

AperTO - Archivio Istituzionale Open Access dell'Università di Torino

Identification d'opiaces sur les pupes vides : contribution experimentale

This is the author's manuscript

Original Citation:

Availability:

This version is available <http://hdl.handle.net/2318/1503204> since 2017-11-05T19:26:03Z

Terms of use:

Open Access

Anyone can freely access the full text of works made available as "Open Access". Works made available under a Creative Commons license can be used according to the terms and conditions of said license. Use of all other works requires consent of the right holder (author or publisher) if not exempted from copyright protection by the applicable law.

(Article begins on next page)

Mai/May 2001 - N° 3 - Volume 44

ISSN : 0249-6208

ISBN 2-7472-0245-3



9 782747 202459

JOURNAL DE
MEDECINE LEGALE
DROIT MEDICAL
VICTIMOLOGIE
DOMMAGE CORPOREL

Expertise - Déontologie - Urgences

JOURNAL OF FORENSIC MEDICINE

Articles originaux
Original Papers

Compte rendu des actes du colloque
« ACTUALITES MEDICO-LEGALES »

Report of the Proceedings of the
SYMPOSIUM "FORENSIC NEWS"

Juin/June 2000, LYON, FRANCE

Fondateur : † Pr. Louis Roche / Lyon



Éditions
ALEXANDRE
LACASSAGNE



Diffusion
ESKA

Publication bimestrielle

Identification d'opiacés sur les pupes vides : contribution expérimentale¹

F. INTRONA² Jr., G. DI VELLA², R. GAGLIANO CANDELA²

RÉSUMÉ

Les auteurs ont réalisé une étude expérimentale qui vise à vérifier l'utilité de l'analyse toxicologique exécutée sur les pupes vides de diptères cadavériques (*Calliphora Eritrocephala*). Trente terrains de culture (foie bovin) ont été additionnés à la morphine en concentrations connues et exposés à la colonisation des diptères cadavériques. La recherche d'opiacés dans les pupes vides prélevées, a été réalisée à travers le système Abbot ADX Analyzer. Les résultats ont été positifs dans les échantillons prélevés des terrains de culture à très hautes concentrations de morphine. L'emploi de l'analyse toxicologique sur les pupes vides se propose, donc, comme un moyen pour établir les causes de la mort de cadavres d'intérêt historique, en cas de soupçon d'une intoxication mortelle.

Mots-clés : Entomotoxicologie cadavérique, Pupes vides, Morphine.

SUMMARY

Opiate Analysis on Empty Puparia: Experimental Results

The authors have set up an experimental research to reveal if toxicological analysis can be performed with success on empty puparia. Empty cases of *Calliphora Erythrocephala* have been obtained from 30 experimental liver specimens with known different morphine concentrations. Opiate quantitative and qualitative analysis was then performed using Fluorescence Polarization ImmunoAssay (FPIA – Abbot ADX Analyzer). The results reveal an opiate positive qualitative analysis for empty cases obtained from the specimens with high morphine concentrations. This evidence allows the use in extreme forensic cases of even empty puparia of cadaveric blowflies as useful specimens for toxicological analysis; that seems really interesting in solving ancient historical suspected drug-related deaths.

Key-words: Cadaveric entomotoxicology, Empty puparia, Morphine.

1. Cet article a été présenté au XX International Congress of Entomology, Firenze (Italy), 25-31 August, 1996.
2. Istituto di Medicina Legale, Università di Bari, Policlinico, p. zza G. Cesare, 70125 BARI (Italy).

I. INTRODUCTION

Les études toxicologiques conduites sur la microfaune des cadavres ont démontré, il y a quelque temps, la possibilité de mettre en évidence dans les prélèvements entomologiques quelques substances présentes dans un cadavre putréfié, en offrant ainsi un support efficace pour faire des hypothèses sur l'existence d'un empoisonnement ou d'une intoxication (par médicaments, stupéfiants, etc.) dans un homme au moment de la mort [7, 10, 11, 15].

L'entomotxicologie se propose, donc, comme un moyen très utile pour vérifier la présence de facteurs qui peuvent avoir eu un rôle causal ou ayant concouru à déterminer la mort [1, 6, 8]. Cela peut offrir en effet, sur la base des renseignements caractéristiques des substances toxiques recueillies, des paramètres sur la zone géographique d'origine du cadavre [2, 14].

On a observé aussi que le résultat négatif de l'examen toxicologique des diptères n'admet pas d'exclure la présence de substances toxiques dans un cadavre putréfié en toute certitude. En effet, quelques auteurs ont fait l'expérience que certaines substances (comme amitriptyline, nortriptyline, propoissiphène) peuvent être dosées pendant les premiers stades de développement du cycle de reproduction (par exemple dans les larves au troisième stade). Au contraire elles ne se relèvent plus dans les stades suivants (pupes – adultes) en avançant ainsi l'hypothèse du métabolisme de la substance toxique de l'insecte même [18]. Cela semble confirmé aussi par le fait que constamment la substance toxique, si elle présente, peut être dosée dans l'insecte en concentrations qu'on ne peut pas comparer à celles qu'on trouve dans un cadavre [16, 17].

Dans le domaine médico-légal, donc, l'emploi de recherches entomotxicologiques semble être essentiel et il faut absolument en tenir compte lorsque ce n'est pas possible de procéder à la routine toxicologique pour cause de pénurie ou défaut des substrats cadavériques habituels (sang, urine, bile, parenchymes, etc.). D'autre part, on doit aussi remarquer que la présence de substances toxiques relevées dans les diptères présents sur les cadavres est utile soit pour comprendre la cause de la mort, soit pour analyser la durée des cycles vitaux des diptères [9]. À ce sujet en littérature, on a rapporté les résultats d'études expérimentales qui ont attesté l'existence de corrélations spécifiques entre le changement des temps de développe-

ment des diptères (surtout dans le stade larvaire et dans la phase de puppe) et le genre de substance toxique présente dans le cadavre colonisé par les insectes [3, 4, 5]. Il s'agit d'un relief d'un très grand intérêt médico-légal, surtout en ce qui concerne les constatations thanatologiques : en effet ignorer l'existence d'une intoxication dans la personne au moment de la mort, peut induire en erreurs grossières lorsqu'on interprète les éléments acquis par l'application de l'entomologie à l'estimation de la datation de la mort [13].

Dans le cadre de la microfaune cadavérique, donc, les diptères se prêtent facilement à un screening toxicologique sérieux soit parce qu'ils sont parmi les premiers organismes à attaquer le cadavre et donc à prendre contact avec les concentrations initiales des différentes substances toxiques éventuellement présentes dans les tissus biologiques, soit pour la facilité relative avec laquelle on peut les recueillir comme échantillons à analyser. De plus, quand on demande l'examen du médecin légiste sur les restes en phase de transformation avancée ou même à l'état squelettique, c'est-à-dire quand les cycles de reproduction des diptères sont pour la plupart tout à fait épuisés, en ce cas il est possible de retrouver parmi les restes, seulement des pupes vides ayant appartenu à plusieurs familles (*Sarcophagidae*, *Calliphoridae*, *Muscidae*, etc.) qui se sont chronologiquement succédé sur le cadavre, quelquefois entremêlées aussi à des pupes d'insectes d'un autre ordre (*Lepidoptera*, *Hymenoptera*, *Coleoptera*, etc.). Voilà les circonstances dans lesquelles les seuls matériaux entomologiques disponibles pour les estimations toxicologiques sont représentés par les pupes vides ; ces structures, en plus, sont facilement découvertes pendant la descente sur les lieux ou l'analyse du cadavre.

Les études expérimentales précédemment exécutées ont remarqué la possibilité de relever la présence de substances toxiques (cocaïne et ses métabolites) à travers l'emploi de pupes vides, en offrant ainsi de nouvelles perspectives d'étude adressées au dosage de substances toxiques accumulées dans la matrice protéique des enveloppes des pupes [12].

Sur la base de ces fondements, notre équipe a réalisé une étude expérimentale qui vise à vérifier la possibilité d'extraire les opiacés des pupes vides qui ont fait partie de colonies de diptères qui, à leur tour, se sont développées sur des substrats biologiques à concentrations connues de morphine.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Trente échantillons, chacun de 100 g de foie bovin qui ont été trouvés négatifs à la recherche faite précédemment d'opiacés ou d'autres substances toxiques à travers la routine de laboratoire (Abbot ADX Analyzer; chromatographie gazeuse de masse), ont été additionnés à la morphine chlorhydrate en concentrations prédéterminées (2,5, 5, 10 mcg/g), volontairement au-dessus de celles qu'on trouve normalement sur le substrat cadavérique. De cette manière, on a obtenu trois séries d'échantillons, chacune avec dix unités à contenu connu de morphine. Cinq échantillons négatifs, prélevés séparément et testés préalablement, chacun avec 100 g de tissu hépatique, ont été employés comme série de contrôle.

Chaque échantillon a été individuellement placé dans un petit verre et exposé à la colonisation des diptères cadavériques de la première escouade à condition de vie. Pendant le développement du cycle de reproduction, quelques larves au troisième stade ont été recueillies des terrains de culture et congelées. On a permis aux autres larves de chaque élevage de passer à la phase de pupes; chaque terrain de culture a été donc placé sur un substrat de terre dans un autre récipient plus grand (500 ml) couvert par un filet à mailles fines. Quand le développement a atteint une phase avancée, tout le matériel entomologique obtenu de chaque élevage (larves, pupes pleines, pupes vides, insectes adultes qui voltigeaient) a été sacrifié en le plaçant dans un réfrigérateur (T - 20 °C) pendant six heures.

On a ensuite prélevé, de chaque élevage, 0,5 g de larves au troisième stade et 0,1-0,2 g de pupes vides qui, après un nettoyage avec de l'eau distillée, ont été déshydratées et gardées à basse température. Ensuite on a encore lavé, essuyé et homogénéisé tous les échantillons entomologiques dans 2 ml d'eau distillée par homogénéisateur de Potter avant d'être soumis à un examen toxicologique. Tous les prélèvements furent ensuite soumis à la procédure suivante :

- extraction : 2 ml d'homogénéisé ont été mélangés pendant quelques minutes avec 5 ml d'acétone (solvant) et centrifugés jusqu'à réunir les protéines ;
- évaporation du solvant jusqu'au séchage avec un flux d'azote à +40 °C ;
- reconstitution du reste dans l'acide trichloroacétique (10 %) et séparation de la composante protéique à travers une microcentrifugeuse.

On a ensuite testé le sur-nageant par le système Abbot ADX Analyzer, qui est une méthode enzymatique habituellement employée dans les laboratoires ordinaires pour la détermination demi-quantitative des opiacés et de leurs métabolites dans les échantillons d'urine humaine. On a considéré les valeurs de 0,2 mcg/g « cut off » de positivité du dosage de morphine pour exclure les interférences de substances présentes dans le tissu hépatique.

III. RÉSULTATS

Les résultats obtenus de la recherche de morphine dans les échantillons examinés ont été reportés dans les tableaux 1 et 2.

L'estimation toxicologique réalisée sur les larves et sur les pupes vides a mis en évidence un résultat différent selon la concentration de morphine présente dans l'échantillon examiné.

En ce qui concerne les larves, le test pour la morphine a été positif :

- dans 8 échantillons sur 10 pris dans les substrats où il y avait la plus grande concentration de morphine (10 mcg/g) ;
- dans 6 échantillons sur 10 lorsque le dosage a été fait sur des échantillons prélevés des terrains de culture à concentrations moyennes de morphine (5 mcg/g) ;
- seulement dans 2 cas d'échantillons qui provenaient des préparations à concentrations de morphine pareilles à 2,5 mcg/g.

Les recherches sur les pupes vides ont mis en évidence que :

- parmi celles prélevées des échantillons avec la plus grande concentration de morphine (10 mcg/g), seulement en 4 cas on a relevé des valeurs supérieures aux limites établies (0,2 mcg/g) ;
- on a obtenu les mêmes résultats (4 cas positifs) pour les pupes vides échantillonnées dans les substrats à concentrations moyennes de morphine (5 mcg/g) ;
- on n'a obtenu aucune valeur supérieure au cut off dans l'analyse des pupes vides qui provenaient des terrains de culture avec concentrations minimales de morphine (2,5 mcg/g).

La recherche de morphine dans les larves et dans les pupes vides trouvées dans les terrains de culture préparés pour le contrôle a été tout à fait négative.

Tableau 1 : Intervalles et valeurs moyennes (mcg/g) des concentrations de morphine [m] dosées dans les larves au troisième stade proliférées sur des substrats avec des dosages connus de morphine

[morphine] dans le foie	10 mcg/g	5 mcg/g	2,5 mcg/g
total échantillons	10	10	10
reliefs positifs [m] > 0,2	8	6	2
[morphine] min. - max.	0,151-0,670	0,110-0,711	0,075-0,320
[morphine] moyenne	0,205	0,173	0,093
reliefs négatifs	2	4	8

Tableau 2 : Les résultats des dosages (mcg/g) de la morphine dans les pupes vides prélevées dans les échantillons à concentrations connues de morphine [m]

[morphine] dans le foie	10 mcg/g	5 mcg/g	2,5 mcg/g
total échantillons	10	10	10
reliefs positifs [m] > 0,2	4	4	0
[morphine] min. - max.	0,05-0,280	0,035-0,240	0,00-0,047
[morphine] moyenne	0,085	0,061	0,021
reliefs négatifs	6	6	10

IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le screening toxicologique fait sur les pupes vides de diptères cadavériques a démontré qu'il est possible de vérifier la présence d'opiacés à partir de l'enveloppe protéique résidu ; cela confirme donc les théories sur l'absorption par l'insecte de substances toxiques qui se trouvent sur le cadavre.

Toutefois il en est résulté que la présence fréquente de substances toxiques a été rigoureusement mise en corrélation soit à la quantité de morphine présente dans le terrain de culture, soit à la méthode de recherche employée. On a observé que le plus grand nombre de dosages positifs a été relevé dans les échantillons qui provenaient des préparations à très hautes concentrations de morphine (10 mcg/g). Cependant les quantités dosées dans les pupes vides montraient une valeur moyenne inférieure au cut off (0,085 mcg/g) comme preuve du nombre très haut de cas négatifs (6 sur 10) et, de toute façon, de la faible concentration de morphine observée dans les cas positifs.

En ce qui concerne le système de recherche employé (Abbot ADX Analyzer), qui se fonde sur une méthode enzymatique, même si il représente une technique de très grande diffusion dans les laboratoires hospitaliers ordinaires, il exige dans le substrat des concentrations de morphine très hautes et qui difficilement se trouvent dans les tissus biologiques des sujets s'adonnant

à l'emploi voluptuaire d'opiacés ou bien victimes de narcotisme aigu. Donc il s'ensuit que l'évaluation toxicologique sur les pupes vides doit être réalisée en se servant de procédures d'analyse (quantitatives et qualitatives) plus sérieuses, douées de plus grande sensibilité, en état d'identifier des concentrations de la substance toxique même en termes de ng/g de tissu.

En définitive, donc, l'étude toxicologique effectuée sur les pupes vides peut donner des résultats très utiles. Cela confirme encore d'attirer l'attention sur un autre aspect, opérationnel, c'est-à-dire sur le besoin que les recherches sur le cadavre soient bien coordonnées dès le début et surtout dans la phase de découverte et de récolte des restes cadavériques. De tout cela il ressort l'indispensable participation d'un médecin légiste compétent et très expert en entomologie, capable de déterminer et recueillir des éléments apparemment accessoires, tels que les pupes vides présentes sur le cadavre ou dans les lieux limitrophes, mais d'une concrète utilité à établir la cause de la mort du sujet à qui appartenaient, sa vie durant, les restes examinés.

Enfin l'étude toxicologique des pupes vides pourrait conduire à la résolution de cas « historiques » puisque à travers la détermination de substances éventuellement accumulées et cachées dans l'enveloppe des pupes, pourraient se dévoiler les causes ou les phases qui ont précédé la mort de sujets qui ont vécu dans un passé même peu récent. ■

V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] BEYER J.-C., ENOS W.F., STAJIC M. – Drug identification through analysis of maggots. *J. Forensic Sci.*, 1980, 25, 411-412.
- [2] BYRNE A.L., CAMANN M.A., CYR T.L., CATTS E.P., ESPELIE K.E. – Forensic Implications of biochemical differences among geographic population of the black blow fly, *Phormia Regina* (Meigen). *J. Forensic Sci.*, 1995, 40, 372-377.
- [3] GOFF M.L., OMORU A.I., GOODBROD J.-R. – Effect of cocaine in tissue on the rate of development of *Boettcherisca peregrina* (diptera: sarcophagidae). *J. Med. Entomol.*, 1989, 26, 91-93.
- [4] GOFF M.L., BROWN W.A., KAMANI A., HEWADIKARAM M.S. and OMORI A.I. – Effect of heroin in decomposing tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (diptera: sarcophagidae) and implication of this effect on estimation of postmortem intervals using arthropod development patterns. *J. Forensic Sci.*, 1991, 36, 537-542.
- [5] GOFF M.L., BROWN W.A., OMORI A.I. – Preliminary observation of the effect of methamphetamine in decomposing tissues on the development rate of *Parasarcophaga ruficornis* (diptera: sarcophagidae) and implication of this effect on estimation of postmortem intervals. *J. Forensic Sci.*, 1992, 37, 867-872.
- [6] GOFF M.L., LORD W.D. – Entomotoxicology. A new area for forensic investigation. *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 1994, 15, 1, 51-57.
- [7] GUNATILAKE K., GOFF M.L. – Detection of organophosphate poisoning in a putrefying body by analyzing arthropod larvae. *J. Forensic Sci.*, 1989, 34, 714-716.
- [8] INTRONA F. Jr., LO DICO C., CAPLAN Y., SMIALEK J.E. – Opiate analysis in cadaveric blowfly larvae as an indicator of narcotic intoxication. *J. Forensic Sci.*, 1990, 35, 118-122.
- [9] KINTZ P., GODELAR B., TRACQUI A., MANGIN P., LUGNIER A., CHAUMONT A. – Fly larvae: a new toxicological method of investigation in Forensic Medicine. *J. Forensic Sci.*, 1990, 35, 204-207.
- [10] KINTZ P., TRACQUI A., LUCES B., WALLER J., BOUKHABZA A., MANGIN P., LUGNIER A., CHAUMONT A. – Fly larvae and their relevance in Forensic toxicology. *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 1990, 11, 1, 63-65.
- [11] KINTZ P., TRACQUI A., MANGIN P. – Analysis of opiates in fly larvae sampled on a putrefied cadaver. *J. Forensic Sci. Soc.*, 1994, 34, 2, 95-97.
- [12] MANHOFF D.T., HOOD I., CAPUTO F., PERRY J., ROSEN S., MIRCHANDANI H.G. – Cocaine in decomposed human remains. *J. Forensic Sci.*, 1991, 36, 1732-1735.
- [13] NOLTE K.B., PINDER R.D., LORD W.D. – Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposed body. *J. Forensic Sci.*, 1992, 37, 1179-1185.
- [14] NORTUEVA P., NORTUEVA S.L. – The fate of mercury in sarcosaprophagus flies and in insects eating them. *Ambio.*, 1982, 11, 34-7.
- [15] POUNDER D.J. – Forensic Entomo-toxicology. *J. Forensic Sci. Soc.*, 1991, 31, 4, 469-472.
- [16] SADLER D.W., FUKU C., COURT F., POUNDER D.J. – Drug accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae. *Forensic Sci. Int.*, 1995, 71, 191-197.
- [17] WILSON Z., HUBBARD S. and POUNDER D.J. – Drug analysis in fly larvae. *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 1993, 14, 118-20.
- [18] WOHLBERG N., LINDSEY T., BACKER R., NOLTE K.B. – Isolation of nortriptyline from maggots, muscle, hair, skin and cancellous vertebral bone in skeletonized remains. *Proceedings of the 44th Annual Meeting, American Academy of Forensic Sciences*, New Orleans, Colorado Springs: Filtje Brothers Printing Co., 1992, 199.

LE VERT EST DANS LE FRUIT

Professeur Etienne FOURNIER

Cet essai a pour objet une information aussi précise que possible sur la toxicité de notre environnement. Celle-ci sera associée au refus public de l'exploitation partisane et politique d'hypothèses non vérifiées, au rejet des amalgames terrifiants basés sur des arguments sans rapport avec les acquis scientifiques élémentaires de la médecine et de la chimie. Le mode critique s'y retrouve sans complaisance tant le coût social et psychologique des abus est élevé.

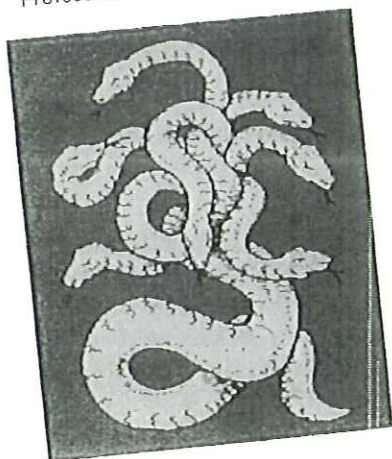
Redonnant leur place aux systèmes de détoxification et de régulation de l'organisme, il décrit en détail pour quelles raisons il se veut souvent rassurant sur les dangers encourus réellement dans notre pays. Les parties de niveau biologique assez élevées sont précisées de telle sorte que le lecteur puisse limiter l'étude à ses propres connaissances.

Ne se réclamant que de la Médecine, il expose avec chaque substance l'incroyable dérive du Droit et de la Vie Politique qu'introduit le dogme du Principe de Précaution Illimitée dans notre Société développée. Il sollicite une conception plus équilibrée du choix politique : Bénéfice Social contre Risque Santé Individuelle.

Étienne FOURNIER est ancien élève de l'École Normale Supérieure (rue d'ULM), agrégé de physique et chimie, et, par ailleurs Médecin des Hôpitaux de Paris, chef de service honoraire, Professeur honoraire de Médecine légale et Toxicologie à l'Université Paris VII, doyen honoraire de la Faculté Lariboisière Saint Louis. Toute sa carrière professionnelle s'est développée en Médecine plus précisément en Toxicologie humaine et expérimentale. Médecin de l'hôpital Fernand Widal (AP-HP), où il a exercé pendant 35 ans, d'abord comme agrégé du Professeur Michel Gaultier, il y a installé le premier Centre antipoison Européen, initié les activités médicales propres aux divers aspects de la toxicologie et dirigé une Unité de recherches INSERM spécialisée en toxicologie expérimentale. Il a participé pendant plus de trente ans, comme expert indépendant Français, à l'élaboration des Directives Européennes de Toxicologie dans la Sous Commission Toxicologie-Écotoxicologie.

LE VERT
EST DANS
LE FRUIT

Professeur Etienne FOURNIER



Editions
ESKA



Editions
ESKA

rue du Quatre-Septembre - 75002 PARIS
: 01 42 86 55 73 - Fax : 01 42 60 45 35

<http://www.eska.fr>

ISBN 2.7472.0009.4
16 x 24 cm - 512 pages

Prix : 179 F TTC (27,29 €)
(+ 23 F (3,51 €) de frais de port)

BON DE COMMANDE à retourner aux Éditions ESKA

12, rue du Quatre-Septembre 75002 PARIS - Tél. : 01 42 86 55 73 - Fax : 01 42 60 45 35

Je désire recevoir exemplaires de « **Le vert est dans le fruit** » E. FOURNIER, au prix de 179 FF (27,29 €)
(+ 23 FF (3,51 €) de port), soit 202 FF (30,79 €) x = FF

NOM Prénom

Adresse

Code postal Ville

Je joins mon règlement par : Chèque bancaire à l'ordre des Éditions ESKA
 Virement postal aux Éditions ESKA - CCP Paris 1667-494-Z