T. Nagata, T. Imamura, S. Kage, Y. Hida, Int. J. Legal Med. 104 (1991) 67-69.
[27] B. Levine, A. Grieshaber, J. Pestaner, K.A. Moore, J.E. Smialek, J. Anal. Toxicol. 26 (2002) 52-54.
[28] S. Bjorkman, A. Fyge, Z. Qi, J. Pharm. Sci. 85 (1996) 887-889.
[29] F. Musshoff, S. Padosch, S. Steinborn, B. Madea, Forensic Sci. Int. 142 (2004) 161-210.
[30] M. Schulz, A. Schmoldt, Pharmazie. 52 (1997) 895-911.
[31] M. Schulz, A. Schmoldt, Pharmazie. 58 (2003) 447-474.
[32] TIAFT reference blood level list of therapeutic and toxic substances, http://www.gtfch.org/cms/images/stories/Updated_TIAFT_list_202005.pdf, August 2011.
[33] Bioanalytical method validation, http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm064964.htm, April 2011.
[34] V.P. Shah, K.K. Midha, J.W. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonelli, C.T. Viswanathan, A. Yacobi, Pharm. Res. 17 (2000) 1551-1557.
[35] J. Segura, R. Ventura, C. Jurado, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 713 (1998) 61-90.
[36] C. Pistos, I. Panderi, J. Atta-Politou, J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 810 (2004) 235-244.
[37] T. Jiang, Z. Rong, L. Peng, B. Chen, Y. Xie, C. Chen, J. Sun, Y. Xu, Y. Lu, H. Chen, J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 878 615-619.
[38] J. Wang, X. Shen, J. Fenyk-Melody, J.V. Pivnichny, X. Tong, Rapid Commun. Mass Spectrom. 17 (2003) 519-525.
[39] V.F. Samanidou, M.N. Uddin, I.N. Papadoyannis, Bioanalysis. 1 (2009) 755-784.
[40] V.N. Atanasov, S. Stoykova, A. Runiov, T. Dimitrova, D. Aleksandrova, S. Tsakovski, M. Mitewa, Forensic Sci. Int. (2011) [Epub ahead of print].
[41] A. El Mahjoub, C. Staub, J. Pharm. Biomed. Anal. 23 (2000) 1057-1063.
[42] B. Levine, R.V. Blanke, J.C. Valentour, J. Forensic Sci. 28 (1983) 102-115.
[43] F.T. Peters, Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 1505-1519.
[44] S.S. Singh, H. Shah, S. Gupta, M. Jain, K. Sharma, P. Thakkar, R. Shah, J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 811 (2004) 209-215.
[45] K. Tada, T. Moroji, R. Sekiguchi, H. Motomura, T. Noguchi, Clin. Chem. 31 (1985) 1712-1715.
[46] F. Boer, Br. J. Anaesth. 91 (2003) 50-60.

[47] T. Takatori, S. Tomii, K. Terazawa, M. Nagao, M. Kanamori, Y. Tomaru, Int. J. Legal Med. 104 (1991) 185-188.

[48] J.H. Watterson, J.E. Botman, J. Forensic Sci. 54 (2009) 708-714.

[49] L.M. McIntyre, C.V. King, M. Boratto, O.H. Drummer, Ther. Drug Monit. 22 (2000) 79-83.

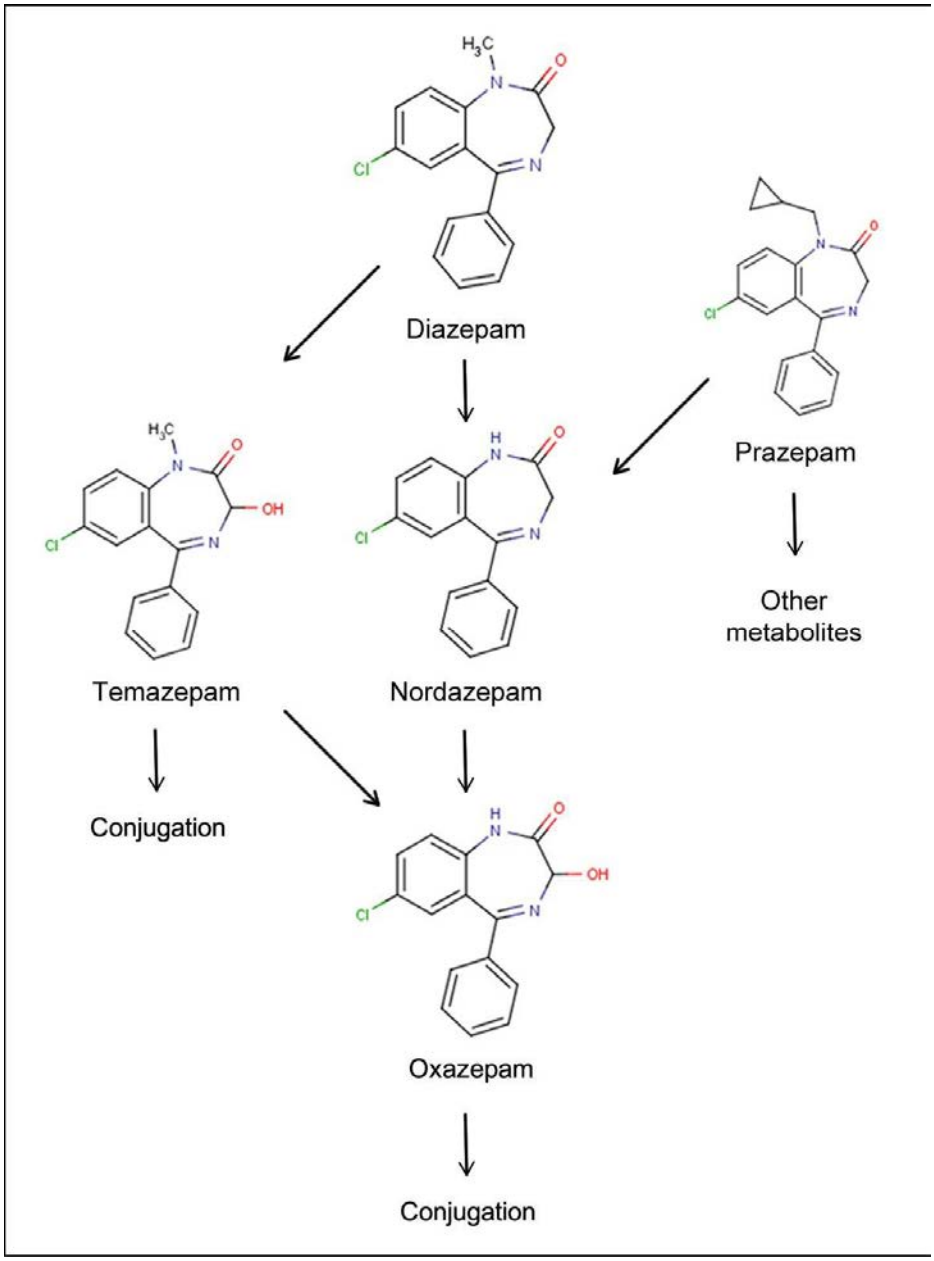


Fig. 1. Metabolic pathway of some benzodiazepines

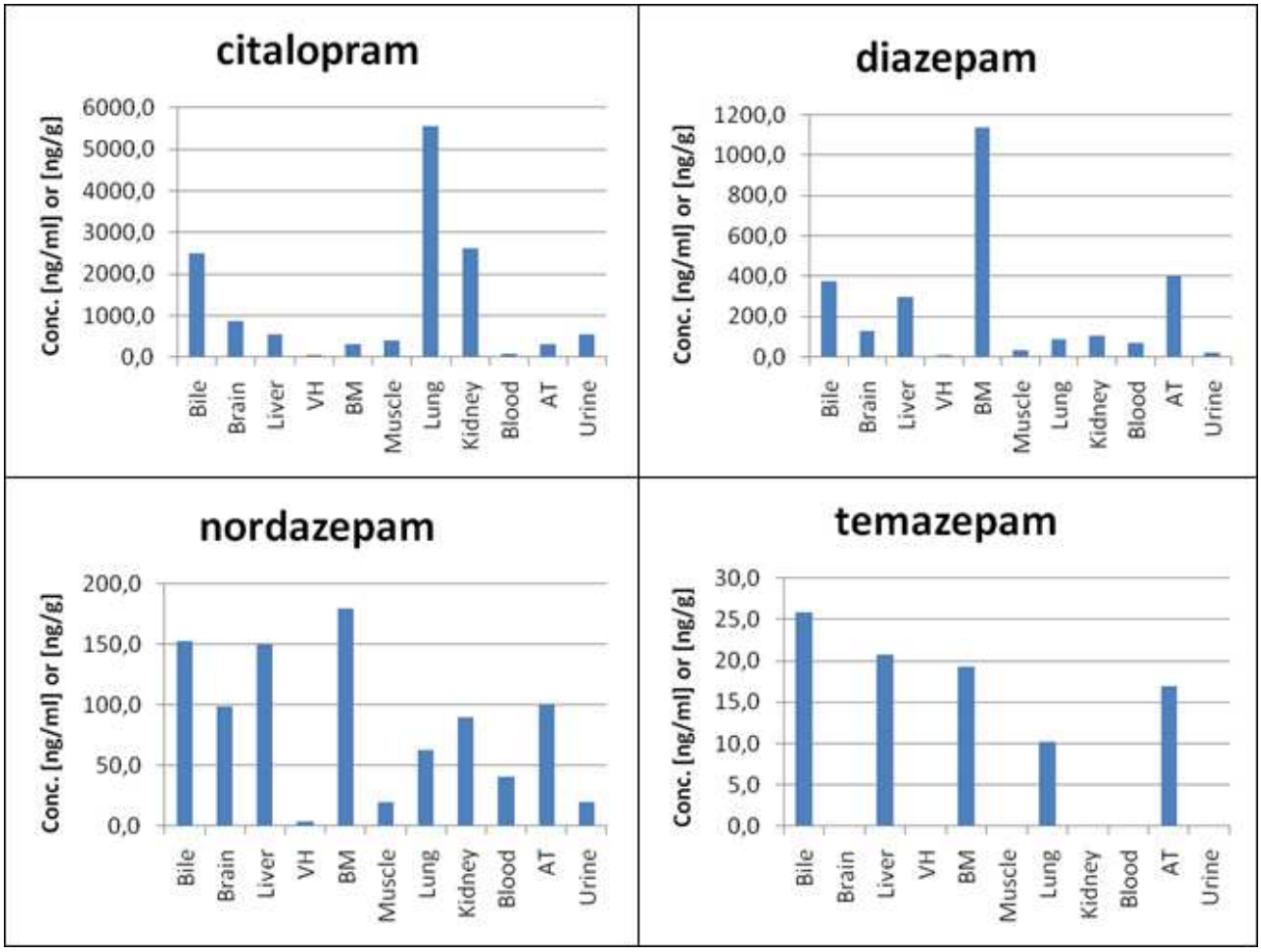


Fig. 2. Distribution patterns of diazepam, nordazepam, temazepam and citalopram in rabbit specimen after IV injection of 1.1 mg/kg and 2.8 mg/kg diazepam and citalopram, respectively. Oxazepam < LOQ in all but one specimen (liver = 11.3 ng/g).

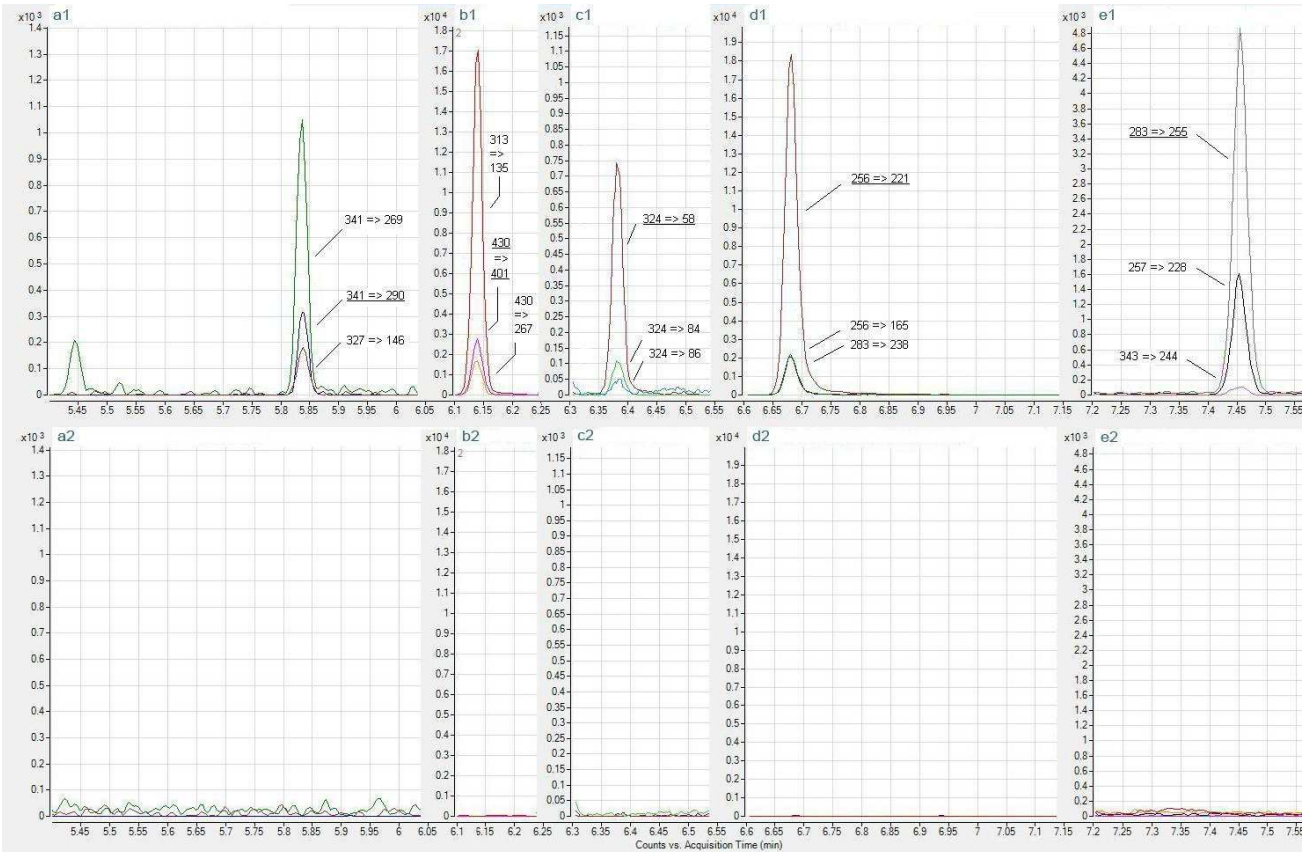


Fig. 3. (a1-e1) Chromatogram of quantifying transition of putrefied matrix extract spiked at low QC level, with quantifier (underlined) and qualifier transitions. (a1) nordazepam (3 ng/g), (b1) oxazepam (30 ng/g), (c1) citalopram (15 ng/g), (d1) diazepam (30 ng/g), (e1) temazepam (30 ng/g). (a2-e2) Corresponding blank extract chromatogram.

Table 1 Retention times and parameters used in selected reaction monitoring mode for the study compounds and their internal standards.

Compound	RT[a] (min)	Quantifier		Qualifier 1		Qualifier 2	
		Transition[b] (*m/z*)	CE[c] (eV)	Transition[b] (*m/z*)	CE[c] (eV)	Transition[b] (*m/z*)	CE[c] (eV)
Nordazepam-TMS[d]	5.84	341 → 290	15	341 → 269	20	327 → 146	25
Nordazepam-d5-TMS[d]	5.83	347 → 232	10	347 → 275	15	332 → 151	30
Oxazepam-TMS[d]	6.14	430 → 401	10	430 → 267	25	313 → 135	25
Oxazepam-d5-TMS[d]	6.13	435 → 406	10	435 → 345	20	318 → 288	35
Citalopram	6.38	324 → 58	3	324 → 84	1	324 → 86	7
Citalopram-d6	6.36	330 → 64	5	64 → 60	20	64 → 45	20
Diazepam	6.68	256 → 221	15	256 → 165	35	283 → 238	20
Diazepam-d5	6.67	261 → 226	15	287 → 252	20	287 → 209	35
Temazepam-TMS[d]	7.45	283 → 255	20	257 → 228	20	343 → 244	15
Temazepam-d5-TMS[d]	7.44	262 → 227	20	262 → 232	20	348 → 276	10

[a] RT: Retention time

[b] Transition: precursor ion → product ion

[c] CE: Collision Energy

[d] -TMS: analyzed in trimethylsilyl form

Table 2 Between-days validation of calibration curves according to chosen model of citalopram, diazepam and metabolites in BM. Data from calibration curves analyzed on 3 different days.

Concentration (ng/g)			
Spiked	Found (mean ± SD, 3 days)	Precision (%) (Between runs)	Accuracy (%)
Nordazepam	Calibration model: linear; weighting factor: 1/[concentration]²		
1	1.0 ± 0.0	1.9	102.5
5	4.5 ± 0.5	10.6	89.2
20	19 ± 1	3.2	94.6
80	82 ± 5	6.0	102.1
200	226 ± 16	6.9	113.0
Oxazepam	Calibration model: quadratic ; weighting factor: 1/[concentration]²		
10	10.1 ± 0.1	0.8	101.3
50	46 ± 4	8.2	92.0
200	196 ± 7	3.4	98.1
800	862 ± 44	5.1	107.7
2,000	1,954 ± 29	1.5	97.7
Diazepam	Calibration model: linear; weighting factor: 1/[concentration]²		
10	10.2 ± 0.1	1.1	101.5
50	46 ± 2	4.3	92.7
200	195 ± 1	0.7	97.3
800	823 ± 37	4.5	102.9
2,000	2,110 ± 102	4.8	105.5
Temazepam	Calibration model: linear; weighting factor: 1/[concentration]²		
10	12.2 ± 1.4	11.4	121.5
50	46 ± 1	2.7	91.7
200	186 ± 9	5.0	92.7
800	782 ± 8	1.0	97.8
2,000	2,040 ± 18	0.9	102
Citalopram	Calibration model: linear; weighting factor: 1/[concentration]		
5	5.1 ± 0.1	1.2	101.9
25	23 ± 1	1.8	91.1
100	95 ± 0	0.1	94.6
400	420 ± 18	4.4	104.9
1,000	1,072 ± 98	9.2	107.2

Table 3 Assessment of accuracy, precision and extraction recovery at LOQ, low QC and high QC, and during dilution validation and 72h autosampler stability check for full validation on BM.

	Concentration (ng/g)		Accuracy (%)	Precision (%)		Extraction recovery (%)
	Spiked	Found (mean ± SD, 3 days)		Within-run	Between-runs	
Nordazepam						
Low QC[a]	3	2.7 ± 0.3	88.9	7.6	8.1	55
High QC[a]	140	146 ± 11	104.2	7.2	1.4	43
LOQ[b]	1	0.8 ± 0.1	80.9	11.4		
AS stability[b]	3	2.5 ± 0.3	83.6	12.9		
AS stability[b]	140	136 ± 8	97.2	5.9		
1/10th dilution[b]	1,000	1,019 ± 10	101.8	4.7		
Oxazepam						
Low QC[a]	30	27.3 ± 4.5	90.9	12.0	12.6	20
High QC[a]	1,400	1411 ± 81	100.8	5.1	3.3	16
LOQ[b]	10	8.9 ± 1.1	88.8	12.8		
AS stability[b]	30	25.9 ± 3.6	86.2	13.9		
AS stability[b]	1,400	1350 ± 58	96.4	4.3		
1/10th dilution[b]	10,000	1,0646 ± 180	106.5	1.7		
Diazepam						
Low QC[a]	30	27.1 ± 2.0	90.2	4.9	6.5	36
High QC[a]	1,400	1,490 ± 114	106.4	5.9	5.8	30
LOQ[b]	10	9.6 ± 0.1	95.9	1.3		
AS stability[b]	30	25.6 ± 1.8	85.3	6.9		
AS stability[b]	1,400	1,499 ± 102	107.1	6.8		
1/10th dilution[b]	10,000	10,837 ± 1020	108.4	9.4		
Temazepam						
Low QC[a]	30	30.6 ± 3.1	102.0	5.0	10.5	8
High QC[a]	1,400	1,398 ± 137	99.9	6.9	8.2	5
LOQ[b]	10	9.3 ± 0.9	93.1	10.1		
AS stability[b]	30	32.4 ± 2. 6	108.1	7.9		
AS stability[b]	1,400	1,445 ± 62	103.2	4.3		
1/10th dilution[b]	10,000	9,428 ± 647	94.3	6.9		
Citalopram						
Low QC[a]	15	14.1 ± -2.0	93.7	10.8	11.4	68
High QC[a]	700	699 ± -78	99.9	9.4	6.9	49
LOQ[b]	5	4.8 ± 0.2	95.0	4.4		
AS stability[b]	15	16.7 ± 3.3	111.5	9.5		
AS stability[b]	700	630 ± 256	90.0	10.6		
1/10th dilution[b]	5,000	4,307 ± 468	86.1	10.9		

[a] Data from 5 replicates, analyzed on 3 different days.

[b] Data from 5 replicates, accuracy and within-run precision was measured as relative percentage deviation from nominal concentrations and relative standard deviation (RSD), respectively.

(AS stability: autosampler stability).

Table 4 Assessment of accuracy, precision and extraction recovery at LOQ, low QC and high QC levels in partially validated matrix. Data from 5 replicates analyzed in each matrix from 1 calibration curve per matrix.

	LOQ [a]		Low quality control [b]			High quality control [c]		
	Accuracy (%)	Precision (%)	Accuracy (%)	Precision (%)	Extraction recovery (%)	Accuracy (%)	Precision (%)	Extraction recovery (%)
Nordazepam								
Blood	119.2	9.6	89.2	3.5	57	99.6	1.0	70
VH	94.8	9.3	87.5	2.5	56	108.9	5.7	50
Urine	98.3	15.4	85.6	7.8	65	107.4	3.7	61
Bile	80.3	12.5	87.9	9.9	60	109.4	4.6	64
Liver	97.8	8.2	86.7	7.5	45	113.2	4.2	40
Kidney	82.6	4.8	108.1	6.7	52	96.7	2.4	43
Lung	81.2	12.7	94.8	11.3	52	112.0	5.0	52
Muscle	100.6	6.8	88.9	5.5	41	114.5	3.2	26
Brain	93.5	6.4	86.6	8.3	32	113.2	3.4	50
AT	112.8	13.5	98.4	7.2	53	110.7	5.8	62
Oxazepam								
Blood	94.7	10	87.7	2.1	17	101.5	1.0	29
VH	102	10.5	99.8	3.8	17	100	4.8	19
Urine	105.5	3.1	85.6	6.3	24	92.1	2.9	29
Bile	81.7	10.9	89.3	7.3	20	101	4.1	25
Liver	76.8	3.5	82.6	5.4	13	103.5	3.4	14
Kidney	76	17	81.4	8.1	21	97.1	2.0	16
Lung	115.7	3.5	88.8	5.1	17	104.4	3.6	19
Muscle	92.2	5	85.8	8.8	11	112.4	3.9	9
Brain	84	11.7	85.1	6.7	9	113.7	3.3	17
AT	111.9	6.2	92.2	7.1	16	96.1	2.5	34
Diazepam								
Blood	97.2	10.3	108.8	12.0	44	108.5	5.3	52
VH	101.5	3.1	95.2	4.6	37	106.9	4.9	31
Urine	103.5	0.6	112.3	6.1	58	104.2	7.2	46
Bile	113.2	3.4	106.7	1.9	49	102.6	4.1	45
Liver	75.3	16.4	90.6	6.5	40	97	2.1	30
Kidney	124.2	2.6	105.9	6.4	38	97	1.4	27
Lung	119.6	1.1	99.1	2.7	60	112.9	6.0	36
Muscle	104.1	2.5	99.6	5.3	33	111.4	3.4	24
Brain	114.1	2.4	108.3	2.5	29	113.6	3.1	34
AT	119.5	5.3	107.7	6.1	43	101.1	5.5	51
Temazepam								
Blood	80.1	12.7	92.3	1.2	9	102.4	2.9	12
VH	106.9	4.0	92.1	3.9	6	98.7	5.4	6
Urine	114.3	2.0	85.6	2.9	9	88.2	3.3	10
Bile	88.7	6.3	85.7	4.5	8	100.7	3.3	9
Liver	98.7	2.3	85.4	2.6	6	101.6	3.6	6
Kidney	86.1	2.5	88.3	2.4	8	96.1	2.2	6
Lung	119.7	8.5	85.1	5.1	6	103.7	3.7	7
Muscle	111.4	2.6	91.2	8.3	6	110.7	3.4	4
Brain	80.9	2.4	85.3	4.7	4	112.8	3.3	7
AT	91.1	9.3	87.5	8.2	7	101	5.2	9

Table 4 (continued)

	LOQ [a]		Low quality control [b]			High quality control [c]		
	Accuracy (%)	Precision (%)	Accuracy (%)	Precision (%)	Extraction recovery (%)	Accuracy (%)	Precision (%)	Extraction recovery (%)
Citalopram								
Blood	111.9	8.7	92.4	2.4	77	94.5	4.1	97
VH	105.5	5.2	100.9	8.0	102	102.7	5.9	57
Urine	97.8	3.8	85.9	4.1	67	98.8	5.1	75
Bile	85.2	5.3	88.3	5.1	109	96.2	4.4	78
Liver	111.1	12.3	92.2	5.5	58	105.1	3.5	51
Kidney	96.3	12.8	85.7	4.1	70	99.7	1.0	45
Lung	112.5	14.7	97.8	5.9	98	109.1	5.6	54
Muscle	113.5	11.3	89.7	7.6	44	111.3	3.7	26
Brain	98.2	1.4	92.0	5.3	50	112.4	3.1	41
AT	119	7.3	95.7	6.4	68	100.7	1.7	38

[a] 1ng/ml(/g) for nordazepam; 10ng/ml(/g) for diazepam, oxazepam and temazepam; 5ng/ml(/g) for citalopram
[b] 3ng/ml(/g) for nordazepam; 30ng/ml(/g) for diazepam, oxazepam and temazepam; 15ng/ml(/g) for citalopram
[c] 140ng/ml(/g) for nordazepam; 1400ng/ml(/g) for diazepam, oxazepam and temazepam; 700ng/ml(/g) for citalopram

Table 5 Quantification of nordazepam and oxazepam in human postmortem samples of a victim treated by prazepam.

	Nordazepam	Oxazepam
Cardiac blood (ng/ml)	420	20
BM (ng/g)	1267	28
Liver (ng/g)	667	64
Kidney (ng/g)	544	188
Lung (ng/g)	463	42
Brain (ng/g)	747	64

Modélisation PBPK pour l'évaluation de la distribution tissulaire du citalopram, diazepam et nordazepam. Application potentielle en toxicologie médicolégale.

Dans cette étude, la distribution tissulaire humaine du citalopram, du diazepam et de son métabolite principal, le nordazepam, est prédite chez l'homme, à partir de données issues d'une expérimentation animale, grâce à une approche de modélisation pharmacocinétique basée sur la physiologie (PBPK "physiologically based pharmacokinetic").

La modélisation pharmacocinétique consiste à mettre au point des modèles mathématiques permettant de décrire l'évolution des concentrations d'un médicament dans les fluides, tissus et/ou organes en fonction du temps afin de représenter et prédire le devenir du médicament dans l'organisme. Il existe différentes approches de modélisation [31]. L'approche non compartimentale s'intéresse essentiellement à l'évolution des concentrations sanguines et est principalement utilisée lors d'études de bioéquivalence. L'approche compartimentale conventionnelle est celle la plus communément utilisée. L'organisme y est représenté sous la forme d'un ou plusieurs compartiments, ne correspondant pas à des organes définis, et la distribution du médicament sous forme de transfert entre ces compartiments, modélisée par des paramètres mathématiques théoriques. Bien que très informative sur le comportement sanguin du médicament, cette approche ne permet pas d'étudier la distribution tissulaire de façon précise. L'approche PBPK est elle aussi une modélisation compartimentale mais celle-ci se base sur une structure et des paramètres encrés dans la physiologie et reproduisant au plus proche la mécanistique sous-tendant la distribution des médicaments dans l'organisme:

- Chaque compartiment représente un organe ou groupe d'organes aux propriétés semblables, placés selon l'anatomie du système cardiovasculaire.
- Les processus pharmacocinétiques sont définis en termes de paramètres qui se rapportent à la physiologie ou à la biochimie sous-jacente: volume et débit sanguin des organes, coefficients de partage tissus/plasma…

Ainsi, par cette structure physiologique, la modélisation de type PBPK est plus proche de la problématique médicolégale, puisqu'elle permet d'envisager une distribution dans les différents tissus et organes analysés en *post mortem* et donc potentiellement d'y interpréter les concentrations mesurées.

Cette approche PBPK possède, de plus, de fortes capacités d'extrapolation qui découle, d'une part, de sa structure physiologique similaire pour tous les mammifères, et d'autre part de la

richesse des paramètres provenant de diverses sources physiologiques, chimiques, biochimiques… Ainsi, à partir d'un modèle construit et validé sur une population test et en modifiant les paramètres adéquats, il est possible de simuler la cinétique dans une autre population. Ces propriétés prédictives puissantes permettent notamment:

- l'extrapolation inter-espèces
- l'extrapolation à d'autres voies d'administrations ou d'autres schémas posologiques
- la prédiction d'interactions médicamenteuses (influence positive ou négative sur le métabolisme, sur les transporteurs actifs…)
- la simulation du comportement pharmacocinétique dans des populations spécifiques pour lesquelles des paramètres physiologiques ou biochimiques sont différents (obésité, patient en état choc hémorragique, personnes âgées…)
- la simulation du profil d'autres molécules à partir des connaissances d'une molécule apparentée.
- l'extrapolation à d'autres tissus, tel que le compartiment fœtal, des tissus cancéreux…

De par ces propriétés, les modèle PBPK sont actuellement utilisés dans le domaine de la toxicologie environnementale (application reconnue par les instances gouvernementales) où les composés chimiques à risque ne peuvent pas, en toute évidence, être administrés à l'homme. Ce modèle est aussi de plus en plus appliqué à différents stades de la recherche pharmaceutique : phases de sélection des molécules candidates, développement préclinique (notamment l'extrapolation des données pharmacocinétiques fournies par expérimentations animales) et développement clinique (prédiction dans des populations spécifiques) [32]. Cette propriété essentielle d'extrapolation est utilisée pour notre étude afin de simuler la cinétique tissulaire chez l'homme pour une administration orale de citalopram et de diazepam à partir des cinétiques intraveineuses issues de l'expérimentation animale.

Notre étude s'est déroulée en deux temps. Des expérimentations animales ont permis d'établir la cinétique du citalopram, diazepam, et de son métabolite le nordazepam dans 8 tissus et organes d'intérêt médicolégal chez le lapin. A partir de ces données et de paramètres physiologiques propres à cette espèce trouvés dans la littérature, un modèle, représentant la distribution tissulaire de ces médicaments, est construit. Dans un second temps, ce modèle est transposé à l'homme en remplaçant les paramètres cuniculaires par les paramètres humains. Le modèle ainsi développé est utilisé pour prédire la cinétique sanguine et tissulaire humaine d'une administration thérapeutique orale de citalopram et de diazepam.

Les résultats obtenus sont discutés d'un point de vue médicolégal pour aider à l'interprétation des concentrations tissulaires. A travers cette étude, l'approche PBPK montre tout son intérêt

dans le domaine de la toxicologie médicolégale en permettant d’obtenir des données de concentrations tissulaires humaines pour des molécules et/ou des matrices peu ou pas décrites dans la littérature. Il serait intéressant d'appliquer ce modèle à d'autres molécules aux propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques différentes ou à d'autres schémas posologiques (administration chronique, surdosage aigu au cours d'un traitement chronique…).

Modélisation pharmacocinétique basée sur la physiologie pour l'évaluation de la distribution tissulaire du diazepam, du nordazepam, et du citalopram après administration orale unique. Application potentielle en toxicologie médicolégale.

1. Introduction

Dans le domaine de la toxicologie *post mortem*, différentes situations (absence de sang, putréfaction…) requièrent l'analyse de prélèvements autopsiques autres que le sang. En utilisant une technique analytique appropriée, la détection de toxiques est possible dans de nombreux tissus. L'interprétation des concentrations qui y sont mesurées reste complexe et périlleuse du fait de nombreux phénomènes *post mortem* mais aussi par manque de connaissance de la pharmacocinétique tissulaire. Chez l'homme, les données tissulaires sont principalement décrites au travers de « case report ». Toutefois elles restent parcellaires : peu de molécules étudiées, faible nombre de cas, nombre de matrices décrites limité, manque d'information concernant le délai absorption-prélèvement et la quantité absorbée… De plus, ces données *post mortem* correspondent à la résultante de la distribution tissulaire *ante mortem* des molécules et des phénomènes *post mortem* (redistribution, dégradation *in corpore*…). Ces données restent donc spécifiques aux cas rapportés et sont difficilement utilisables comme base d'interprétation au cours d'autres investigations toxicologiques. L'utilisation de données issues d'études standardisées permet de s'affranchir de certaines de ces limites. De telles études ne peuvent être conduites que chez l'animal. Il se pose alors le problème de l'extrapolation des résultats à l'homme. L'utilisation de certains outils de modélisation permet d'optimiser cette étape de transposition.

Les modèles pharmacocinétiques basés sur la physiologie (PBPK) sont des modèles compartimentaux construits à partir d'une structure physiologique (chaque compartiment représente un organe ou groupes d'organes relié par le système vasculaire), similaire pour tous les mammifères et qui intègrent de nombreuses informations physiologiques, chimiques, et biochimiques. Il découle de ces propriétés une forte capacité de prédiction. Cette approche est aujourd'hui principalement utilisée en toxicologie environnementale ou professionnelle pour extrapoler la toxicité de certains composés à partir de données issues de l'expérimentation animale. Elle est également utilisée dans la recherche pharmaceutique pour l'optimisation de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique et en phases de développement clinique. Toutefois, le modèle PBPK reste un outil complexe ce qui limite son utilisation [32]. Enfin,

l’application de ce type de modèle dans le domaine de la toxicologie forensique n’a pas encore été décrite.

Dans cette étude l’approche PBPK a été utilisée pour prédire la distribution tissulaire du citalopram, du diazepam et de son métabolite, le nordazepam chez l'homme, après estimation de certains paramètres nécessaires à la construction du modèle au travers d'expérimentations animales. Huit matrices d’intérêt médicolégal sont intégrées à ce modèle: poumon, tissu adipeux, foie, rein, muscle squelettique, cerveau, sang, et MO. Le lapin a été choisi comme modèle pour permettre la réalisation de prélèvements de l’ensemble des matrices en quantité suffisante pour la réalisation des analyses. Les molécules étudiées étaient le citalopram et le diazepam. Ces molécules présentent un intérêt médicolégal certain puisque ce sont des molécules psychotropes fréquemment rencontrées lors d’investigations toxicologiques *post mortem*. Elles ont également été choisies pour leurs propriétés pharmacocinétiques et physicochimiques communes à de nombreux médicaments (Tableau 1). Le diazepam permet par ailleurs d’étudier le comportement des métabolites à travers son principal métabolite actif : le nordazepam. Le citalopram et le diazepam ont été administrés simultanément afin de refléter le contexte médicolégal, où il est fréquent de retrouver cette association de médicaments, et le contexte thérapeutique, où sont souvent associées les propriétés antidépressives et anxiolytiques de ces 2 molécules. L'absence d'interaction pharmacocinétique entre ces 2 molécules a été vérifiée par une revue de la littérature [33-38]. Pour faciliter la quantification des molécules dans les prélèvements, tout en évitant un décès par surdose de l’animal, les doses administrées à l’animal correspondaient à une dose légèrement supérieure aux normales thérapeutiques humaines. Cette étude présente le modèle PBPK choisi, l'étape d'estimation des paramètres chez l'animal suivi de l'extrapolation des distributions tissulaires chez l'homme. Les résultats obtenus sont discutés d'un point de vue médicolégal pour aider à l'interprétation des concentrations tissulaires.

Tableau 1 : Propriétés physicochimiques, pharmacocinétiques et intérêt médicolégal des 3 molécules étudiées.

	Citalopram	**Diazepam**	**Nordazepam**
Classe	Antidépresseur	Anxiolytique, Anticonvulsivant	Anxiolytique
Famille	Inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine	Benzodiazépine	Benzodiazépine
Propriétés physicochimiques			
Log P (octanol/eau) [39]	3.74	2.82	2.93
Solubilité dans l'eau [39]	31 mg/L [40]	50 mg/L	57 mg/L
pKa	9.6 [41]	3.4 [39]	3.5, 12 [42]
Propriétés pharmacocinétiques			
½ vie plasmatique d'élimination [43]	25 -35 h	32 – 47 h	31 - 97 h
Volume de distribution [43]	12 – 16 L/kg	0.7 – 2.6 L/kg	0.5 – 2.5 L/kg [42]
Intérêt Médicolégal			
Proportions de dossiers traités au laboratoire LAT LUMTOX en 2010	5.33% (43 / 807)	3.84% (31 / 807)	16.6% (134 / 807)

2. Matériel et Méthodes

2.1 Etude pharmacocinétique chez l'animal

2.1.1 Matériel

Les lapins provenaient du laboratoire Charles Rivers (L'arbresle, France). Les produits utilisés étaient les suivants: héparine sodique pour intraveineuse (25000 ui/5mL, Panpharma), propofol en émulsion injectable à 500 mg/50mL (Diprivan®, AstraZeneca), sérum physiologique (NaCl 0.9%, poche de 500mL), citalopram sous forme de solution à diluer pour perfusion à 40 mg/mL (Seropram®, racémique (R+S), Lundbeck SAS) et diazepam sous forme de solution injectable à 10mg/2mL (Valium®, Roche).

2.1.2 Etude animale

Les expériences ont été réalisées sur 25 lapins de race New Zealand, variété albinos, dans le respect des consignes pour le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation et avec accord du comité d'éthique local (Lyon, France, n° BH 2008-14). Pendant la semaine de conditionnement ainsi que toute la durée des expérimentations, les animaux sont logés, une cage pour chaque animal, au sein de l'Animalerie Commune de Rockefeller (Lyon, France) avec accès libre à l'eau et la nourriture et des soins quotidiens, la température y est maintenue constante à 24°C et un rythme jour nuit (12h/12h) est conservé. La veille de l'injection médicamenteuse, les lapins sont pesés pour déterminer avec précision la dose de médicaments à injecter. Les animaux reçoivent une dose de 1.1 mg/kg de diazepam et 2.8 mg/kg de citalopram injectée par voie intraveineuse dans la veine marginale de l'oreille sans anesthésie préalable. Cinq groupes (I à V) de 5 lapins sont constitués. L'euthanasie est réalisée 2h, 4h, 7h, 17h ou 32h après l'injection pour les groupe I à V respectivement. Après anesthésie profonde par injection intraveineuse de 70 mg de propofol au niveau de la veine marginale de l'oreille non piquée, l'euthanasie est induite par exsanguination intracardiaque. Le sang cardiaque prélevé pendant la saignée, sur tubulures et seringues héparinées, est conservé pour analyse.

Les prélèvements sont immédiatement réalisés une fois la mort déclarée. Le cerveau est prélevé à l'aide d'une spatule après réalisation d'une fenêtre osseuse au sommet du crane en utilisant une scie à plâtre. Une incision abdominale est réalisée et les côtes sectionnées pour dégager la cage thoracique. Le poumon droit et gauche, l'extrémité inférieure du lobe droit du foie, le rein droit et gauche ainsi que le tissu adipeux abdominal sont prélevés. Les reins sont coupés sagitalement et seule la partie corticale est conservée pour analyse. Un fragment du quadriceps droit est prélevé après incision au niveau de la patte postérieure. Les organes prélevés sont rincés abondamment pour éliminer un maximum de sang contaminant puis séchés et broyés. Les 4 os des pattes postérieures droites et gauches sont désarticulés afin de permettre le prélèvement de MO : les os sont nettoyés et rincés pour éviter toute contaminations sanguines, sectionnés et la MO est prélevée à la spatule. L'ensemble des échantillons (sang cardiaque, cerveau, poumon, foie, rein, tissu adipeux, muscle, MO) sont conservés à -20°C jusqu'à analyse.

2.1.3 Analyse

La méthode d'extraction en 3 étapes suivie d'une analyse par GC-MS/MS décrite dans la partie précédente a été utilisée, sans modification, pour l'analyse des prélèvements issus des expérimentations. Dans chaque série, l'ensemble des prélèvements d'une même matrice correspondant aux groupes I à V est analysé. La quantification est effectuée en utilisant pour chaque série une gamme composée de 5 points (nordazepam 1-200 ng/g ou mL, diazepam 10-2000 ng/g ou mL, citalopram 5-1000 ng/g ou mL) et 2 contrôles qualités (nordazepam 3 et 140 ng/g ou mL, diazepam 30 et 1400 ng/g ou mL, citalopram 15 et 700 ng/g ou mL) réalisés dans la matrice analysée. Les prélèvements initialement trouvés en dehors de la gamme de calibration, sont analysés dilués selon le protocole décrit et validé.

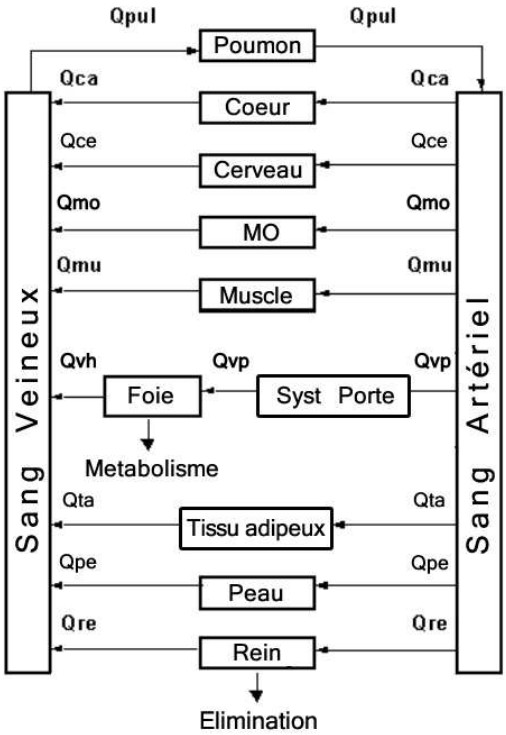
2.2 Modèle PBPK

Pour la modélisation, le logiciel Adapt II [44], plateforme de modélisation pour applications pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (Biomedical Simulations Resource, University of Southern California, USA) a été utilisé. Ce logiciel permet, pour un modèle quelconque, la simulation de courbes cinétiques ainsi que l'estimation de paramètres à partir de données

expérimentales, par régression non linéaire, en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance.

2.2.1 Structure du modèle PBPK

Le modèle PBPK décrit par Levitt [45] a été utilisé pour l'estimation des paramètres chez le lapin et la simulation chez l'homme avec certaines modifications. Brièvement, la MO a remplacé le compartiment "autre" du modèle de Levitt alors qu'ont été retirés les compartiments "os" et "tendon" intervenant faiblement dans la pharmacocinétique de ces médicaments. Le modèle utilisé comprend ainsi 12 compartiments représentant le sang veineux et artériel, le poumon, le foie, le rein, le système porte (estomac, intestin, pancréas et rate), le cœur, le cerveau, le muscle, le tissu adipeux, la peau et la MO. Les compartiments sont connectés par le système cardiovasculaire en respectant l'anatomie. Le poumon est connecté en série entre le compartiment veineux et artériel aussi il reçoit l'intégralité du débit total cardiaque. La Figure 1 représente schématiquement les 12 compartiments et leurs connexions.



Les tissus et organes sont disposés d'après l'anatomie et connectés par le système vasculaire.
Q correspond aux flux sanguins : pul pulmonaire, ca cardiaque, re renal, mo moelle osseuse, mu muscle, vh veine hépatique, vp veine porte, ta tissu adipeux, pe peau, ce cerveau

Figure 1 : Représentation schématique du modèle PBPK

2.2.2 Les 2 étapes de la modélisation

2.2.2.1 Modèle lapin : Identification des coefficients de partage sang/plasma (Kp)

Dans un premier temps, le modèle est construit pour être appliqué chez le lapin à l'aide des données physiologiques et pharmacocinétiques propres à cette espèce. Ce modèle est utilisé, pour chacune des 3 molécules, en implémentant les données issues des expérimentations animales (dose administrée, voie d'administration, concentrations sanguines et tissulaires, clairance sanguine totale) dans le but d'estimer les variables (paramètres non fixés) du modèle dont les Kp de chaque compartiment. Cette première étape de modélisation consiste donc pour le logiciel Adapt II à ajuster la valeur numérique de l'ensemble des variables afin que les courbes prédites par le modèle correspondent au mieux aux cinétiques observées lors des expérimentations animales.

2.2.2.2 Modèle homme : Simulation des cinétiques sanguines et tissulaires

Dans un second temps, le modèle est transposé à l'homme en remplaçant les données physiologiques propres à l'espèce animale par celles qui correspondent chez l'homme. Les Kp reflètent l'affinité de la molécule pour un tissu et sont donc considérés comme propre à chaque molécule mais indépendants de l'espèce. Les Kp estimés chez le lapin, seront donc implémentés tels quels dans ce second modèle. Grâce aux données physiologiques humaines, aux paramètres pharmacocinétiques déjà connus chez l'homme pour les 3 molécules dans la littérature et à l'ensemble des Kp estimés chez l'animal, il devient alors possible de simuler la cinétique humaine sanguine et tissulaire du citalopram, diazepam et nordazepam après administration orale de citalopram et de diazepam.

2.2.3 Paramètres du modèles PBPK

2.2.3.1 Description des équations du modèle PBPK

Une brève description des équations du modèle PBPK est présentée. Plus de détails et explications peuvent être trouvés dans la publication de référence de Levitt [45].

Le modèle est décrit sous forme d'un ensemble d'équations différentielles. Chaque équation décrit la variation de la concentration de la forme libre du médicament dans le fluide interstitiel d'un organe (ou compartiment). Chaque organe *i* est caractérisé par sa masse (V*i*, en kg), son flux sanguin (Q*i* en L/min/kg d'organe), le ratio de concentration interstitielle en albumine sur la concentration plasmatique (rcP*i*), sa fraction d'eau extracellulaire (wecf*i* en L/kg), et le produit perméabilité surface pour le médicament libre (PS*i* en L/min/kg).

La fraction libre de médicament dans le volume de fluide interstitiel (assimilé à l'espace dans lequel se répartit l'EDTA) de chaque organe, fu_{Ti}, est calculée selon l'équation suivante:

$$\mathrm{fu}Ti = \frac{1}{1 + \mathrm{Kass} \,.\, \left(\frac{\mathrm{rcP}i}{\propto i}\right) . \mathrm{Prot}}$$

Où Kass correspond à la constante d'association du médicament pour l'albumine, protéine de liaison, mesurée dans le plasma (L/mol), Prot est la concentration plasmatique d'albumine (mol/L), et α_i est la fraction d'espace intersitiel accessible au médicament pour chaque organe.

Dans le cas d'une diffusion limitée par la perméabilité du médicament dans l'espace intersitiel d'un organe, la fraction de la concentration médicamenteuse artérielle qui diffuse dans le fluide interstitiel lors d'un passage unique est calculée comme suit:

$$\mathrm{fclear}i = 1 - \exp(- \frac{\mathrm{fu}b \,.\, \mathrm{Ps}i}{1.06\ \mathrm{wecf}b \,.\, \mathrm{Q}i})$$

où fu_b est la fraction libre du médicament dans le sang, $wecf_b$ la fraction d'eau du sang en L/kg et 1.06 la densité du sang en kg/L.

La constante de vitesse de diffusion de la fraction libre de médicament depuis le sang jusqu'à l'espace interstitiel de chaque organe en L/min est calculée comme suit:

$$\mathrm{k}Ti = 1.06\ \mathrm{fclear}i \,.\, \frac{\mathrm{fu}Ti \,.\, \mathrm{wecf}b \,.\, \mathrm{Q}i}{\mathrm{fu}b \,.\ \mathrm{wecf}i}$$

Cette équation peut être vue comme le ratio de la clairance de distribution de la fraction libre ($1.06\ wecf_b \,.\, Q_i \,.\, V_i \,/\, fu_b$) sur le volume de distribution de la fraction libre ($V_i \,.\, wecf_i/fu_{Ti}$).

L'équation générique décrivant la variation de la concentration de la fraction libre de médicament dans le fluide interstitiel d'un organe (Cu_{Ti}) est:

$$\frac{\mathrm{dCu}Ti}{\mathrm{dt}} = \mathrm{k}Ti\ (\mathrm{Cu}A - \mathrm{Cu}Ti) - \ \mathrm{ke} \,.\ \mathrm{Cu}Ti$$

Où Cu_A est la concentration de médicament libre dans le sang artériel et ke est la constante de vitesse d'élimination, si nécessaire. Cette constante est calculée comme le ratio de la clairance

d'élimination de la fraction libre (1.06 $wecf_b$. CL_i / fu_b) sur le volume de distribution de la fraction libre (V_i . $wecf_i$ / fu_{Ti}). CL_i est la clairance intrinsèque totale du médicament, en relation avec la clairance de l'organe CL_{org} par un modele de clairance. Dans le cas simple d'un modèle "well mixed", la formule est:

$$\mathrm{CL}i = \frac{\mathrm{CL}org}{1 - (\mathrm{CL}org \,/\, \mathrm{Q}org)}$$

Les ratios des concentrations tissus/plasma (Kpi) sont calculés par la formule suivante:

$$\mathrm{Kp}i = \frac{\mathrm{fu}\,.\ \mathrm{wecf}i}{0.94\ \mathrm{fu}Ti}$$

Où 0.94 représente la fraction d'eau dans le plasma en L/kg.

Le volume de distribution du médicament total à l'état d'équilibre est calculé comme suit:

$$\mathrm{Vss} = \mathrm{Vp} + \sum_{1}^{\mathrm{n}} (\propto i\,.\mathrm{V}i\,.\mathrm{wecf}i\,.(\lambda\mathrm{E}\,.\ \frac{\mathrm{fu}p}{\mathrm{fu}Ti} + (1 - \lambda\mathrm{E})\,.\ \mathrm{fu}p)$$

Où Vp correspond au volume d'eau dans le plasma, λ_E à la fraction de volume interstitiel (espace de l'EDTA) accessible à l'albumine (λ_E = 0.45) et la somme s'applique aux *n* organes.

2.2.3.2 Présentation des paramètres et hypothèses initiales

Le modèle est ainsi décrit sous la forme d'un ensemble d'équations différentielles dans lequel apparaissent des paramètres pharmacocinétiques et physiologiques. Comme pour toute modélisation, des hypothèses ont été retenues afin de simplifier l'écriture des équations du modèle en vue de simuler les mécanismes physiologiques et ce au plus proche de la réalité.

- La concentration est considérée homogène au sein de chaque compartiment (modèle "well-mixed").
- La distribution du médicament est supposée s'effectuer par diffusion passive uniquement. Cette distribution peut être limitée par le débit sanguin ou par la perméabilité membranaire.
- Une seule protéine de liaison plasmatique est prise en compte et la liaison aux protéines, caractérisée par la fraction libre plasmatique (fup), est décrite comme linéaire c'est-à-dire non saturable.
- L'élimination est soit hépatique soit rénale, sans distinction entre la filtration glomérulaire et la sécrétion tubulaire. Elle est décrite par deux paramètres, la clairance sanguine totale (Cl*t*) et le pourcentage de médicament éliminé par le foie (fraction de

clairance hépatique fCl*h)* ; la clairance hépatique Cl*h* est déduite par la formule Cl*h* = Cl*t* * fCl*h* et la clairance rénale Cl*r* par la formule Cl*r* = Cl*t* * (1-fCl*h*).

- Chaque organe *i* est caractérisé par sa masse (V*i*), son flux sanguin (Q*i*), sa fraction d'eau extracellulaire (wecf*i*) en L/kg, et son produit perméabilité surface pour le médicament libre (PS*i*) en L/min/kg. Les paramètres physiologiques des organes V*i*, Q*i*, wecf*i* sont fixés et issus de la littérature. Le PS caractérise la vitesse de diffusion à travers une membrane biologique. Selon Levitt [45], tous les PS*i* sont calculés par référence au PS du muscle. Ce dernier est relié à la fraction du médicament pénétrant dans le tissu lors du premier passage (fclear) fixé arbitrairement à 0,5.
- Seule la cinétique d'une administration médicamenteuse unique a été étudiée, par conséquent, la concentration initiale de médicaments dans chaque compartiment avant administration est considérée comme nulle et donc fixée à 0.
- La constante d'absorption K*abs* intervient dans le modèle chez l'homme pour simuler une administration orale; elle est issue des données pharmacocinétiques disponibles dans la littérature pour chaque molécule.
- Si les poumons n'ont pas de rôle pharmacocinétique majeur et si la différence artério-veineuse n'a pas besoin d'être modélisée (ce qui est en général le cas pour les molécules non volatiles et non éliminées par voie pulmonaire), le compartiment veineux peut être rapproché du compartiment artériel. Ainsi, dans ce modèle, le Kp et les concentrations veineuses sont considérés comme équivalents aux paramètres artériels.
- La distribution de la molécule au sein des différents compartiments est décrite par l'intermédiaire des coefficients de partage tissu/plasma (Kp) qui correspondent à l'affinité de la molécule pour chaque tissu. Ces Kp sont spécifiques à un couple tissu-molécule et sont indépendants de l'espèce.
- La cinétique du modèle est décrite comme linéaire au travers des différentes équations. De ce fait les concentrations prédites pour une dose peuvent être utilisés pour calculer les concentrations à d'autres doses par simple proportionnalité.
- Modèle d'erreur résiduelle : la concentration observée C*obs* est égale à la concentration prédite par le modèle C*pred* ajouté d'une erreur résiduelle (eps). La variance de cette erreur Var(eps) est modélisée selon la formule $Var(eps) = a^2 * Cpred^{2b}$ où a et b sont 2 paramètres que l'on peut fixer ou estimer : "b" a été fixé tel que le coefficient de variation de eps est divisé par 2 lorsque la concentration est multipliée par 20, ce qui est cohérent avec les propriétés de la méthode analytique estimées lors de la validation (précision de la méthode). "a" a été fixé à 0.1 pour avoir un ajustement raisonnable des données.

Les valeurs des grandeurs pharmacocinétiques et physiologiques intervenant dans les 2 modèles sont synthétisées dans les Tableau 2 et Tableau 3.

Tableau 2 : Paramètres pharmacocinétiques utilisés ou estimés dans le modèle PBPK chez le lapin et l'homme.

	Lapin	**Homme**
Fup	Paramètres d'ajustement du modèle	Citalopram: 20% Diazepam: 2% Nordazepam: 3.4%
Clt (L/min)	Citalopram: 0.129 Diazepam: 0.067 Nordazepam: 0.029	Citalopram: 0.45 Diazepam: 0.026 Nordazepam:0.020
fClh	Paramètres d'ajustement du modèle	Citalopram: 88.7% Diazepam: 99.9% Nordazepam: 99.9%
Voie d'administration	Intraveineuse	Orale
Dose (mg)	Citalopram: 7.84 Diazepam: 3.08	Citalopram: 50 Diazepam: 10
Kabs	-	Citalopram: 0.019 Diazepam: 0.092

Tableau 3 : Paramètres physiologiques utilisés dans le modèle PBPK chez le lapin et l'homme

		Lapin	Homme
Masse (kg)	Sang veineux	0.124	4.4
	Sang artériel	0.041	1.1
	Poumon	0.020	0.536
	Système porte	0.060	1.5
	Foie	0.086	1.8
	Rein	0.015	0.31
	Cerveau	0.016	1.4
	Cœur	0.006	0.33
	Peau	0.476	2.6
	Muscle	1.04	26
	Tissu adipeux	0.224	17.5
	MO	0.118	2.94
Flux sanguin (L/min)	Sang veineux	0.584	5.618
	Sang artériel	0.584	5.618
	Poumon	0.584	5.618
	Système porte	0.140	1.025
	Foie	0.037	0.410
	Rein	0.08	1.130
	Cerveau	0.006	0.715
	Cœur	0.016	0.242
	Peau	0.053	0.240
	Muscle	0.155	0.535
	Tissu adipeux	0.032	0.675
	MO	0.065	0.615
Fraction d'eau tissulaire (L/kg)	Sang veineux	0.82	
	Sang artériel	0.82	
	Poumon	0.8	
	Système porte	0.78	
	Foie	0.7	
	Rein	0.8	
	Cerveau	0.8	
	Cœur	0.8	
	Peau	0.8	
	Muscle	0.78	
	Tissu adipeux	0.2	
	MO	0.3	

2.2.3.3 Paramètres du modèle chez le lapin

Les paramètres physiologiques standards du lapin ont été utilisés pour un poids de référence de 2,8 kg, poids moyen des animaux lors des expérimentations, et correspondant à un débit cardiaque de 0.584 L/min [46]. Les masses et flux sanguins de chaque organe proviennent de la littérature [46-48] à l'exception des masses du système porte, du compartiment musculaire et de la moelle osseuse, informations indisponibles qui ont du être calculées par allométrie à partir des données humaines. Le facteur d'allométrie, communément appliqué pour les volumes (et les masses) tissulaires et décrit par West et al dans deux revues de référence [49, 50], correspond au ratio du poids du lapin (2,8kg) sur le poids standard du corps humain (70kg) soit un facteur de correction égal à 0.04. Clewell and Jarnot [51] présument que 11% du débit total cardiaque est distribué à la moelle osseuse chez les souris, les rats et les hommes. Cette donnée n'étant pas disponible pour le lapin, elle a été considérée comme identique pour cette espèce. Ce débit est loin d'être négligeable alors qu'il n'est habituellement pas considéré dans les modèles PBPK. De ce fait, l'ensemble des débits sanguins rapportés dans la littérature ont du être diminués proportionnellement afin que la somme final des débits n'excède pas le débit total cardiaque de 0.584 L/min. La composition des organes est souvent considérée dans les modèle PBPK comme équivalente entre les différentes espèces de mammifères supérieurs [47]. Ainsi, les fractions d'eau de chaque organe décrites par Levitt pour l'homme [45] ont été également utilisées pour le modèle chez le lapin.

Les expérimentations animales ont permis de quantifier le diazepam, le nordazepam et le citalopram dans huit matrices (Sang, Poumon, Foie, Rein, Cerveau, Muscle, Tissu adipeux, MO) à 5 temps (2 h, 4 h, 7 h, 17 h et 32 h) après l'injection intraveineuse de 1,1 mg/kg de diazepam (soit 3,08 mg) et 2,8 mg/kg de citalopram (soit 7,84 mg). Pour chaque temps et chaque matrice, la médiane des 5 concentrations a été sélectionnée afin d'obtenir une cinétique moyenne.

Afin de tenir compte de l'ensemble des données issues de l'expérimentation animale et notamment des concentrations très faibles ou de l'absence de molécule lors des prélèvements à des temps éloignés de la prise médicamenteuse, il est necessaire d'implémenter dans le modèle des valeurs numériques pour l'ensemble des temps et des matrices. Ainsi, pour les besoins du modèle pharmacocinétique, certaines approximations sont communément admises. Deux cas sont distingués:

- la molécule est détectée, répond aux critères d'identification mais est déterminée inférieure à la limite de quantification (nordazepam 1 ng/mL ou /g, diazepam

10 ng/mL ou /g, citalopram 5 ng/mL ou /g): la valeur dans le modèle pharmacocinétique est arbitrairement fixé à la moitié de la limite de quantification (0.5, 5 et 2.5 ng/mL ou /g pour le nordazepam, le diazepam et le citalopram, respectivement).

- Aucun pic n'est détecté ou la présence de la molécule est rejetée d'après les critères d'identification: la valeur correspondante dans le modèle pharmacocinétique est fixée à 0.

Les critères analytiques d'identification de la molécule sont les suivants: temps de rétention inclus dans une fourchette de ± 0.1 min par rapport au temps de rétention du contrôle positif traité et inclus dans la même série, ratio des aires des transitions qualifiantes sur la transition quantifiante inclus dans la fourchette de ± 25% par rapport au ratio observé sur le contrôle positif traité et inclus dans la même série.

Les clairances totales sanguines pour le citalopram, le diazepam et le nordazepam ne sont pas référencées chez le lapin. Aussi, elles ont été estimées grâce aux cinétiques construites avec les données issues des expérimentations décrites précédemment. La Cl*t* répond à la formule suivante Clt = dose / $AUC_{0\rightarrow\infty}$ où la dose correspond à la dose totale administrée (soit 7.84 mg de citalopram et 3.08 mg de diazepam pour un lapin moyen de 2,8kg) et l'$AUC_{0\rightarrow\infty}$ à l'aire sous la courbe de 0 à l'infini. Cette dernière a été estimée par la méthode des trapèzes à partir des données expérimentales.

La fup des 3 molécules ainsi que la fCl*h* sont des informations indisponibles chez le lapin aussi ces 2 paramètres ne sont pas fixés dans le modèle et ont été estimés par régression avec les données expérimentales.

2.2.3.4 Paramètres du modèle chez l'homme

Les paramètres physiologiques standards (V*i*, Q*i* et wecf*i*) pour l'homme décrits par Levitt [45] ont été utilisés pour la simulation chez l'homme. La MO représente 4.2% de la masse totale du corps [47], soit pour un poids standard de 70 kg, un volume de 2.94 kg. Le flux sanguin correspondant à la MO représente 11% du débit cardiaque total [51], soit 0.615 L/min. De la même manière que pour le lapin, afin d'intégrer ce débit sanguin important dans le modèle, les débits des autres compartiments ont été proportionnellement diminués.

Les paramètres pharmacocinétiques propres à chaque molécule, tels que la fup, la Clt et la fClh, sont plus aisément retrouvés dans la littérature pour l'homme que leur équivalent chez le lapin. Bezchlibnyk-Butler et al, dans une revue sur les effets cliniques et pharmacologiques du citalopram [52], synthétisent les propriétés pharmacocinétiques essentielles du citalopram. Quant aux benzodiazépines, les paramètres pharmacocinétiques nécessaires au modèle ont été trouvés en recoupant plusieurs articles [36, 53-55].

En vue de simuler chez l'homme la prise *per os* de ces médicaments, beaucoup plus répandue que leur usage par voie injectable, deux paramètres sont pris en compte: la constante d'absorption K*abs* et la dose administrée *per os*. Les cinétiques chez l'homme ont été simulées pour une administration orale de 50 mg de citalopram et de 10 mg de diazepam. La constante d'absorption du citalopram a été calculée à partir du Tmax selon la formule suivante $Tmax = 5 * t_{1/2abs} = 5 * \ln(2)/Kabs$ où T max correspond au temps après administration pour lequel la concentration sanguine maximale est atteinte et $t_{1/2abs}$ à la demi vie de l'absorption. Le K*abs* du diazepam est donné par Riss et al [36].

2.2.3.5 Cas particulier du Nordazepam

Le nordazepam n'est pas injecté en tant que tel aux animaux, il est étudié dans ce modèle uniquement en tant que métabolite du diazepam. Ainsi, la formation du nordazepam à partir du produit parent est prise en compte dans le modèle par une somme d'exponentielles ajustée chez le lapin aux données expérimentales, et chez l'homme aux données cinétiques publiées [53, 54].

2.2.4 Etude de sensibilité du modèle

Afin d'étudier la sensibilité des prédictions de la cinétique de la MO à la variation de certains paramètres du modèle (Kp_{MO}, volume de la moelle V_{MO}, et débit perfusant la MO Q_{MO}) une simulation de population est réalisée pour le citalopram. Dans ce mode de simulation, le logiciel Adapt II réalise 200 simulations de la cinétique du citalopram dans la MO en faisant varier les 3 paramètres cités, individuellement ou simultanément, dans une fourchette de ±20%, le résultat est traduit par une courbe moyenne avec un écart type.

3 Résultats et discussion

3.1 Constitution du modèle PBPK

3.1.1 Etude cinétique chez l'animal

Les doses administrées de 1.1 mg/kg de diazepam et 2.8 mg/kg de citalopram administrées à l'animal ont été choisies légèrement supra-thérapeutiques afin d'être plus facilement quantifiées dans l'ensemble des matrices. Des doses plus élevées auraient été intéressantes à étudier pour l'exploitation médicolégale des résultats mais le risque de surdosage létal devenait non négligeable. Les doses thérapeutiques chez le lapin ont été estimées par allométrie à partir des fourchettes thérapeutiques classiquement utilisées chez l'homme et décrites dans le Vidal [38] (20 à 60mg/jour pour le Citalopram, 5 à 15mg/jour pour le diazepam). La formule utilisée est $D_{lapin} = D_{hom} \times (BW_{lapin}/BW_{hom})^{0.75}$ où D_{lapin} et D_{hom} représentent la dose chez le lapin et l'homme, et BW_{lapin} et BW_{hom}, le poids de référence du lapin et de l'homme respectivement [49, 50]. La voie intraveineuse a été choisie car elle offre un plus grand contrôle que le voie orale de la dose administrée à l'animal et permet de limiter la variabilité interindividuelle liée à l'absorption du médicament.

Les lapins ont été euthanasiés 2 h, 4 h, 7 h, 17 h et 32 h après l'injection médicamenteuse. Le dernier temps a été choisi pour correspondre à environ trois demi-vies plasmatiques d'élimination chez le lapin, représentant une décroissance théorique de la concentration initiale d'un facteur 8. La demi-vie plasmatique chez le lapin est là encore estimée par allométrie selon la formule $t_{1/2\beta lapin} = t_{1/2\beta hom} \times (BW_{lapin}/BW_{hom})^{0.25}$ où $t_{1/2\beta lapin}$ et $t_{1/2\beta hom}$ représentent la demi-vie plasmatique d'élimination chez le lapin et l'homme respectivement [49, 50]. A partir du temps final, les autres temps de mesure sont déduits par division d'un facteur 2 en prenant en compte les contraintes horaires de l'animalerie. Au regard des courbes représentant la cinétique prédite et observée *in vivo* du citalopram et du diazepam, un temps d'euthanasie plus précoce que 2h pourrait sembler judicieux pour estimer avec une plus grande précision la phase rapidement décroissante de ces cinétiques. Cependant, par expérience, l'utilisation des données se situant dans la zone du pic sanguin suite à une administration intraveineuse rapide tend à fausser la modélisation.

Vingt-cinq lapins ont été inclus dans l'expérimentation animale afin de construire la cinétique sanguine et tissulaire du citalopram, du diazepam et du nordazepam. Du fait d'un problème expérimental avéré à l'injection, 2 lapins (n°17 et 22) ont été exclus de l'étude. L'euthanasie est induite par exsanguination cardiaque, à l'exception des lapins n° 6 et 7 pour lesquels la saignée cardiaque n'a pas été suffisante et qui ont reçu une injection létale de propofol.

L'ensemble des résultats des dosages des 3 molécules dans le sang, le poumon, le foie, le rein, le cerveau, le muscle, le tissu adipeux et la MO sont présentés dans les Tableau 4, Tableau 5 et Tableau 6. Classiquement, les cinétiques sanguines ou urinaires sont construites par des prélèvements répétés chez un même individu afin de limiter la variabilité inter-individuelle. Cette méthode n'est pas réalisable pour étudier les cinétiques tissulaires qui nécessitent l'euthanasie de l'animal à chaque temps expérimental. Afin de limiter l'impact de cette variabilité inter-individuelle, les médianes des 5 concentrations pour chaque matrice à chaque temps d'euthanasie ont été retenues pour construire la cinétique moyenne sanguine et tissulaire et sont implémentées dans la modélisation chez le lapin.

Tableau 4: Résultats des dosages du citalopram dans les différentes matrices issues de l'expérimentation ainsi que les médianes intégrées dans le modèle PBPK lapin.

Citalopram

		Concentration (ng/g ou /ml) en fonction du temps après injection							
		Cerveau	Foie	MO	Muscle	Poumon	Rein	Tissu adipeux	Sang
2h	lapin 11	2345	1022	1404	560	11053	2939	499	158
	lapin 12	1766	663	1505	710	8250	3993	567	230
	lapin 13	1891	894	990	464	10622	3217	319	142
	lapin 14	2174	652	1036	517	10618	2464	837	187
	lapin 15	2555	1660	1095	448	17333	3308	597	127
Médiane		**2174**	**894**	**1095**	**517**	**10622**	**3217**	**567**	**158**
4h	lapin 16	746	414	453	425	6442	1951	226	76
	lapin 18	820	266	552	305	3987	1315	316	104
	lapin 19	879	550	317	388	5554	2621	325	80
	lapin 20	970	557	312	327	6301	2070	305	71
Médiane		**850**	**482**	**385**	**358**	**5297**	**2010**	**311**	**78**
7h	lapin 21	223	133	113	155	2064	646	83	30
	lapin 23	281	142	108	98	2264	973	140	24
	lapin 24	181	116	288	46	967	289	60	25
	lapin 25	360	164	57	108	2372	645	147	16
Médiane		**252**	**137**	**111**	**103**	**2164**	**646**	**111**	**25**
17h	lapin 6	8.6	6.7	9.4	<LOQ	64	45	<LOQ	<LOQ
	lapin 7	7.4	6.1	<LOQ	<LOQ	53	15	<LOQ	<LOQ
	lapin 8	25	37	15	16	193	48	9.2	<LOQ
	lapin 9	13	22	11	<LOQ	92	54	<LOQ	<LOQ
	lapin 10	19	25	15	8.1	153	59	5.8	<LOQ
Médiane		**13**	**22**	**11**	**2.5**	**92**	**48**	**2.5**	**2.5**
32h	lapin 1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	11	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	lapin 2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5.6	<LOQ	<LOQ	8.5
	lapin 3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	lapin 4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	lapin 5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Médiane		**2.5**	**2.5**	**2.5**	**2.5**	**2.5**	**2.5**	**2.5**	**2.5**

<LOQ La molécule est détectée, répond aux critères d'identification mais est déterminée inférieure à la limite de quantification (5 ng/mL ou /g): pour les besoins du modèle pharmacocinétique, la valeur correspondante implémentée dans le modèle est fixé à la moitié de la limite de quantification (2.5 ng/mL ou /g).

Tableau 5 : Résultats des dosages du diazepam dans les différentes matrices issues de l'expérimentation ainsi que les médianes intégrées dans le modèle PBPK lapin.

Diazepam

		Concentration (ng/g ou /ml) en fonction du temps après injection							
		Cerveau	Foie	MO	Muscle	Poumon	Rein	Tissu adipeux	Sang
2h	lapin 11	248	404	1327	58	139	162	442	102
	lapin 12	203	209	965	58	137	142	507	91
	lapin 13	145	182	942	42	95	104	393	83
	lapin 14	246	451	1798	54	134	106	1026	92
	lapin 15	219	439	1719	35	202	142	536	98
Médiane		**219**	**404**	**1327**	**54**	**137**	**141**	**507**	**92**
4h	lapin 16	152	344	921	35	80	114	759	95
	lapin 18	72	128	329	19	70	43	440	34
	lapin 19	129	295	1139	33	88	105	406	71
	lapin 20	88	195	296	19	84	48	431	43
Médiane		**109**	**245**	**625**	**26**	**82**	**76**	**435**	**57**
7h	lapin 21	26	46	189	5.0	34	18	197	15
	lapin 23	47	151	266	5.0	45	38	501	24
	lapin 24	92	229	634	15	78	68	738	58
	lapin 25	116	232	439	22	58	85	833	52
Médiane		**70**	**190**	**352**	**10**	**51**	**53**	**620**	**38**
17h	lapin 6	<LOQ	<LOQ	30	ND	<LOQ	<LOQ	120	<LOQ
	lapin 7	<LOQ	<LOQ	12	ND	<LOQ	<LOQ	25	<LOQ
	lapin 8	<LOQ	13	42	ND	<LOQ	<LOQ	142	<LOQ
	lapin 9	<LOQ	12	17	ND	<LOQ	<LOQ	69	<LOQ
	lapin 10	11	16	45	ND	<LOQ	<LOQ	214	<LOQ
Médiane		**5**	**12**	**30**	**0**	**5**	**5**	**120**	**5**
32h	lapin 1	ND	<LOQ	<LOQ	ND	ND	ND	5.0	ND
	lapin 2	ND	<LOQ	<LOQ	ND	ND	ND	47	ND
	lapin 3	ND	<LOQ	<LOQ	ND	ND	ND	11	ND
	lapin 4	ND	<LOQ	14	ND	ND	ND	42	ND
	lapin 5	ND	<LOQ	<LOQ	ND	ND	ND	19	ND
Médiane		**0**	**5**	**5**	**0**	**0**	**0**	**19**	**0**

<LOQ La molécule est détectée, répond aux critères d'identification mais est déterminée inférieure à la limite de quantification (10 ng/mL ou /g): pour les besoins du modèle pharmacocinétique, la valeur correspondante implémentée dans le modèle est fixé à la moitié de la limite de quantification (5 ng/mL ou /g).

ND (non détecté) Aucun pic n'est détecté ou la présence de la molécule est rejetée d'après les critères d'identification: pour les besoins du modèle pharmacocinétique, la valeur correspondante implémentée dans le modèle pharmacocinétique est fixée à 0.

Tableau 6 : Résultats des dosages du nordazepam dans les différentes matrices issues de l'expérimentation ainsi que les médianes intégrées dans le modèle PBPK lapin.

Nordazepam

		Concentration (ng/g ou /ml) en fonction du temps après injection							
		Cerveau	Foie	MO	Muscle	Poumon	Rein	Tissu adipeux	Sang
2h	lapin 11	209	385	303	34	143	115	116	63
	lapin 12	147	298	194	29	114	89	129	56
	lapin 13	101	155	119	13	82	65	64	36
	lapin 14	127	173	221	19	159	72	170	18
	lapin 15	99	159	180	12	87	53	82	32
Médiane		**127**	**173**	**194**	**19**	**114**	**72**	**116**	**36**
4h	lapin 16	123	184	186	23	189	104	163	55
	lapin 18	127	245	150	24	65	95	167	52
	lapin 19	99	151	180	19	63	90	100	41
	lapin 20	130	248	109	21	122	87	152	52
Médiane		**125**	**215**	**165**	**22**	**93**	**92**	**158**	**52**
7h	lapin 21	30	67	43	7.9	30	21	43	13
	lapin 23	108	239	145	17	88	79	195	42
	lapin 24	106	209	154	14	117	80	192	42
	lapin 25	125	179	129	16	92	96	191	43
Médiane		**107**	**194**	**137**	**15**	**90**	**80**	**191**	**42**
17h	lapin 6	8.7	15	16	1.5	5.7	5.0	28	4.3
	lapin 7	8.9	14	8.6	1.5	7.8	5.8	11	2.0
	lapin 8	27	69	41	5.5	18	18	68	9.7
	lapin 9	18	43	13	2.4	10	8.4	29	7.1
	lapin 10	26	51	31	5.8	21	15	58	13
Médiane		**18**	**43**	**16**	**2.4**	**10**	**8.4**	**29**	**7.1**
32h	lapin 1	1.6	2.4	1.5	<LOQ	1.0	<LOQ	2.1	<LOQ
	lapin 2	1.4	2.7	1.9	<LOQ	<LOQ	1.1	4.1	<LOQ
	lapin 3	<LOQ	1.1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	lapin 4	2.4	4.7	4.9	<LOQ	1.7	1.5	6.2	1.3
	lapin 5	<LOQ	1.4	1.0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2.0	<LOQ
Médiane		**1.4**	**2.4**	**1.5**	**0.5**	**0.5**	**0.5**	**2.1**	**0.7**

<LOQ La molécule est détectée, répond aux critères d'identification mais déterminée inférieure à la limite de quantification (1 ng/mL ou /g): pour les besoins du modèle pharmacocinétique, la valeur correspondante implémentée dans le modèle est fixé à la moitié de la limite de quantification (0.5 ng/mL ou /g).

3.1.2 Modèle chez le lapin: Estimation des Kp

Dans un premier temps, le modèle est construit pour être appliqué chez le lapin, en implémentant les données issues des expérimentations animales dans le but d'estimer les Kp de chaque compartiment. Cette première étape de modélisation consiste pour le logiciel Adapt II à ajuster la valeur numérique de l'ensemble des variables (Kp des 12 compartiments, fup, fCl*h*) afin que les courbes prédites par le modèle correspondent au mieux aux cinétiques observées lors des expérimentations animales. Aussi pour valider les résultats issus de cette modélisation, il est nécessaire, dans un premier temps, de s'assurer que la prédiction est en adéquation avec les données observées in vivo.

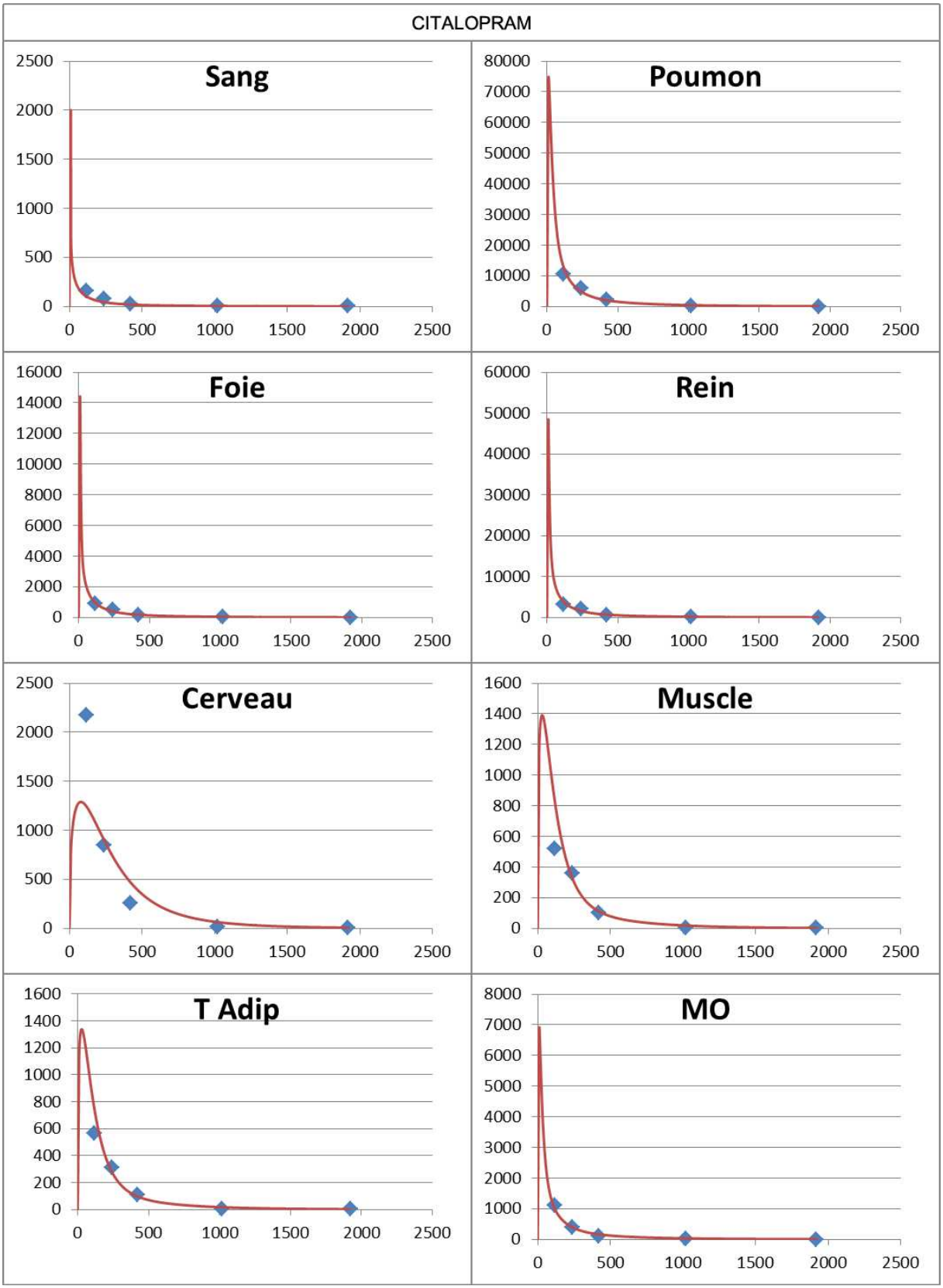
3.1.2.1 Critères d'adéquation du modèle

L'adéquation entre la cinétique prédite et celle observée in vivo est étudiée au regard de 3 critères:

- l'observation visuelle : les courbes représentant la concentration sanguine ou tissulaire en fonction du temps pour la cinétique prédite ainsi que les points expérimentaux dans les 8 matrices étudiées (sang, poumon, foie, rein, cerveau, muscle, tissu adipeux et MO) pour le citalopram, le diazepam et le nordazepam sont présentées respectivement dans les Figure 2, Figure 3 et Figure 4.
- les coefficients de détermination r^2 qui calculent, par la méthode de la régression linéaire, l'écart entre les concentrations prédites et observées (Tableau 7).
- la distribution des résidus (les écarts entre concentrations prédites et observées), qui doit être symétrique autour de zéro.

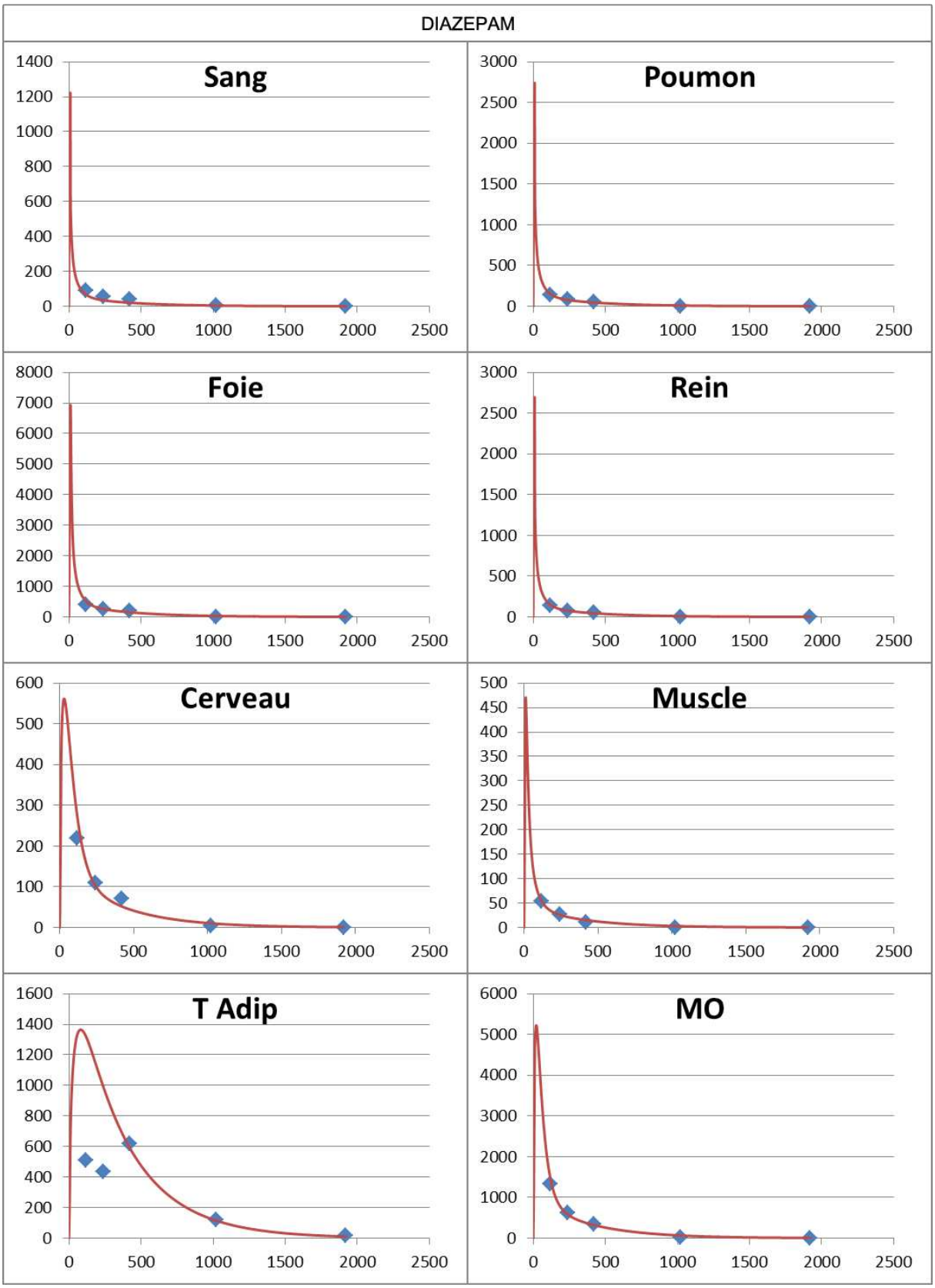
Tableau 7 : Coefficients de détermination (r^2) entre la cinétique prédite et les points expérimentaux observés pour chaque matrice pour le citalopram, le diazepam et le nordazepam.

	Citalopram	Diazepam	Nordazepam
Sang	0.993	0.979	0.915
Poumon	0.969	0.987	0.960
Foie	0.983	0.959	0.908
Rein	0.956	0.992	0.938
Cerveau	0.868	0.971	0.940
Muscle	0.915	0.991	0.987
Tissu adipeux	0.969	0.611	0.897
MO	0.996	0.992	0.975



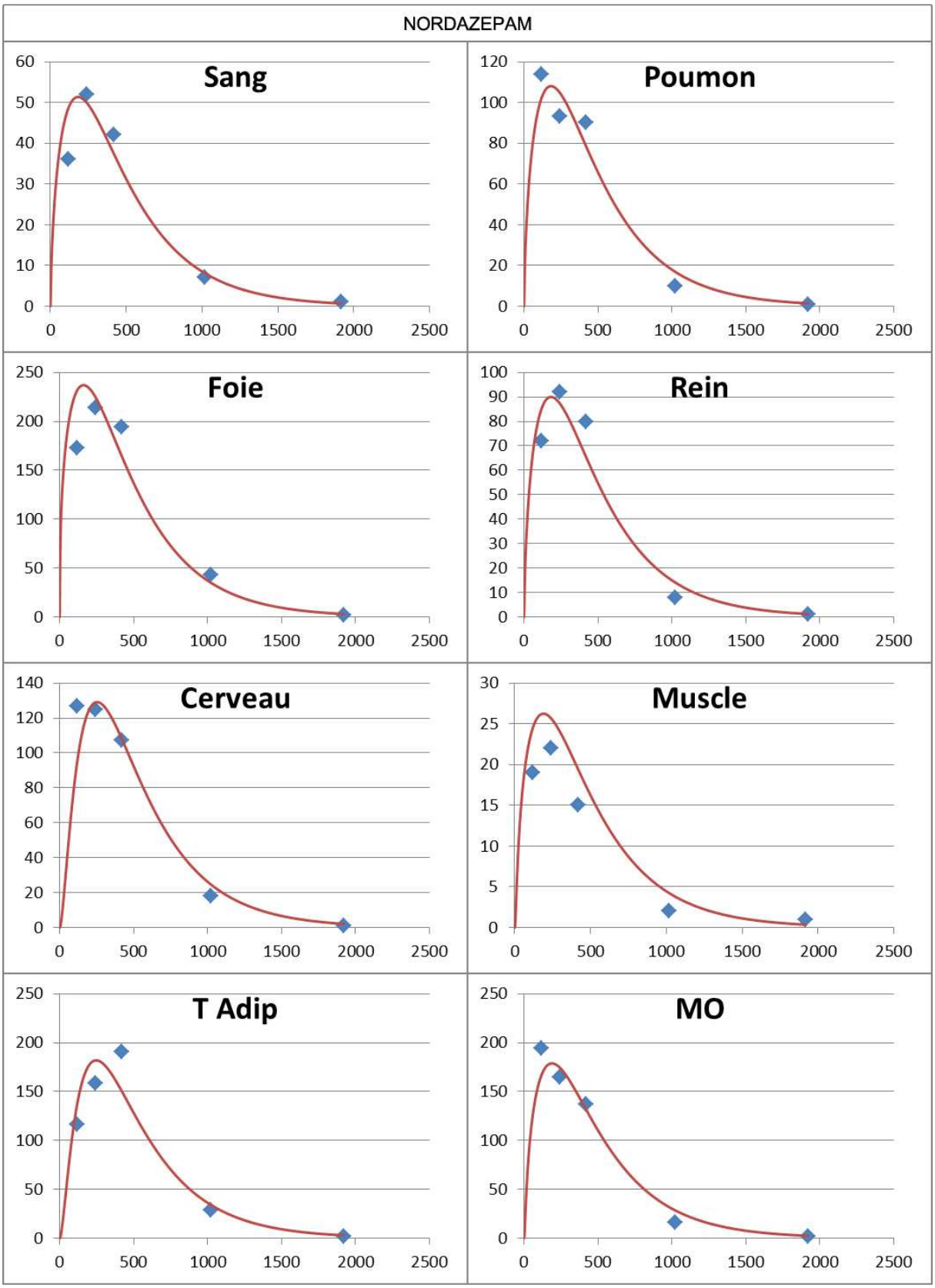
Concentration en ng/ml ou /g en fonction du temps en min
Trait rouge : cinétique prédite par le modèle.
Losange bleu : concentrations observées in vivo

Figure 2 : Cinétique du citalopram prédite par le modèle et concentrations observées in vivo chez le lapin.



Concentration en ng/ml ou /g en fonction du temps en min
Trait rouge : cinétique prédite par le modèle.
Losange bleu : concentrations observées in vivo

Figure 3 : Cinétique du diazepam prédite par le modèle et concentrations observées in vivo chez le lapin.



Concentration en ng/ml ou /g en fonction du temps en min
Trait rouge : cinétique prédite par le modèle.
Losange bleu : concentrations observées in vivo

Figure 4 : Cinétique du nordazepam an tant que métabolite du diazepam prédite par le modèle et concentrations observées in vivo chez le lapin.

Au vu de ces résultats, l'adéquation du modèle s'est révélée excellente pour l'ensemble des molécules et des tissus, excepté pour le citalopram dans le cerveau (r^2 0.868) et le diazepam dans le tissu adipeux (r^2 0.611). Pour cette dernière matrice, les données expérimentales présentent un profil difficilement ajustable à une courbe de cinétique classique. Toutefois la prédiction dans cette matrice s'ajuste parfaitement aux données à 7, 17 et 32 h après injection. La prédiction du nordazepam en tant que métabolite du diazepam était un point délicat du modèle. Les coefficients de corrélation sont plus faibles que les autres molécules tout en restant satisfaisant (r^2 de 0.897 à 0.975). L'observation des courbes correspondant à cette molécule (Figure 4) montre une adéquation convenable du modèle aux données observées. La MO est particulièrement bien prédite avec une parfaite concordance visuelle et les coefficients de corrélations les plus élevés (0.996, 0.992, 0.975 pour le citalopram, le diazepam et le nordazepam, respectivement). Cette bonne concordance générale entre cinétique prédite et observée *in vivo* permet d'estimer de façon fiable les Kp de chaque tissu.

3.1.2.2 Estimation des Kp

Les Kp estimés grâce au modèle PBPK chez le lapin sont résumés dans le Tableau 8 et seront implémentés tel quels dans la modélisation chez l'homme.

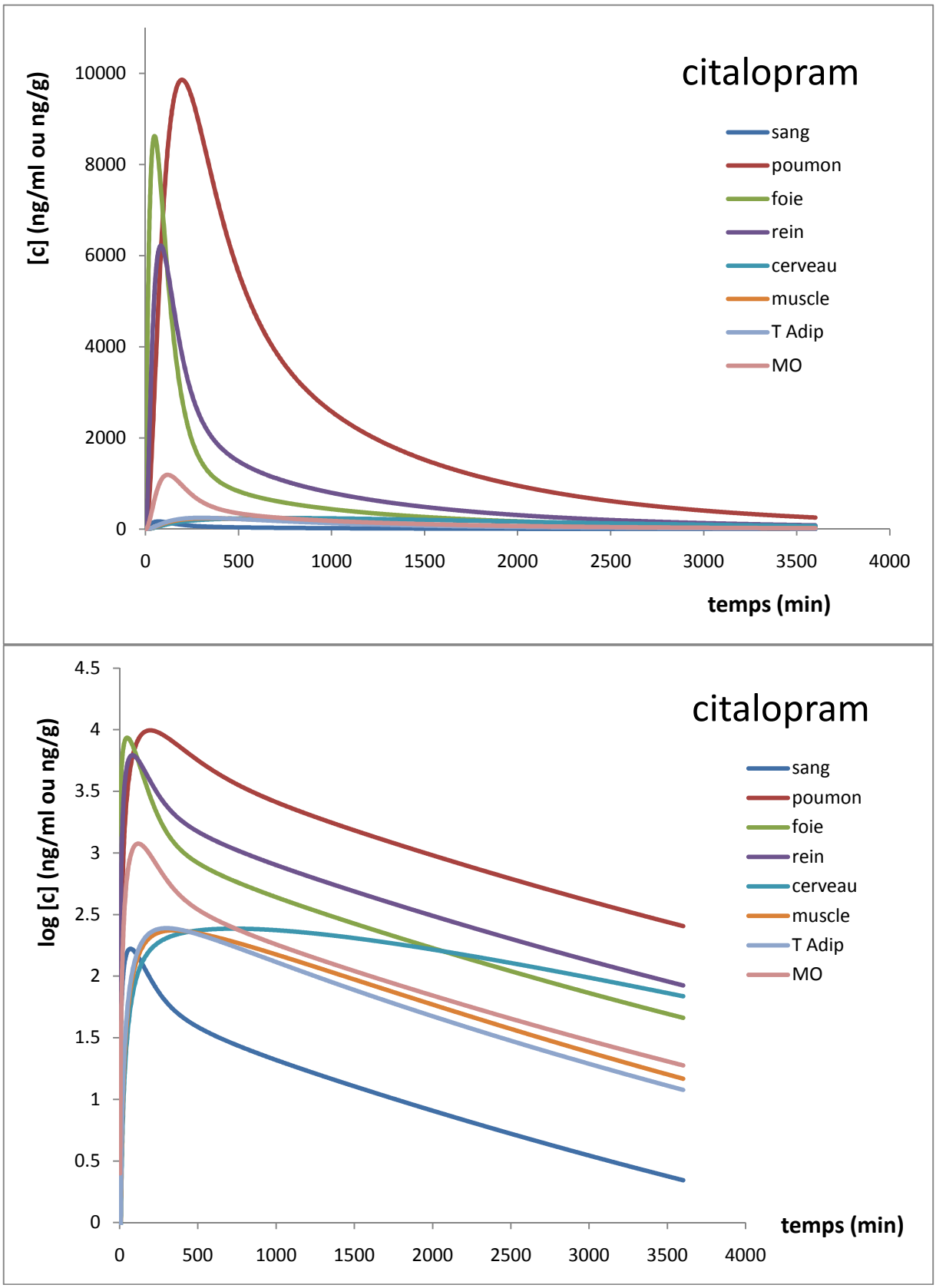
Tableau 8 : Coefficients de partage tissu/plasma estimés grâce au modèle PBPK chez le lapin pour le citalopram, le diazepam et le nordazepam.

	Citalopram	**Diazepam**	**Nordazepam**
Sang	0.633	0.889	2.17
Poumon	68.3	2.14	4.84
Système porte	0.343	2.43	0.446
Foie	19.0	7.67	9.34
Rein	26.6	5.94	5.48
Cerveau	5.80	2.10	6.03
Cœur	3.16	12.5	24.6
Peau	14.2	13.6	3.98
Muscle	2.95	0.694	1.18
Tissu adipeux	2.69	13.1	8.44
MO	5.59	14.0	8.02

3.1.3 Modèle chez l'homme: simulation des cinétiques tissulaires

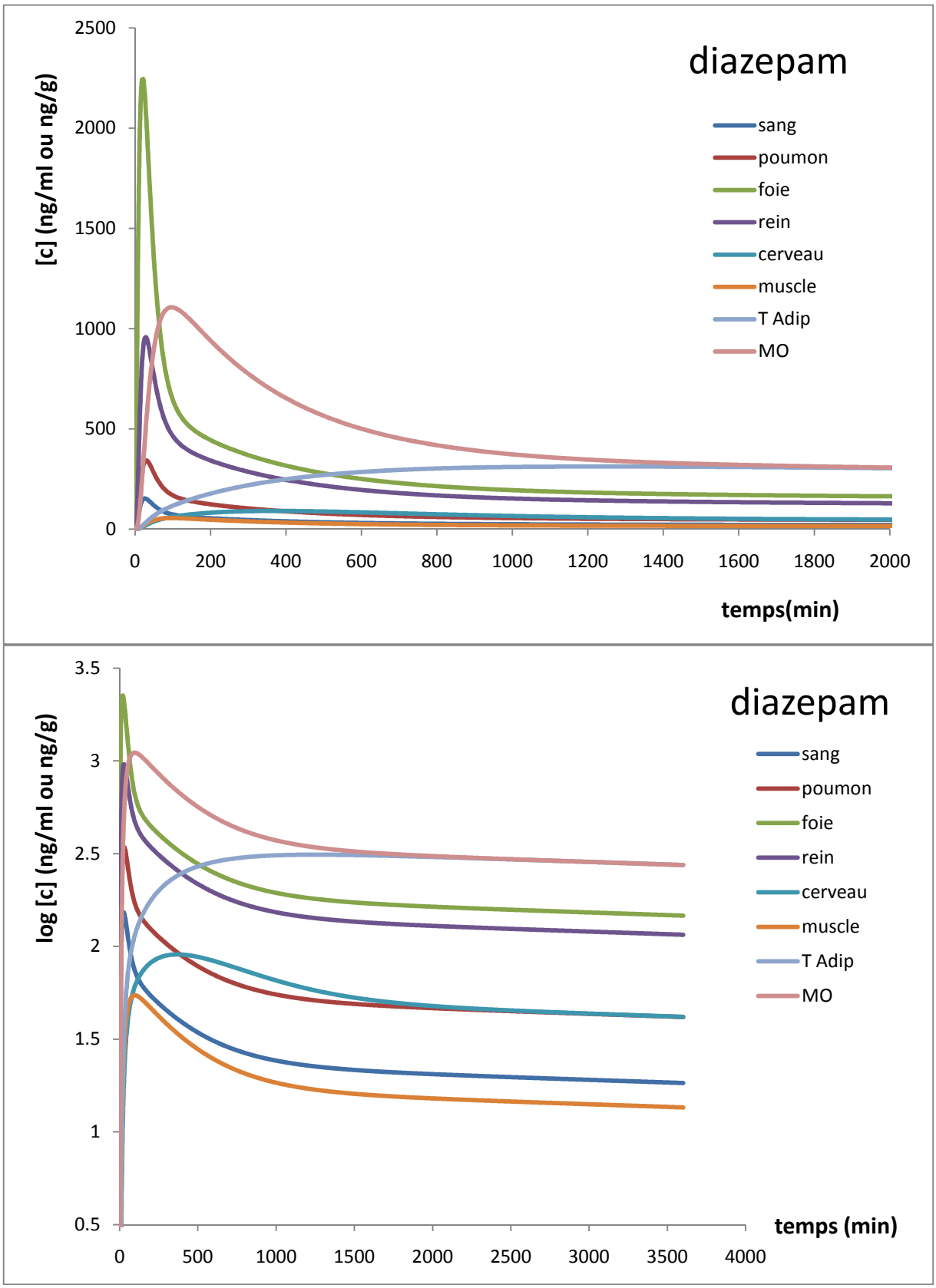
En transposant le modèle à l'homme selon les paramètres décrits dans les Tableau 2 et Tableau 3 et en implémentant les Kp estimés grâce aux données *in vivo* (Tableau 8), les cinétiques sanguines et tissulaires (poumon, foie, rein, cerveau, muscle, tissu adipeux et MO) ont été simulées. Alors que pour des besoins expérimentaux, les médicaments ont été administrés par voie intraveineuse chez le lapin, cette voie d'administration pour ces molécules est rare en thérapeutique humaine et réservée à l'usage hospitalier. Aussi, les simulations chez l'homme ont-elles été réalisées pour une administration unique orale en faisant intervenir dans le modèle des paramètres pharmacocinétiques propres à cette voie d'administration telle que la constante d'absorption. Le choix des doses pour la simulation chez l'homme s'est orienté vers des doses thérapeutiques pour lesquelles des données cinétiques sanguines ou plasmatiques ont été publiées [54, 56], soit une administration thérapeutique unique *per os* de 50 mg de citalopram et de 10 mg de diazepam. Comme le modèle est linéaire par construction, le profil cinétique est proportionnel à la dose. A chaque fois qu'on double la dose, une demi-vie plasmatique d'élimination supplémentaire est nécessaire pour atteindre une concentration donnée, notamment la limite de quantification. Toutefois l'approximation par modèle linéaire a ses limites car certains phénomènes, tels que le métabolisme et la liaison aux protéines plasmatiques, sont saturables lors d'une forte exposition. Cette non linéarité physiologique se traduirait en règle générale par une exposition plus forte et plus prolongée que celle prédite par le modèle linéaire.

Les cinétiques sanguines et tissulaires du citalopram sont représentées Figure 5 et les cinétiques du diazepam et de son principal métabolite en Figure 6 et Figure 7 respectivement. Ces cinétiques sont également représentées en semilog afin de limiter l'influence visuelle des fortes concentrations prédites dans certaines matrices et de mettre en évidence la phase d'élimination. En effet, représentée en semilog, la phase terminale d'élimination est une droite dont la pente est proportionnelle à la vitesse d'élimination et, par extension, des droites d'élimination parallèles reflèteront une vitesse d'élimination identique.



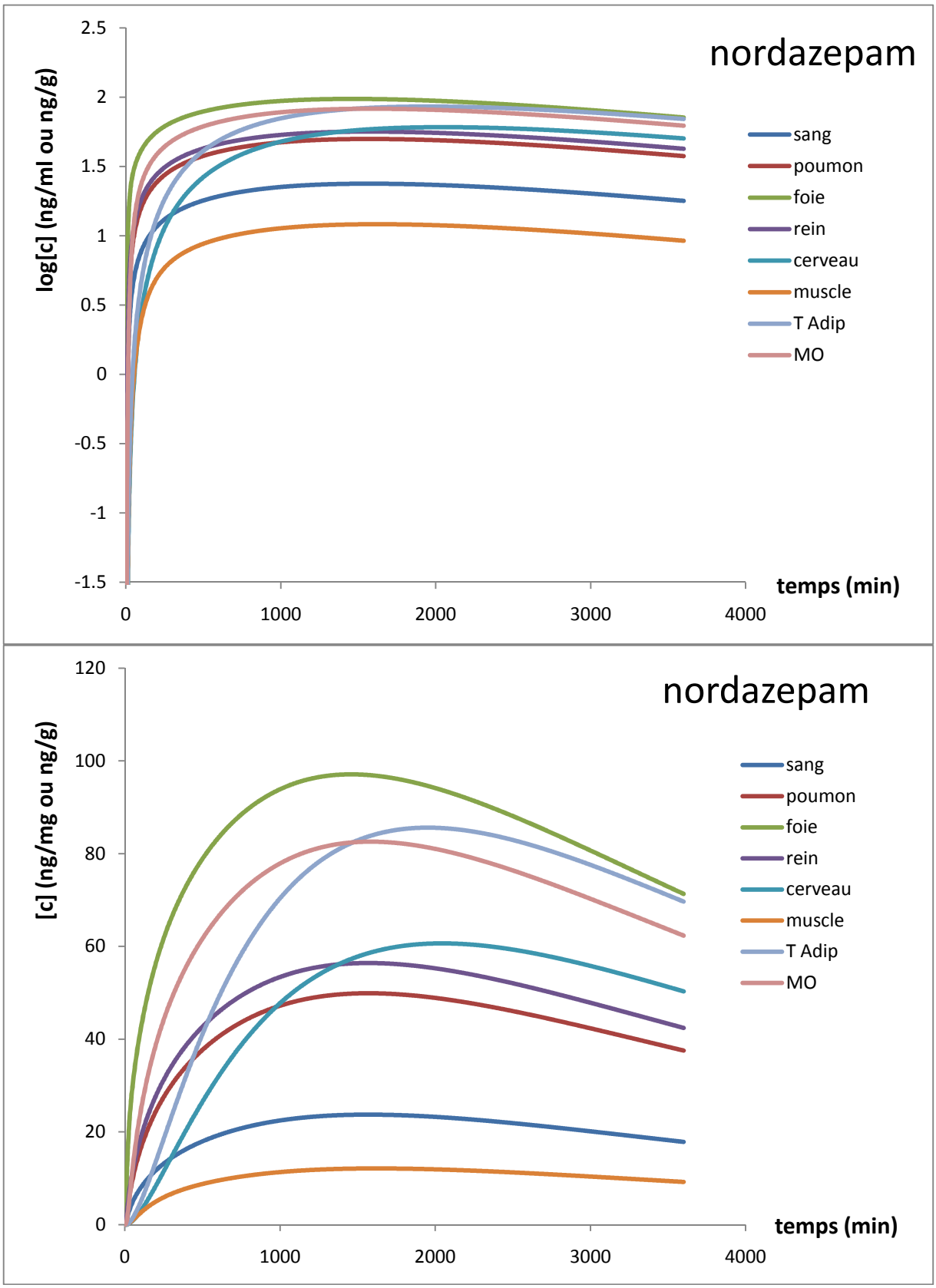
En haut : concentration (ng/mL ou /g) en fonction du temps après injection (min)
En bas : log(concentration en ng/mL ou /g) en fonction du temps (min)

Figure 5 : Cinétique du citalopram dans les 8 matrices après administration orale de 50mg de citalopram



En haut : concentration (ng/mL ou /g) en fonction du temps après injection (min)
En bas : log(concentration en ng/mL ou /g) en fonction du temps (min)

Figure 6 : Cinétique du diazepam dans les 8 matrices après administration orale de 10mg de diazepam



En haut : concentration (ng/mL ou /g) en fonction du temps après injection (min)
En bas : log(concentration en ng/mL ou /g) en fonction du temps (min)

Figure 7 : Cinétique du nordazepam dans les 8 matrices après administration orale de 10mg de diazepam

3.2 Exploitations médicolégales des résultats

3.2.1 Cas du citalopram

La cinétique sanguine du citalopram prédite par le modèle (Figure 8) est caractérisée par un pic de concentration à 166 ng/mL (Cmax) atteint à 68 min (Tmax) et une demi-vie d'élimination de 13,5 h. Le T max moyen rapporté dans la littérature est de 2 à 4 h [52, 56, 57] mais il est soumis à une importante variabilité inter-individuelle comme le montre l'étude de Joffe et al où il varie de 1 h à 6 h chez 12 volontaires sains ayant reçus 40 mg *per os* de citalopram [57]. Le citalopram est une molécule à demi-vie longue, généralement décrite proche des 30 h [38, 56, 57]. Au vu de ces paramètres, il apparaît que la cinétique sanguine du citalopram prédite par le modèle est plus rapide que ce qui est décrit dans la littérature. Il est cependant important de retenir que si la faible demi-vie prédite se traduit par une décroissance plus rapide des concentrations et une période de détection plus courte du citalopram, elle n'a aucune incidence sur le profil de répartition entre les différents tissus pour lesquels la vitesse d'élimination est équivalente au sang.

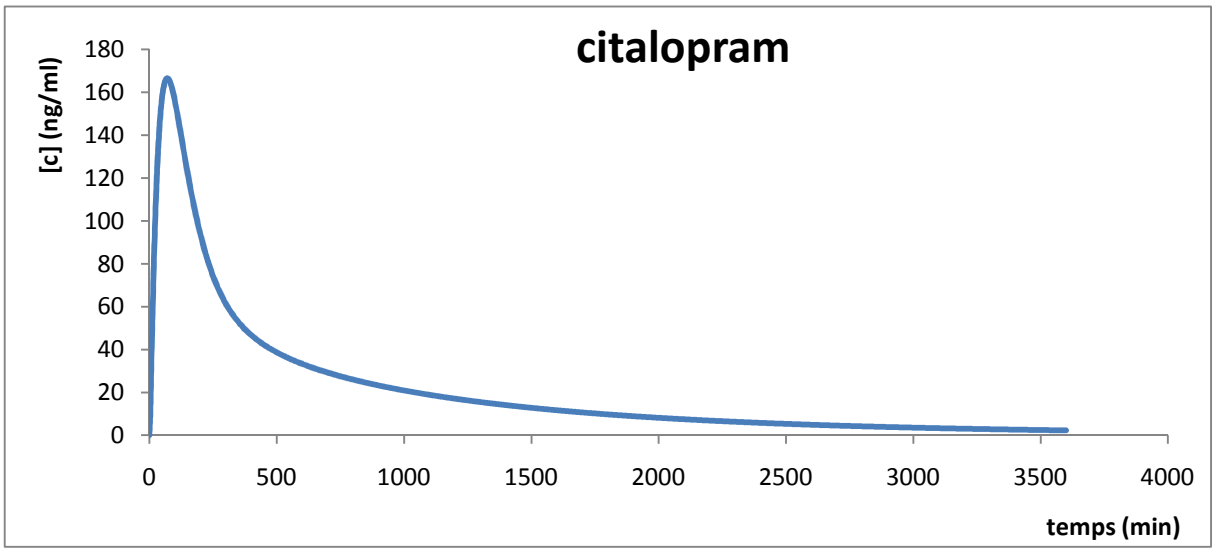


Figure 8 : Simulation de la cinétique sanguine du citalopram pour une administration orale unique de 50 mg de citalopram.

La distribution tissulaire du citalopram estimée par le modèle est marquée par une accumulation très importante dans le tissu pulmonaire. Ce phénomène d'extraction pulmonaire a été décrit pour plusieurs molécules médicamenteuses. Il peut concerner jusqu'à

90% d’une dose administrée dans un but d’anesthésie pour le fentanyl [58]. Une étude menée chez le rat concernant le citalopram [59] rapporte des concentrations pulmonaires plus de 30 fois supérieures aux concentrations sanguines 3h après administration sous cutanée de la molécule. Des concentrations pulmonaires très largement supérieures au sang sont également rapportées au cours d'intoxications humaines au citalopram [60, 61].

D’après le modèle, le citalopram se distribue rapidement et intensément dans les deux organes d'élimination : le rein et le foie. Les « case-report » publiés décrivent de la même façon des concentrations de citalopram hépatiques et rénales toujours supérieures à celle retrouvées dans le sang [60-64]. Les ratios de concentrations rein/sang et foie/sang rapportés sont cependant plus faibles que dans cette simulation.

Le modèle montre une accumulation rapide du citalopram dans la MO, celle-ci est cependant plus faible que dans les organes précédents. Aucun dosage de cette molécule dans la MO n'a été rapporté dans la littérature [65].

Le citalopram se distribue de manière significative dans le muscle, le tissu adipeux et le cerveau avec une phase de distribution lente comme en témoigne le décalage dans le temps du pic de concentration dans ces matrices par rapport au pic sanguin. Alors qu'à notre connaissance cette molécule n'a pas été analysée dans le muscle et le tissu adipeux, certaines études se sont intéressées à la quantification et à la distribution dans le cerveau, site d'action du médicament [66-70]. Par ailleurs des dosages *post mortem* cérébraux sont décrits dans des « case-report » [60, 61, 64]. L'ensemble de ces données montre une accumulation du citalopram dans le cerveau qui peut être très importante. Ainsi, dans une étude menée chez le rat, 6 heures après administration IV de citalopram (10 mg/kg) les concentrations mesurées étaient de 5290 ng/g dans le cerveau et de 392 ng/mL dans le sang.

D’une manière générale, il est intéressant de retenir que, d’après cette distribution tissulaire du citalopram simulée par le modèle PBPK, les concentrations tissulaires sont toujours supérieures aux concentrations sanguines sauf pour le muscle, le tissu adipeux et le cerveau dans les heures qui suivent l'administration. Cette constatation donne des clefs pour l'interprétation en toxicologie médicolégale en l'absence de sang analysable:

- Des concentrations *post mortem* tissulaires de citalopram élevées, par rapport au référentiel sanguin, doivent être interprétées avec précaution, et ce principalement pour le poumon le foie, le rein et la moelle osseuse, pour ne pas envisager à tort un surdosage.
- De faibles concentrations tissulaires, voisines des concentrations sanguines thérapeutiques, indiquent qu’un surdosage est très peu probable.

- En l'absence de données sur le délai entre la prise médicamenteuse et la survenue du décès, l'interprétation des concentrations dans le cerveau, le muscle et le tissu adipeux est plus délicate.

Au regard de la cinétique représentée en semilog, les droites correspondant à la phase terminale d'élimination sur la durée de la simulation sont toutes parallèles exceptée celle du cerveau. Ainsi, à l'exclusion du cerveau, la vitesse d'élimination est comparable pour l'ensemble des matrices (tissus et sang). Le cerveau présente une cinétique spécifique caractérisée par une distribution progressive suivie d'une phase d'élimination plus lente que les autres tissus. Cette faible vitesse d'élimination donnée par le modèle peut être la traduction de phénomènes réels telle qu'une liaison forte du citalopram sur certains sites du cerveau. Toutefois, il est important de noter que le modèle PBPK construit ne prend en compte ni le métabolisme cérébral du citalopram par des monoamines oxydases ni l'efflux actif de citalopram via sa liaison à la glycoprotéine P rapportés dans la littérature [52]. Ainsi, le modèle pourrait être à l'origine d'une sous-estimation de la vitesse d'élimination du citalopram dans le cerveau et d'une sur-estimation des concentrations cérébrales sans qu'il soit possible d'évaluer dans quelle mesure.

Cette vitesse d'élimination comparable entre les tissus et le sang, associée aux concentrations tissulaires supérieures aux concentrations sanguines tend à montrer que le citalopram pourra être quantifié dans les tissus pendant une période plus longue après la prise que dans le sang. Cette constatation, qui est à nuancer en tenant compte des limites de quantification/détection de la méthode analytique utilisée, apporte des éléments d'interprétation intéressants pour une application en toxicologie *post mortem*:

- L'analyse de ces tissus, et plus particulièrement le poumon, le rein et le foie, permet d'augmenter la fenêtre de détection du citalopram.

- Si du citalopram est détecté dans un tissu cela ne signifie pas forcément qu'il était présent à une concentration sanguine quantifiable, et donc pharmacologiquement active, au moment du décès et qu'il a ainsi interféré avec celui ci (altération chimique de la vigilance, du comportement, des mécanismes réflexes…).

L'utilisation de ces résultats pour l'interprétation en toxicologie *post mortem* sera donc variable en fonction du contexte médicolégal et de la question posée ; elle devra toujours être faite avec précaution en prenant en compte les phénomènes *post mortem* (redistribution, stabilité). Il est important de rappeler que ces données tissulaires ont été simulées pour une

administration orale unique thérapeutique et que la distribution tissulaire peut être différente au cours d'une administration chronique en raison de phénomènes d'accumulation jusqu'à l'équilibre.

3.2.2 Cas du diazepam et son métabolite principal le nordazepam

La prédiction des cinétiques sanguines du diazepam et de son métabolite principal, le nordazepam pour une administration de 10 mg de diazepam sont représentées Figure 9. La cinétique prédite du diazepam se caractérise par un pic sanguin rapide (Cmax = 152 ng/mL, Tmax = 28 min) suivie d'une phase d'élimination très lente (t1/2vieβ = 162 h). L'absorption du diazepam est connue pour être rapide avec un Tmax compris entre 30 et 90 min [36, 55]. Dans l'étude de Kaplan et al [54], une administration orale de 10 mg, identique à celle étudiée, induit chez 4 sujets un pic plasmatique dans les 90 min de 137 à 189 ng/mL compatible avec les données prédites. Toutefois, la demi-vie sanguine d'élimination prédite par le modèle, 162 h, est plus élevée que la demi-vie habituellement rapportée de 20 à 40 h [36, 53, 54]. Cependant, la demi-vie observée expérimentalement chez un sujet peut être sous-estimée parce que la dernière phase d'élimination n'est pas toujours visible si elle se produit lorsque les concentrations sont inférieures à la limite de quantification. Cette demi-vie terminale très longue peut également passer inaperçue dans les études à doses réitérées si elle ne modifie que très peu le plateau apparent de concentration. Quoi qu'il en soit, la persistance de la molécule dans le sang et les tissus prédite par le modèle devra être interprétée avec précaution en ce qui concerne la durée de détection du diazepam. Ce biais n'aura cependant pas d'influence sur le profil de répartition entre les tissus pour lesquels la vitesse d'élimination est équivalente au sang.

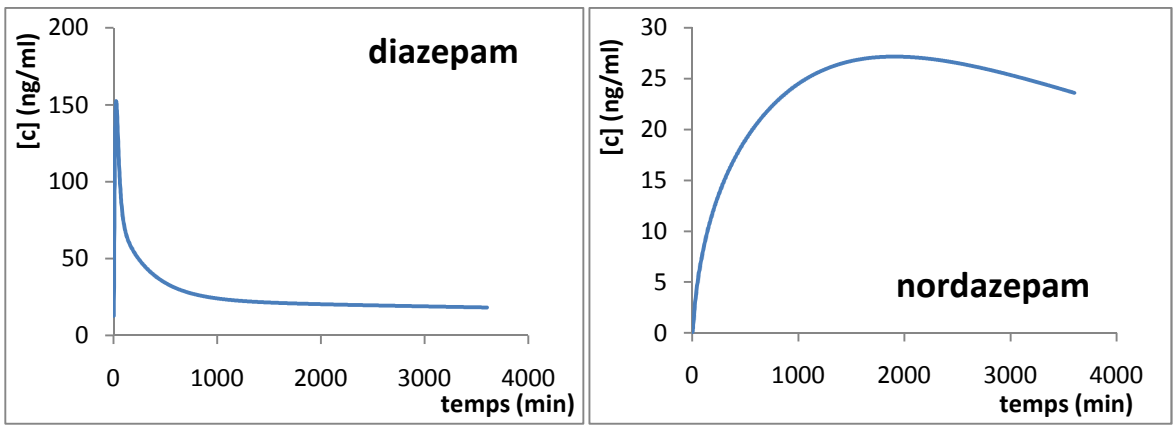


Figure 9: Simulation de la cinétique sanguine du diazepam et du nordazepam après administration orale de 10 mg de diazepam.

Le profil sanguin prédit du nordazepam est caractéristique d'un métabolite: augmentation des concentrations progressive et retardée par rapport au pic sanguin de la molécule mère, suivie d'une lente décroissance correspondant à l'élimination du métabolite combinée à sa formation continue à partir de la molécule mère. Bien que le profil de cette cinétique soit comparable à ceux publiés par Kaplan [54] (Figure 10) et Jack [53], l'augmentation des concentrations prédites du nordazepam dans sa première phase est plus lente entrainant un Tmax retardé proche des 25 h dans notre étude contre 10-12 h [53, 54] pour une Cmax identique proche de 24 ng/g.

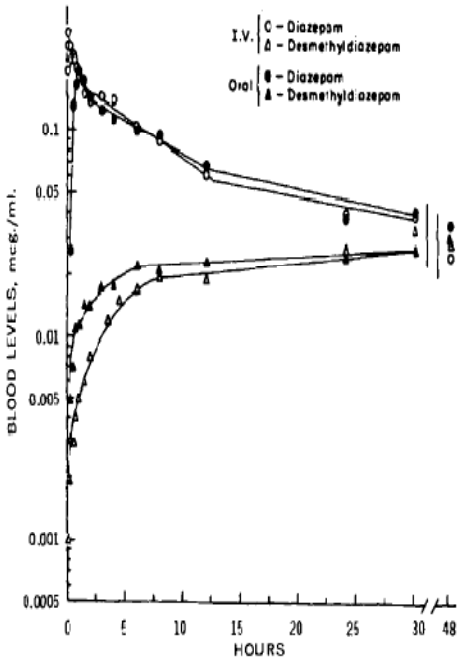


Figure 10 : Cinétique observée du diazepam et du nordazepam après administration orale ou intraveineuse de 10 mg de diazepam [54]

Bien que les profils cinétiques sanguins et tissulaires prédits du diazepam et du nordazepam diffèrent de façon évidente, correspondant à une administration orale et à la formation d'un métabolite, respectivement, la répartition entre les tissus de ces deux molécules est très voisine. Ceci peut s'expliquer en grande partie par leur similitude physicochimique.

Ainsi, ces deux molécules se distribuent rapidement et intensément dans le foie, la MO, le rein et enfin, dans une moindre mesure, dans le poumon. Les concentrations prédites au sein de ces tissus sont toujours supérieures aux concentrations sanguines. Peu d'études sont disponibles sur la répartition tissulaire du diazepam et ses métabolites. Un « case-report » décrit des concentrations hépatiques de diazepam et nordazepam supérieures aux concentrations sanguines après absorption orale unique de diazepam [71]. Une étude expérimentale menée chez le rat montre des concentrations hépatiques, rénales et pulmonaires plus de 10 fois supérieures au sang [72]. Pour d'autres benzodiazepines (alprazolam, triazolam

et bromazepam), les concentrations rapportées dans le poumon, le rein et le foie, étaient supérieures aux concentrations sanguines et cela au cours d'investigations médicolégales [73-75]. Le diazepam se distribue majoritairement dans la MO alors que les concentrations de nordazepam dans la MO sont légèrement plus faibles que celle prédites pour le foie, site de formation de ce métabolite. L'accumulation des benzodiazépines dans la MO a déjà été décrite lors d'expérimentations animales ainsi que chez l'homme. Takatori et al [76] rapportent chez le rat des concentrations médullaires toujours supérieures au sang et supposent que le diazepam sera plus longtemps quantifiable dans la MO que dans le sang. Mc Intyre et al [8], sur une série de cas autopsiques humains, constatent que les concentrations des benzodiazépines dans la MO sont environ 2.5 fois supérieures à celles du sang et sont 8 fois supérieures dans le cas du diazepam. La vitesse d'élimination depuis le foie, le rein, le poumon et la MO est identique à celle du sang ce qui tend à montrer que ces deux médicaments sont quantifiables plus longtemps dans les tissus que dans le sang.

La distribution prédite du diazepam et du nordazepam dans le muscle est lente et faible conduisant à des concentrations légèrement inférieures à celles du sang. Cette répartition est peu décrite dans la littérature. Dans un « case report », sont décrites des concentrations musculaires de diazepam et de nordazepam plus de 2 fois supérieures à celles du sang (diazepam 24.9 ng/g versus 8ng/mL, nordazepam 18.9 g/g versus 9.3 ng/mL) [71]. La technique analytique utilisée n'était pas validée sur le muscle et n'utilisait pas d'étalon deutéré pour compenser l'éventuel effet matrice. Une étude expérimentale menée chez le rat montre des concentrations égales dans le muscle et le sang 1h après administration [72]. Dans un autre « case report » concernant le bromazepam, les auteurs indiquent que la concentration musculaire équivaut à la moitié des concentrations sanguines avec une technique analytique robuste et validée dans chaque matrice [77].

Le cerveau et le tissu adipeux présentent une cinétique particulière caractérisée par une accumulation lente et progressive (absence de pic de concentrations bien défini pour le diazepam) suivie par une phase terminale d'élimination à la vitesse comparable à celle des autres tissus. Au cours de la première partie de la phase de distribution, les concentrations cérébrales et dans le tissu adipeux sont inférieures aux concentrations sanguines. Ensuite, une accumulation importante se produit au sein de ces deux matrices et conduit à des concentrations pour ces deux matrices très supérieures aux concentrations sanguines. Cette cinétique est compatible avec celle décrite dans l'étude menée chez le rat par Takatori et al [76]. Chez l'homme, une large distribution du diazepam dans le cerveau et le tissu adipeux est décrite brièvement dans la littérature [54, 55].

Ces prédictions concernant les distributions tissulaires du diazepam et du nordazepam pourront se révéler utiles en toxicologie médicolégale pour l'interprétation d'analyse sur des matrices alternatives en absence de sang utilisable. Là encore, la distribution tissulaire rapportée a été simulée pour une administration orale unique thérapeutique de diazepam.

Il est intéressant de retenir que les concentrations hépatiques, rénales, pulmonaires et médullaires du diazepam et du nordazepam prédites par le modèle sont toujours supérieures aux concentrations sanguines. La vitesse d'élimination terminale depuis ces matrices est comparable à celle du sang. A l'image du citalopram, les enseignements médicolégaux seront les suivants:

- Une concentration retrouvée au sein de ses tissus très supérieure aux concentrations thérapeutiques sanguines ne témoigne pas forcément d'un surdosage surtout pour la MO.
- A l'inverse, une concentration retrouvée dans ces tissus proche des concentrations sanguines thérapeutiques tend à montrer qu'un surdosage est peu probable
- La durée de quantification de ces molécules dans ces matrices sera plus longue que dans le sang. Ainsi, la fenêtre de détection du diazepam et du nordazepam après la prise médicamenteuse peut être augmentée par l'analyse de ces tissus et tout particulièrement la MO et le foie. Ce phénomène implique aussi que la quantification de ces molécules dans le foie, la MO, le rein et le poumon, ne témoigne pas forcément d'une imprégnation sanguine quantifiable et donc pharmacologiquement active.

D'après les prédictions du modèle, les concentrations de diazepam et nordazepam dans le tissu adipeux et le cerveau sont inférieures au dosage dans le sang dans les heures qui suivent l'administration puis deviennent supérieures. Cette constatation rend difficile l'interprétation des résultats dans ces matrices en l'absence de données sur le délai administration/décès. Comme les vitesses d'élimination terminale dans ces matrices sont comparables à celle du sang, et les concentrations au cours de la phase d'élimination sont supérieures à la concentration sanguine, les deux benzodiazépines perdureront de manière quantifiable plus longtemps dans le cerveau et le tissu adipeux que dans le sang.

Les prédictions tendent à montrer que le nordazepam et le diazepam se distribuent plus faiblement dans le muscle avec des concentrations musculaires légèrement inférieures aux concentrations sanguines. Les vitesses d'élimination terminales étant par ailleurs comparables à celle du sang, la durée de détection sera plus courte dans le muscle que dans le sang. D'un point de vue médicolégal, ces prédictions permettent certaines interprétations qui sont à

utiliser avec précautions au vu de la littérature controversée sur la répartition musculaire des benzodiazépines [71, 72, 77]:

- Des concentrations musculaires très élevées par rapport aux seuils sanguins d'interprétation sont en faveur d'un surdosage, et des concentrations musculaires voisines des concentrations sanguines thérapeutiques tendent à montrer que le surdosage est peu probable.
- La quantification de diazepam ou de nordazepam dans le muscle est en faveur de sa présence dans le sang.

3.2.3 Etude de population: Analyse de sensibilité

La construction d'un modèle PBPK est basée sur la compilation d'un ensemble de paramètres physiologiques (Vi, Qi…) et pharmacocinétiques (fup, Clt, fClh, Kp…) qui sont soumis à la variabilité inter-individuelle ou aux erreurs d'estimation. Le modèle PBPK permet d'étudier la sensibilité des prédictions du modèle aux variations de ces paramètres en simulant la cinétique d'une population pour laquelle la valeur de ces paramètres fluctue autour d'une référence dans une fourchette choisie. Cette étude de population permet de construire une cinétique moyenne au sein de la population et d'estimer un écart- type illustrant la dispersion autour des concentrations prédites.

Pour illustrer ce mode de simulation, l'influence des paramètres de la MO (Kp_{MO}, volume de moelle V_{MO}, et débit perfusant la MO Q_{MO}) sur la cinétique prédite du citalopram a été étudiée. La fluctuation des paramètres autour de leur valeur de référence est fixée à ±20% ce qui représente une variabilité physiologique acceptable. La Figure 11 représente la cinétique moyenne du citalopram dans la MO sur une population de 200 individus; le trait vertical est proportionnel à l'écart type attribué à cette concentration lorsque le Kp_{MO}, le V_{MO}, et le Q_{MO} varient individuellement ou conjointement. Le Tableau 9 synthétise les écarts-types attribués à cinq concentrations médullaires prédites à 225, 450, 900, 1800 et 3600 min après administration. Il apparaît ainsi que la cinétique médullaire du citalopram prédite par le modèle est peu sensible aux fluctuations inter-individuelles de débit perfusant la MO et de volume de MO. Au contraire, la variation du coefficient de partage MO/plasma (Kp_{MO}) induit une dispersion importante des valeurs prédites dans le modèle représentant la quasi-totalité de la variabilité observée en faisant fluctuer les 3 paramètres conjointement.

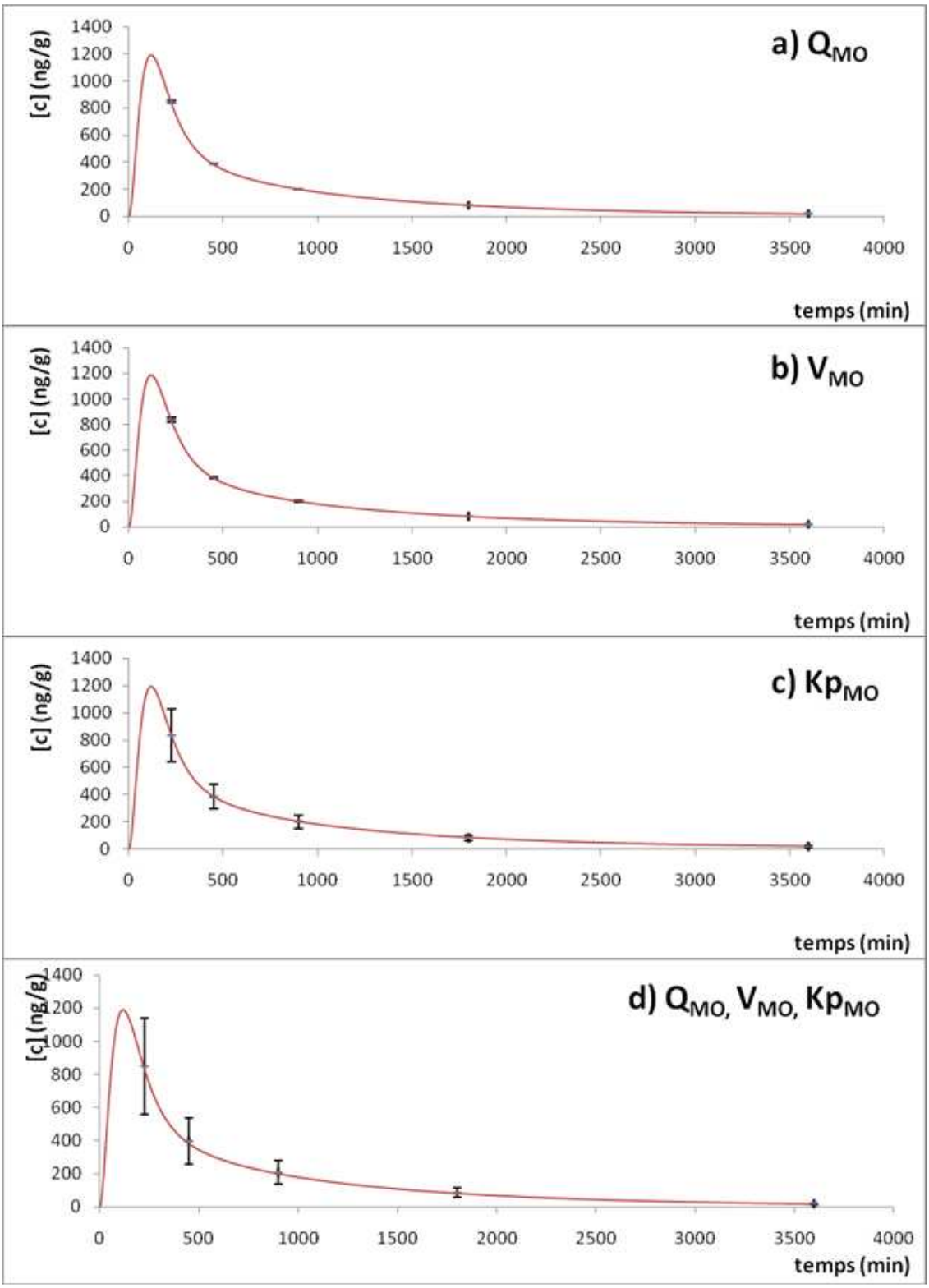
Tableau 9 : Influence de la fluctutation individuelle ou simultanée du Q_{MO}, V_{MO} et Kp_{MO} sur la détermination et la dispersion des concentrations prédites par le modèle.

	Conc. citalopram MO prédite (ng/g) ± écart-type en fonction du paramètre fluctuant [valeur de référence ±20%]			
Temps (min)	V_{MO} (kg) 2.94 ±20%	Q_{MO} (mL/min) 0.615 ±20%	Kp_{MO} 5.585±20%	V_{MO} + Q_{MO} + Kp_{MO} simultanément
225	838.8 ± 13.29	846.1 ±16.56	834.2 ±185.3	848.1 ±192.9
450	384.5 ±12.59	387.6 ±10.36	383.9 ± 94.13	396.5 ±103.34
900	201.7 ±3.511	202.3 ±2.176	200.7 ±45.91	206.5 ±49.95
1800	83.36 ±1.653	83.59 ±0.7072	83.02 ±19.20	85.38 ±20.79
3600	18.87 ±0.4769	18.92 ±0.1359	18.82 ±4.464	19.37 ±4.841

Les sources de variations du Kp_{MO} peuvent provenir d'erreurs d'estimation de sa valeur mais aussi de variations physiologiques et/ou pathologiques de la composition de la MO (contenu lipidique variable avec l'âge et le site de prélèvement, hémopathie...).

Ces données permettent également de calculer l'intervalle de confiance à 95% des concentrations prédites (valeur moyenne ± 2 écart-types). Par exemple, dans une population où le volume, le débit et la MO varient de ± 20% autour des valeurs de référence, l'intervalle de confiance à 95% de la concentration du citalopram dans la MO 225 min après administration orale de 50 mg de citalopram s'étend de 462 à 1234 ng/g. Cet intervalle assez étendu rend délicate l'extrapolation de la dose administrée à partir d'une concentration médullaire.

Ainsi, le modèle PBPK, au travers de cette analyse de sensibilité sur une population, permet-il de distinguer les paramètres influents sur la distribution du médicament et de définir un intervalle de confiance relatif aux concentrations estimées.



Trait rouge : Cinétique moyenne du citalopram dans une population dans laquelle varient Q_{MO} (a), V_{MO} (b), le Kp_{MO} (c) et les 3 paramètres simultanément (d).: cinétique moyenne
Tiret bleu : concentration moyenne à ce temps
Trait vertical noir proportionnel à la valeur de l'écart type correspondant à cette concentration.

Figure 11 : Sensibilité de la cinétique du citalopram à la fluctuation des paramètres physiologiques de la MO.

4. Conclusion

Dans cette étude, un modèle PBPK a été développé pour prédire chez l'homme la distribution tissulaire du citalopram, du diazepam et de son métabolite principal, le nordazepam, suite à une administration unique orale thérapeutique. Ce modèle est construit en deux étapes. La première permet d'estimer les coefficients de partage tissus/sang (Kp) propres à chaque molécule à partir de données issues d'expérimentations animales. Cette modélisation a présenté de bonnes qualités intrinsèques (adéquation des données prédites chez l'animal aux données observées in vivo) permettant une estimation fiable des Kp qui sont intégrés dans un second temps au modèle humain. Cette seconde étape permet de simuler des cinétiques tissulaires chez l'homme. Les données obtenues par ce deuxième modèle ont été comparées aux données disponibles dans la littérature: paramètres pharmacocinétiques sanguins, « case report » reportant des dosages tissulaires *post mortem* chez l'homme, et études de distribution tissulaire chez l'animal. Les différences observées sur certains paramètres pharmacocinétiques sanguins n'ont pas d'incidence sur le profil de répartition des molécules entre les tissus. Ainsi le modèle développé permet une description fiable de la distribution tissulaire.

Les résultats obtenus indiquent que les concentrations tissulaires de citalopram, diazepam et nordazepam sont généralement supérieures aux concentrations sanguines. Les concentrations sont plus faibles pour les deux benzodiazépines dans le muscle. Par ailleurs, pour les tissus présentant une distribution plus lente que le sang tels que le cerveau, le muscle ou le tissu adipeux, il existe une zone d'incertitude correspondant aux heures suivant l'administration dans laquelle les concentrations tissulaires sont inférieures aux concentrations sanguines. Les distributions sont maximales dans la moelle osseuse pour le diazepam, dans le foie pour le nordazepam et dans le poumon pour le citalopram. Les vitesses d'élimination depuis les différentes matrices sont identiques au sang à l'exception de celle du citalopram dans le cerveau. Ces constatations tirées des prédictions du modèle PBPK apportent des éléments intéressants pour l'interprétation de concentrations tissulaires en toxicologie médicolégale. Comme pour toute investigation toxicologique *post mortem*, l'interprétation des résultats d'analyse d'une matrice alternative doit être faite avec précaution en tenant compte du contexte médicolégal, des phénomènes *post mortem* (redistribution, stabilité), des caractéristiques de la technique analytique (notamment les limites de quantification/détection tissulaires et sanguines) et du délai entre la prise et la survenue du décès pour certaines matrices.

A travers cette étude, l’approche PBPK a montré tout son intérêt dans le domaine de la toxicologie médicolégale en permettant d’obtenir des données de concentrations tissulaires humaines pour des molécules et/ou des matrices peu ou pas décrites dans la littérature, ainsi que leur variabilité attendue. Il serait intéressant d'appliquer ce modèle à d'autres molécules aux propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques différentes ou à d'autres schémas posologiques (administration chronique, surdosage aigu au cours d'un traitement chronique…).

Quantification post mortem de la caféine dans la MO: influence du site de prélèvement et corrélation avec le sang

Au cours de l'étude pharmacocinétique décrite précédemment, la MO humaine a été considérée comme un tissu homogène résultant de l'extrapolation de la MO fémorale d'un lapin adulte. Pourtant, un bref regard sur la physiologie de la MO met en évidence sa dualité MO jaune et rouge qui évolue physiologiquement et à cause de certains phénomènes pathologiques. Ce phénomène résulte en une variabilité de composition en fonction de la localisation anatomique considérée et de l'âge. L'influence de la composition de la MO (proportion de contenu cellulaire et lipique) et donc du site de prélèvement de MO a été envisagéee au cours de certaines travaux [8, 17] mais n'a fait l'objet d'aucune étude spécifique.

Une étude a donc été conduite dans le but d'étudier, chez l'homme, l'influence du site de prélèvement sur les concentrations médullaires et sur la corrélation de ces concentrations avec les dosages sanguins. Cette étude ne pouvait être réalisée pour le citalopram et le diazepam en raison de la difficulté de constituer une série de cas statistiquement significative de prélèvement autopsiques positifs à l'une de ces deux molécules dans un délai compatible avec la réalisation de la thèse. La caféine a donc été choisie comme molécule modèle pour sa fréquente consommation qui permet un recrutement facilité d'une série de cas autopsiques. La concentration de caféine a été déterminée, pour 21 cas autopsiques, dans le sang et 6 prélèvements de MO: 5ème côte gauche et droite, fémur droit et gauche au niveau proximal et médial.

Cette étude a montré que les concentrations médullaires de caféine varient en fonction du site de prélèvement. De plus, une corrélation satisfaisante a été montrée entre les concentrations sanguines et médullaires permettant d'interpréter les résultats à partir d'une analyse dans la MO. D'un point de vue pratique, pour des molécules aux propriétés physicochimiques proches de la caféine, le prélèvement de la MO costale semble préférable aux prélèvements de MO fémorale. En effet, les concentrations dans la MO des cotes droites et gauches sont trouvées statistiquement égales, supérieures aux concentrations de la MO fémorale et mieux corrélées au sang. Au contraire, les concentrations fémorales montrent une grande variabilité entre les prélèvements provenant des fémurs droits et gauches et entre les localisations proximales et médiales. Cette hétérogénéité au niveau de la MO fémorale peut être mise en parallèle avec la grande variabilité d'aspect observée macroscopiquement sur les prélèvements allant d'une MO jaune à rouge, liquide ou tissulaire. L'étude montre qu'en moyennant les concentrations

médullaires issues des 4 prélèvements fémoraux, la corrélation avec les concentrations sanguines est améliorée. Ainsi, l'analyse d'un prélèvement multiple à plusieurs niveaux du fémur peut limiter l'effet de la variabilité des concentrations à l'intérieur des fémurs.

Cette étude a montré que le site de prélèvement avait une influence sur la détermination des concentrations médullaires en caféine; il constitue donc un paramètre important à prendre en compte lors de l'interprétation en vue d'analyses quantitatives dans la MO. L'influence de ce paramètre devra être étudiée sur des molécules ayant des propriétés pharmacologiques et physicochimiques différentes afin d'améliorer l'interprétation des dosages médullaires et de définir un protocole de prélèvement optimisé pour l'analyse toxicologique de cette matrice.

Forensic Science International xxx (2011) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forsciint

Postmortem measurement of caffeine in bone marrow: Influence of sample location and correlation with blood concentration

N. Cartiser [a,b], F. Bévalot [b,c,*], C. Chatenay [b], C. Le Meur [b,c], Y. Gaillard [b], D. Malicier [c], J. Guitton [a,d], L. Fanton [c]

[a] Laboratoire de Toxicologie, ISPB-Faculté de Pharmacie, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 8 Avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex 08, France
[b] Laboratoire LAT LUMTOX, 98 Avenue des Frères Lumière, 69008 Lyon, France
[c] Institut de Médecine Légale, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 8 Avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex 08, France
[d] Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Hospices Civils de Lyon, 165 Chemin Grand Revoyet, 69495 Pierre Bénite cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 December 2010
Received in revised form 22 February 2011
Accepted 26 February 2011
Available online xxx

Keywords:
Forensic toxicology
Caffeine
Bone marrow

ABSTRACT

Bone marrow (BM) analysis is of forensic interest in postmortem toxicological investigation in case of limited, unavailable or unusable blood samples. However, it remains difficult to determine whether a drug BM concentration is therapeutic or represents overdose, due to the lack of studies on this alternative matrix. Given the variations in BM composition in the body, sample location was suggested to be a relevant factor in assessing BM concentration. The aim of the present study was to compare postmortem caffeine concentrations in various BM sample locations and secondly to consider the correlation between BM and blood concentrations. Six BM samples (right and left side: proximal and medial femur and 5th rib) and a blood sample were collected from 21 forensic autopsies. Gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry was performed. Blood caffeine concentrations ranged from 60 to 7591 ng/mL. Femoral and rib BM concentrations ranged from 51 to 6171 ng/g and 66 to 7280 ng/g, respectively. Blood concentrations were always higher than BM concentrations. As a good correlation was demonstrated between blood and rib BM and between blood and the average of the four femoral BM concentrations, blood caffeine concentrations could be correctly extrapolated from BM concentrations. BM caffeine concentration was found to depend on sample location. Rib BM caffeine concentrations appeared to be systematically greater than averaged femur values and concentrations were much more variable between the 4 femur BM samples than between the 2 ribs. From a practical point of view, for caffeine analysis, rib BM appeared more relevant than femoral BM, which requires multisampling to overcome the concentration variability problem.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Bone marrow (BM) has been shown to be of forensic interest in postmortem toxicological investigation in case of limited, unavailable or unusable blood samples (e.g., extreme putrefaction, skeletonization, and bloodless corpse) [1,2]. While the qualitative relevance of BM analysis has been supported by the findings of cases where numerous drugs have been retrieved from this matrix, determining whether a BM concentration is therapeutic or represents an overdose remains difficult, limiting its use in routine cases. Among studies on this topic, Winek and Jones [3], studying alcohol, showed greater variability and a weaker BM/blood correlation for rabbit femoral and tibial BM than for human rib BM. In another study concerning psychotropic drugs, McIntyre et al. [4] observed a weaker correlation between femoral BM and blood than between vertebral BM and blood. In both cases, the authors suggested that sample location might partly explain such differences, because of variations in BM composition (cellularity and lipid level) within the body. Thus, location appears to be a relevant factor in interpreting BM concentration. To the best of our knowledge, however, it has not been investigated except in a single case report by Maeda [5]. The present study was therefore undertaken to examine whether BM sample location may influence postmortem BM quantification. Correlations between BM and blood concentrations were also considered. Caffeine was selected as a model compound mainly for its widespread consumption, allowing recruitment of a significant human autopsy series, as well as for its increasing toxicological interest [6,7].

2. Materials and methods

2.1. Study population

The study was conducted at the Lyon Forensic Institute during August 2010. Cases were randomly selected for toxicological history, sex, postmortem interval/

* Corresponding author at: Laboratoire LAT LUMTOX, 98 Avenue des Frères Lumière, 69008 Lyon, France. Tel.: +33 4 78 76 67 15; fax: +33 4 78 76 67 19.
E-mail address: f.bevalot@latlumtox.com (F. Bévalot).

0379-0738/$ – see front matter © 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.forsciint.2011.02.028

Table 1
Population study: demographic characteristics, postmortem interval (PMI), cause and manner of death.

Case	Sex	Age (years)	PMI (days)	Cause of death	Manner of death
1	F	65	<1	Hanging	Suicide
2	M	59	<1	Mixed drug toxicity	Suicide
3	M	66	<1	Multiple trauma	Accident
4	M	54	Unknown	Sudden cardiac death	Natural death
5	M	63	<1	Multiple trauma	Accident
6	M	29	<1	Gunshot death	Suicide
7	M	60	<1	Digestive hemorrhage	Natural death
8	M	58	Unknown	Hanging	Suicide
9	F	44	<1	Drowning	Suicide
10	M	?	Unknown (putrefied)	Gunshot death	Suicide
11	F	78	3	Drowning	Suicide
12	F	67	<1	External hemorrhage	Suicide
13	M	41	Unknown	Sudden cardiac death	Natural death
14	M	50	Unknown (putrefied)	Sudden cardiac death*	Natural death
15	M	48	2	Hanging	Suicide
16	M	54	6 (putrefied)	Sudden cardiac death*	Natural death
17	F	28	<1	Sudden cardiac death	Natural death
18	M	27	<1	Mixed drug toxicity	Suicide
19	F	59	6 (putrefied)	Heart failure*	Natural death
20	M	53	Unknown (putrefied)	Coronary thrombosis*	Natural death
21	M	85	<1	Multiple trauma	Accident

* Uncertain due to putrefaction process.

putrefaction, cause and manner of death, age. All relative data are reported in Table 1. The average age was 54.4 years and the male to female ratio was 2.5. For men (n = 15), mean age was 53.4 years (range, 28–85 years), and for women (n = 6) 56.8 years (range, 27–78). Postmortem time, when known, varied from less than 1 day to several days (putrefaction process in progress). Cases included suicide, accident, natural death and undetermined death.

2.2. Sample collection

Blood samples were collected from the cardiac cavity. BM was separately collected at 6 locations: proximal and medial femurs (right and left) and 5th ribs (right and left). Femurs were sectioned transversally at the superior third; femoral bone marrow was sampled from this section, on either the proximal or the medial side. Bone marrow from the anterior part of the left and right ribs was extracted by squeezing with pliers after opening the thorax. Fig. 1 shows the macroscopic aspect of collected BM.

2.3. Chemicals

Caffeine, provided by Merck (Fontenay-sous-Bois, France), and caffeine-trimethyl-13C, by Isotec (Miamisburg, OH, USA), were available in powder form. Methanol, water, chloroform, n-hexane and propan-2-ol were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France) in HPLC grade. Potassium dihydrogen phosphate anhydrous (KH_2PO_4) was supplied by Merck. Absolute ethanol was provided by Carlo Erba (Val de Reuil, France).

2.4. Preparation of stock, working standard and quality control solutions

Individual stock solutions of caffeine and its internal standard (IS: caffeine-trimethyl-13C) were prepared by dissolving drugs in absolute methanol to obtain final drug concentrations of 1 mg/mL, and stored at −20 8C. Standard solutions of caffeine, for calibration curves and quality control, were prepared daily by further dilution with methanol to 50 ng/mL, 14 ng/mL and 1.25 ng/mL. IS solution was prepared daily by dilution with methanol from the 1 mg/ml IS stock solution to 5 ng/ml (for BM analysis) or 25 ng/ml (for blood analysis).

2.5. Preparation of calibration and QC samples

Human autopsy samples of BM and blood in which caffeine concentrations were found to be negligible were used for daily calibrations curves and quality control (QC). A 5-point calibration curve (50, 200, 400, 800 and 2000 for both blood (ng/mL) and BM (ng/g)) and one low and one high QC sample (125 and 1400 for both blood (ng/mL) and BM (ng/g)) were systemically included in each analytical series. For samples initially falling outside the validated calibration curve, a second analysis was undertaken with the final extract diluted in an increased volume of ethyl acetate and proportionally increased IS concentration.

2.6. Sample preparation

2.6.1. Blood

One milliliter of sample was spiked at 500 ng/mL with caffeine-trimethyl-13C and mixed with 2 mL of KH_2PO_4 buffer (pH 2.5 0.5 M). Three milliliters of chloroform:isopropanol (90:10, v/v) was added to the liquid phase and mechanical shaking was carried out for 20 min. After centrifugation (10 min at 3000 × g), the lower organic layer was saved and evaporated to dryness at 50 8C under a stream of nitrogen. The residue was reconstituted in 100 mL deionized water plus 1 mL ethanol and washed by addition of n-hexane (4 mL). The mixture was vortex-mixed 30 s and centrifuged 5 min at 3000 × g. The lower ethanolic layer was removed, evaporated to dryness at 50 8C under a stream of nitrogen and reconstituted in 40 mL ethyl acetate. After centrifugation in microcentrifuge tubes (10 min at 12,000 × g), 1 mL was injected into the GC/MSMS system.

2.6.2. Bone marrow

Two hundred milligrams of sample, after addition of IS solution at 500 ng/g, was homogenized in 2 mL KH_2PO_4 buffer (pH 2.5–0.5 M) by agitation for 20 min. The mixture was then centrifuged (10 min at 3000 × g) and the liquid phase was transferred to a 10 mL glass tube while the solid residues were discarded. Three milliliters of chloroform:isopropanol (90:10, v/v) was added to the liquid phase and mechanical shaking was carried out for 20 min. After centrifugation (10 min at 3000 × g), the lower organic layer was saved and evaporated to dryness at 50 8C under a stream of nitrogen. The residue was reconstituted in 100 mL deionized water plus 1 mL ethanol and washed by addition of n-hexane (4 mL). The mixture

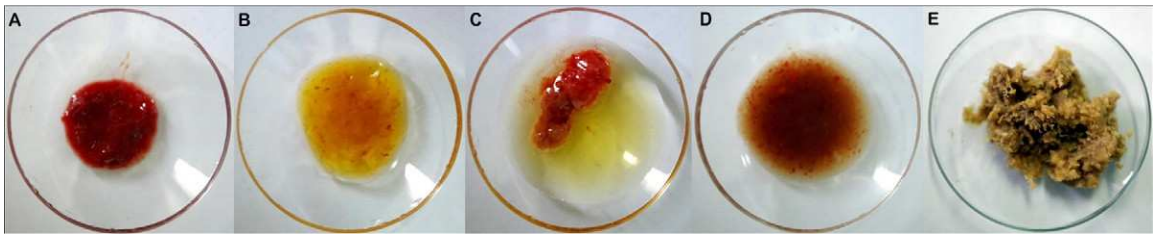


Fig. 1. Various macroscopic aspects of BM samples from case no. 7: (A) left rib, (B) right medial femur, (C) left medial femur, (D) right proximal femur; and from case no. 14 (putrefied body) and (E) right medial femur.

Table 2
Case by case blood (ng/mL) and BM (ng/g) caffeine concentrations and relative standard deviation between femoral concentrations and rib concentrations. LLOQ: lower limit of quantification; NA: not available (blood in cases 10 and 14: putrefaction process; right rib BM in case 19: insufficient sample; left femur BM in case 8: hip prosthesis); RSD: relative standard deviation.

Case	Right medial femur (ng/g)	Right proximal femur (ng/g)	Left medial femur (ng/g)	Left proximal femur (ng/g)	RSD%	Right rib (ng/g)	Left rib (ng/g)	RSD%	Blood (ng/mL)
1	666	804	659	823	11.9	1237	1150	5.2	2 275
2	120	115	72	89	22.7	237	231	1.8	324
3	308	287	268	286	5.6	437	376	10.6	471
4	949	1095	984	1002	6.2	1542	1883	14.1	2671
5	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	–	<LLOQ	<LLOQ	–	<LLOQ
6	464	491	447	376	11.1	496	401	15.1	1028
7	3549	6171	2127	5247	42.0	7280	7267	0.1	7591
8	165	148	NA	NA	7.6	270	257	3.5	434
9	3174	3615	2054	3213	22.2	5505	5639	1.7	6977
10	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	–	<LLOQ	<LLOQ	–	NA
11	645	1258	735	812	31.6	1437	1364	3.7	3063
12	107	89	81	82	13.3	223	257	10.0	291
13	168	431	318	534	43.3	472	465	1.0	524
14	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	–	<LLOQ	<LLOQ	–	NA
15	225	287	234	364	23.0	545	588	5.4	770
16	51	71	65	76	18.7	133	140	3.8	112
17	53	110	117	102	32.5	142	106	20.1	125
18	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	–	85	66	17.8	60
19	1528	2470	3894	2084	40.5	NA	4219	–	5596
20	125	205	138	91	34.1	201	237	11.5	315
21	432	399	431	502	9.9	836	813	2.0	1513
				Mean	22.1		Mean	7.5	

was vortex-mixed 30 s and centrifuged for 5 min at 3000 × g. The lower ethanolic layer was removed, evaporated to dryness at 50 8C under a stream of nitrogen and reconstituted in 40 mL ethyl acetate. 1 mL was injected into the GC/MSMS system.

2.7. Chromatography

Gas chromatography was carried out on a 7890A GC system (Agilent, Santa Clara, CA, USA) equipped with a 7693A autosampler (Agilent). Compounds were separated on an HP-5MS capillary column with a 5% phenyl-95% methyl-polysilixane stationary phase (30 m length × 0.250 mm I.D. × 0.25 mm film thickness). The carrier gas was helium, with a constant flow-rate of 1.4 ml/min. Injection was performed in splitless mode at an injection temperature of 260 8C. The transfer line was held at 310 8C. The initial oven temperature of 100 8C was kept for 1 min, and subsequently increased at a rate of 20 8C/min to 200 8C. After maintaining for 3 min at 200 8C, the temperature finally increased at a rate of 50 8C/min to 300 8C, held for 3 min. The total runtime of this method was 14 min. The retention time of caffeine and its internal standard was 8.6 min. Detection was performed using a 7000 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent) in electronic ionization (EI) mode. The ion source temperature was set at 230 8C and the ionization energy at −70 eV. The collision gas was nitrogen (flow-rate, 1.5 ml/min) with helium quench (flow-rate, 2.25 ml/min). Acquisition was performed under selected reaction monitoring (SRM). The transitions were chosen according to their selectivity and abundance, in order to maximize the signal-to-noise ratio in matrix extracts: one transition per compound was used as quantifier (underlined) and 2 transitions as qualifiers. The transitions studied for caffeine with the corresponding collision energy were 194 → 55 (25 eV), 194 → 109 (10 eV) and 109 → 55 (5 eV), and for caffeine-trimethyl-13C, 197 → 57 (25 eV), 197 → 111 (10 eV) and 111 → 57 (5 eV).

2.8. Method validation

According to Shah's recommendations for the validation of different matrices within an animal species [8], a full (three day) validation was performed for bone marrow samples and a partial (one day) validation for blood.

Calibration curves with the weighting factor 1/[concentration] were linear for blood (r^2 = 0.9994; five calibration points, 50, 200, 400, 800 and 2000 ng/mL) and for BM (mean r^2 = 0.9996; five calibration points, 50, 200, 400, 800 and 2000 ng/g; in triplicate). The dilution of the final extract, by increasing the final volume of ethyl acetate, was validated to analyze samples initially falling outside the validated calibration curve. 1/10th dilution was tested on 5 replicates to quantify BM overloaded with caffeine at 10,000 ng/g, using an initial IS concentration of 5000 ng/g instead of 500 ng/g and reconstituting the final residue with 400 mL ethyl acetate instead of 40 mL (variation coefficient, 1.50%; accuracy, −1.38%).

Repeatability, reproducibility and recovery were tested at low (blood, 125 ng/mL; BM, 125 ng/g) and high (blood, 1400 ng/mL; BM, 1,400 ng/g) concentration levels. For BM, accuracy and precision were respectively assessed by the mean relative percentage deviation from the nominal concentration and the within-run precision (WRP) and between-run precision (BRP). These parameters were calculated with the method described by Carli et al. [9] using Statview software for Windows, version 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). The within-run precision of the assay (each of the two concentration levels analyzed 5 times) was 4.99% at low and 1.59% at high concentration level. Between-run precision (each of the two concentration levels analyzed 5 times 3 days consecutively) was 0.68% at low and 1.88% at high concentration level. Accuracy was 3.22% at low and 8.72% at high concentration level. For blood, the repeatability study (each of the two concentration levels analyzed 5 times) gave variation coefficients of 1.97% and 4.71%. Accuracy was 0.68% and 6.13%, respectively. Mean recovery was 82.5% and 74.3% for blood and 56.8% and 56.3% for BM for the low and high levels, respectively.

The lower limit of detection was not evaluated, due to the difficulty of finding blank samples testing completely free of caffeine. The lower limit of quantification (LLOQ) (lowest concentration which could be measured with acceptable accuracy (<20%) and precision (<20%)) was estimated at 50 ng/mL for blood and 50 ng/g for BM.

3. Results

Caffeine concentrations in blood and 6 BM samples are reported for 21 cases, corresponding to 142 analyses, in Table 2. For 4 cases (5, 10, 14 and 18), caffeine concentrations were lower than or close to the LLOQ and were excluded from further calculations. Blood caffeine concentrations ranged from 60 to 7591 ng/mL. Femoral and rib BM concentrations ranged from 51 to 6171 ng/g and 66 to 7280 ng/g, respectively.

Caffeine concentrations determined from right and left ribs were fairly similar: the ratio between the two locations was 1.023 ± 0.14 with a strong correlation (r2 = 0.998). A matched-series means comparison test confirmed that right and left rib concentrations were not significantly different (Student's test, a = 5%, n = 17). The mean ratio of caffeine concentration between averaged rib BM and averaged femoral BM levels were 1.73 (±0.39). Data concerning correlations between BM and blood samples are presented in Table 3. The best correlations were observed between blood and rib concentrations and between blood and averaged femur concentrations, as illustrated in Fig. 2. Except for cases 16 and 18, which were close to the LLOQ, blood concentrations were always higher than BM concentrations.

4. Discussion

Knowledge of the postmortem distribution of xenobiotics between different sample locations for a given matrix is necessary in order to improve sample collection protocols and to interpret

Table 3
Determination coefficient and ratio of caffeine concentrations between BM samples and blood.

	Right rib	Left rib	Averaged rib concentration	Right medial femur	Right proximal femur	Left medial femur	Left proximal femur	Averaged femoral concentration
Linear correlation to blood (r^2)	0.953	0.958	0.958	0.927	0.892	0.740	0.887	0.954
Average ratio blood/BM	1.44	1.47	1.44	2.84	2.23	2.78	2.46	2.46
Standard deviation	0.40	0.46	0.41	0.75	0.78	1.05	0.91	0.71

analytical results [10,11]. The present study compared caffeine concentrations between bone marrow collection sites (rib and femur), and correlations between blood and bone marrow concentrations were investigated.

Femoral blood is considered to be the best blood-sample location in postmortem toxicology for quantitative purposes [10]. In the present study, femoral blood was not always collectable from autopsy, due to putrefaction; blood samples were then collected from the cardiac cavity. The impact of this choice on the results was supposed to be negligible, since caffeine does not undergo postmortem redistribution (mean heart/femoral blood concentration ratio 1.2 (range, 1.0–1.4) [12]).

Femoral BM concentrations of caffeine varied between proximal and medial locations in the femur, and between right and left femurs (mean relative standard deviation (RSD) = 22.1%). In contrast, right and left rib BM concentrations did not show such difference (mean RSD = 7.5%) and were statistically equal. There was a good correlation between rib BM and blood concentrations (r^2 = 0.958), and between averaged femoral BM and blood concentrations (r^2 = 0.954), However, the correlation was lower for some femoral locations taken separately (e.g., left medial femur, r^2 = 0.740). These findings could be related to the gross examination of the BM samples collected: color and consistency were more heterogeneous in femur than in rib samples. Physiologically, in adults, the ribs contain active hematopoietic marrow which consists of richly vascularized cellular tissue [13]. Ribs BM, indeed, appeared consistently bright red and firm (Fig. 1A), and similar on the right and left sides. In contrast, BM in long bones such as the femur undergoes physiological conversion with age from active red to inactive yellow BM until all red marrow is, normally, located exclusively in the proximal part [14]. Reconversion from yellow to red BM can be induced by certain pathological or therapeutic events [15–18]. These processes could explain the heterogeneity of the BM collected from a given cadaver within the femur and between right and left femurs, which could be as different as those shown in Fig. 1B–D. Postmortem change increased this heterogeneity (Fig. 1E). As seen previously, in the present study, averaging the four femoral BM concentrations improved the correlation between femoral and rib BM concentrations and between femoral BM and blood concentrations. Analysis of multiple femoral samples could be an alternative to limit site-dependent variation in caffeine concentrations. Winek et al. proposed another approach to balance the influence of BM composition, by correcting BM concentration according to the sample's water/lipid ratio; they successfully applied this correction factor to some water-soluble compounds such as methanol [19], ethanol [20], isopropanol and acetone [21].

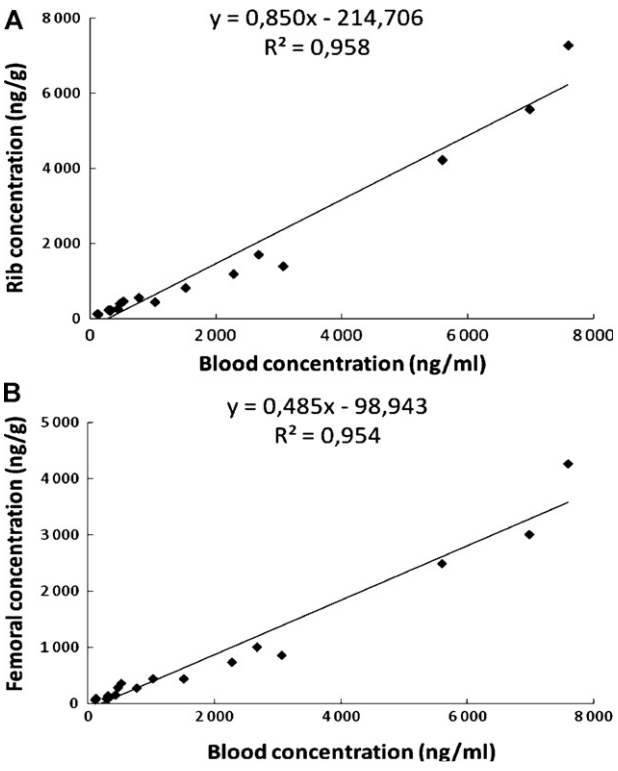


Fig. 2. Correlation curve between blood caffeine concentrations and (A) mean rib BM concentrations and (B) mean of 4 femoral BM concentrations.

Blood caffeine concentrations were higher than in BM (blood/rib BM ratio = 1.44 ± 0.41; blood/femoral BM = 2.46 ± 0.71), suggesting that caffeine did not accumulate in BM. This observation is compatible with previously published results on drugs with the same properties. Caffeine is hydrophilic (log P −0.07), like meprobamate (log P 0.7) and ethanol (log P −0.31) for which BM concentrations were reported to be lower than in blood [20,22]. Drugs with lipophylic properties (e.g., diazinon [23], benzodiazepines [4,24,25], and tricyclic antidepressant [26,27]), on the other hand, were reported to accumulate in BM (high BM/blood concentration ratio).

No standardized procedure for BM sampling has been recommended in the literature. BM is collected from three different locations: in femur, after sectioning of the cortical bone [3]; in ribs, squeezed out using pliers [28]; or in vertebral bodies, by trocar aspiration [29]. The last of these procedures seems complex in postmortem application, as BM aspirates are frequently unavailable in cases such as senile victims, death from blood loss or multiple trauma [29]. For practical and physiological reasons, the sectioned femur and squeezed rib procedures were selected for sample collection in the present study. On the basis of the present results, rib BM caffeine concentrations appeared to be better correlated to blood concentrations and systematically greater than averaged femur values (mean rib BM/mean femoral BM ratio = 1.73 ± 0.39). Thus, rib BM seemed more relevant than femoral BM for detection and quantification of molecules with the same properties as caffeine, either for screening purposes or for interpretation of BM concentrations.

In conclusion, BM caffeine concentration depends on the collection site. From the present results, blood caffeine concentrations could be correctly extrapolated from BM concentrations. From a practical point of view, rib BM appeared more relevant than femoral BM, which requires multisampling to limit concentration variability within the femur. Since each xenobiotic has its own pharmacological and physicochemical properties, these results

may not be transposable: other molecules should be studied with the same objectives before their BM concentrations can be interpreted and in order to design an optimal BM sampling protocol for systematic toxicological analysis.

Acknowledgements

Nathalie Cartiser is grateful to the ''Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, Service CIFRE'' for her PhD grant.

References

[1] N. Cartiser, F. Bevalot, L. Fanton, Y. Gaillard, J. Guitton, State-of-the-art of bone marrow analysis in forensic toxicology: a review, Int. J. Legal Med (2010), Nov 9 [Epub ahead of print]..
[2] J. Watterson, Challenges in forensic toxicology of skeletonized human remains, Analyst 131 (2006) 961–965.
[3] C.L. Winek, T. Jones, Blood versus bone marrow ethanol concentrations in rabbits and humans, Forensic Sci. Int. 16 (1980) 101–109.
[4] L.M. McIntyre, C.V. King, M. Boratto, O.H. Drummer, Post-mortem drug analyses in bone and bone marrow, Ther. Drug. Monit. 22 (2000) 79–83.
[5] H. Maeda, S. Oritani, K. Nagai, T. Tanaka, N. Tanaka, Detection of bromisovalum from the bone marrow of skeletonized human remains: a case report with a comparison between gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS), Med. Sci. Law. 37 (1997) 248–253.
[6] G. Thelander, A.K. Jonsson, M. Personne, G.S. Forsberg, K.M. Lundqvist, J. Ahlner, Caffeine fatalities—do sales restrictions prevent intentional intoxications?, Clin. Toxicol. (Phila), 48, 354–358.
[7] C.J. Reissig, E.C. Strain, R.R. Griffiths, Caffeinated energy drinks—a growing problem, Drug. Alcohol. Depend. 99 (2009) 1–10.
[8] V.P. Shah, K.K. Midha, J.W. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonelli, C.T. Viswanathan, A. Yacobi, Bioanalytical method validation—a revisit with a decade of progress, Pharm. Res. 17 (2000) 1551–1557.
[9] D. Carli, M. Honorat, S. Cohen, M. Megherbi, B. Vignal, C. Dumontet, L. Payen, J. Guitton, Simultaneous quantification of 5-FU 5-FUrd, 5-FdUrd, 5-FdUMP, dUMP and TMP in cultured cell models by LC-MS/MS, J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 877 (2009) 2937–2944.
[10] R.J. Flanagan, G. Connally, J.M. Evans, Analytical toxicology: guidelines for sample collection postmortem, Toxicol. Rev. 24 (2005) 63–71.
[11] G. Skopp, Preanalytic aspects in postmortem toxicology, Forensic Sci. Int. 142 (2004) 75–100.
[12] M. Dalpe-Scott, M. Degouffe, D. Garbutt, M. Drost, A comparison of drug con- centrations in postmortem cardiac and peripheral blood in 320 cases, Can. Soc. For. Sci. J. 28 (1995) 113–121.
[13] J.S. Blebea, M. Houseni, D.A. Torigian, C. Fan, A. Mavi, Y. Zhuge, T. Iwanaga, S. Mishra, J. Udupa, J. Zhuang, R. Gopal, A. Alavi, Structural and functional imaging of normal bone marrow and evaluation of its age-related changes, Semin. Nucl. Med. 37 (2007) 185–194.
[14] S.C. Kim, B.R. Krynyckyi, J. Machac, C.K. Kim, Patterns of red marrow in the adult femur, Clin. Nucl. Med. 31 (2006) 739–741.
[15] H.E. Daldrup-Link, T. Henning, T.M. Link, MR imaging of therapy-induced changes of bone marrow, Eur. Radiol. 17 (2007) 743–761.
[16] S. Hwang, D.M. Panicek, Magnetic resonance imaging of bone marrow in oncology, Part 2, Skeletal Radiol. 36 (2007) 1017–1027.
[17] S. Hwang, D.M. Panicek, Magnetic resonance imaging of bone marrow in oncology, Part 1, Skeletal Radiol. 36 (2007) 913–920.
[18] B.R. Rosen, D.M. Fleming, D.C. Kushner, K.S. Zaner, R.B. Buxton, W.P. Bennet, G.L. Wismer, T.J. Brady, Hematologic bone marrow disorders: quantitative chemical shift MR imaging, Radiology 169 (1988) 799–804.
[19] C.L. Winek, D. Susa, Blood versus bone marrow methanol concentrations in rabbits, Forensic Sci. Int. 19 (1982) 165–175.
[20] C.L. Winek, F.M. Esposito, Comparative study of ethanol levels in blood versus bone marrow, vitreous humor, bile and urine, Forensic Sci. Int. 17 (1981) 27–36.
[21] C.L. Winek, J.K. Janssen, Blood versus bone marrow isopropanol concentrations in rabbits, Forensic Sci. Int. 20 (1982) 11–20.
[22] F. Bévalot, L. Dujourdy, L. Fanton, N. Cartiser, L. Magné, F. Besacier, C. Le Meur, Y. Gaillard, D. Malicier, Statistic interpretation of meprobamate concentrations in bone marrow, vitreous and bile, in: Proceedings of the International Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, Washington, United States of America, Abstract K59, 2008, p. 431.
[23] R. Akcan, A. Hilal, N. Daglioglu, N. Cekin, M.K. Gulmen, Determination of pesticides in postmortem blood and bone marrow of pesticide treated rabbits, Forensic Sci. Int. 189 (2009) 82–87.
[24] C.L. Winek, M. Pluskota, W.W. Wahba, Plasma versus bone marrow flurazepam concentration in rabbits, Forensic Sci. Int. 19 (1982) 155–163.
[25] T. Takatori, S. Tomii, K. Terazawa, M. Nagao, M. Kanamori, Y. Tomaru, A comparative study of diazepam levels in bone marrow versus serum, saliva and brain tissue, Int, J. Legal Med. 104 (1991) 185–188.
[26] C.L. Winek, S.E. Westwood, W.W. Wahba, Plasma versus bone marrow desipramine: a comparative study, Forensic Sci. Int. 48 (1990) 49–57.
[27] C.L. Winek, E.M. Morris, W.W. Wahba, The use of bone marrow in the study of postmortem redistribution of nortriptyline, J. Anal. Toxicol. 17 (1993) 93–98.
[28] H. Schloegl, T. Rost, W. Schmidt, F.M. Wurst, W. Weinmann, Distribution of ethyl glucuronide in rib bone marrow, other tissues and body liquids as proof of alcohol consumption before death, Forensic Sci. Int. 156 (2006) 213–218.
[29] H. Maeda, B.L. Zhu, T. Ishikawa, S. Oritani, T. Michiue, D.R. Li, D. Zhao, M. Ogawa, Evaluation of post-mortem ethanol concentrations in pericardial fluid and bone marrow aspirate, Forensic Sci. Int. 161 (2006) 141–143.

Please cite this article in press as: N. Cartiser, et al., Postmortem measurement of caffeine in bone marrow: Influence of sample location and correlation with blood concentration, Forensic Sci. Int. (2011), doi:10.1016/j.forsciint.2011.02.028

Conclusions et Perspectives

L'interprétation des résultats d'analyses est souvent la phase la plus complexe de l'expertise toxicologique médicolégale et doit prendre en compte de nombreux paramètres. En effet, les concentrations *post mortem* mesurées sont la résultante de la distribution ante mortem et des phénomènes *post mortem* (redistribution, dégradation *in corpore*…) auxquelles viennent s'ajouter les traitements réalisés au cours de la chaine judiciaire: prélèvement, conservation, analyse. En l'absence de sang analysable, matrice de référence en toxicologie, l'expert peut avoir recours à l'analyse de matrices diverses (prélèvements d'organes, liquide de putréfaction, MO…). Cependant, les données analytiques, pharmacocinétiques et forensiques, concernant ces matrices restent lacunaires rendant d'autant plus complexe l'interprétation des résultats obtenus sur ces prélèvements. Parmi ces matrices alternatives au sang, la MO se révèle très intéressante et prometteuse. L'objectif de cette thèse était de faire le point sur la place de la MO en toxicologie médicolégale et d'approfondir les connaissances de cette matrice autour des problématiques du prélèvement, de l'analyse et de la distribution *ante mortem* afin de contribuer à l'interprétation qualitative et quantitative des analyses réalisées sur la MO.

La MO représente près de 4% du poids du corps. Elle est protégée par l’os des agressions extérieures et de certaines sources de contaminations. Site unique de l'hématopoïèse, la MO est vascularisée par un riche réseau de sinusoïdes très perméables. Aussi, les molécules présentes dans le sang devraient être retrouvées dans la MO sous réserve d'utiliser une technique analytique adaptée. Cette matrice peut ainsi se révéler utile dans diverses situations médicolégales telles que la putréfaction extrême, les processus de squelettisation ou momification, certains polytraumatismes sévères, en cas de calcination ou d'exsanguination… Une des particularités de la MO est sa conversion physiologique avec l'âge de la MO rouge (hématopoïétiquement active, tissulaire) vers la MO jaune (inactive, lipidique) et une conversion inverse lors de certains processus pathologiques. Cette particularité entraine une hétérogénéité du prélèvement interindividuelle et chez un même individu en fonction de la localisation. Elle doit donc être prise en compte lors de l’analyse toxicologique de cette matrice notamment lors de la phase analytique et du choix du site de prélèvement.

D'un point de vue analytique, l'analyse de la MO exige donc, le plus souvent, une phase importante de préparation de l'échantillon. La revue des méthodes d'extraction présentées dans les publications a montré qu'une phase d'homogénéisation et une phase d'extraction des lipides sont généralement entreprises. Compte tenu de la complexité du tissu, une validation spécifique est également indispensable pour prendre en compte l'effet matrice et évaluer les caractéristiques de la méthode. Dans notre travail, ont été étudiées deux molécules, le citalopram et le diazepam, représentatives par leur propriétés physicochimiques d'un grand

nombre de médicaments et fréquemment retrouvées au cours des investigations médicolégales. Nous avons développé et validé une technique analytique pour la quantification de ces molécules et les métabolites principaux du diazepam sur la MO et dix autres fluides biologiques, tissus ou organes. Cette procédure consiste en une triple extraction liquide/liquide, suivie d'une dérivation en ligne et d'une analyse par GC-MS/MS. La phase de préparation d'échantillon en trois étapes avec une rétro-extraction en phase aqueuse est adaptée à l'analyse de matrices lipidiques (comme la MO, le tissu adipeux, le cerveau) et dégradées (tels que les prélèvements putréfiés ou carbonisés). Cette méthode a montré une sélectivité satisfaisante lors d'analyse de cas réels autopsiques et une sensibilité suffisante à l'établissement d'une cinétique tissulaire chez l'animal au cours de l'étude pharmacocinétique.

L’influence du site de prélèvement de la MO sur la détermination des concentrations médullaires et sur la corrélation de ces concentrations avec les dosages sanguins, a été étudiée pour la caféine. Les concentrations de caféine dans la MO des côtes sont trouvées supérieures et mieux corrélées au sang que les concentrations de la MO fémorale. Si les concentrations entre les cotes gauches et droites sont identiques permettant un prélèvement unique, les prélèvements réalisés en différentes localisations des fémurs présentaient une hétérogénéité de concentrations significative. L'influence de cette variabilité peut être limitée par l'analyse de multiples prélèvements à plusieurs niveaux du fémur.

Le manque de données sur la distribution *ante mortem* des xénobiotiques au sein de l'organisme limite considérablement l'interprétation des concentrations tissulaires. Un modèle pharmacocinétique PBPK a été développé pour prédire chez l’homme la distribution tissulaire du citalopram, du diazepam et de son métabolite principale, le nordazepam, suite à une administration unique orale thérapeutique. Ce modèle a permis d'étudier la répartition tissulaire, en fonction du temps après administration, dans des matrices jusque-là peu étudiées telles que la MO. Ces constatations apportent des éléments intéressants pour l’interprétation de concentrations tissulaires en toxicologie médicolégale.
Selon les prédictions du modèle PBPK, le citalopram se distribue dans le poumon, le rein, le foie et en quatrième lieu dans la MO. Le diazepam quant à lui se répartit majoritairement dans la MO, les concentrations rénales et hépatiques sont initialement élevées puis décroissent rapidement. Le nordazepam en tant que métabolite est majoritaire dans le foie, site du métabolisme du diazepam, puis se distribue de façon importante dans la MO. Les concentrations médullaires du citalopram, diazepam et du nordazepam prédites par le modèle sont toujours largement supérieures aux concentrations sanguines. La vitesse d'élimination terminale depuis la MO est comparable à celle du sang. Ces constatations donnent des clefs

intéressantes pour l'interprétation quantitative des concentrations médullaires en toxicologie médicolégale:

- Une concentration retrouvée au sein de la MO très supérieure aux concentrations thérapeutiques sanguines ne témoigne pas forcément d'un surdosage.
- A l'inverse, une concentration médullaire proche des concentrations sanguines thérapeutiques tend à montrer qu'un surdosage est peu probable
- La durée de quantification de ces 3 molécules dans la MO sera plus longue que dans le sang. Ainsi, la fenêtre de détection du citalopram, du diazepam et du nordazepam après la prise médicamenteuse peut être augmentée par l'analyse de la MO. Ce phénomène implique aussi que la quantification de ces molécules dans la MO ne témoigne pas forcément d'une imprégnation sanguine quantifiable et donc pharmacologiquement active.

Comme pour toute investigation toxicologique *post mortem*, l'interprétation des résultats d'analyse d'une matrice alternative doit être faite avec précaution en tenant compte du contexte médicolégal, des phénomènes *post mortem* (redistribution, stabilité), des caractéristiques de la technique analytique (notamment les limites de quantification/détection tissulaires et sanguines).

Ce travail confirme le potentiel de la MO comme matrice alternative au sang en toxicologie médicolégale. Les enseignements tirés de ces trois études devraient être élargis à d'autres molécules aux propriétés pharmacocinétiques et physicochimiques différentes. Ce travail fournit tous les outils pour aller dans ce sens: plan d'une étude sur l'influence du site de prélèvement, protocole de validation croisée de plusieurs matrices, modélisation PBPK. Quatre autres molécules d'intérêt médicolégal avaient été initialement proposées pour explorer un large éventail de propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques : le méprobamate, la morphine, la cyamémazine et la caféine ; et pourraient être intéressantes à étudier pour la poursuite de ce travail. La modélisation PBPK a rempli ses attentes en permettant d'extrapoler à partir d'expérimentations animales la distribution de xénobiotiques chez l'homme dans des tissus difficilement accessibles. Toutefois, les prédictions sanguines comparées aux cinétiques sanguines observées dans certaines études, présentent certaines limites. Aussi, il serait intéressant de confirmer les résultats simulés par la modélisation sur une série de cas autopsiques. Cette étude, de grand intérêt, se confronte à certaines limitations techniques: difficulté de recrutement de cas connus *a priori* positifs en citalopram ou diazepam, manque d'informations sur les quantités administrées et le délai entre la prise et le décès… Pour finir, la problématique des phénomènes *post mortem* dont la stabilité *in corpore* et la redistribution *post mortem*, était au-delà du cadre de ce travail.

Références

1. Frank WE, Llewellyn BE. A time course study on STR profiles derived from human bone, muscle, and bone marrow. J Forensic Sci 1999 Jul;44(4):778-82.
2. Gruspier KL, Pollanen MS. Limbs found in water: investigation using anthropological analysis and the diatom test. Forensic Sci Int 2000 Jul 24;112(1):1-9.
3. Pollanen MS. The diagnostic value of the diatom test for drowning, II. Validity: analysis of diatoms in bone marrow and drowning medium. J Forensic Sci 1997 Mar;42(2):286-90.
4. Pollanen MS, Cheung C, Chiasson DA. The diagnostic value of the diatom test for drowning, I. Utility: a retrospective analysis of 771 cases of drowning in Ontario, Canada. J Forensic Sci 1997 Mar;42(2):281-5.
5. Roll P, Beham A, Beham-Schmid C. Post-mortem histopathological investigations of the bone marrow in forensic medicine: An important issue for both the forensic and clinical pathologist. Forensic Sci Int 2009 Feb 19.
6. Sakai K, Takatsu A, Shigeta A, Abe S, Ikegami M, Takagi K. Sudden death due to undiagnosed acute promyelocytic leukemia: a case report. Int J Legal Med 2007 Jul;121(4):311-4.
7. Umezawa A, Yamada T, Ogawa Y, Kuramochi S, Watanabe Y. Postmortem diagnosis of acute megakaryocytic leukemia. Usefulness of immunohistochemistry and tissue hemogram. Acta Pathol Jpn 1990 Sep;40(9):693-8.
8. McIntyre LM, King CV, Boratto M, Drummer OH. Post-mortem drug analyses in bone and bone marrow. Ther Drug Monit 2000 Feb;22(1):79-83.
9. Rochdi M, Sabouraud A, Baud FJ, Bismuth C, Scherrmann JM. Toxicokinetics of colchicine in humans: analysis of tissue, plasma and urine data in ten cases. Hum Exp Toxicol 1992 Nov;11(6):510-6.
10. Raikos N, Tsoukali H, Njau SN. Determination of opiates in postmortem bone and bone marrow. Forensic Sci Int 2001 Dec 1;123(2-3):140-1.
11. Bal TS, Hewitt RW, Hiscutt AA, Johnson B. Analysis of bone marrow and decomposed body tissue for the presence of paracetamol and dextropropoxyphene. J Forensic Sci Soc 1989 May-Jun;29(3):219-23.
12. Kudo K, Sugie H, Syoui N, Kurihara K, Jitsufuchi N, Imamura T, et al. Detection of triazolam in skeletal remains buried for 4 years. Int J Legal Med 1997;110(5):281-3.
13. Maeda H, Oritani S, Nagai K, Tanaka T, Tanaka N. Detection of bromisovalum from the bone marrow of skeletonized human remains: a case report with a comparison

between gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). Med Sci Law 1997 Jul;37(3):248-53.

14. Noguchi TT, Nakamura GR, Griesemer EC. Drug analyses of skeletonizing remains. J Forensic Sci 1978 Jul;23(3):490-2.
15. Kojima T, Okamoto I, Miyazaki T, Chikasue F, Yashiki M, Nakamura K. Detection of methamphetamine and amphetamine in a skeletonized body buried for 5 years. Forensic Sci Int 1986 Jun;31(2):93-102.
16. Winek CL, Esposito FM. Comparative study of ethanol levels in blood versus bone marrow, vitreous humor, bile and urine. Forensic Sci Int 1981 Jan-Feb;17(1):27-36.
17. Winek CL, Jones T. Blood versus bone marrow ethanol concentrations in rabbits and humans. Forensic Sci Int 1980 Sep-Oct;16(2):101-9.
18. Maeda H, Zhu BL, Ishikawa T, Oritani S, Michiue T, Li DR, et al. Evaluation of post-mortem ethanol concentrations in pericardial fluid and bone marrow aspirate. Forensic Sci Int 2006 Sep 12;161(2-3):141-3.
19. Schloegl H, Rost T, Schmidt W, Wurst FM, Weinmann W. Distribution of ethyl glucuronide in rib bone marrow, other tissues and body liquids as proof of alcohol consumption before death. Forensic Sci Int 2006 Jan 27;156(2-3):213-8.
20. Bévalot F, Dujourdy L, Fanton L, Cartiser N, Magné L, Besacier F, et al., editors. Statistic interpretation of meprobamate concentrations in bone marrow, vitreous and bile. Proceedings of International Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists; 2008 February 18-23; Washington, United States of America.
21. Winek CL, Susa D. Blood versus bone marrow methanol concentrations in rabbits. Forensic Sci Int 1982 Mar-Apr;19(2):165-75.
22. Winek CL, Janssen JK. Blood versus bone marrow isopropanol concentrations in rabbits. Forensic Sci Int 1982 Jul-Aug;20(1):11-20.
23. Winek CL, Costantino AG, Wahba WW, Collom WD. Blood versus bone marrow pentobarbital concentrations. Forensic Sci Int 1985 Jan;27(1):15-24.
24. Winek CL, Pluskota M, Wahba WW. Plasma versus bone marrow flurazepam concentration in rabbits. Forensic Sci Int 1982 Mar-Apr;19(2):155-63.
25. Winek CL, Morris EM, Wahba WW. The use of bone marrow in the study of postmortem redistribution of nortriptyline. J Anal Toxicol 1993 Mar-Apr;17(2):93-8.
26. Winek CL, Westwood SE, Wahba WW. Plasma versus bone marrow desipramine: a comparative study. Forensic Sci Int 1990 Nov;48(1):49-57.
27. Winek CL, Cibulas W, Jr., Wahba WW. A comparative study of ethchlorvynol levels in blood versus bone marrow. Forensic Sci Int 1981 May-Jun;17(3):197-202.

28. Cengiz S, Ulukan O, Ates I, Tugcu H. Determination of morphine in postmortem rabbit bone marrow and comparison with blood morphine concentrations. Forensic Sci Int 2006 Jan 27;156(2-3):91-4.
29. FDA. Bioanalytical method validation. consulté le 29 avril 2011: Center for Drug Evaluation and Research of the U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration; 2001 [updated 2001; cited 2011 April]; Available from: http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm064964.htm.
30. Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, et al. Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress. Pharm Res 2000 Dec;17(12):1551-7.
31. Vinson C. Modèles pharmacocinétiques basés sur la physiologie et analyse d'incertitude: Application de l'analyse de sensibilité et l'analyse de Monte Carlo à l'étude de la variabilité pharmacocinétique de molécules en développement. Lyon: Université Lyon 1 - Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques; 2004.
32. Rowland M, Balant L, Peck C. Physiologically based pharmacokinetics in Drug Development and Regulatory Science: a workshop report (Georgetown University, Washington, DC, May 29-30, 2002). AAPS J 2004;6(1):56-67.
33. Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. Clin Pharmacokinet 2002;41(12):913-58.
34. Murdoch D, Keam SJ. Escitalopram: a review of its use in the management of major depressive disorder. Drugs 2005;65(16):2379-404.
35. Rao N. The clinical pharmacokinetics of escitalopram. Clin Pharmacokinet 2007;46(4):281-90.
36. Riss J, Cloyd J, Gates J, Collins S. Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics. Acta Neurol Scand 2008 Mar 31.
37. Tanaka E. Clinically significant pharmacokinetic drug interactions with benzodiazepines. J Clin Pharm Ther 1999 Oct;24(5):347-55.
38. VIDAL Drug Compendium edition t, editor. France; 2008.
39. Toxnet: ChemID plus. [cited 2011 06/03]; Available from: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CHEM.
40. DrugBank. [cited 2011 06/03]; Available from: http://www.drugbank.ca/.
41. Kwon JW, Armbrust KL. Aqueous solubility, n-octanol-water partition coefficient, and sorption of five selective serotonin reuptake inhibitors to sediments and soils. Bull Environ Contam Toxicol 2008 Aug;81(2):128-35.

42. Moffat AC. Clarke's Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. 2nd edition ed. London, UK: The Pharmaceutical Press; 1986.
43. Baselt RC. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 6th edition ed. Foster City, CA: Biomedical Publications; 2002.
44. D'argenio DZ, Schumitzky A. Adapt II User's Guide: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Systems Analysis Software. Los Angeles: Biomedical Simulations Resource; 1997.
45. Levitt DG. The pharmacokinetics of the interstitial space in humans. BMC Clin Pharmacol 2003 Jul 30;3:3.
46. Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. Pharm Res 1993 Jul;10(7):1093-5.
47. Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR, Beliles RP. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. Toxicol Ind Health 1997 Jul-Aug;13(4):407-84.
48. Sweeney LM, Kirman CR, Gannon SA, Thrall KD, Gargas ML, Kinzell JH. Development of a physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for methyl iodide in rats, rabbits, and humans. Inhal Toxicol 2009 May;21(6):552-82.
49. West GB, Brown JH, Enquist BJ. The fourth dimension of life: fractal geometry and allometric scaling of organisms. Science 1999 Jun 4;284(5420):1677-9.
50. West GB, Brown JH, Enquist BJ. A general model for the origin of allometric scaling laws in biology. Science 1997 Apr 4;276(5309):122-6.
51. Clewell HJ, 3rd, Jarnot BM. Incorporation of pharmacokinetics in noncancer risk assessment: example with chloropentafluorobenzene. Risk Anal 1994 Jun;14(3):265-76.
52. Bezchlibnyk-Butler K, Aleksic I, Kennedy SH. Citalopram--a review of pharmacological and clinical effects. J Psychiatry Neurosci 2000 May;25(3):241-54.
53. Jack ML, Colburn WA. Pharmacokinetic model for diazepam and its major metabolite desmethyldiazepam following diazepam administration. J Pharm Sci 1983 Nov;72(11):1318-23.
54. Kaplan SA, Jack ML, Alexander K, Weinfeld RE. Pharmacokinetic profile of diazepam in man following single intravenous and oral and chronic oral administrations. J Pharm Sci 1973 Nov;62(11):1789-96.
55. Mandelli M, Tognoni G, Garattini S. Clinical pharmacokinetics of diazepam. Clin Pharmacokinet 1978 Jan-Feb;3(1):72-91.

56. Kragh-Sorensen P, Overo KF, Petersen OL, Jensen K, Parnas W. The kinetics of citalopram: single and multiple dose studies in man. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) 1981 Jan;48(1):53-60.
57. Joffe P, Larsen FS, Pedersen V, Ring-Larsen H, Aaes-Jorgensen T, Sidhu J. Single-dose pharmacokinetics of citalopram in patients with moderate renal insufficiency or hepatic cirrhosis compared with healthy subjects. Eur J Clin Pharmacol 1998 May;54(3):237-42.
58. Boer F. Drug handling by the lungs. Br J Anaesth 2003 Jul;91(1):50-60.
59. Kugelberg FC, Kingback M, Carlsson B, Druid H. Early-phase postmortem redistribution of the enantiomers of citalopram and its demethylated metabolites in rats. J Anal Toxicol 2005 May-Jun;29(4):223-8.
60. Horak EL, Jenkins AJ. Postmortem tissue distribution of olanzapine and citalopram in a drug intoxication. J Forensic Sci 2005 May;50(3):679-81.
61. Luchini D, Morabito G, Centini F. Case report of a fatal intoxication by citalopram. Am J Forensic Med Pathol 2005 Dec;26(4):352-4.
62. Levine B, Zhang X, Smialek JE, Kunsman GW, Frontz ME. Citalopram distribution in postmortem cases. J Anal Toxicol 2001 Oct;25(7):641-4.
63. Anastos N, McIntyre IM, Lynch MJ, Drummer OH. Postmortem concentrations of citalopram. J Forensic Sci 2002 Jul;47(4):882-4.
64. Fu K, Konrad RJ, Hardy RW, Brissie RM, Robinson CA. An unusual multiple drug intoxication case involving citalopram. J Anal Toxicol 2000 Oct;24(7):648-50.
65. Cartiser N, Bevalot F, Fanton L, Gaillard Y, Guitton J. State-of-the-art of bone marrow analysis in forensic toxicology: a review. Int J Legal Med 2010 Nov 9. [Epub ahead of print] Nov 9.
66. Crifasi JA, Bruder MF, Long CW, Janssen K. Performance evaluation of thermal desorption system (TDS) for detection of basic drugs in forensic samples by GC-MS. J Anal Toxicol 2006 Oct;30(8):581-92.
67. Liu X, Van Natta K, Yeo H, Vilenski O, Weller PE, Worboys PD, et al. Unbound drug concentration in brain homogenate and cerebral spinal fluid at steady state as a surrogate for unbound concentration in brain interstitial fluid. Drug Metab Dispos 2009 Apr;37(4):787-93.
68. Unceta N, Ugarte A, Sanchez A, Gomez-Caballero A, Goicolea MA, Barrio RJ. Development of a stir bar sorptive extraction based HPLC-FLD method for the quantification of serotonin reuptake inhibitors in plasma, urine and brain tissue samples. J Pharm Biomed Anal 2010 Jan 5;51(1):178-85.

69. Wang NS, Lemmer B. Determination of citalopram in plasma and brain tissue of the rat by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. J Chromatogr 1989 Mar 24;488(2):492-7.
70. Wille SM, De Letter EA, Piette MH, Van Overschelde LK, Van Peteghem CH, Lambert WE. Determination of antidepressants in human postmortem blood, brain tissue, and hair using gas chromatography-mass spectrometry. Int J Legal Med 2009 Nov;123(6):451-8.
71. Kudo K, Nagata T, Kimura K, Imamura T, Noda M. Sensitive determination of diazepam and N-desmethyldiazepam in human material using capillary gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr 1988 Oct 14;431(2):353-9.
72. Shiota H, Nakashima M, Terazono H, Sasaki H, Nishida K, Nakamura J, et al. Postmortem changes in tissue concentrations of triazolam and diazepam in rats. Leg Med (Tokyo) 2004 Oct;6(4):224-32.
73. Jenkins AJ, Levine B, Locke JL, Smialek JE. A fatality due to alprazolam intoxication. J Anal Toxicol 1997 May-Jun;21(3):218-20.
74. Moriya F, Hashimoto Y. Tissue distribution of nitrazepam and 7-aminonitrazepam in a case of nitrazepam intoxication. Forensic Sci Int 2003 Jan 28;131(2-3):108-12.
75. Moriya F, Hashimoto Y. A case of fatal triazolam overdose. Leg Med (Tokyo) 2003 Mar;5 Suppl 1:S91-5.
76. Takatori T, Tomii S, Terazawa K, Nagao M, Kanamori M, Tomaru Y. A comparative study of diazepam levels in bone marrow versus serum, saliva and brain tissue. Int J Legal Med 1991;104(4):185-8.
77. Zhang XX, Kudo K, Imamura T, Jitsufuchi N, Nagata T. Sensitive determination of bromazepam in human tissues using capillary gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Appl 1996 Feb 23;677(1):111-6.