



HAL
open science

Intérêt d'une méthode enzymatique pour le diagnostic des intoxications par GHB/GBL

Marion Soichot, Marion Leclercq, Marie Allard, Amine Mihoubi, Hervé Gourlain, Emmanuel Bourgogne, Bruno Megarbane, Laurence Labat

► To cite this version:

Marion Soichot, Marion Leclercq, Marie Allard, Amine Mihoubi, Hervé Gourlain, et al.. Intérêt d'une méthode enzymatique pour le diagnostic des intoxications par GHB/GBL. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 2019, 31, pp.106 - 115. 10.1016/j.toxac.2019.03.137 . hal-03484996

HAL Id: hal-03484996

<https://hal.science/hal-03484996>

Submitted on 20 Dec 2021

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

Intérêt d'une méthode enzymatique pour le diagnostic des intoxications par GHB/GBL

Usefulness of enzymatic method in the diagnosis of GHB/GBL poisoning

Marion SOICHOT¹, Marion LECLERCQ¹, Marie ALLARD¹, Amine MIHOUBI¹, Hervé GOURLAIN¹, Emmanuel BOURGOGNE¹, Bruno MEGARBANE^{2,3}, Laurence LABAT^{1,3*}

1 Laboratoire de Toxicologie Biologique, Hôpital Lariboisière, 2 rue Ambroise Paré, 75010 Paris, France

2 Réanimation Médicale et Toxicologique, Hôpital Lariboisière, 2 rue Ambroise Paré, 75010 Paris, France

3 INSERM UMR-S 1144, Universités (Paris Descartes – Paris Diderot), France

*auteur correspondant

Laurence LABAT

Laboratoire de Toxicologie Biologique, Hôpital Lariboisière, 2 rue Ambroise Paré, 75010 PARIS

laurence.labat@aphp.fr

Résumé

Le GHB ou gamma-hydroxybutyrate utilisé comme anesthésique ou dans le traitement de la narcolepsie a été détourné pour un usage à des fins récréatives comme dans les cas de soumission chimique dans les années 90. Plus récemment de nouveaux modes de consommation de GHB/GBL sont décrits dans le cadre d'une utilisation festive. Le GHB, incolore et inodore et le GBL, solvant industriel incolore précurseur du GHB, sont facilement transportables sous forme de « doses » par les usagers dans les établissements festifs. Depuis la fin des années 2000, le GHB/GBL est également utilisé dans le cadre privé du *chemsex* en s'inscrivant dans une recherche d'endurance et de performance sexuelle. Une augmentation récente de l'intérêt que porte la population autour du GHB/GBL est observée depuis 2017. Suite à la médiatisation des cas de comas intervenus dans les lieux festifs parisiens au début de l'année 2018, le laboratoire de Toxicologie de l'hôpital Lariboisière a fait évoluer sa stratégie de dépistage et de dosage du GHB/GBL pour une réponse rapide rendue 24/24, visant à aider le diagnostic du clinicien en charge d'un patient présentant un coma suspecté d'origine toxique.

Le dépistage et le dosage du GHB dans le plasma et les urines étaient jusqu'à présent réalisés par une méthode validée en GC/MS. A partir de 2018, un test enzymatique (Bühlmann Laboratories AG) pour un dosage dans le plasma ou les urines est proposé sur un automate de chimie en routine qui fonctionne 24/24. Pour chaque dosage de GHB, le dosage d'éthanol est réalisé pour apprécier l'éventuelle interférence décrite entre l'éthanol et cette méthode enzymatique.

La méthode enzymatique utilise une gamma-hydroxybutyrate deshydrogénase en présence de NAD⁺. L'analyse de précision et de justesse réalisée sur trois contrôles de qualité interne (n=10) montrent des CV<13,3%. La méthode est linéaire entre 5 et 250 mg/L. Les tests de dilutions pour 1/10 et 1/50 sont validés sur des échantillons patients. Une comparaison des

concentrations plasmatiques et urinaires de GHB mesurées en méthode enzymatique et en GC/MS (n= 46) montre une très bonne corrélation ($r^2 > 0,983$) pour des concentrations variant entre 5 et 10059 mg/L. Sur la période entre octobre 2017 et mai 2018, 30 cas d'intoxications au GHB/GBL ont été observés. Ce sont en majorité des hommes (plus de 80%), avec une médiane d'âge de 29 ans, consommateurs dans des contextes festifs (> 52%) et multiconsommateurs (plus de 40% consommateur de cocaïne et près de 30% de boissons alcoolisées, de MDMA et d'amphétamines). Un cas de décès a été observé non imputé au tableau toxicologique.

Ce test rapide enzymatique sur automate de chimie apparaît après environ sept mois d'expérience tout à fait adapté à une stratégie de dépistage et dosage 24/24 en cas de suspicion d'intoxication par le GHB/GBL. En 2019, il contribue à la prise en charge optimale des patients admis pour coma avec suspicion de consommation de GHB/GBL, souvent à l'origine de concentrations élevées.

Abstract

GHB or gamma-hydroxybutyrate, prescribed as anesthetics or for narcolepsy treatment, has been misused for recreational purposes including for sexual drug-facilitated crimes in the 1990s. More recently, new recreational patterns of GHB/GBL consumption have been emerged. GHB, a colorless and odorless liquid and GBL, a colorless industrial solvent, parent compound of GHB, can be carried easily as « doses » by users during parties. In the late 2000s, GHB/GBL has also been used in *chemsex* parties by people seeking endurance and sexual performance. Increasing interest for GHB/GBL has been recently observed since 2017. To address issues related to this renewed interest, mainly after media coverage of comatose users found in recreational scenes in Paris at the beginning of 2018, the toxicology laboratory

of Lariboisière Hospital have changed its GHB detection and quantification strategy for rapid 24/24 response to help clinicians in charge of patients with presumed drug-related comas.

Detection and determination of GHB concentrations in urine and plasma were usually analyzed using GC/MS method. In 2018, an enzymatic assay (Bühlmann Laboratories AG) for concentration measurement in plasma and urine was adapted on an analyzer for routine 24/24 use. For each determination, ethanol concentration was measured in plasma or urine to estimate ethanol interference.

This enzymatic assay is based on NAD⁺-dependent gamma-hydroxybutyrate deshydrogenase. Accuracy and precision were estimated on three internal quality controls (n=10) with CV<13.3%. Linearity was observed between 5 and 250 mg/L. Dilution tests 1/10 and 1/50 were validated with patient samples. A comparative study with GHB concentrations in plasma and urine measured with enzymatic assay and GC/MS (n =46) showed excellent correlation ($r^2 > 0,983$) for concentrations ranging between 5 and 10059 mg/L.

From October 2017 to May 2018, 30 cases of GHB/GBL poisonings were admitted to the hospital. The majority were men (>80%) with a median age of 29 years, recreational drug users (>52%) and multidrug consumers (cocaine in >40% and ethanol, MDMA and amphetamines in nearly 30%). Only one fatality was observed, not attributed to the drug use. This rapid enzymatic assay using a clinical chemistry analyzer seems adapted to 24/24 GHB/GBL screening after about seven months. In 2019, it routinely contributes to the optimal management of comatose patients with suspected GHB/GBL exposure, resulting often in elevated blood concentrations.

Mots clés

GHB – GBL – test enzymatique – test rapide

Introduction

Le GHB (gamma-hydroxybutyrate) est un neurotransmetteur endogène, métabolite du GABA (gamma-aminobutyrate) qui a été synthétisé dans le début des années 60 pour être utilisé pour ses propriétés amnésiantes et sédatives comme anesthésique et dans le traitement de la narcolepsie. Il est d'ailleurs commercialisé en France sous le nom de Xyrem® pour le traitement de la cataplexie dans la narcolepsie mais il peut être également utilisé dans le traitement du sevrage alcoolique [1-3]. Dans les années 80, son usage récréatif se développe notamment aux Etats Unis chez les bodybuilders qui trouvent à le consommer dans des suppléments alimentaires [1]. Ces dernières années son utilisation fréquemment détournée, notamment pour soumission chimique, fait qu'il est communément appelé « drogue du viol » et de nombreux cas sont alors décrits dans la littérature, même si ce statut est largement exagéré [4]. C'est une des raisons pour laquelle, il a ainsi été classé en 1999 comme stupéfiant en France [5].

Plus récemment, de nouveaux modes festifs de consommation de GHB/GBL sont décrits, notamment dans la capitale parisienne [5]. Le GBL (gamma butyrolactone) est un solvant industriel précurseur du GHB dont l'ingestion entraîne les mêmes effets que le GHB. Il se consomme dans les établissements festifs mais il est également utilisé dans le cadre privé du *chemsex* en s'inscrivant dans une recherche d'endurance et de performance sexuelle. Une augmentation récente de l'intérêt que porte la population autour du GHB/GBL est observée depuis 2017 [5]. Il est utilisé dans les grandes villes françaises et en particulier à Paris par des personnes aimant fréquenter des salles, des clubs ou des bars, hors sexe et il devient une alternative festive au MDMA ou à la cocaïne. Ainsi, une population différente et plus large est attirée par ces consommations dans les soirées festives. Ce sont des personnes aimant les lieux où l'on peut consommer de la drogue, à prix réduit dans une ambiance musicale branchée [5].

En raison du classement de son métabolite le GHB comme stupéfiant, de sa vente libre sur internet comme produit de dégraissage des jantes de voiture, de son faible prix (40 à 70 euros le demi-litre), la consommation du GBL augmente. Il est apporté par les consommateurs dans les lieux festifs en petites doses, facilement transportables, le plus souvent dans des petites bouteilles, des pipettes ou des seringues. Sur le lieu festif, le consommateur l'ajoute à sa propre boisson dans des volumes définis par lui-même en fonction de sa propre expérience, en général entre 1 et 2 mL.

Lorsque des petites doses (de l'ordre de 20 à 30 mg/kg chez l'homme) sont consommées, les effets observés sont l'euphorie, la désinhibition et la somnolence. Des doses plus élevées entraînent des effets sédatifs, la perte de mémoire ainsi que des états comateux [6]. Des décès sont également décrits après consommation de GHB/GBL avec une dépression cardiovasculaire et respiratoire [7].

De nombreuses méthodes chromatographiques sont décrites dans la littérature et résumées dans une revue générale en 2014 [8] décrivant l'identification et le dosage du GHB dans les différents milieux biologiques en toxicologie clinique et médico-légale (plasma, sang, urine, tissus et matrices alternatives : cheveux, salive, sueur, spots de sang séché...) [8, 9]. Les méthodes les plus couramment décrites dans la littérature restent les méthodes spécialisées en chromatographie de phase gazeuse ou liquide couplée à de la détection en spectrométrie de masse. Cependant en 2011, une méthode enzymatique permettant le dosage dans le sérum et l'urine du GHB est décrite par une société Suisse qui commercialise le kit sur un automate classique de chimie [10]. En 2012, Grenier *et al* adapte cette méthode sur d'autres matrices comme le sang total et l'humeur vitrée en toxicologie médico-légale [11]. Dans un contexte de nouvelles consommations de GHB/GBL à Paris, il est apparu indispensable de mettre en place cette méthode de dosage enzymatique dans un laboratoire fonctionnant dans un contexte d'urgence 24/24. Après une période d'essai où l'ensemble des résultats étaient confirmés par

une ancienne méthode en chromatographie phase gaz couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS), les résultats de validation rapide sur un automate de chimie et la corrélation sur des échantillons plasmatiques et urinaires pendant une période de sept mois ont été réalisés. Ce travail présente ces premiers résultats et la description de la population prise en charge sur le site de Lariboisière par les Urgences et les services de Réanimations dans les mois qui ont suivi l'alerte lors de la recrudescence de la consommation de GHB/GBL dans les milieux festifs à Paris. Ces résultats permettent de compléter les premières données décrites sur ce phénomène par l'Observatoire Français des Drogues et Toxicomanies (OFDT) [5].

Matériels et méthodes

Calibrateurs, contrôles de qualité

Les calibrateurs et deux des contrôles internes de qualité sont commercialisés par la société Bühlmann Laboratories AG (Schönenbuch, Switzerland). Les calibrateurs utilisés ont des concentrations en GHB de 10 et 100 mg/L et sont reconstitués avec de l'eau désionisée. Deux contrôles urinaires bas et élevés sont utilisés dont les cibles des concentrations se situent respectivement dans des fourchettes entre 10 et 20 mg/L (contrôle niveau 1) et entre 60 et 90 mg/L (contrôle niveau 2). Il s'agit de GHB lyophilisé dans de l'urine humaine reconstitué avec de l'eau désionisée. Un troisième contrôle UTAK GHB 20 (concentration cible de 20 mg/L dans les urines) de la Société UTAK (Chilly Mazarin, France) est également utilisé comme contrôle de qualité interne.

Réactifs utilisés sur automate de chimie

Le test de dépistage avec l'ensemble des réactifs est commercialisé par la société Bühlmann Laboratories AG (Schönenbuch, Switzerland). Il comprend trois réactifs : le cofacteur qui est du NAD⁺ lyophilisé, l'enzyme recombinante lyophilisée qui est une GHB déshydrogénase,

tous les deux reconstitués dans de l'eau désionisée et le tampon d'incubation, du 2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol dans un tampon Tris-HCl [10].

Validation rapide de la méthode de dosage enzymatique sur l'automate c4000®

L'automate de chimie sur lequel a été réalisé cette étude est un c4000® de chez Abbott (Rungis, France). Avant d'utiliser ce test sur les prélèvements de patients hospitalisés, une validation rapide a été réalisée sur l'automate. Trois contrôles de qualité (CQ niveau 1, CQ niveau 2 et UTAK GHB 20) ont permis une étude de la répétabilité en intra-jour sur la même série (n=10) et une étude de la fidélité intermédiaire en inter-jour sur 10 séries différentes réalisée sur 10 jours différents (n=10). La reproductibilité est exprimée par un coefficient de variation (inférieur à 15%) et la précision par le pourcentage d'écart par rapport à la concentration théorique (inférieur à 15%) [12].

Enfin, l'effet dilution a été validé pour deux facteurs : dilution 1/10 réalisée automatiquement par le c4000® à partir d'un plasma et d'une urine de patients (n = 10) et dilution 1/50 réalisée manuellement sur un prélèvement urinaire de patients (n=10). La précision et la reproductibilité sont estimées. Pour le calcul de la précision, les concentrations théoriques avant dilution sont celles mesurées par la méthode de référence en GC/MS [13].

Une inscription à un contrôle de qualité externe (CQE) dans le plasma de chez Arvecon GmbH (Walldorf, Germany) a été réalisée pendant la période de l'étude.

Une étude de corrélation a été réalisée sur 46 prélèvements plasmatiques et urinaires, positifs en méthode enzymatique et dont le volume était suffisant pour qu'ils soient également analysés en GC/MS.

Population étudiée

Les patients de cette étude sont des patients admis aux Urgences, dans les services de Réanimation et notamment en Réanimation Médicale Toxicologique de l'Hôpital Lariboisière pour la grande majorité entre octobre 2017 et mai 2018 (n= 106) pour lesquels 144 prélèvements de plasma ou urine ont été transmis au laboratoire avec une demande de dépistage de GHB dans le cadre d'une suspicion d'intoxication. Pour ne pas biaiser l'étude descriptive avec des patients dont les concentrations positives peuvent correspondre à du GHB endogène, une sélection a été réalisée pour ceux dont les concentrations étaient supérieures à 5 mg/L dans le plasma ou supérieures à 10 mg/L dans les urines après confirmation en GC/MS [9]. Ces demandes spécifiques de GHB/GBL sont ajoutées aux demandes globales de screening toxicologique sur plasma et urine. Pour les urines, une recherche des drogues classiques est réalisée par des méthodes immunologiques sur le même automate type c4000[®] Architect (Abbott, Rungis, France) avec des tests urinaires de dépistage de chez Abbott. Pour le plasma, un screening sur LC/MS-DAD est réalisé. Tout dépistage positif de médicaments ou drogues par ces premières étapes de screening est confirmé par des méthodes spécialisées en GC/MS et LC/MSMS selon les procédures habituelles du laboratoire [14, 15]. Un dosage d'éthanol par méthode enzymatique est également systématiquement associé à la demande de dépistage de GHB quel que soit le type de matrice.

Pendant le temps de l'étude, toutes les demandes de dépistage de GHB ont été confirmées par une méthode en GC/MS lorsque le volume de prélèvement le permettait [13]. La corrélation entre les deux méthodes enzymatique et GC/MS est réalisée par une étude de régression linéaire sur 46 échantillons (26 échantillons d'urines et 20 échantillons de plasma) prélevés chez les 30 patients pour lesquels une intoxication en GHB/GBL a été confirmée par les résultats du laboratoire pour les deux techniques.

Résultats

Validation de la méthode de dosage enzymatique sur l'automate c4000®

Les résultats des études de reproductibilité et précision sur les 3 contrôles de qualité sont résumés dans le tableau 1. Ils sont satisfaisants pour une validation de méthode sur l'automate de type c4000®. Les résultats de l'effet dilution ont été validés pour les deux dilutions, avec des pourcentages d'écart et un CV de reproductibilité toujours inférieurs à 15%.

Les résultats du CQE 2018 (2 échantillons, 3 séries) montrent des résultats satisfaisants avec des pourcentages d'écart situés entre 0,0 et 8,3 % pour des valeurs cibles entre 21,6 et 72,0 mg/L avec une participation au minimum de 33 laboratoires toutes techniques confondues (données non montrées).

Une étude de corrélation est réalisée pour l'ensemble des prélèvements (n=46) dont les concentrations sont supérieures à 5 mg/L en GHB en méthode enzymatique (figure 1). On observe une bonne corrélation ($r^2 > 0,983$) pour des concentrations entre 5 mg/L et 10059 mg/L. Pour toutes les concentrations supérieures à 250 mg/L, un facteur de dilution a été appliqué pour se situer dans la zone de linéarité de la méthode selon les recommandations du fournisseur.

Population étudiée

Parmi les 106 patients étudiés, on a observé pour 30 d'entre eux des concentrations en GHB supérieures à 5 mg/L en méthode enzymatique sur l'automate c4000® dans le plasma et/ou dans les urines. Quand le volume des prélèvements le permettait, les résultats négatifs et positifs ont été confirmés en GC/MS. Sur les 63 prélèvements positifs en méthode enzymatique, on observe cinq faux positifs dans le plasma pour des concentrations mesurées entre 6 et 9 mg/L proches des concentrations endogènes (pour trois d'entre eux l'alcoolémie était supérieure à 0,5 g/L) (tableau 2). Dans les urines, douze faux positifs avec des

concentrations mesurées entre 5,2 et 12,6 mg/L (tableau 2). Pour huit de ces prélèvements, les concentrations en éthanol supérieures à 0,5 g/L (entre 0,5 et 5,8 g/L) expliquent également par une interférence les valeurs discordantes. Enfin, sur 67 prélèvements négatifs en méthode enzymatique, seuls trois n'ont pas été confirmés négatifs en GC/MS pour des valeurs mesurées inférieures ou très proche de la limite de quantification de la méthode enzymatique (3,2 mg/L, 3,5 mg/L et 7,8 mg/L).

Dans la population étudiée, pour des concentrations plasmatiques supérieures à 5 mg/L et des concentrations urinaires supérieures à 10 mg/L, on observe ainsi 30 patients ayant consommé du GHB/GBL hospitalisés dans les services des Urgences et de Réanimations de l'hôpital Lariboisière pendant la période étudiée entre octobre 2017 et mai 2018. Une étude des dossiers de ces patients permet de décrire les caractéristiques sociodémographiques, le contexte de prise, les consommations associées lors de l'intoxication par le GHB/GBL, les consommations déclarées habituelles, la durée de l'hospitalisation et le nombre de décès. Ces données sont résumées dans la figure 2 et dans le tableau 3. Il apparaît une population majoritairement constituée d'hommes (plus de 80%) jeunes avec une médiane d'âge de 29 ans qui ont consommé du GHB/GBL pour une majorité dans un contexte festif (52%). On retrouve également une consommation en milieu privé dans des situations de *chemsex* mais en pourcentage beaucoup plus faible.

Dans les consommations déclarées, plus de 40% disent consommer de la cocaïne, et plus de 20% du MDMA ou du cannabis. 40% de cette population déclare avoir déjà consommé du GHB/GBL. La distinction entre ingestion de GHB ou GBL n'est pas toujours bien décrite. La majorité correspond à des consommateurs réguliers d'alcool. Dans la population étudiée, un seul décès est observé. Il s'agit d'un patient de réanimation, décédé des suites d'un accident vasculaire cérébral ischémique sans rapport avec une intoxication.

Pour la majorité des patients pris en charge dans le service de Réanimation Médicale Toxicologique, le diagnostic comprend systématiquement un suivi toxicologique avec un bilan d'entrée global dans lequel près de 40% sont positifs en cocaïne (dépistage de benzoylecgonine urinaire), un tiers positifs en amphétamines ou MDMA et plus d'un tiers dépistés positifs en benzodiazépines.

Discussion

Ces premiers résultats montrent la possibilité d'utiliser un test enzymatique rapide sur un automate de chimie pour le dosage du GHB dans un contexte d'urgence dans un laboratoire hospitalier 24/24. C'est un test suffisamment sensible avec trois faux positifs et près de 94% de sensibilité calculée dans notre étude (tableau 2). Il est de plus rapide et simple permettant une approche quantitative dans des matrices biologiques utilisées en clinique. Ce test a été commercialisé en 2009 et son utilisation validée sur différents types d'automates mais qui parfois ne sont plus commercialisés [10, 11]. Dans notre étude, nous utilisons ce test avec les mêmes réactifs et la même calibration pour les urines et pour le plasma. Grenier *et al* en 2012 adaptent ce test enzymatique sur un automate de chimie pour de la toxicologie médico-légale à d'autres types de matrices comme le sang total ou l'humeur vitré [11]. Notre étude est la première décrite en France utilisant ce test sur un automate de chimie type c4000®.

Le laboratoire réalisait jusqu'en 2017 le dépistage et le dosage du GHB dans les urines et le plasma par une méthode en GC/MS qui ne répondait plus à une demande urgente dans le cadre d'une activité 24/24 [13]. Le changement de stratégie pour dépister et doser le GHB est directement lié au contexte de consommation plus fréquente de GHB/GBL, récemment observé dans les milieux festifs à Paris. Les alertes de fin d'année 2017 [5] et le nombre croissant de demande de dosages par les urgences et les services de réanimations nous ont

alertés quant à la nécessité d'implanter ce test dans notre laboratoire dans une activité d'urgence 24/24.

La toxicocinétique connue du GHB/GBL, la présence de GHB endogène, les conditions de stabilité et de conservation des prélèvements sont cependant des points importants à connaître pour une meilleure interprétation des résultats [8]. Le GHB est présent physiologiquement à des concentrations faibles dans les matrices biologiques et peut également être produit *in vitro* notamment dans les échantillons sanguins [9, 16]. Pour distinguer le GHB exogène du GHB endogène, il est bien établi qu'il est fondamental de situer les « cut off » de ces méthodes de dosage à 5 mg/L dans le plasma et 10 mg/L dans les urines [3, 8]. La méthode enzymatique présentant un seuil de quantification à 5 mg/L, seuls les résultats supérieurs à 10 mg/L dans les urines seront interprétés comme liés à une prise exogène de GHB/GBL. Les échantillons doivent également être collectés le plus vite possible après l'ingestion en raison d'un métabolisme rapide du GHB/GBL et d'une demi-vie plasmatique très courte de l'ordre de 30 minutes. En conséquence, le GHB reste difficilement détectable dans les fluides biologiques avec des fenêtres de détection étroites entre 5 et 6 heures par exemple dans le plasma [3, 8, 9, 17, 18]. Dans les urines, elle est augmentée même si les fenêtres sont en général inférieures à 12 heures [8]. Il est également décrit spécifiquement pour le GBL, en raison du caractère plus lipophile de ce produit, une absorption rapide et complète par voie orale avec une biodisponibilité supérieure au GHB. Les concentrations ainsi obtenues après métabolisation en GHB sont plus élevées que celles mesurées pour une prise équivalente en GHB.

Notre étude montre pour une validation réalisée sur trois contrôles de qualités internes des résultats satisfaisants répondant aux critères classiques de validation de l'EMA [12]. Il nous a semblé intéressant d'ajouter un contrôle d'un autre fournisseur proche des valeurs basses, zone plus difficile d'interprétation d'un tableau d'intoxication. De plus, ces trois contrôles internes étant des contrôles urinaires, il est également important d'être inscrit à un programme

de CQE disponible dans le plasma. D'autre part, le test enzymatique utilisé permet une quantification sans dilution pour des concentrations entre 5 et 250 mg/L et jusqu'à 2500 mg/L par dilution automatique au 1/10. Pour des concentrations plus élevées, notamment pour les urines, on peut être amené à réaliser une dilution manuelle (1/50) avec des concentrations observées dans notre étude jusqu'à 10059 mg/L. Nos premiers résultats de validation nous permettent de réaliser une étude de corrélation sur une série de patients pendant une période de sept mois avant de pouvoir utiliser le test enzymatique dans le laboratoire d'urgence 24/24. L'étude a été réalisée sur 106 patients hospitalisés avec 144 prélèvements mais seuls les prélèvements dont les concentrations étaient supérieures à la limite de quantification de la méthode enzymatique ont été retenus pour l'étude de corrélation avec la méthode en GC/MS. Ainsi, 46 prélèvements de 30 patients pour lesquels une concentration en GHB était supérieure à 5 mg/L dans le plasma et les urines ont été retenus. L'étude sur ces échantillons montre une excellente corrélation des résultats entre les deux méthodes.

L'étude des 30 patients intoxiqués par le GHB/GBL montre qu'une concentration supérieure à 5 mg/L est seulement observée sur le premier prélèvement plasmatique des patients. En effet, pour la plupart des patients un second prélèvement réalisé entre 4 et 24 heures après ne permet pas de quantifier le GHB (concentrations inférieures à la limite de quantification). Par contre, on observe pour la majorité des cas, une concentration en GHB urinaire mesurable sur les deux premiers prélèvements. Il est donc intéressant de réaliser le dépistage sur le plasma et les urines pour augmenter la fenêtre de détection notamment dans le cadre d'une prise en charge médicale plus tardive après l'ingestion.

Les interférences de ce test de dosage du GHB ont déjà été décrits [10, 11] avec notamment un croisement avec le GBL à hauteur de 4%. Cette interférence ne pose pas de problème dans l'interprétation des résultats en raison non seulement du faible pourcentage de croisement mais surtout du métabolisme de transformation du GBL en GHB extrêmement rapide connu

chez l'homme. Pour les autres possibilités d'interférences, les analogues du GHB ou précurseurs avec notamment l'1,4-butanediol, l'acide gamma hydroxy valérique, les acides alpha- et bêta-hydroxy butyriques ont été rapportés avec des taux de croisements négatifs pour des concentrations entre 100 et 1000 mg/L [10]. Par contre, un croisement avec l'éthanol dans le plasma ou les urines a été décrit à l'origine de faux positifs [8, 10] et explique la spécificité mesurée à 79% dans notre étude (tableau 2). A partir de concentrations supérieures à 0,5 g/L en éthanol, une relation équivalente entre 1,06 g/L d'éthanol et une valeur mesurée en GHB de 3 mg/L pour le test enzymatique est à considérer dans l'interprétation des résultats [10]. Cette interférence est maîtrisée dans notre bilan toxicologique 24/24 qui est toujours associé à un dosage d'éthanol par méthode enzymatique sur le même automate. Elle explique dans la majorité des cas les faux positifs observés pour les concentrations basses proches de la limite de quantification et la spécificité du test calculé de l'ordre de 79% dans le tableau 2. Nous observons cependant deux faux positifs avec des patients pour lesquels des concentrations mesurées de 8 et 9 mg/L en méthode enzymatique n'ont pas été confirmées en GC/MS. Pour ces patients les alcoolémies mesurées inférieures à la limite de quantification, et l'absence d'autres interférences ne nous ont pas permis d'expliquer ces résultats. Pour les urines, parmi les 13 faux positifs, seuls deux ont des concentrations supérieures à la concentration de 10 mg/L et ne s'expliquent pas par l'interférence avec l'éthanol. D'autre part, on observe un seul faux négatif non expliqué dans les urines avec une concentration en GHB mesurée à 7,8 mg/L en GC/MS (inférieure au cut off de 10 mg/L) et non quantifiée en méthode enzymatique (< 5 mg/L). Les deux autres cas de faux négatifs s'expliquent par la différence de limite de quantification entre les deux méthodes. Ainsi, pour aucun de ces 12 prélèvements urinaires, l'utilisation de la technique enzymatique n'a posé de problème d'interprétation.

Les concentrations observées dans le plasma pour les 30 patients sur le premier prélèvement ont une concentration moyenne de 236 +/- 177 mg/L (de 30 à 679 mg/L) avec une

concentration maximale de 679 mg/L observée pour un étudiant ayant bu par accident dans la bouteille d'un ami, qui contenait du GHB. Dans les urines, les concentrations observées sont plus élevées avec sur le premier prélèvement, une concentration moyenne de 1443 +/- 2130 mg/L (de 26 à 10059 mg/L) et la concentration maximale de 10059 mg/L observée pour le même patient ayant consommé par accident. Les concentrations que nous observons dans notre étude sont plus élevées que celles décrites dans l'étude de Schröck *et al*, après administration contrôlée d'une dose de 1,5 mL de GBL à deux volontaires sains. Dans cette étude, les concentrations plasmatiques maximales observées dans le plasma sont de 95 et 106 mg/L et dans les urines, les concentrations maximales sont de 120 et 140 mg/L [17]. D'autre part, Busardo *et al* en 2015 décrivent des concentrations de l'ordre de 100 mg/L pour des comportements euphoriques et de désinhibition alors que des concentrations plus élevées de l'ordre de 500 mg/L peuvent entraîner le décès par dépression cardiorespiratoire [9]. Les résultats de notre étude permettent de suggérer soit une prise de GHB/GBL plus importante que dans l'étude de Schrock *et al*, soit plusieurs prises dans la soirée de doses équivalentes. Après une prise en charge par le service de Réanimation, un seul décès est observé mais non imputable aux toxiques.

Cette étude sur une période de sept mois en 2017/2018 décrit une population de consommateurs jeunes, intégrés dans la vie professionnelle ou étudiante pour la majorité, ayant consommés du GHB/GBL souvent en association avec d'autres substances principalement en milieux festifs parisiens. Ces cas sont une illustration de la nouvelle augmentation de consommation de GBL dans un cadre festif décrite très récemment [5]. Ils doivent correspondre pour une majorité d'entre eux à une ou plusieurs prises de doses de l'ordre de 1 mL à 2 mL de GBL et permettent d'observer des concentrations beaucoup plus élevées que celle décrites notamment dans le cadre de soumissions chimiques [3]. Dans notre population, la prise d'autres substances comme l'alcool, les amphétamines, le MDMA, la

cocaïne, le cannabis ou les benzodiazépines semble assez fréquente et habituelle pour des consommateurs de GHB/GBL. Le groupe Euro-DEN décrit les mêmes substances associées dans une étude prospective européenne en 2013 regroupant 710 cas et conclut sur un état clinique plus sévère dans le cas d'associations GHB/GBL et autres substances [19].

Conclusion

La méthode enzymatique permet d'obtenir des résultats fiables, assez rapidement pour un dosage du GHB plasmatique ou urinaire. Elle peut être utilisée en première intention en activité 24/24, même si comme pour toute méthode enzymatique, il convient de rester prudent quant à l'interprétation des basses concentrations proches des concentrations endogènes et de prévoir une confirmation par méthode en spectrométrie de masse. Il est également recommandé de réaliser dans un même bilan, un dosage d'éthanol permettant de maîtriser l'interférence connue avec ce test. Dans les nouvelles situations de consommation de GHB/GBL dans les milieux festifs des grandes villes, cette méthode semble tout à fait adaptée en raison de la transformation rapide du GBL en GHB et des valeurs observées souvent élevées. Notre étude permet de montrer que le dosage du GHB en méthode enzymatique automatisée est un excellent outil à l'aide au diagnostic dans un contexte d'urgence en présence d'un coma suspect d'origine toxique, pour mieux orienter le patient vers un service spécialisé, éviter de réaliser des examens complémentaires à la recherche d'un diagnostic différentiel et prévoir l'évolution rapidement favorable. On notera ainsi dans notre série, l'évolution favorable des patients après une durée d'hospitalisation courte en réanimation et l'absence de décès imputable au GHB/GBL après prise en charge spécialisée optimale.

Conflits d'intérêt : Aucun

Remerciements :

Les auteurs remercient l'ensemble des techniciens du laboratoire de Toxicologie Biologique de l'Hôpital Lariboisière pour leur aide technique dans cette étude et en particulier Christel Grondin.

Références

- [1] Nicholson KL, Balster RL. GHB: A new and novel drug of abuse. *Drug Alcohol Depend.* 2001; 63: 1-22.
- [2] Caputo F, Vignoli T, Maremmani I, Bernardi M, Zoli G. Gamma hydroxybutyric acid (GHB) for the treatment of alcohol dependence: A review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2009; 6 : 1917-1929.
- [3] Busardo FP, Jones AW. Interpreting γ -Hydroxybutyrate concentrations for clinical and forensic purposes. *Clin. Toxicol.* 2018; 11 : 1-15.
- [4] Nemeth Z, Kun B, Demetrovics Z. The involvement of gamma-hydroxybutyrate in reported sexual assaults : systemic review. *J. Psychopharmacol.* 2010; 24 (9): 1281-1287.
- [5] Gérome C, Chevallier C, Cadet-Taïrou A, Nefau T, Batisse A, Djeddar S, Tissot N, Pfau G, Benso V. Surdoses de GHB/GBL: mise en perspective et état des lieux des données récentes. Saint Denis, OFDT : Note n°2018-01.
- [6] Chin RL, Sporer KA, Cullison B, Dyer JE, Wu TD. Clinical course of gamma-hydroxybutyrate overdose. *Ann. Emerg. Med.* 1998; 31: 716-722
- [7] Kalasinsky KS, Dixon MM, Schmunk GA, Kish S.J. Blood brain and hair GHB concentrations following fatal ingestion. *J. Forensic Sci.* 2001; 46: 728-730.
- [8] Ingels AS, Wille SM, Samyn N, Lambert WE, Stove CP. Screening and confirmation methods for GHB determination in biological fluids. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013; 406 (15): 3553 -3577.

- [9] Busardo FP, Jones AW. GHB pharmacology and toxicology: acute intoxication, concentrations in blood and urine in forensic cases and treatment of the withdrawal syndrome. *Curr. Neuropharmacol.* 2015; 13: 47-70.
- [10] Hasan L, Jermann T, Wéber J, Abrahamsson L, Sciotti MA, Böttcher M, Jöchle W, Gygax, Scholer A. An enzymatic method to determine γ -hydroxybutyric acid in serum and urine. *Ther. drug monit.* 2011; 33(6): 757-765.
- [11] Grenier V, Huppé G, Lamarche M, Mireault P. Enzymatic assay for GHB determination in forensic matrices. *J. Anal. Toxicol.* 2012; 36: 523-528.
- [12] Recommandations European Medicines Agency : [Document consulté sur le site <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/scientific-guidelines> le 28 janvier 2019]
- [13] Jamey C, Kintz P, Martrille L, Raul JS. Fatal combination with 3-methylmethcathinone (3-MMC) and gamma-hydroxybutyric acid (GHB). *J. Anal. Toxicol.* 2016; 40: 446-452.
- [14] Adamowicz P, Kala M. Simultaneous screening for and determination of 128 date-rape drugs in urine by gas chromatography electron ionization mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 2010; 198: 39-45.
- [15] French D. The challenges of LC/MSMS analysis of opiates and opioids in urine. *Bioanalysis* 2013 ; 5(22) : 2803-20.
- [16] Zörntlein S, Kopp A, Becker J, Kaufmann T, Röhrich J, Urban R. In vitro production of GHB in blood and serum samples under various storage conditions. *Tiaft Bulletin* 2011; 41 (2): 38-9.
- [17] Schröck A, Hari Y, König S, Auwärter V, Schürch S, Weinmann W. Pharmacokinetics of GHB and detection window in serum and urine after single uptake of a low dose of GBL- an experiment with two volunteers. *Drug Test. Analysis* 2013; 6 (4): 363-366.

[18] Schep LJ, Knudsen K, Slaughter RJ, Vale JA, Mégarbane B. The clinical toxicology of gamma-hydroxybutyrate, gamma-butyrolactone and 1,4-butanediol. *Clin. Toxicol.* 2012; 50(6): 458-470.

[19] Miro O, Galicia M, Dargan P, Dines AM, Giraudon I, Heyerdahl F, Hovda KE, Yates C, Euro-DEN Research Group, Wood DM. Intoxication by gamma hydroxybutyrate and related analogues: clinical characteristics and comparison between pure intoxication and that combined with other substances of abuse. *Toxicol. Letter* 2017; 277: 84-91.

Figure 1 : Comparaison des méthodes de dosage du GHB (plasma et urine) en méthode enzymatique et GC/MS sur 46 échantillons

Figure 2 : contexte d'intoxication des 30 patients étudiés dont les concentrations plasmatiques sont supérieures à 5 mg/L (ou urinaires supérieures à 10 mg/L)

Figure 1 :

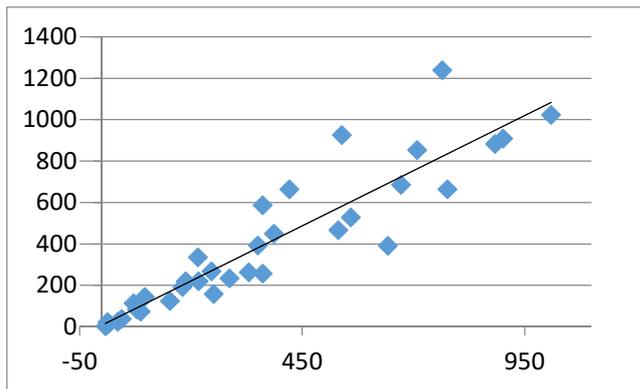
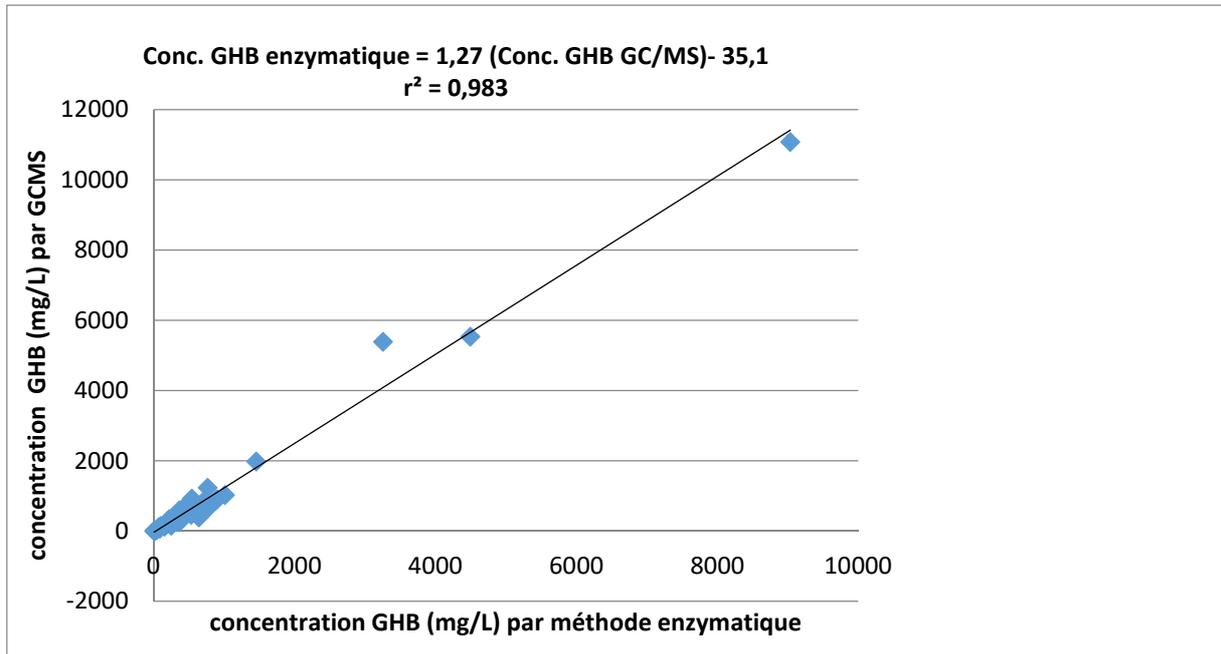


Figure 2 :

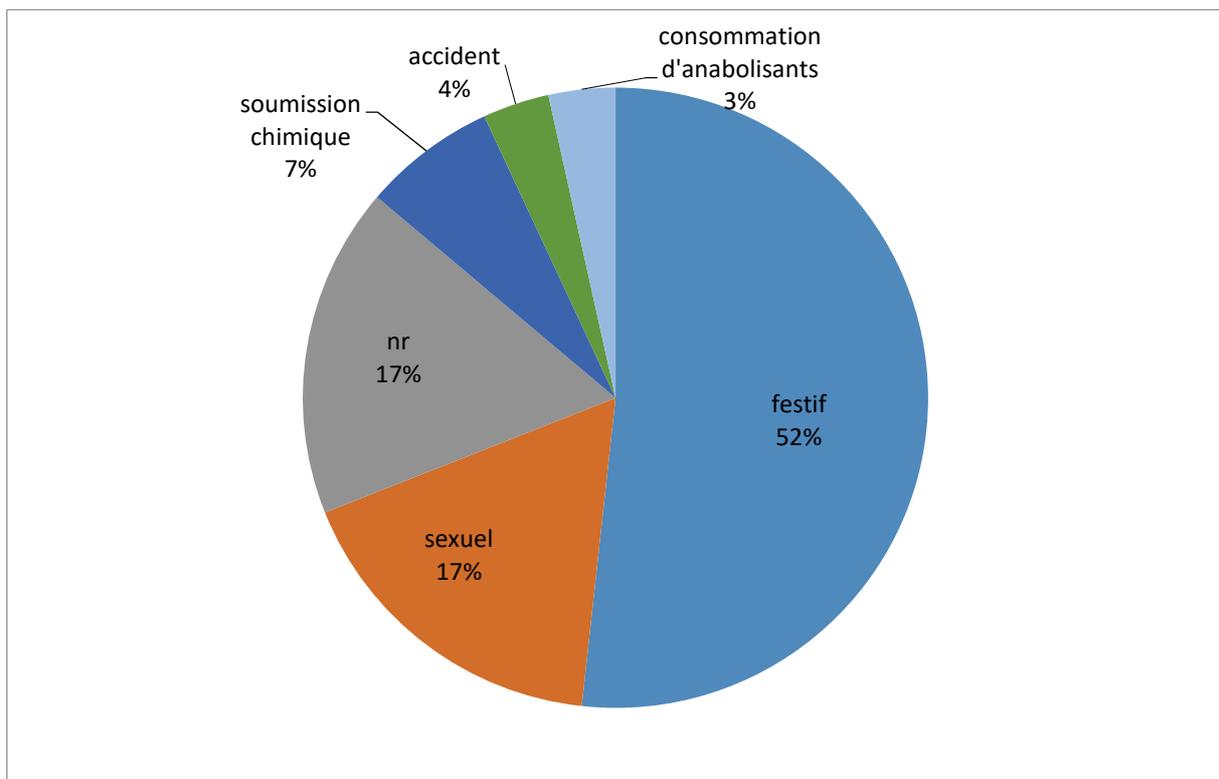


Tableau 1 : Paramètres de validation de la méthode enzymatique pour le dosage du GHB

Paramètres de validation		n	Niveaux de concentrations	Résultats	
Intra-jour Précision (%)	Intra-jour répétabilité (%)	10	CQ Niveau 1 (cible attendue 14,5 mg/L)	12,2 %	3,5 %
		10	CQ Niveau 2 (cible attendue 78,7 mg/L)	7,3 %	1,2 %
		10	CQ UTAK GHB 20 (cible théorique 20 mg/L)	8,6 %	3,7 %
Inter-jour Précision (%)	Inter-jour Fidélité intermédiaire (%)	10	CQ Niveau 1 (cible attendue 14,5 mg/L)	13,3 %	4,9 %
		10	CQ Niveau 2 (cible attendue 78,7 mg/L)	5,1 %	3,8 %
		10	CQ UTAK GHB 20 (cible théorique 20 mg/L)	9,4 %	7,1 %
Effet dilution			Dilution automatique 1/10 d'un plasma et d'une urine de patients dans sérum physiologique Dilution manuelle 1/50 d'une urine de patient dans sérum physiologique	Précision et répétabilité < 15%	

Tableau 2 : Comparaison des concentrations mesurées de GHB dans le plasma et les urines par méthode enzymatique (sur automate c4000®) et en GC/MS pour 130 échantillons.

Méthode enzymatique « Cut off » utilisé 5 mg/L	GC/MS « Cut off » utilisé 2,5 mg/L		
	Positif	Négatif	Total
Plasma :			
Positif	20	5	25
Négatif	0	15	15
Urine :			
Positif	26	12	38
Négatif	3	49	52
Total	49	81	130
Sensibilité du test enzymatique	46/49 ou 93,8%		
Spécificité du test enzymatique		64/81 ou 79,0%	

Tableau 3 : Caractéristiques des patients ayant consommés du GHB/GBL hospitalisés en réanimation médicale Toxicologique entre octobre 2017 et mai 2018.

Nombre	30
Age médian (minimum-maximum)	29 ans (19 – 66)
Sex-ratio	5/25 soit 83,3% d'hommes et 16,6% de femmes
Profession	Etudiant 5 (17,2%) En activité 16 (55,2%) Sans profession 4 (13,8%) Non définie 5 (16,6%)
Historique de consommation (déclaratif)	Pas d'historique 6 (20,7%) Consommation régulière d'alcool 21 (72,4%) Consommation de tabac 17 (58,6%) Consommation de cocaïne 12 (41,4%) Consommation de cannabis 7 (24,1%) Consommation d'ecstasy (MDMA) 6 (20,7%) Consommation de GHB/GBL 12 (41,4%) Consommation de stéroïdes anabolisants 1 (3,5%) Consommation de cathinones 2 (6,9%) Consommation de kétamine 1 (3,5%) Consommation de poppers 1 (3,5%)
Résultats des bilans toxicologiques urinaires du screening d'entrée en Réanimation (tests immunochimiques et screening GC/MS)	Ethanol 10 (33%) Cannabis 7 (21,0%) Amphétamines 8 (27,5%) Ecstasy (MDMA) 8 (27,5%) Cocaïne 12 (41,4%) Opiacés 3 (10,0%) Méphédronne 3 (10,0%) Benzodiazépines 12 (41,0%) Barbituriques 1 (3,4%) Buprénorphine 1 (3,4%) 4-MEC 1 (3,4%)
Résultats des bilans toxicologiques plasmatiques du screening d'entrée en Réanimation (tests dépistages immunochimiques et screening LC/MS-DAD)	Ethanol 8 (27,5%) Benzodiazépines 3 (10,0%) Sildénafil 1 (3,4%) Quinine 2 (6,9%)
Valeur moyenne de la durée de l'hospitalisation en Réanimation (minimum-maximum)	1 +/- 3,4 jours (1-14)
Sortie de Réanimation	Favorable 29 (96,6%) Décès 1 (3,3%)

