HAL
open science

# Apport de l'analyse toxicologique des cheveux dans le diagnostic de décès toxiques impliquant la méthadone

Soline Chambert

## To cite this version:

Soline Chambert. Apport de l'analyse toxicologique des cheveux dans le diagnostic de décès toxiques impliquant la méthadone. Sciences pharmaceutiques. 2009. dumas-00592212

**HAL Id: dumas-00592212**

**https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00592212v1**

Submitted on 11 May 2011

**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.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2009 N°

# Apport de l'analyse toxicologique des cheveux dans le diagnostic de décès toxiques impliquant la méthadone

Mémoire Du Diplôme d'Etude Spécialisée

Internat discipline Pharmacie Spécialisée

Conformément aux dispositions du décret n° 90-180 du 10 septembre 1990, tient lieu de

**THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Par **SOLINE CHAMBERT**

Née le 04 juillet 1978 à Echirolles (38)

Thèse soutenue publiquement à la Faculté de Pharmacie de Grenoble

Le : 22 octobre 2009

Devant le jury interrégional composé de :

Président : Mr le Professeur V. Danel

Membres : Mr le Professeur L. Barret

Mr le Professeur J. Guitton

Mme le Docteur H. Eysseric

Mr le Docteur M. Mallaret (directeur de thèse)

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2009 N°

# Apport de l'analyse toxicologique des cheveux dans le diagnostic de décès toxiques impliquant la méthadone

Mémoire Du Diplôme d'Etude Spécialisée

Internat discipline Pharmacie Spécialisée

Conformément aux dispositions du décret n° 90-180 du 10 septembre 1990, tient lieu de

**THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Par **SOLINE CHAMBERT**

Née le 04 juillet 1978 à Echirolles (38)

Thèse soutenue publiquement à la Faculté de Pharmacie de Grenoble

Le : 22 octobre 2009

Devant le jury interrégional composé de :

Président : Mr le Professeur V. Danel

Membres : Mr le Professeur L. Barret

Mr le Professeur J. Guitton

Mme le Docteur H. Eysseric

Mr le Docteur M. Mallaret (directeur de thèse)

# REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude envers les membres de mon jury de thèse :*

**Au Président du jury, Monsieur le Professeur Vincent Danel,**

Je te remercie d'avoir immédiatement accepté d'être le Président de jury de ma thèse d'exercice. Tout au long de mon cursus, j'ai apprécié la qualité et la pédagogie de ton enseignement en tant qu'étudiante et la confiance donnée pour m'avoir confiée tes enseignements en tant qu'interne. Je te remercie pour ta disponibilité et ton écoute attentive, pour m'avoir permis de goûter à la transmission du savoir dans ma discipline de cœur. Tu trouveras ici l'assurance de mon profond respect.

**Au Directeur de thèse, Monsieur le Docteur Michel Mallaret,**

Je te remercie d'avoir encadré ce travail, plusieurs fois sous plusieurs formes. Sans en avoir été l'instigateur, tu nous as toujours apporté ton avis éclairé et éclairant sur la question. J'ai apprécié nos discussions, ton esprit critique et ton aide précieuse pour la correction de ce mémoire.

**A mon Ex-directrice de masterS, Madame le Docteur Hélène Eysseric,**

Je te remercie pour m'avoir encadrée si souvent, en DEA et en master Professionnel. Grâce à toi, j'ai pu toucher à tout et me diversifier tant sur le fondamental que sur l'analytique… ce que je suis devenue. Merci pour tout le temps que tu as consacré à ma formation scientifique et à mon intégration dans la vie multi-équipes. Tu trouveras ici l'expression de ma profonde reconnaissance

**A Monsieur le Professeur Luc Barret,**

Je vous remercie de me faire l'honneur de participer à mon jury et de consacrer du temps pour examiner ce mémoire. Je vous fais part de toute ma gratitude pour m'avoir acceptée au sein de votre équipe de recherche avant la fin de mes études en pharmacie. Vous m'avez offert un environnement de travail qui m'a permis de me réaliser. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

**A Monsieur le Professeur Jérôme Guitton,**

Je vous remercie d'avoir eu la gentillesse d'accepter de faire partie de mon jury et de juger mon travail, complété depuis sa première présentation en master il y a 4 ans.

*Puis, je voudrais témoigner ma plus sincère reconnaissance à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce travail :*

**Aux Docteur Nathalie Allibe et Docteur Brigitte Gonthier,**

Je vous remercie infiniment pour votre disponibilité, vos précieux conseils, pour tout le temps que vous avez consacré à mon apprentissage, "au transfert de vos connaissances", à la rigueur d'esprit que vous m'avez apportée. En mémoire de vous : "Je sers la Science et c'est Ma Joie".

**A Mme Catherine Vassal**

Plus qu'un merci pour ces bons de commandes, (bons) petits plats et (bons) cadeaux.

**Aux membres de l'équipe de Médecine Légale UJF et CHU, de la Pharmaco CHU**

Biologistes, Chercheurs, Ingénieurs, Techniciens, Secrétaires : merci pour tous vos conseils tant sur le plan technique que méthodologique. Merci pour votre bonne humeur et les bons moments passés en votre compagnie.

**Aux membres de l'équipe du Centre Méthadone et du Centre de Pharmacovigilance**

Au CSST : merci pour la collecte précieuse de ces échantillons, sans votre recrutement cette étude n'aurait pu aller à son terme et à ses conclusions. Au CPV : Claude merci pour ton travail de fourmi, et aux autres membres merci pour l'emploi du temps de qui vous savez.

**Aux membres de l'équipe de Spectrométrie de Masse et d'HP2**

Enseignants-Chercheurs, Biologistes, Médecins, Techniciens, Secrétaires et Etudiants, merci de m'avoir permis d'acquérir de nouvelles compétences personnelles et techniques. Apprendre à vos côtés fut un réel plaisir et une satisfaction pour mon esprit curieux.

Je remercie vivement tous **mes Amis** – qui se reconnaîtront – ainsi que toute personne qui cherche désespérément son nom dans ses lignes. Si je commençais un peu, Mick, Nicole, Dominique, Ju, Marie-Hélène P., Denis M., tous les Aspiraliens de cœur, Isa F., Dame Dudu (Oh oui merci), les Bios, Linda, Marion & Cyllou, Elo, Cécile, Yass, les Meds : Cath, Erika, Nabil etc…, Mag & Phillou, MCA, Patrick T., Isa M., Maniak, MP. Coll, les profs… Et tous ceux de l'ombre que j'oublie en lettres… et qui sont dans mon coeur.

Je remercie tout particulièrement **ma Famille** pour son inconditionnel soutien et votre présence à nos côtés. Merci à Grany, Odette et mes autres grands-mères pour la fierté que vous m'avez témoignée. Une pensée pour Serge, Philippe et celui que je nomme mon père spirituel de la pharmacie Roger L.

Enfin, je remercie **Aurélien**. Tu as la gentillesse d'être à mon écoute depuis toutes ses années, je vais suivre tes conseils en PPG. A mon chronophage et attentionné **JAO**. *Vivre et partager ensemble le bonheur d'être en famille.*

Je dédie ce travail à mon fils JAO, à Toi Aurélien,

à notre petite graine

à mes Parents et Grands-parents

« Pour expliquer un brin de paille, il faut démonter tout l'univers. »

Rémy de Gourmont

# Avant-propos

Ce travail a été effectué au laboratoire de Médecine Légale de Grenoble, à la Faculté de Médecine – Pharmacie, ainsi qu'au sein du laboratoire de toxicologie et Pharmacologie au CHU de Grenoble.
Les thématiques du laboratoire tant sur l'expertise médico-légale qu'en recherche fondamentale sur l'alcool, sont reconnues nationalement et internationalement. J'ai pu travailler sur ces deux versants et apprendre à me construire scientifiquement.

Ce mémoire présente tout d'abord une revue bibliographique décrivant la méthadone puis la particularité de la matrice cheveux comme « carotte glaciaire » de notre exposition à l'environnement extérieur et à nos consommations. La seconde partie fait référence aux techniques employées et aux populations étudiées. Enfin, un exposé des résultats et leurs discussions fait place sur l'apport complémentaire de l'analyse toxicologique des cheveux pour évaluer l'état de tolérance pharmacodynamique, rétrospectif, d'un sujet à la méthadone ainsi qu'à d'autres opioïdes. Il est intéressant de maintenir l'étude et l'analyse de cette matrice capillaire pour de nombreux autres xénobiotiques, car ses applications sont très variées.

# SOMMAIRE

**Remerciements**

**Avant-propos**

**Sommaire** ..... I

**Liste des abréviations** ..... IV

**Index des illustrations** ..... VI

**Introduction** ..... 1

**Revue de la littérature** ..... 3

**1- La méthadone** ..... 3

***1.1. Propriétés pharmacologiques*** ..... 4

***1.2. Formes galéniques*** ..... 4

***1.3. Classe* chimique** ..... 5

***1.4. Méthadone et système opioïdes*** ..... 5

***1.5. Mode d'action et phénomène de tolérance*** ..... 8

1.5.1 L'exposition aigüe et la « down regulation » du récepteur mu ..... 10

1.5.2 Le phénomène de up-régulation du système AMP cyclique (AMPc) suite à une exposition chronique aux opiacés ..... 11

1.5.3 Régulation homologue ..... 11

1.5.4 Régulation hétérologue ..... 12

***1.6. Pharmacocinétique*** ..... 12

***1.7. Règles de prescription de la méthadone*** ..... 14

***1.8. Adaptation posologique*** ..... 14

***1.9 Concentrations thérapeutiques, toxiques et létales*** ..... 15

***1.10. Surdosage et décès*** ..... 16

***1.11 Méthodes d'analyse*** ..... 16

**2- Incorporation des xénobiotiques dans les cheveux** ..... 17

**2.1** ***Généralités sur le cycle pilaire et la composition physico-chimique des cheveux*** ..... 17

***2.2. Modèles d'incorporation des xénobiotiques*** ..... 20

2.2.1. Incorporation interne par transfert passif ..... 20
2.2.2. Incorporation externe ..... 21

**Matériels et Méthodes ..... 23**

**1- Matériels ..... 23**

***1.1. Matériels ..... 23***

***1.2. Réactifs et consommables ..... 23***

***1.3. Préparations des réactifs ..... 24***

***1.4. Populations étudiées ..... 24***

***1.5 Principes de l'analyse de la méthadone dans les cheveux ..... 24***

**2- Méthodes ..... 25**

***2.1. Prélèvement de cheveux ..... 25***

***2.2. Décontamination des cheveux ..... 25***

***2.3. Broyage ou découpage fin des cheveux ..... 26***

2.3.1. Broyage ..... 26
2.3.2. Découpage ..... 26

***2.4. Ajout de standards internes deutérés ..... 27***

***2.5. Méthodes d'extraction ..... 27***

2.5.1 Incubation méthanolique décrite par PATERSON ..... 27
2.5.2. Incubation en milieu acide puis extraction SPE utilisée au laboratoire de pharmacologie ..... 27

***2.6. Méthode d'analyse en CPG-SM pour les patients du centre de substitution et les sujets décédés de 1999 à 2005. ..... 29***

***2.7. Méthode d'analyse en CPG-SM et tableau de surcharge pour la gamme de calibration, pour les sujets décédés depuis 2006. ..... 29***

**Résultats et discussions ..... 31**

**1- Mise au point du dosage ..... 31**

***1.1 Optimisation de la préparation de l'échantillon ..... 31***

1.1.1 Choix de la méthode d'extraction ..... 32
1.1.2 Courbes de calibration ..... 35

2- Prélèvements de cheveux des patients du Centre de Substitution de Grenoble ..... 35

3- Prélèvements de cheveux de cas médico-légaux ..... 41

4- Intérêts et limites de l'utilisation des cheveux ..... 49

*4.1 Intérêts* ..... 49

*4.2 Limites, précautions et biais dont il faut tenir compte* ..... 50

**Conclusions** ..... 53

**Bibliographie** ..... 55

**Annexes** ..... VIII

**Serment des Apothicaires**

# LISTE DES ABREVIATIONS

- °C : degré Celsius
- [MTD] : concentration de méthadone
- 6-MAM : 6-Mono Acétyl Morphine
- AC : Adénylate cyclase.
- ACTH : Hormone corticotrope ou Adreno CorticoTropic Hormone.
- AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé.
- BE : Benzyl-Ecgonine
- BHD : Buprénorphine Haut Dosage.
- BSTFA : N,O-bis-(trimetylsilyl)trifluoroacetamide
- $Ca^{2+}$ : calcium.
- CEDIA : Cloned Enzyme Donor Immunoassay
- C02 : dioxyde de carbone.
- CPAM : Caisse Primaire d'Assurance Maladie
- CSST : centres spécialisés de soins aux toxicomanes.
- CPG-SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
- CR : Centre Respiratoire.
- CTZ : Chemoreceptor Trigger Zone ou centre du vomissement.
- DGS : Direction Générale de la Santé
- DHOS : Direction de l'Hospitalisation de l'Organisation de Soins.
- DRAMES : Décès en Relation avec l'Abus de Médicaments et de Substances.
- EDDP : Ethylidène-diméthyl-diphenylpyrrolidine.
- EME : Ecgoninéméthylester
- EMIT : Enzyme Multiplied Immunoassay
- eV : électronvolts
- F : Femme
- FID : Détecteur par Ionisation de Flamme
- FPIA : Fluorescence Polarization Immunoassay
- FSH : Hormone follicostimulante.
- g, mg, ng : gramme, milligramme, nanogramme
- GRK : Kinases couplées aux récepteurs G métabotropes.
- HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance
- j : jour

- $K^+$ : potassium.

- L, mL, µL : litre, millilitre, microlitre

- LEEM : Les Entreprises du Médicaments, syndicat national de l'industrie pharmaceutique

- LH : Hormone Lutéinisante.

- M : Masculin

- m, cm, mm, µm : mètre, centimètre, millimètre, micromètre

- min : minutes

- MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase.

- N° : numéro

- NPD : Détecteur Azote (N) – Phosphore (P)

- OFDT : Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies.

- PDE : PhosphoDiEstérase.

- PM : post-mortem

- Protéine Gi/0 : Récepteur couplé aux Protéines G Inhibitrice de l'adénylate cyclase (Gi) et aux protéines G se liant aux canaux potassiques et calciques (G0)

- RIA : Radio Immuno Assay

- SCAN : screening des molécules

- sg : sang

- SIAMOIS : Système d'information sur l'accessibilité au matériel officinal d'injection stérile et à la substitution.

- SID : Standards Internes Deutérés

- SIM : mode impact électronique ou Single Ion Monitoring

- SFTA : Société Française de Toxicologie Analytique.

- SM : Spectrométrie de Masse

- SNC : Système Nerveux Central.

- SPE : Extraction en phase solide.

- TIAFT : The International Association of Forensic Toxicologists.

- TMCS : Triméthylchlorosilane

- uma : unite de masse atomique

# INDEX DES ILLUSTRATIONS

# Figures

**Figure 1** : Estimation du nombre de personnes recevant un traitement de substitution entre 1995 et 2007. ..... 3
**Figure 2** : Formule plane de la méthadone. ..... 5
**Figure 3** : Site actif par une approche tridimensionnelle des opioïdes endogènes vis-à-vis de la morphine..... 5
**Figure 4** : Sites d'action des messages douloureux. ..... 7
**Figure 5** : Régulation des récepteurs couplés aux protéines G tiré de Marie, 2009. ..... 11
**Figure 6** : Métabolisation hépatique de la méthadone. ..... 13
**Figure 7** : Schéma d'un follicule pileux. ..... 18
**Figure 8** : Coupe d'une tige pilaire. ..... 18
**Figure 9** : Modèle possible d'incorporation des xénobiotiques par transfert passif dans les cheveux pendant la phase anagène..... 20
**Figure 10** : Modèle possible d'incorporation des xénobiotiques par contamination externe via le modèle de la sueur. ..... 22
**Figure 11** : Principe de l'analyse de la méthadone dans les cheveux. ..... 25
**Figure 12** : Importance d'un bon positionnement des bandes de cheveux. ..... 26
**Figure 13** : Sur 30 mg de cheveux broyés. Extrait SPE : A = mode SCAN, C = mode SIM. Extrait méthanol : B = mode SCAN, D = mode SIM ..... 33
**Figure 14** : Courbe de calibration de la méthadone en ng/mg de cheveux..... 35
**Figure 15** : Corrélation entre les concentrations de méthadone dans les cheveux et la posologie journalière de méthadone. ..... 38
**Figure 16** : Concentrations des toxiques dans les matrices sanguines, urinaires et capillaires en fonction du temps d'élimination et de présence des molécules..... 49

# Tableaux

**Tableau I** : Récepteur opiacés effecteurs secondaires, agonistes et localisations. ..... 6
**Tableau II** : Effets des agonistes opioïdes et dérivés en fonction de l'organe cible. ..... 8
**Tableau III** : Concentrations thérapeutiques, toxiques et létales, tirées de la SFTA et du TIAFT. ..... 15
**Tableau IV** : Méthodes d'analyses de la méthadone selon la matrice utilisée. ..... 17
**Tableau V** : Le cycle pilaire chez l'homme..... 19
**Tableau VI** : Gamme de calibration réalisée pour la mise au point de la méthode de dosage (2005)..... 27
**Tableau VII** : Méthodes d'extraction de la méthadone testées dans les cheveux..... 28
**Tableau VIII** : Ions spécifiques de la méthadone en mode Impact Electronique ou SIM..... 29
**Tableau IX** : Gamme de calibration pour les cas médico-légaux de décès avec une gamme élargie aux opioïdes et stupéfiants (depuis 2006)..... 30
**Tableau X** : Concentrations de méthadone mesurées dans les cheveux pour un homogénat d'un même patient. ..... 32
**Tableau XI** : Patients Unité de Substitution de Grenoble. ..... 36
**Tableau XII** : Prélèvement 18 : Diminution de la concentration dans les cheveux de méthadone en fonction de l'importance de la coloration. ..... 37
**Tableau XIII** : Comparaison de nos résultats avec 2 études publiées. ..... 39
**Tableau XIV** : Ensemble des cas médico-légaux grenoblois de 1999 à 2009 pour lesquels des concentrations sanguines post-mortem de méthadone sont retrouvées..... 43
**Tableau XV** : Profil de tolérance en fonction de l'analyse segmentaire des cheveux. ..... 45

**Tableau XVI** : Décès médico-légaux classés suivant le profil de consommation. .....46
**Tableau XVII** : Exemples d'interprétation des concentrations sanguines post-mortem (PM) de méthadone si comprises entre 200 à 1000 µg/L grâce aux données issues de l'analyse de deux segments capillaires les plus proches de la racine. .....48

# Annexes

**Annexe 1** : Réactifs chimiques utilisés..... VIII
**Annexe 2** : Lettre d'explication sur les motifs et les objectifs de l'étude. ..... IX

# INTRODUCTION

En 2007 le nombre de patients recevant un traitement de substitution aux opiacés était d'environ 28 700 personnes sous méthadone et plus de 93 000 sous buprénorphine haut dosage (Subutex et génériques). L'enquête DRAMES (Décès en Relation avec l'Abus de Médicaments Et de Substances) de 2007 a recensé, sur les réponses de 18 services français, 200 décès liés à un usage abusif de drogue n'étant ni des suicides médicamenteux ni des accidents mortels de la circulation (AFSSAPS, 2009). Sur ces 200 décès répertoriés, 192 cas étaient directement liés à des produits licites ou illicites dont 72 cas représentaient des décès impliquant un traitement de substitution aux opiacés. Sur ces 72 cas, 61 décès impliquaient la méthadone soit seule (27 cas) ou soit en association avec des drogues psychoactives (28 cas) ou soit un stupéfiant licite ou non (6 cas) ; 11 décès impliquaient la buprénorphine haut dosage soit seule (4 cas) ou soit en association avec un médicament psychoactif (6 cas) ou soit de la codéine (1 cas). Il est à souligner qu'il y a davantage de décès sous méthadone pour un nombre inférieur de patients traités par cette molécule. Le recensement de ces décès, des médicaments en cause et des formes galéniques, sont des informations très intéressantes d'un point de vue réglementaire car une éventuelle évolution des notices médicamenteuses, des retraits de produits ou d'une obligation de surveillance biologique peuvent être décidés par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS).

Dans le cadre de la toxicologie médico-légale, et tout particulièrement dans "la recherche des causes de la mort", l'interprétation d'une concentration sanguine post-mortem constitue une étape importante de l'expertise. Dans le cas des opioïdes, tels que la méthadone, une concentration sanguine ne peut être discutée qu'en tenant compte de l'état de tolérance de l'individu vis à vis des morphiniques.

Ainsi, une même concentration sanguine de méthadone peut être considérée d'ordre thérapeutique chez un patient sous traitement de substitution et potentiellement mortelle chez un autre patient dit "naïf", c'est à dire non consommateur chronique d'opiacés (Wolf *et al.*, 2004). C'est pourquoi, des investigations toxicologiques dans les cheveux peuvent permettre d'apporter des éléments d'informations complémentaires sur les habitudes de consommation d'un individu. Il s'agit en effet d'une matrice biologique alternative permettant d'augmenter la fenêtre de détection de plusieurs

semaines à plusieurs mois, sur la consommation chronique de l'individu selon la disponibilité du prélèvement (Jung and Reidenberg, 2005).

L'objectif principal de cette étude a été d'évaluer l'apport de l'analyse toxicologique des cheveux comme aide complémentaire pour l'interprétation des concentrations sanguines de méthadone dans les "recherches des causes de la mort" afin de déterminer l'état de tolérance pharmacodynamique du sujet pour la méthadone ou d'autres opioïdes.

Dans la première étape de ce travail, nous avons mis au point une méthode de dosage de la méthadone et de son métabolite principal l'éthylidène-diméthyl-diphenylpyrrolidine (EDDP) dans des cheveux par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). Deux modes de préparation des échantillons ont été testés (le broyage ou le découpage aux ciseaux), ainsi que deux modes d'incubation : en milieu organique (méthanol) ou milieu acide suivi d'une extraction en phase solide (SPE).

Pour optimiser la technique, nous avons travaillé sur des prélèvements de cheveux réellement positifs à la méthadone obtenus de patients suivis au Centre de Substitution de Grenoble. Ce suivi d'exposition du traitement de substitution à la méthadone nous a également permis de déterminer, dans nos propres conditions analytiques, des concentrations usuellement rencontrées et de définir un seuil de positivité.

Dans la seconde étape, nous avons étudié les cas médico-légaux de l'institut médico-légal de Grenoble pour lesquels des prélèvements de cheveux post-mortem étaient disponibles, et qui présentaient des concentrations sanguines post-mortem de méthadone et d'EDDP. Nous avons ainsi évalué l'intérêt de ces dosages capillaires comme éléments d'informations complémentaires, en association aux éléments obtenus auprès de l'anapathologie et des résultats de l'autopsie, dans la discussion sur le rôle possible de la méthadone dans la survenue du décès, sur les phénomènes de tolérance croisée aux opiacés.

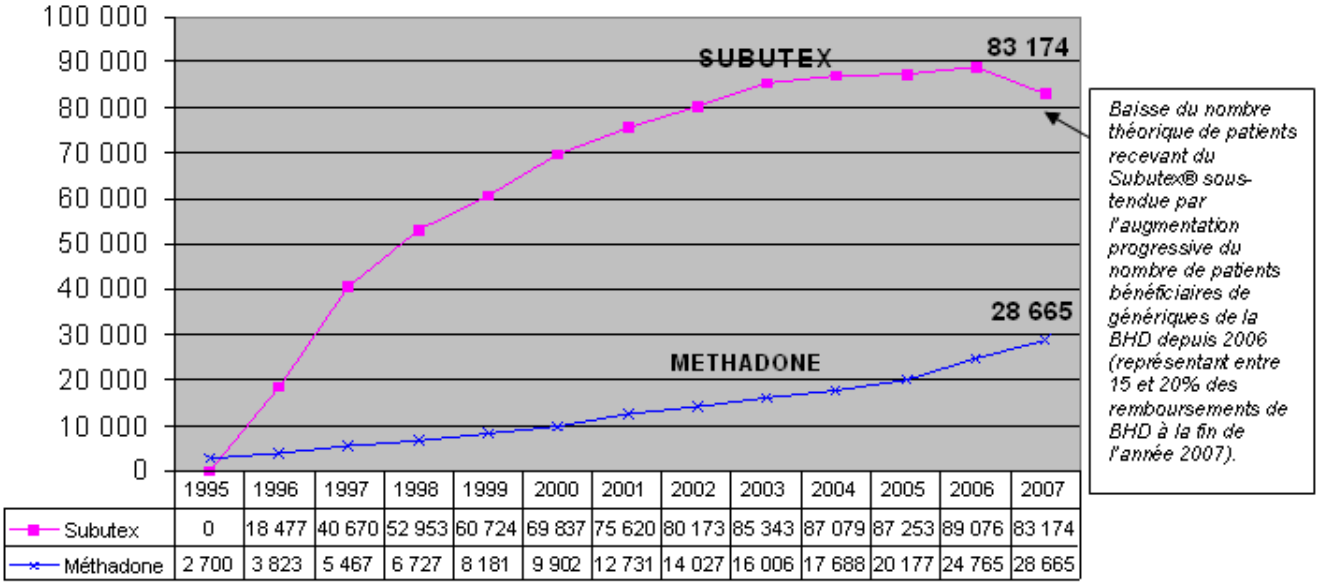
# REVUE DE LA LITTERATURE

## 1- La méthadone

La méthadone, opioïde de synthèse, a comme seule indication en France, depuis 1995, le "traitement substitutif des pharmacodépendances majeures aux opiacés dans le cadre d'une prise en charge médicale, sociale et psychologique", définition figurant dans son autorisation de mise sur le marché (Dictionnaire Vidal, 2009). Dans certains pays européens et aux Etats-Unis la méthadone est aussi indiquée dans le traitement des douleurs rebelles chroniques.

La méthadone se distingue essentiellement de la morphine (opiacé naturel) et de l'héroïne (opiacé semi-synthétique) par son action prolongée sur les récepteurs opioïdes mu (Etape web site, 2009). Le second dérivé opioïde qui présente la même indication thérapeutique est la buprénorphine (génériques ou SUBUTEX®), dont l'activité d'agoniste partiel est attribuée à la liaison lentement réversible aux récepteurs mu qui minimiserait le risque de dépression respiratoire en raison de l'effet plafond et l'appétence pour l'héroïne pendant sa présence dans l'organisme.

D'après les données de l'étude SIAMOIS présentées sur le site de l'Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies (OFDT), l'estimation du nombre de personnes recevant un traitement de substitution Subutex® 8 mg et Méthadone 60 mg entre 1995 et 2007 est décrit dans la figure 1. (OFDT site web, 2009).




| | 1995 | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Subutex | 0 | 18 477 | 40 670 | 52 953 | 60 724 | 69 837 | 75 620 | 80 173 | 85 343 | 87 079 | 87 253 | 89 076 | 83 174 |
| Méthadone | 2 700 | 3 823 | 5 467 | 6 727 | 8 181 | 9 902 | 12 731 | 14 027 | 16 006 | 17 688 | 20 177 | 24 765 | 28 665 |

*[Source : GERS/SIAMOIS/InVS]*

**Figure 1 : Estimation du nombre de personnes recevant un traitement de substitution entre 1995 et 2007** pour du Subutex® 8 mg ou de la Méthadone 60 mg (OFDT site web, 2009)

Depuis 1995, la méthadone est en augmentation à un rythme constant mais beaucoup plus lentement en raison des modalités plus restrictives de sa prescription. En 2008 la Buprénorphine Haut Dosage (BHD 8 mg) représente toujours 80% de l'ensemble des prescriptions en ville et le nombre total de bénéficiaires de remboursements de BHD (Subutex® et génériques) étant de 99 043 au deuxième semestre versus 25 517 bénéficiaires de méthadone sur la même période.

### *1.1. Propriétés pharmacologiques*

Dérivée des opiacés, la méthadone agit comme un antalgique morphinomimétique et un antitussif. Elle peut entraîner un syndrome de dépendance pharmacologique, cependant ses propriétés euphorisantes, sédatives et constipantes seraient plus faibles que la morphine. Chez le patient dépendant aux opiacés elle supprime les symptômes de manque et à doses ajustées n'induit pas d'effet euphorisant important, ni d'altération de la vigilance ou des performances cognitives (Thériaque site internet, 2009 ; Pépin, 1998).

Dans le cas d'intoxication avérée à la méthadone, l'antidote utilisé est la naloxone qui agit comme antagoniste des récepteurs morphiniques (Dictionnaire Vidal, 2009).

### *1.2. Formes galéniques*

Elle est commercialisée en France sous deux formes :

- sirop : METHADONE AP-HP® sirop, en principe non injectable, qui nécessite une seule administration quotidienne contrôlée par du personnel soignant ou une délivrance fractionnée par tranches de 7 jours.
- Gélule : METHADONE AP-HP® gélule, en principe non injectable (artifice galénique), qui nécessite une seule administration quotidienne. Ce traitement est proposé aux patients après un an de traitement par la forme sirop.

Ces formes sont synthétisées par l'assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP) et exploitées par les laboratoires Bouchara-Ricordati (Dictionnaire Vidal, 2009).

Aux Etats-Unis, par exemple, elle existe sous forme de sirop, comprimé ou injectable (METHADONE HYDROCHLORIDE INJECTION USP®, DOLOPHINE®). La forme injectable peut être prescrite dans le cas où la prescription orale d'analgésique pour des

soins d'hospitalisation est impossible et nécessite un recours à la voie parentérale et si le patient n'est pas consommateur d'héroïne. La seconde indication correspond aux périodes d'urgence pour initier un traitement de substitution à l'héroïne, en n'excédant pas trois jours de traitement suivi du relais par une prise orale de méthadone (FDA web site, 2009).

### *1.3. Classe chimique*

La méthadone est un dérivé des diphénylpropylamines la 6-diméthylamino-4-4-diphenyl-3-heptanone, dont la formule plane est décrite ci-dessous (figure 2).

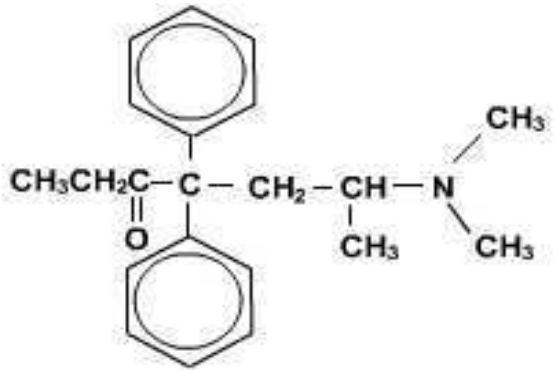



**Figure 2 : Formule plane de la méthadone**

### *1.4. Méthadone et système opioïdes*

Le système opioïde est composé par des cellules nerveuses pourvues de récepteurs opiacés. Celles-ci communiquent entre elles par l'intermédiaire de neuropeptides endogènes : les endorphines, enképhalines et dynorphines, dont la structure est très proche de celle des opiacés (figure 3).

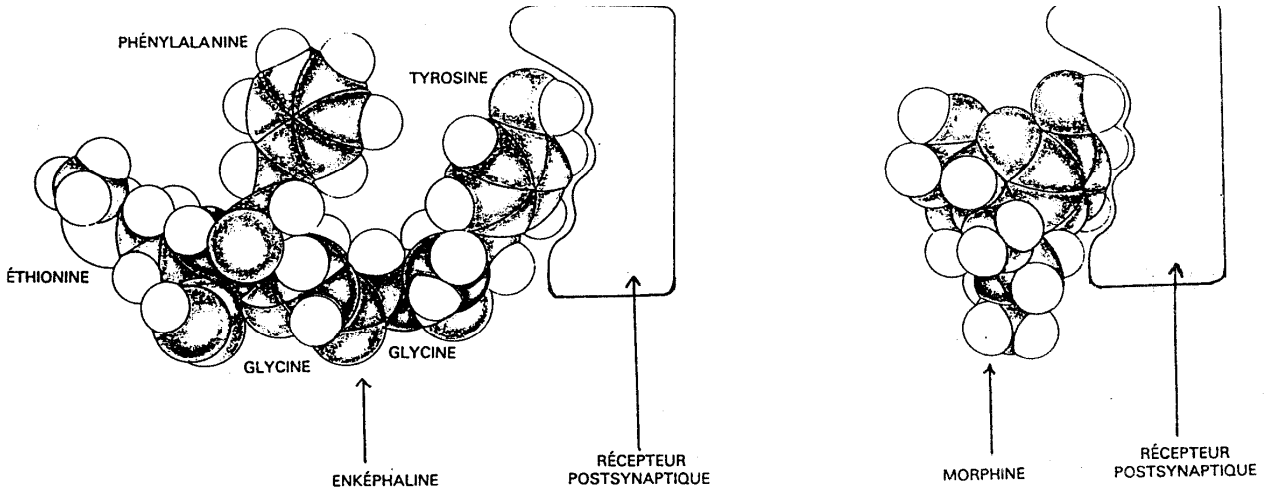



**Figure 3 : Site actif par une approche tridimensionnelle des opioïdes endogènes vis-à-vis de la morphine**

Les récepteurs opiacés sont impliqués dans les voies neuronales qui interviennent dans la perception de la douleur et dans certaines structures sous-corticales du cerveau intervenant dans la gestion des émotions, telles que le système limbique. En agissant sur ces structures, la prise d'héroïne, agoniste pur, se traduit par un effet euphorisant associé à de la somnolence et de l'analgésie (Gaveriaux-Ruff, 2007). Largement distribués dans le système nerveux central, les récepteurs opiacés mu, delta et kappa sont des médiateurs de l'action analgésique, et jouent un rôle dans les phénomènes d'addiction des opiacés en interagissant avec les neurones dopaminergiques du système de la récompense (Kieffer and Gavériaux-Ruff, 2002 ; Wolff, 2002).

Les récepteurs opiacés sont des récepteurs métabotropes couplés aux protéines G. Ils sont classés en 3 types mu, kappa et delta et plusieurs sous-types ; de nouveaux récepteurs dits récepteurs nociceptine ont été caractérisés dernièrement (tableau I) (Wolff, 2002 ; Zaveri *et al*, 2005 ; Lambert, 2008).

| Famille | Transduction | Agoniste | Affinité | Localisation | Effets/Antagonistes |
|---|---|---|---|---|---|
| μ - mu 1,2,3 Ou OP3 | Protéine Gi<br>AC (-)<br>Protéine G0<br>⇨ Ouverture canaux K+<br>⇨ Fermeture canaux $Ca^{2}$+ | Morphine<br>Sulfentanyl<br>DAMGO-enképhaline | Affinité pour μ : endomorphine-1 >> β-endorphine = enképhaline >> (faible affinité dynorphines) | Pré et postsynaptique<br>1. SNC<br>2. Intestinal<br>3. Etc… | Analgésie spinale et supra-spinale<br>Naloxone<br>Naltrexone<br>Cyprodim<br>ω-Conotoxin |
| κ -kappa 1,2,3 ou OP2 | Protéine Gi/0<br>AC (-) ; PDE (+)<br>⇨ Ouverture canaux K+<br>⇨ Fermeture canaux-N $Ca^{2}$+ | Dynorphine-A ou B<br>α-neo-endorphine<br>kétazocine | Dynorphines | SNC | Naloxone<br>Naltrexone<br>Nor-binaltrophimin |
| δ - delta 1,2,3 ou OP1 | Protéine Gi/0<br>⇨ Ouverture canaux K+<br>⇨ Fermeture canaux $Ca^{2}$+ | Ala-Leu-enképhalin<br>Meth-enképhalin<br>Ala-Glu-deltorphine | enképhaline<br>β-endorphine | SNC | Analgésie spinale<br>Naloxone<br>Naltrindol<br>Ala-Leu-Cys-enképhalin |
| NOP ou OP4 | | Récepteur Nociceptine<br>Orphanine FQ | | SNC | Nociception, douleur, mémoire, apprentissage, anxiété, rythme circadien… |

**Tableau I : Récepteurs opiacés effecteurs secondaires, agonistes et localisations**. AC : Adénylate Cyclase, PDE : Phosphodiestérase, (+) : stimulant, (-) : inhibiteur, $K^{+}$ : potassiques, $Ca^{2+}$ : calciques. (Kieffer and Gavériaux-Ruff, 2002 ; (Zaveri *et al*, 2005).)

Les effets antinociceptifs et secondaires des récepteurs opiacés dépendent de leur localisation et de l'agoniste, ce qui permet de distinguer deux sites d'action principaux et un site accessoire (Gaveriaux-Ruff, 2007) (figure 4).

- l'action spinale : la morphine déprime d'emblée la transmission spinale des messages nociceptifs au niveau de la corne postérieure de la moelle épinière. Elle agit au niveau des récepteurs présynaptiques (diminution de la libération des neurotransmetteurs excitateurs) et post-synaptiques (hyperpolarisation des neurones du 1er relais médullaire).

- l'action supra-spinale : l'administration intra-ventriculaire de morphine produit une analgésie très puissante au-delà de la moelle épinière. Les structures riches en récepteurs opiacés se confondent avec les zones d'où émanent les contrôles inhibiteurs descendants : tronc cérébral, noyau raphé-magnus, substance grise péri-aqueducale. Au final, l'action supra-spinale renforce l'effet spinal.

- l'action périphérique : en cas d'inflammation locale, les fibres afférentes primaires A delta et C présentent des récepteurs opioïdes sur leurs terminaisons périphériques et des endomorphines sont libérées localement par les immunocytes.

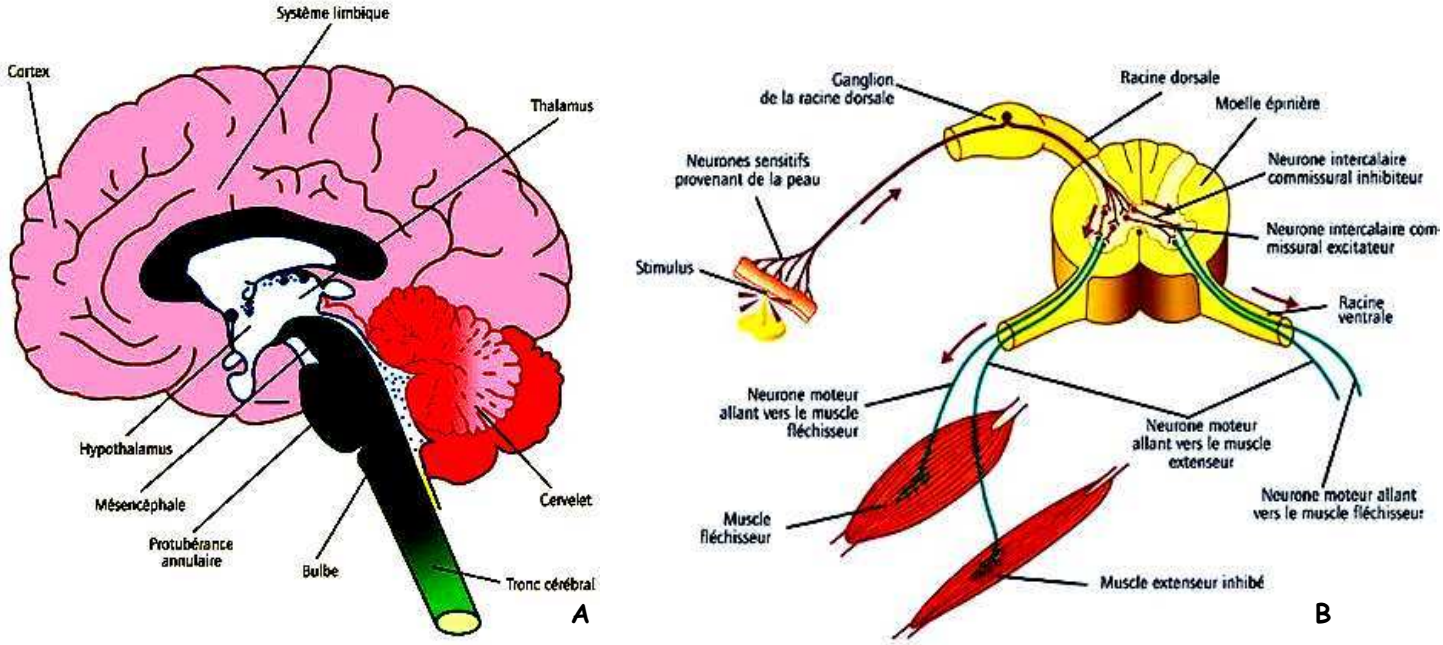



**Figure 4 : Sites d'action des messages douloureux**. 4-A : cerveau humain en coupe transversale, de plusieurs structures impliquées dans le processus et la perception de la douleur. 4-B : connexions entre la moelle épinière et les nerfs impliqués dans la réponse à un stimulus douloureux, tel qu'une piqûre d'épingle. Le nerf sensitif pénètre dans la racine dorsale et transmet son message, par l'intermédiaire des neurones intercalaires, (schéma tiré des illustrations du LEEM)

Il est possible de classer les effets thérapeutiques ou indésirables de la morphine en fonction de l'organe cible (Dictionnaire Vidal, 2009 ; thériaque site internet, 2009) (tableau II).

| Organes | Actions | Thérapeutique | Effets Indésirables |
|---|---|---|---|
| SNC | Spinale et supra-spinale | Analgésie | Sédation/somnolence ou excitation<br>Troubles neurologiques |
| Centre respiratoire (CR) centraux | Dépressive sur CR au $CO_2$ | Dérivé morphinique<br>action antitussive | ↘ rythme / amplitude<br>Risque apnée<br>Hyposialorrhée |
| Centre vomissement | Stimule la zone "Chemoreceptor Trigger Zone" (CTZ) | | Nausée - vomissement |
| Digestif | ↘ péristaltisme niveau central et périphérique | Dérivé morphine<br>Inhibiteurs enképhalinases<br>action anti-diarrhéique | Constipation |
| Œil | Récepteurs $\mu$ et $\kappa$ | | Myosis (surdosage) |
| Sphincter | ↘ tonus fibres musculaires lisses<br>↗ tonus fibres circulaires | Spasme des sphincters | Rétention urinaire si sujet prédisposé |
| Action sur autres systèmes<br><br>Ex : | Libération histamine ⇨ vasodilatation sujet debout | | Vasodilatation ⇨ hypotension |
| | ↘ Dopamine dans l'axe hypothalamo-hypophysaire | | ↗ sécrétion prolactine<br>↘ sécrétion LH, FSH, ACTH |
| | Dopamine - GABA adrénergique | | Tolérance et dépendance |

**Tableau II : Effets des agonistes opioïdes et dérivés en fonction de l'organe cible**. ↘ : diminution, ↗ : augmentation

### *1.5. Mode d'action et phénomène de tolérance*

La méthadone commercialisée se présente sous forme d'un mélange racémique de deux stéréo-isomères. La L-méthadone (lévogyre) est le seul isomère pharmacologiquement actif, cependant la D-méthadone (dextrogyre) pourrait être à

l'origine d'une activité antitussive. Le composé lévogyre est aussi le plus toxique (Ferrari *et al*, 2004).

La méthadone agit comme un agoniste pur et puissant des récepteurs opiacés mu et également présente une affinité pour les récepteurs delta (Wolff, 2002). La méthadone possède aussi une affinité pour les récepteurs NMDA (Wolff, 2002 ; Joo 2007).

L'occupation des récepteurs opiacés par la méthadone entraîne une diminution ou une annulation des effets de l'héroïne si le patient en consomme. Il existe en autre un phénomène de tolérance croisée aux autres opiacés de sorte que la méthadone prise en chronique diminue l'effet euphorisant produit par l'héroïne. La stabilité sérique n'est atteinte qu'après cinq jours d'administration continue de la substance. Une période de trois à cinq jours est donc nécessaire pour s'assurer de l'efficacité de la dose prescrite (Etape web site, 2009).

La tolérance peut se définir simplement comme étant la diminution des effets d'une substance chimique ou xénobiotique lors d'administrations répétées à une même dose. Ce phénomène amène à augmenter les doses pour avoir le même effet que précédemment. Lors d'un traitement prolongé par des opiacés, la tolérance analgésique peut être due à une évolution de la pathologie, à une modification du métabolisme (tolérance pharmacocinétique) ou encore à une modification du signal opioïdergique (tolérance pharmacodynamique) (Marie, 2009 ; Wolff, 2002). De plus, pour une même molécule, la tolérance diffère selon les effets observés. La variabilité de cette tolérance, aussi bien dans sa rapidité d'installation que dans son importance, est aussi fonction de l'agoniste appliqué et de ses modalités d'administration (continue ou fractionnée, systémique ou *per os*…), du type de récepteur et de sa localisation, du type cellulaire en cause, et de la nature des messagers secondaires (Muller *et al*, 1999). Alors que la tolérance aux effets respiratoires de la morphine est faible, comparée à la tolérance aux effets analgésiques, l'augmentation des doses peut conduire à une dépression respiratoire fatale (Marie 2009).

Ces mécanismes adaptatifs ont des répercussions sur l'excitabilité neuronale et sur l'expression génomique : ce sont des modèles de tolérance cellulaire mais ils ne permettent pas d'appréhender toutes les subtilités de la clinique (Muller *et al*, 1999).

Bien que la méthadone interagisse avec les récepteurs mu et kappa, ne seront décrits que les phénomènes moléculaires majeurs qui interviennent dans la régulation du récepteur mu pour lequel la méthadone a le plus d'affinité.

### 1.5.1 L'exposition aigüe et la « down regulation » du récepteur mu

La fixation de l'agoniste sur son récepteur *μ* entraîne un changement de conformation qui permet l'activation des protéines G qui vont aller moduler différents effecteurs intracellulaires (étape 1) via une phosphorylation du GDP en GTP (Marie, 2009 ; Ferrer-Alcon, 2002 ; Joo, 2007) (figure 5). La sous-unité $G\alpha i/0$ couplée au GTP va inhiber l'adénylate cyclase et réduire la production d'AMPc, cette action va nécessiter la libération d'un phosphate du GTP qui retourne sous forme de GDP. La sous-unité $G\beta\gamma$ est impliquée dans la désensibilisation du récepteur via l'action des GRK ou Kinases couplées aux protéines G. Elle est aussi un effecteur secondaire pour activer un ensemble de MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). En effet, le récepteur activé par son agoniste est ensuite phosphorylé par une kinase spécifique GRK et devient substrat pour la β-arrestine. La fixation de cette protéine au récepteur va non seulement provoquer un découplage fonctionnel récepteur/protéine G permettant la désensibilisation (étape 2), mais aussi l'internalisation du récepteur en assurant le recrutement de protéines comme la clathrine et le complexe AP-2 (étape 3). L'endocytose nécessite l'intervention de la dynamine qui grâce à son activité GTPasique va permettre la fermeture du puits de clathrine. Une fois internalisés, les récepteurs sont, soit dirigés dans les lysosomes où ils seront dégradés (étape 4a), soit dirigés dans les endosomes pour y être déphosphorylés puis recyclés dans un état actif à la membrane plasmique (étape 4b). En plus des facteurs mentionnés dans le texte, l'affinité récepteur/β-arrestine jouerait un rôle dans la destinée post-internalisation (Marie, 2009 ; Ferrer-Alcon, 2002).

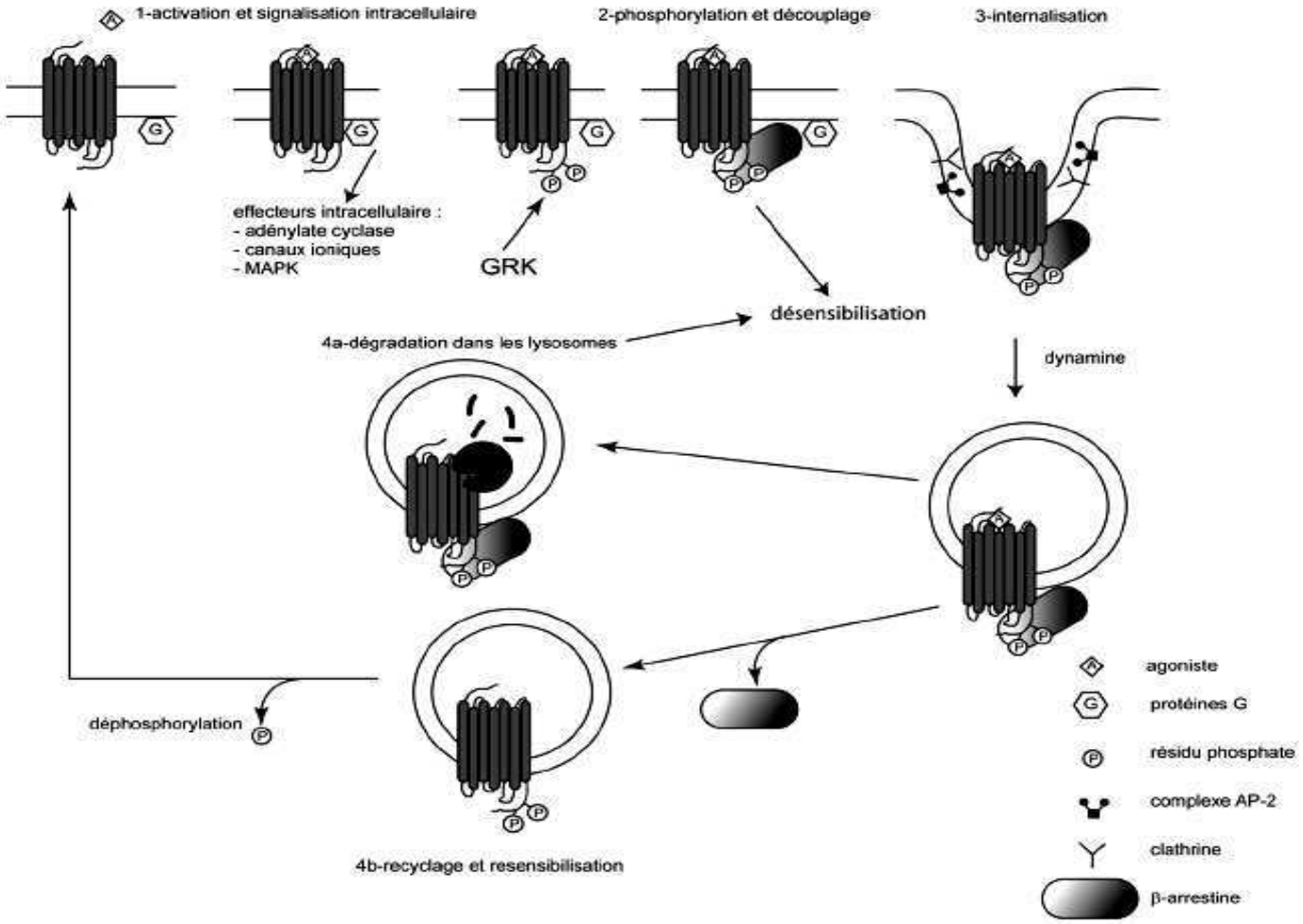



**Figure 5 : Régulation des récepteurs couplés aux protéines G tiré de Marie, 2009.**

### 1.5.2 Le phénomène de up-régulation du système AMP cyclique (AMPc) suite à une exposition chronique aux opiacés

La prise chronique d'opiacés inhibe la production d'AMPc, inhibition qui est compensée à long terme par d'autres mécanismes de production d'AMPc. Lorsque la disponibilité de la drogue vient à manquer, cette capacité accrue de production de l'AMPc est dévoilée et produit l'hyperactivité neuronale et le sentiment de manque (Ferrer-Alcon, 2002 ; Joo, 2007).

### 1.5.3 Régulation homologue

C'est-à-dire une désensibilisation ou internalisation propre au récepteur concerné activé par un agoniste (Ferrer-Alcon, 2002).

1.5.4 Régulation hétérologue

C'est-à-dire une désensibilisation indépendante de l'agoniste faisant intervenir des kinases activés par le récepteur ou par d'autres récepteurs (Ferrer-Alcon, 2002 ; Joo, 2007).

D'autres phénomènes de régulation au niveau cellulaire se mettent en place lors d'exposition chronique aux opiacés, impliquant des changements structurels des cellules opioïdes tels que des modifications des neurofilaments, des activations de facteurs de transcriptions nucléaires… (Ferrer-Alcon, 2002).

### *1.6. Pharmacocinétique*

La prise orale de méthadone est sujette à un important effet de premier passage hépatique et est détectable dans le plasma environ 30 minutes après son administration. La biodisponibilité varie de 50 à 90 %. Son activité maximale se situe en moyenne entre 2 et 4 heures. Du fait de sa forte liposolubilité, 98 % de la méthadone présente dans le compartiment central sont rapidement transférés dans les tissus dont le foie, le rein, les poumons et une petite partie dans le cerveau. Seuls 1 à 2 % de la méthadone restent dans la circulation générale dont 60 à 90 % sont liées aux protéines plasmatiques, surtout l'albumine et les $\alpha$1-glycoprotéines. La fraction restée sous forme libre déterminera l'activité pharmacologique de la méthadone (Ferrari *et al*, 2004).

La demi-vie plasmatique de la méthadone est de l'ordre de 22 à 25 heures en moyenne, mais elle dépend de nombreux facteurs (clairance rénale, pH urinaire, métabolisation, médicaments associés…). Ainsi une seule dose par jour, chez un patient stabilisé, lui permet de ne pas présenter de syndrome de sevrage ni de somnolence.

La métabolisation est presque exclusivement hépatique. La biotransformation majeure est une N-déméthylation par le cytochrome P450 3A4 qui forme deux énantiomères inactifs (figure 5). Cependant au moins 8 métabolites de la méthadone sont connus dont son métabolite principal : EDDP ou 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrroline (Ferrari *et al*, 2004 ; Girod and Staub, 2001).

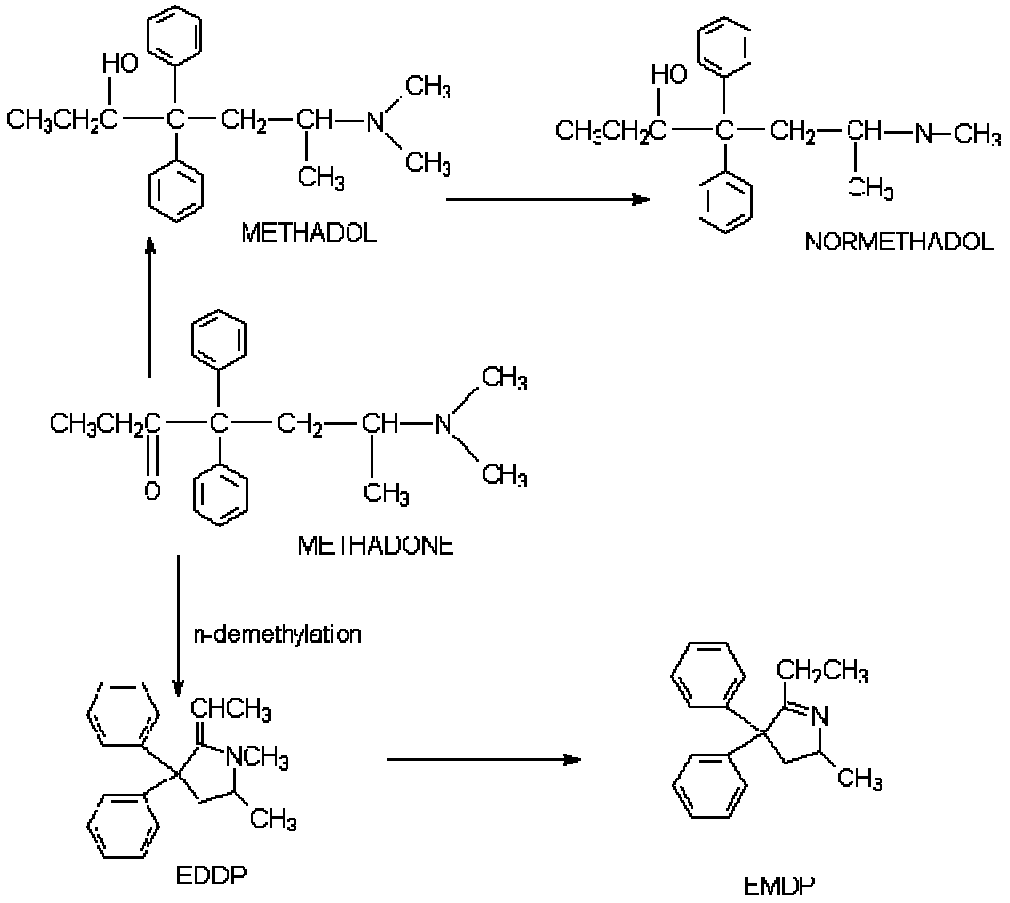



**Figure 6 : Métabolisation hépatique de la méthadone.**
EDDP = 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrroline. EMDP = 2-ethyl-5-methyl-3,3-diphenyl-1-pyrroline.

Du fait de cette métabolisation par des cytochromes, l'élimination de la méthadone varie en fonction de la prise concomitante d'inducteurs ou d'inhibiteurs enzymatiques. L'activité du cytochrome P450 3A4 est fortement inhibée par le kétoconazole, la fluoxétine, la cimétidine et le jus de pamplemousse, d'où une augmentation des concentrations plasmatiques de méthadone (risque de survenue de signes de surdosages). A l'inverse les inducteurs enzymatiques (carbamazépine, rifabutine, rifampicine, griséofulvine et certains traitements anti-rétroviraux) sont à l'origine d'une diminution des concentrations plasmatiques de méthadone d'où un risque d'apparition d'un syndrome de sevrage (Ferrari *et al*, 2004 ; Wolff, 2002 ; Eap *et al*, 2002).

L'élimination de la méthadone et de ses métabolites est principalement rénale. Après administration d'une dose unique de méthadone :

- 20 % sont excrétées dans les urines sous forme inchangée et 13 % sous forme d'EDDP,
- 20 à 40 % de la dose initiale sont retrouvées excrétées dans les fèces sous forme métabolisée.

La méthadone est excrétée par filtration glomérulaire puis subit une réabsorption par le tubule rénal. L'excrétion rénale de la méthadone est augmentée pour des pH urinaires acides (pH < 6), et diminuée pour des pH basiques (pH > 6). L'élimination urinaire de la méthadone peut durer entre 4 et 8 jours (Ferrari *et al*, 2004 ; Thériaque site internet).

### *1.7. Règles de prescription de la méthadone* (Dictionnaire Vidal, 2009)

La méthadone appartient à la classe des stupéfiants. La prescription doit être sur une ordonnance "sécurisée" non renouvelable, répondant aux spécifications fixées par l'arrêté du 31 mars 1999. La durée maximale de prescription est limitée à 14 jours, et la délivrance est fractionnée par période de 7 jours. Ce médicament nécessite une surveillance particulière pendant le traitement. Les patients sont volontaires et doivent accepter les contraintes de la prise en charge :

- venir régulièrement au centre de traitement ou dans l'établissement de santé,
- se soumettre à des analyses urinaires périodiques de contrôle.

C'est un médicament soumis à une prescription initiale réservée aux médecins exerçant en centres spécialisés de soins aux toxicomanes (CSST) ou aux médecins exerçant dans un établissement de santé dans les cas prévus par la circulaire DGS/DHOS n° 2002/57 du 30 janvier 2002, le renouvellement ne peut être effectué que par un médecin exerçant en CSST ou un médecin de ville selon les modalités de relais prévues par la circulaire précitée.

### *1.8. Adaptation posologique*

L'instauration du traitement est uniquement sous forme de sirop et est fonction du niveau de dépendance physique à l'héroïne et doit être administré au moins 10 heures

après la dernière prise de cet opiacé. La dose d'entretien est obtenue progressivement par palier de 10 mg/semaine. L'arrêt du traitement doit être progressif pour éviter tout phénomène de sevrage et/ou de rebond (Dictionnaire Vidal, 2009).

Le phénomène de tolérance, notamment aux effets indésirables, s'installe probablement en quelques semaines mais est individu dépendant. A l'arrêt de la méthadone, la disparition de la tolérance aux effets indésirables tels que la dépression respiratoire est aussi de l'ordre de quelques semaines. Selon l'état de tolérance du sujet à l'héroïne, la posologie de méthadone est à adapter en fonction des signes clinques de sevrage (White and Irvine, 1999 ; Wolff, 2002). L'utilisation de la forme gélule n'est possible que pour les patients sous traitements depuis au moins 1 ans avec du sirop (Dictionnaire Vidal, 2009).

### *1.9 Concentrations thérapeutiques, toxiques et létales*

Les concentrations thérapeutiques, toxiques et létales couramment retrouvées sont montrées dans le tableau III, ce sont des références nationales accréditées COFRAC et internationales émises par des experts toxicologues médicaux-légaux (SFTA web site, TIAFT web site).

| | **SFTA**<br>**Société Française de Toxicologie Analytique** | **TIAFT**<br>**The International Association of Forensic Toxicologists** |
|---|---|---|
| **Concentrations thérapeutiques** | 50 - 1000 ng/mL<br>ou D. Méthadone 50 – 750 ng/mL<br>L.Méthadone 40 – 300 ng/mL | sérique : 50 – 500 ng/mL<br>analgésie : 100 – 300 ng/mL<br>addictif : 200 – 750 ng/mL |
| **Concentrations toxiques** | 1000 - 2000 ng/mL<br>ou D. Méthadone > 1000 ng/mL,<br>L.Méthadone > 500 ng/mL | naïf : 200 ng/mL<br>consommateur > 750 ng/mL |
| **Concentrations létales** | moyenne 1400 ng/mL<br>ou D. Méthadone > 4000 ng/mL,<br>L.Méthadone > 1000 ng/mL | aigu : 200 – 1000 ng/mL |

**Tableau III : Concentrations thérapeutiques, toxiques et létales,** tirées de la SFTA et du TIAFT.

### *1.10. Surdosage et décès*

Les signes cliniques d'un surdosage à la méthadone peuvent comprendre : myosis, bradypnée, dépression respiratoire, œdème pulmonaire, somnolence, coma avec hypotension artérielle, bradycardie, apnée, et défaillance circulatoire (Dictionnaire Vidal, 2009 ; Corkery *et al*, 2004).

Les décès suite à une prise létale de méthadone peuvent être (Corkery *et al*, 2004) :

- d'origine pulmonaire : dépression respiratoire majorée en cas de dysfonctionnement pulmonaire connu, obstructions des voies aériennes (dans les cas d'association avec des benzodiazépines), œdème pulmonaire et inhalation des vomissements / du contenu gastrique (syndrome de Mendelson) sont les plus communs.
- d'origine cardiaque : par un effet stabilisant de membrane, car la méthadone peut bloquer les canaux potassiques du myocarde, d'où l'apparition de complications telles qu'un collapsus cardiovasculaire ou des arythmies.
- d'origine rénale : une insuffisance rénale aiguë plus souvent due aux conditions qui surviennent lors d'une complication, d'une rhabdomyolyse non traumatique, plutôt que due à la méthadone elle même.

### *1.11 Méthodes d'analyse*

Les méthodes d'analyse décrites dans la littérature pour la recherche et/ou le dosage de la méthadone et de ses métabolites sont décrites dans le tableau IV (Pépin, 1998 ; Cairns *et al*, 2004 ; Konstrand *et al*, 2004 ; Alvarez, 2009).

| Techniques | Appareillages | Détecteurs | Milieux | Objectifs |
|---|---|---|---|---|
| Immunologique | - par polarisation de fluorescence<br>FPIA via système TDX<br>- par EMIT<br>- par CEDIA<br>- par RIA<br>- par microgenics* | | urines<br>cheveux (RIA)<br>*Anticorps anti-EDDP | suivi patients en unité toxicomane |
| Chromatographie | Chromatographie en Phase Gazeuse | - ionisation flamme (FID)<br>- Azote-phosphore (NPD)<br>- SM<br>- SM en tandem | urines<br>sang<br>bile<br>liquide gastrique<br>cheveux... | screening<br>quantification |
| | Chromatographie en phase Liquide Haute Performance | - colonne chirale** et Ultraviolet<br>- barrette de diode<br>- SM<br>- SM en tandem | urines<br>sang<br>bile<br>liquide gastrique<br>cheveux... | **séparation racémique<br>screening<br>quantification |
| | Electrophorèse capillaire | | urines<br>sang<br>bile<br>liquide gastrique<br>cheveux... | séparation racémique<br>screening<br>quantification |

**Tableau IV : Méthodes d'analyses de la méthadone selon la matrice utilisée**. CEDIA : Cloned Enzyme Donor Immunoassay, EMIT : Enzyme Multiplied Immunoassay, FID : Détecteur par Ionisation de Flamme, FPIA : Fluorescence Polarization Immunoassay, NPD : Détecteur Azote-Phosphore, RIA : Radio Immunoassay, SM : Spectrométrie de masse.

## 2- Incorporation des xénobiotiques dans les cheveux

### *2.1 Généralités sur le cycle pilaire et la composition physico-chimique des cheveux*

Le cheveu, constitué de 85 % de protéines, de 10 % d'eau, de 5 % de lipides et d'éléments minéraux, comporte une trame protéique importante (Harkey, 1993). Il se compose :

- d'une partie interne non visible, la racine (figure 7)
- et d'une partie externe visible, la tige pilaire (figure 8).

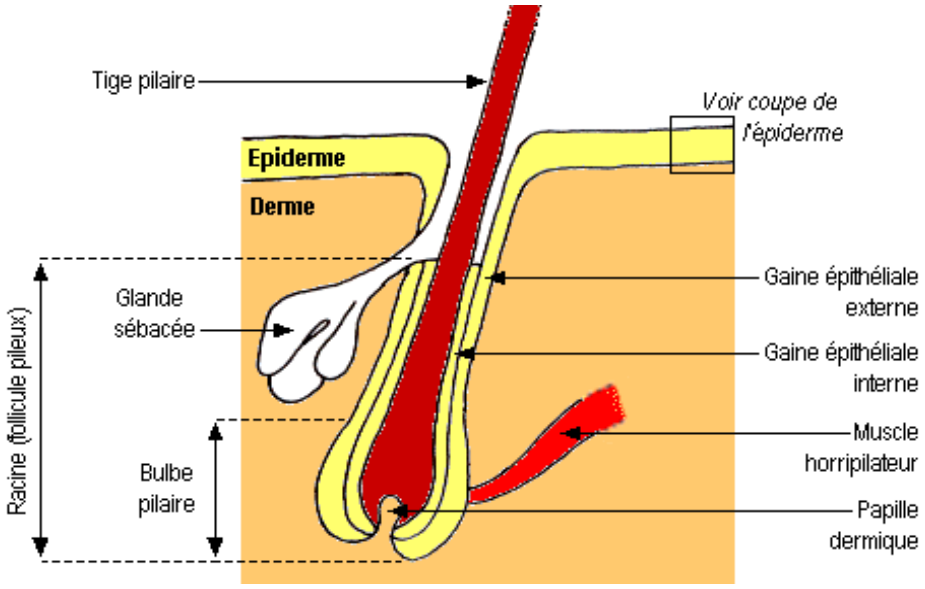



**Figure 7 : Schéma d'un follicule pileux.**

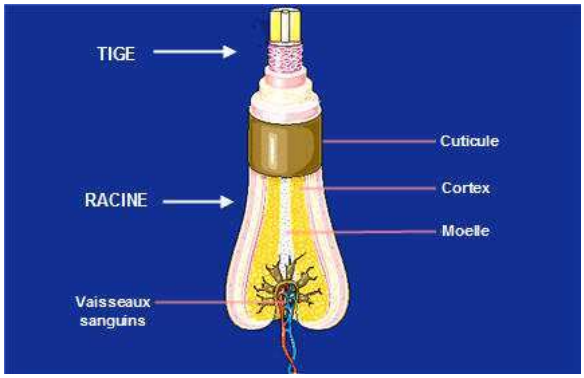



**Figure 8 : Coupe d'une tige pilaire**

La racine est la portion formée de cellules vivantes telles que le follicule pileux associé aux capillaires sanguins et aux glandes sébacées et apocrines.

Le follicule pileux peut être divisé en 3 zones fonctionnelles :

- une zone profonde dans et autour du bulbe, site de la synthèse biologique des cellules du cheveu,
- une zone située au dessus du bulbe, site de la kératogénèse (étape de durcissement et de solidification du cheveu),
- et une zone correspondant au cheveu permanent.

La tige pilaire est constituée de cellules kératinisées mortes. De forme cylindrique, elle comprend 3 couches concentriques (figure 8) :

- au centre, la médulla est présente dans le cheveu mature de l'homme.

- autour le cortex, dont le diamètre correspond à la grosseur du cheveu. Le cortex possède des cellules kératinisées qui contiennent des granules de mélanine et de nombreux filaments de kératine.
- La couche externe, la cuticule dont la fonction est d'ancrer la tige dans le follicule et de protéger l'intérieur de la fibre. Elle est constituée d'une kératine dense, de lipides et de minéraux. La cuticule peut être endommagée ou détruite par la chaleur, la lumière, des traitements chimiques et mécaniques (Harkey, 1993 ; Cone and Joseph, 1996).

Les cheveux poussent de manière cyclique. Trois phases d'activité se succèdent : une phase anagène de croissance, une phase catagène qui précède la dernière phase télogène (tableau V) (Harkey, 1993).

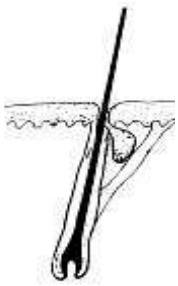
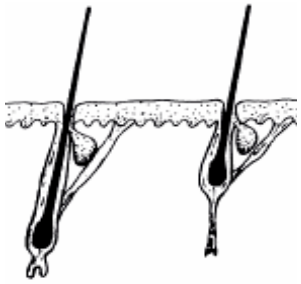
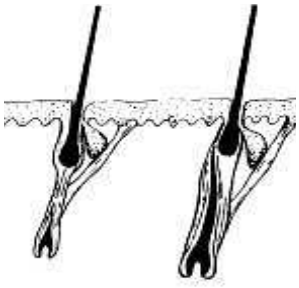
| | **Phase anagène** | **Phase catagène** | **Phase Télogène** |
|---|---|---|---|
| **Phénomènes** | Production continue de la tige pilaire par le follicule | Régression du follicule par un phénomène d'apoptose. | Mise au repos du follicule. Parallèlement formation d'un nouveau bourgeon pilaire. |
| **Durées** | Taux de croissance de 0,3 à 0,4 mm/jour soit 0,9 à 1,2 cm/mois | Très rapide, 2 semaines environ | Environ 3 mois. |
| **Conséquences** | Formation du cheveu, différenciation des cellules en cuticule, cortex ou médulla, puis début de kératinisation | Kératinisation complète de la racine du cheveu | Le cheveu reste ancré dans le bulbe jusqu'à ce qu'il tombe à la fin de cette période. |
| **Schéma** |  |  |  |

**Tableau V : Le cycle pilaire chez l'homme**

Ainsi, la vascularisation des follicules pileux pendant la phase anagène permet de mettre en contact les cheveux avec un réservoir potentiel, de xénobiotiques circulant

dans le sang. L'exposition régulière à des substances étrangères va donc être à l'origine d'une accumulation dans la trame protéique des cheveux. De plus, les cheveux constituent une matrice particulière dans laquelle aucune activité métabolique ni excrétrice n'est observée. Seule la coupe de cheveux ou leur remplacement entraînent une perte des substances stockées (Kronstrand and Scott, 2007).

## *2.2. Modèles d'incorporation des xénobiotiques*

### 2.2.1. Incorporation interne par transfert passif

C'est le dogme le plus répandu et le plus théorique, le "modèle du piège". L'incorporation des xénobiotiques a lieu par un transfert passif à partir du flux sanguin au cours du processus de croissance des cheveux grâce à la présence des capillaires qui nourrissent le follicule pileux. Après l'émergence du cheveu hors du cuir chevelu, les xénobiotiques forment des "bandes" dont la concentration serait directement proportionnelle à la concentration sanguine présente lors de la formation du cheveu (figure 9). Par ailleurs, les molécules piégées sont ainsi protégées de toute perte sauf en cas de traitements capillaires (permanente, décoloration). Comme la croissance des cheveux est constante, ce modèle peut fournir un historique de la consommation à la fois dans le temps et la quantité (Kidwell and Blank, 1996 ; Kidwell and Smith, 2007).

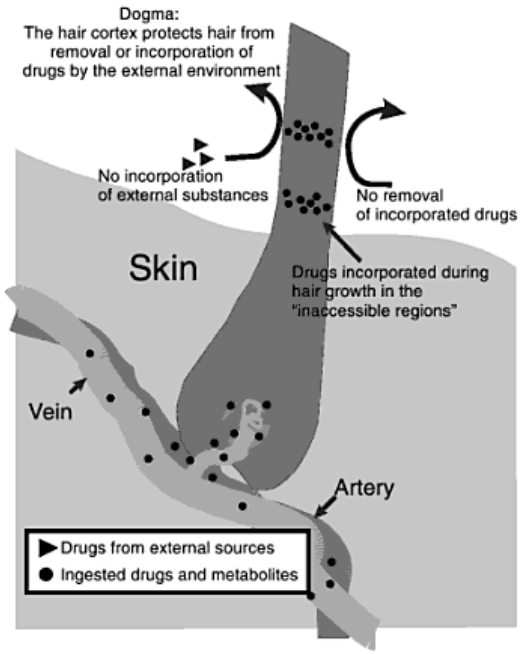



**Figure 9 : Modèle possible d'incorporation des xénobiotiques par transfert passif dans les cheveux pendant la phase anagène**, image tirée de Kidwell and Smith, page 29, 2007

Il est de coutume d'admettre qu'en moyenne les cheveux poussent en moyenne d'un centimètre par mois. Si l'on segmente une mèche de cheveux par section de un centimètre, il est possible d'extrapoler l'historique des consommations durant cette période. L'auteur Martz *et al* a pu travailler sur les cheveux d'un patient ayant fait une overdose à la cocaïne et ayant survécu pendant encore un mois après cet épisode. Parmi les différentes sections, les plus anciens segments avaient permis de mettre en évidence une exposition chronique à la cocaïne. La section relative à la période de l'overdose présentait une augmentation de la teneur capillaire en cocaïne. La portion équivalente à la période de survie marquait l'abstention de prise (Martz *et al*, 1991).

2.2.2. Incorporation externe

Certains auteurs comme Kidwell and Blank proposent 2 autres modes d'incorporation d'origine externe (figure 10) (Kidwell and Blank, 1996 ; Kidwell and Smith, 2007) :

- le premier issus de l'excrétion dans la sueur ou le sébum de xénobiotiques solubles dans l'eau (et/ou leurs métabolites), l'incorporation interviendrait sur des cheveux humides ou en sueur en train d'émerger du cuir chevelu.
- le second issus d'une exposition passive des cheveux aux xénobiotiques suite à un contact avec des vapeurs (fumée) ou une phase solide (drogues sur les meubles ou les vêtements), suivi par une dissolution des produits dans la sueur ou un autre milieu aqueux. L'incorporation fait donc suite à une contamination extérieure après la formation du cheveu et après que le cheveu ait émergé du cuir chevelu.

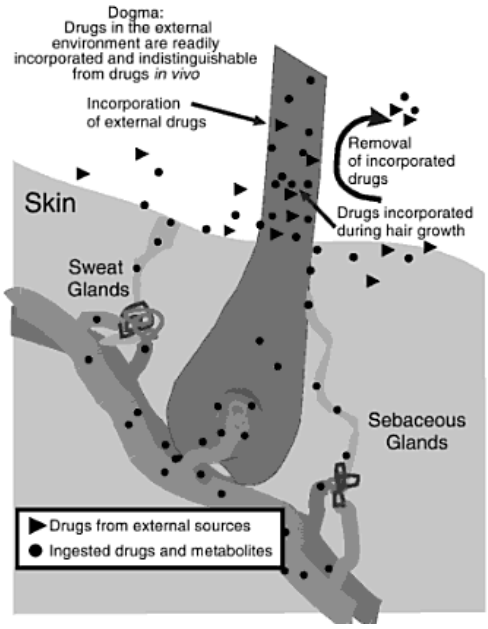



**Figure 10 : Modèle possible d'incorporation des xénobiotiques par contamination externe via le modèle de la sueur**, image tirée de Kidwell and Smith, page 30, 2007

Ce modèle de "la sueur" permettrait d'expliquer pourquoi (Henderson, 1993 ; Kintz, 2004a ; Kidwell and Smith, 2007) :

- la distribution le long du cheveu n'est pas toujours cohérente avec la croissance du cheveu. De plus il faut tenir compte d'une fenêtre d'une dizaine de jours (ou plus) pour tenir compte de l'émergence hors du cuir chevelu de la zone correspondant à l'exposition par voie sanguine (Henderson, 1993).
- le temps d'apparition des drogues dans les cheveux varie considérablement entre les sujets (Henderson, 1993).
- des variations de concentrations dans les cheveux sont observables chez des sujets recevant une même prise (Kintz, 2004a).
- l'absence de corrélation entre les concentrations retrouvées dans les cheveux et celles trouvées dans le sang (Girod *et al*, 2001).
- le ratio entre le xénobiotique et ses métabolites dans le sang est différent de celui retrouvé dans les cheveux. Le xénobiotique principe actif s'accumulant dans la sueur, il est logique d'en retrouver plus (Kintz, 2004a).

Ces mécanismes d'incorporation sont liés aux propriétés de chaque molécule (pKa, liposolubilité, polarité…), à la nature de la matrice kératinisée, ainsi qu'aux variations interindividuelles (Henderson, 1993).

# MATERIELS ET METHODES

# 1- Matériels

## 1.1. Matériels

Broyeur à boulet oscillant (type MM200 Retsch) (avec un bol – acier inox – 10 ml type MM2/BL/AI/10 et deux boulets – acier inox – diamètre 12 mm type MM2/BT/AI/12). Système d'extraction en phase solide Vac Elut (Varian). De 1999 à 2005, utilisation du chromatographe Fisons GC 8000 couplé à un spectromètre de masse Fisons MD 800, logiciel software Mass-Lab (Fisons Instrument). Dès 2006, utilisation du chromatographe 6890N Network GC System (Agilent Technologies) couplé à un spectromètre de masse 5975 inert XL Mass Selective Detector, équipé d'un passeur d'échantillons liquides 7683 Series Autosampler. Les différents logiciels utilisés sont les suivants : MSD ChemStation (Rev. D.02.00.275), Retention Time Locking Software (Rev. B.01.01), qui permet de travailler en temps de rétention bloqués, et MSD Productivity Chemstation Deconvolution Reporting Software (déc. 2005 – Rev.A.02.01). Deux bibliothèques commerciales sont utilisées : NIST 05 Spectral library (Rev. D.05.00) et PMW (Rev.D.04.00).

## 1.2. Réactifs et consommables

De chez SDS : Méthanol pestipur, Dichlorométhane atrasol, Acétate d'éthyle atrasol, Propan-2-ol (HPLC). De chez MERCK : Ammoniaque 25% suprapur, Phosphate de potassium ($KH_2PO_4$) pro-analysis, hydroxyde de potassium (KOH) pro-analysis, de la soude (NaOH). De chez Prolabo : acide chlorhydrique (HCl) 36% RP normapur. De chez Sigma : BSTFA-1%TMCS (ref: T06871). De chez Varian : cartouches d'extraction solide-liquide : Bond Elute Certify LRC 130 mg (10 ml). De chez BCP Instrument Colonne: J.W. DB5-MS, 15 m, diamètre intérieur 0,25 mm, épaisseur du film 0,25 µm. De chez LGC Promochem et Cérillians solutions de standards et de deutérés dans du méthanol : solution de méthadone 1 g/L (M-008), EDDP à 100 mg/L, de méthadone-d3 à 100 mg/L, EDDP-d3 à 100 mg/L, autres opiacés (formes froides et deutérées) : ecgonineméthylester (EME), cocaïne, benzylecgonine (BE), morphine, codéine, dihydrocodéine, codéthylline, 6-mono-acétyl-morphine (6-MAM), pholcodine. Solutions

obtenues après accord de l'unité stupéfiants et psychotropes de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé.

### *1.3. Préparations des réactifs*

Tous les réactifs chimiques utilisés sont référencés dans l'annexe 1.

### *1.4. Populations étudiées*

Les prélèvements de cheveux dits négatifs sont des échantillons de sujets exempts de tout traitement. Les prélèvements de cheveux dits positifs à la méthadone sont des échantillons anonymes de patients en suivi de traitement à l'Unité de Substitution de Grenoble. Ces échantillons ont été obtenus sur la période du 17 juin 2005 au 07 juillet 2005. Sur 70 patients, 26 ont participé et accordé leur consentement oral, 16 hommes et 10 femmes. En annexe 2, la fiche d'information délivrée au patient.

Nous avons recensé 21 expertises de décès pour lesquelles la méthadone a été retrouvée au niveau sanguin, sur la période de janvier 1999 à août 2009. Or seuls neuf prélèvements médico-légaux post-mortem de cheveux, 6 hommes et 3 femmes, ont été exploitables pour des fins scientifiques ou ont été réalisés au cours de l'expertise du sujet décédé.

### *1.5 Principes de l'analyse de la méthadone dans les cheveux*

Le principe de l'analyse dans les cheveux repose sur les étapes suivantes (figure 11), avec 2 modes de préparation de l'échantillon (broyés ou coupés), et 2 modes d'incubation-extraction (méthanolique ou milieu acide suivi d'une SPE).

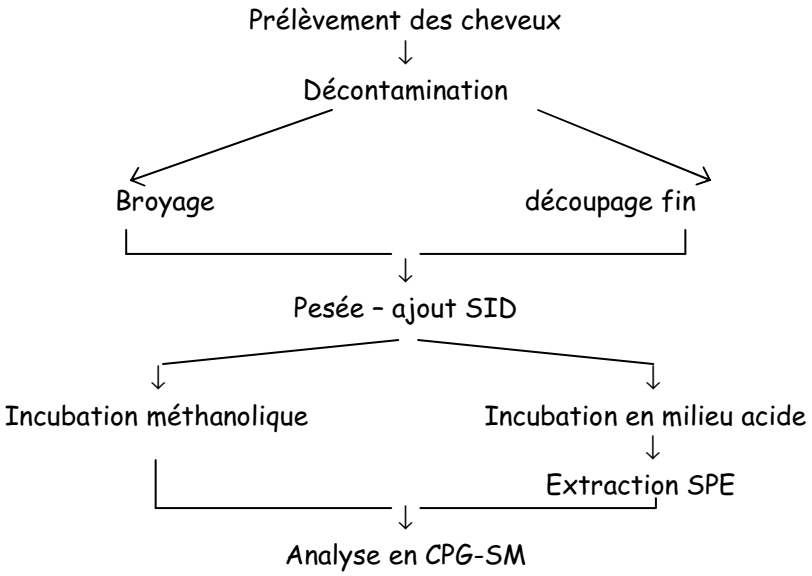



**Figure 11 : Principe de l'analyse de méthadone dans les cheveux.** SID : standards internes deutérés, SPE : extraction en phase solide, CPG-SM : chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

## 2- Méthodes

### *2.1. Prélèvement de cheveux*

Les échantillons de cheveux sont prélevés sur l'arrière du crâne dans la région du vertex postérieur. Des mèches de cheveux, équivalentes à la section d'un crayon, sont coupées le plus près possible du cuir chevelu. Le côté racine est différencié du côté extrémité par l'intermédiaire d'une ficelle.

Les échantillons ainsi prélevés sont identifiés puis stockés, en vue de l'analyse, dans des tubes fermés ou dans des enveloppes en papier à fermeture adhésive et conservés à température ambiante.

Les prélèvements de cheveux témoins sont réalisés suivant le même protocole.

### *2.2. Décontamination des cheveux*

L'analyse porte soit sur toute la longueur de la mèche, soit sur un segment de 1 à 2 cm de cheveux à partir de la racine (coté ficelle).

- Couper précautionneusement des segments de cheveux de 1 cm environ dans un tube en verre (figure 12) (Kronstrand and Druid, 2007)
- Ajouter 5 ml de dichlorométhane, agitation douce pendant 10 minutes

- Eliminer la phase organique et répéter l'opération de décontamination externe une seconde fois
- Sécher les segments de cheveux sur du papier filtre

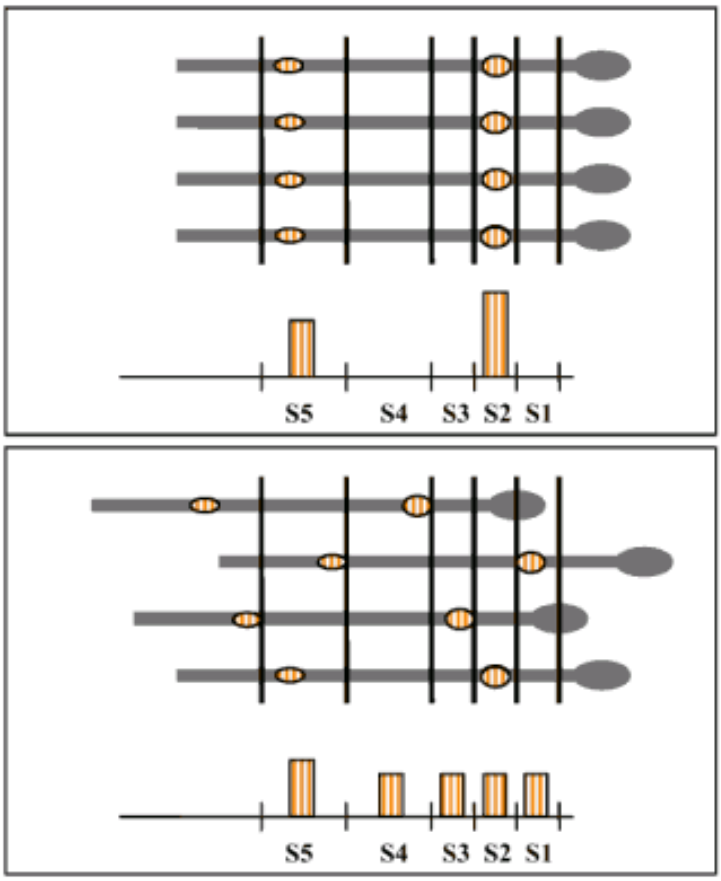



**Figure 12 : Importance d'un bon positionnement des bandes de cheveux** pour éviter un chevauchement des zones exposées (orange) en fonction de la racine. S : segment allant du plus récent ou 1 (proche de la racine) au plus lointain soit 5. Figure tirée de Kronstrand and Druid, 2007

### *2.3. Broyage ou découpage fin des cheveux*

#### 2.3.1. Broyage

Le broyage des cheveux se fait par fraction de 200 mg environ (si possible). Ils sont introduits dans un bol du broyeur à boulet avec 2 billes en acier d'un diamètre de 12 mm. Les conditions d'oscillation sont une fréquence de 60 hertz, pendant 15 min.

#### 2.3.2. Découpage

Les cheveux sont découpés à l'aide d'un ciseau de coiffeur à bouts pointus par segments de 1 mm dans une feuille A5 de papier vierge pliée en 8 et positionnée en

rectangle. Chaque petit contenant en papier est nommé : nom, prénom, date de découpage, numéro du segment et personne ayant réalisé le découpage.

### *2.4. Ajout de standards internes deutérés*

Pour les courbes de calibration, la prise d'essai est de 50 mg, de cheveux broyés ou découpés, transférée dans un tube en verre. Les surcharges en méthadone et EDDP froides ou deutérées sont effectuées selon le protocole suivant :

| **Concentration en ng/mg de cheveux** | **0** | **0,4** | **1** | **2** | **4** | **10** | **20** | **Echantillon à doser** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Méthadone 10 mg/L (µL) | 0 | 2 | 5 | 10 | | | | |
| EDDP 10 mg/L (µL) | 0 | 2 | 5 | 10 | | | | |
| Méthadone 100 mg/L (µL) | | | | | 2 | 5 | 10 | |
| EDDP 100 mg/L (µL) | | | | | 2 | 5 | 10 | |
| Méthadone-d3 100 mg/L (µL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| EDDP-d3 100 mg/L (µL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |

**Tableau VI : Gamme de calibration réalisée pour la mise au point de la méthode de dosage** (avant 2005). Prise d'essai de 50 mg de cheveux broyés ou coupés pour la gamme. Prise d'essai de 20 à 50 mg pour l'échantillon à doser.

### *2.5. Méthodes d'extraction*

#### 2.5.1 Incubation méthanolique décrite par PATERSON (Paterson *et al*, 2001)

Description des étapes dans le tableau VII.

#### 2.5.2. Incubation en milieu acide puis extraction SPE utilisée au laboratoire de pharmacologie

L'extraction SPE est réalisée selon le protocole utilisé en routine au laboratoire pour le dosage (tableau VII) :

- dans le sang et sur l'urine de : la cocaïne, des opiacés, la méthadone et la buprénorphine (Vincent *et al*, 1999),
- ainsi que dans les cheveux de : l'héroïne, la morphine et la codéine.

Pour réaliser une analyse complète en screening des extraits de cheveux pour les autres opioïdes, il est possible de réaliser une dérivation. Une fraction de l'extrait acétate d'éthyle est évaporée puis repris par 35µL de BSTFA-1%-TMCS (une heure à température ambiante) pour une dérivation par silylation.

La conservation de tous les extraits est à –20°C.

| | **Incubation méthanolique** | **Extraction en phase solide (SPE)** |
|---|---|---|
| **Echantillon pesé et décontaminé** | 20 mg de cheveux broyés ou coupés +<br>200 ng standards deutérés +<br>2 ml MeOH pur | 20 mg ou plus de cheveux broyés ou coupés +<br>200 ng standards deutérés +<br>1 ml HCl 0,1 M |
| **extraction ou hydrolyse** | 14h00 à l'étuve à + 45°C | 14h00 au bain-marie à +56°C |
| **Centrifugation** | 10 min à 3000 rotation par minutes | |
| **surnageant transvasé** | avec pipette pasteur en verre dans des vials de 3 mL | avec une pipette pasteur en verre dans des tubes en verre de 5 mL +<br>2 mL de tampon phosphate 0,1N pH 6 +<br>quelques gouttes de NaOH 1N<br>Vérification que le pH = 6 |
| **SPE** | | Cartouche LRC (Bond Elute)<br>- Activation : 2 mL Méthanol, puis 2 mL de tampon phosphate 0,1 N pH 6<br>- dépôt de l'échantillon<br>- Rincages : 6 mL d'eau distillée, 3 mL HCl 0,1 N et 3 mL de méthanol.<br>- Elution dans des tubes borosilicatés avec Dichlorométhane/ propan-2-ol (80/20) et 2% d'ammoniaque concentré. |
| **Evaporation** | à sec sous air, température ambiante | à sec sous air, température ambiante<br>puis 500 µL de dichlorométhane<br>ré-évapore à sec sous air |
| **Reprise du résidu sec** | par 30 µL d'acétate d'éthyle et injection | par 30 µL d'acétate d'éthyle et injection |
| **Evaporation** | à sec sous air, température ambiante | à sec sous air, température ambiante |
| **Reprise du résidu sec** | par 30 µL de BSTFA-1% TMCS et injection | par 30 µL de BSTFA-1% TMCS et injection |

**Tableau VII : Méthodes d'extraction de la méthadone testées dans les cheveux.**

### *2.6. Méthode d'analyse en CPG-SM pour les patients du centre de substitution et les sujets décédés de 1999 à 2005.*

CPG-SM : FISON. Les injections automatiques (1 µL) sont réalisées en mode splitless (45 secondes), à une température de 250°Celsius, sur une colonne capillaire de silice fondue : DB-5ms (30 m x 0,25 mm d.i. ; 0,25 µm d'épaisseur de film). Le gaz vecteur utilisé est l'hélium, à un débit constant de 1 mL/minute. Le programme de température du four est le suivant : 100°C pendant 1mn, puis 10°C par minute jusqu'à 280°C et plateau à 280°C pendant 12 mn. La détection est réalisée en impact électronique à 70eV, en mode SCAN avec un balayage des masses de 40 à 550 unité de masse atomique (uma) (de même pour les injections en screening / SCAN des dérivés BSTFA ou acétate d'éthyle). Les températures de l'interface, de la source sont respectivement de 280 et 200°C.

L'identification et la quantification de la méthadone et de l'EDDP reposent sur la sélection de 3 ions spécifiques couplés aux 3 ions spécifiques des analogues deutérés (tableau VIII).

| Molécules | Fenêtre : temps de rétention (mn) | Dwell time (sec) | ion de quantification (m/z) | ions de confirmation (m/z) |
|---|---|---|---|---|
| Méthadone | 13,25 – 14,50 | 0,20 | 294,19 | 195,12 – 223,13 |
| Méthadone-d3 | | 0,20 | 297,21 | 198,13 – 226,13 |
| EDDP | 11,50 – 13,25 | 0,20 | 277,19 | 262,17 – 276,18 |
| EDDP-d3 | | 0,20 | 280, 21 | 265,18 – 279,20 |

**Tableau VIII : Ions spécifiques de la méthadone en mode Impact Electronique ou SIM** avec l'appareillage FISON.

### *2.7. Méthode d'analyse en CPG-SM et tableau de surcharge pour la gamme de calibration, pour les sujets décédés depuis 2006.*

CPG-SM : Agilent N6890. Les injections automatiques (1 µL) sont réalisées en mode splitless pulsé, à une température de 250°C, sur une colonne capillaire de silice fondue : DB-5ms (30 m x 0,25 mm d.i. ; 0,25 µm d'épaisseur de film). Le gaz vecteur utilisé est l'hélium, à un débit constant de 1 mL/min. Le programme de température du four est le suivant : 100°C pendant 1 min, puis une programmation à 20°C/min jusqu'à 300°C et un

plateau de 11 min à 300°C. La détection est réalisée en impact électronique à 70eV, en mode SCAN avec un balayage des masses de 40 à 600 uma. Les températures de l'interface, de la source et du quadripôle sont respectivement de 315, 230 et 150°C.

Depuis 2006, le laboratoire a modifié la gamme de calibration pour inclure la quantification systématique d'autres opiacés que la méthadone et l'EDDP, ainsi que des stupéfiants de type cocaïne et leurs métabolites (tableau IX). La limite de détection est de 0,05 ng/mg de cheveux et la limite de quantification est de 0,1 ng/mg de cheveux pour la méthadone.

| **Concentration capillaire en ng/mg prise essai 50 mg cheveux coupés** | | **0** | **0,05** | **0,1** | **0,2** | **0,4** | **1** | **2** | **4** | **10** | **20** | **Echantillon à doser 50 mg** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Méthadone 1 mg/L | (µL) | 0 | 2,5 | 5 | | | | | | | | |
| EDDP 1 mg/L | (µL) | 0 | 2,5 | 5 | | | | | | | | |
| Méthadone 10 mg/L | (µL) | 0 | | | 1 | 2 | 5 | 10 | | | | |
| EDDP 10 mg/L | (µL) | 0 | | | 1 | 2 | 5 | 10 | | | | |
| Méthadone 100 mg/L | (µL) | | | | | | | | 2 | 5 | 10 | |
| EDDP 100mg/L | (µL) | | | | | | | | 2 | 5 | 10 | |
| Méthadone-d3 100 mg/L | (µL) | 2 | | | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| EDDP-d3 100 mg/L | (µL) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Mélange opiacés 10mg/L | (µL) | 0 | | | 1 | 2 | 5 | 10 | 20 | 50 | 100 | |
| Mélange opiacés deutérés 10mg/L | (µL) | 10 | | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |

**Tableau IX : Gamme de calibration pour les cas médico-légaux de décès avec une gamme élargie aux opioïdes et stupéfiants (depuis 2006).** Mélange opiacé : EME, cocaïne, BE, morphine, codéine, dihydrocodéine, codéthylline, 6-MAM, pholcodine

# RESULTATS - DISCUSSION

# 1- Mise au point du dosage

La mise au point du dosage de la méthadone et de son métabolite principal l'EDDP a comporté la réalisation de courbes de calibration à partir de cheveux négatifs, exempts de tout traitement et surchargés en méthadone et EDDP. Nous avons ensuite réalisé la comparaison de différentes techniques de préparation de l'échantillon et différentes méthodes d'incubation-extraction en travaillant sur des échantillons de cheveux provenant de patients traités par la méthadone.

D'un point de vue technique, l'objectif était d'obtenir la méthode la plus sensible (bon rendement d'extraction avec une prise d'essai la plus petite possible) pour s'adapter aux prélèvements de cheveux médico-légaux pour lesquels les quantités disponibles de prélèvements sont parfois très faibles.

## *1.1 Optimisation de la préparation de l'échantillon*

Concernant la préparation d'échantillons, nous avons comparé la pulvérisation par broyage versus le "découpage fin" aux ciseaux. Nous avons travaillé à partir d'un homogénat de cheveux positifs à la méthadone pour optimiser les conditions d'analyse.

Cependant, nous avons observé que la pulvérisation à partir d'un broyeur à boulet est à l'origine d'une perte de matrice due à sa rétention sur l'inox par électricité statique. Parallèlement, nous avons étudié l'effet de la quantité de prise d'essai de départ sur la concentration finale extraite dans ce même pool d'échantillon. Dans le tableau X est présenté les différents résultats mesurés dans un même homogénat de cheveux selon les différentes procédures de préparation.

Compte tenu de ces résultats préliminaires, les concentrations capillaires de méthadone par SPE sont plus élevées que celles obtenues suite à une incubation au méthanol quelque soit le mode de préparation du prélèvement. Pour les valeurs SPE, nous avons des concentrations capillaires relativement homogènes que ce soit pour le découpage ou le broyage. Or le découpage présente un double avantage une prise

d'essai contrôlée pouvant être réduite jusqu'à 20 mg et qui ne nécessite pas de perte de produit ni la consommation de 200 mg de cheveux pour réaliser un broyage qui aura les mêmes caractéristiques pour tous les essais (diamètre des grains de poudre).

| **Prise d'essai** | **20 mg** | **30 mg** | **40 mg** |
|---|---|---|---|
| **SPE Broyé** (ng/mg) | 24,09 * | 31,00 | 22,22 |
| **SPE Coupé** (ng/mg) | 22,40 * | | |
| **SPE Coupé puis Broyé** (ng/mg) | 20,52 | | |
| **Méthanol Broyé** (ng/mg) | | 8,92 | 12,31 |
| **Méthanol Coupé** (ng/mg) | | 13,22 | |

**Tableau X : Concentrations de méthadone mesurées dans les cheveux pour un homogénat d'un même patient** exprimées en ng/mg de cheveux. (Moyenne entre 2 injections du même extrait). * Moyenne de 3 extractions différentes du même homogénat.

### 1.1.1 Choix de la méthode d'extraction

D'après les données de la littérature et nos pratiques au laboratoire, nous avons choisi de comparer une incubation liquide avec du méthanol par rapport à une extraction en phase solide (SPE) nécessitant au préalable une étape d'incubation en milieu acide.

A partir d'un homogénat de cheveux d'un patient consommateur chronique de méthadone, nous avons cherché à obtenir la meilleure résolution entre des pics de méthadone et d'EDDP avec le mode de détection spécifique SIM et la méthode de screening SCAN.

La comparaison des analyses de screening (SCAN) (figure 13), permet de remarquer que l'allure générale du chromatogramme obtenu suite à une incubation méthanolique est très différente. Le chromatogramme obtenu après SPE est beaucoup plus satisfaisant d'un point de vue de "sélectivité, résolution et propreté" (Pragts, 2005). Les chromatogrammes obtenus en SIM confirment ce phénomène : l'extraction au méthanol n'est pas satisfaisante car de nombreuses interférences ne permettent un

calcul fiable des rapports des aires sous la courbe entre le standard interne deutéré et son vis à vis (figure 13).

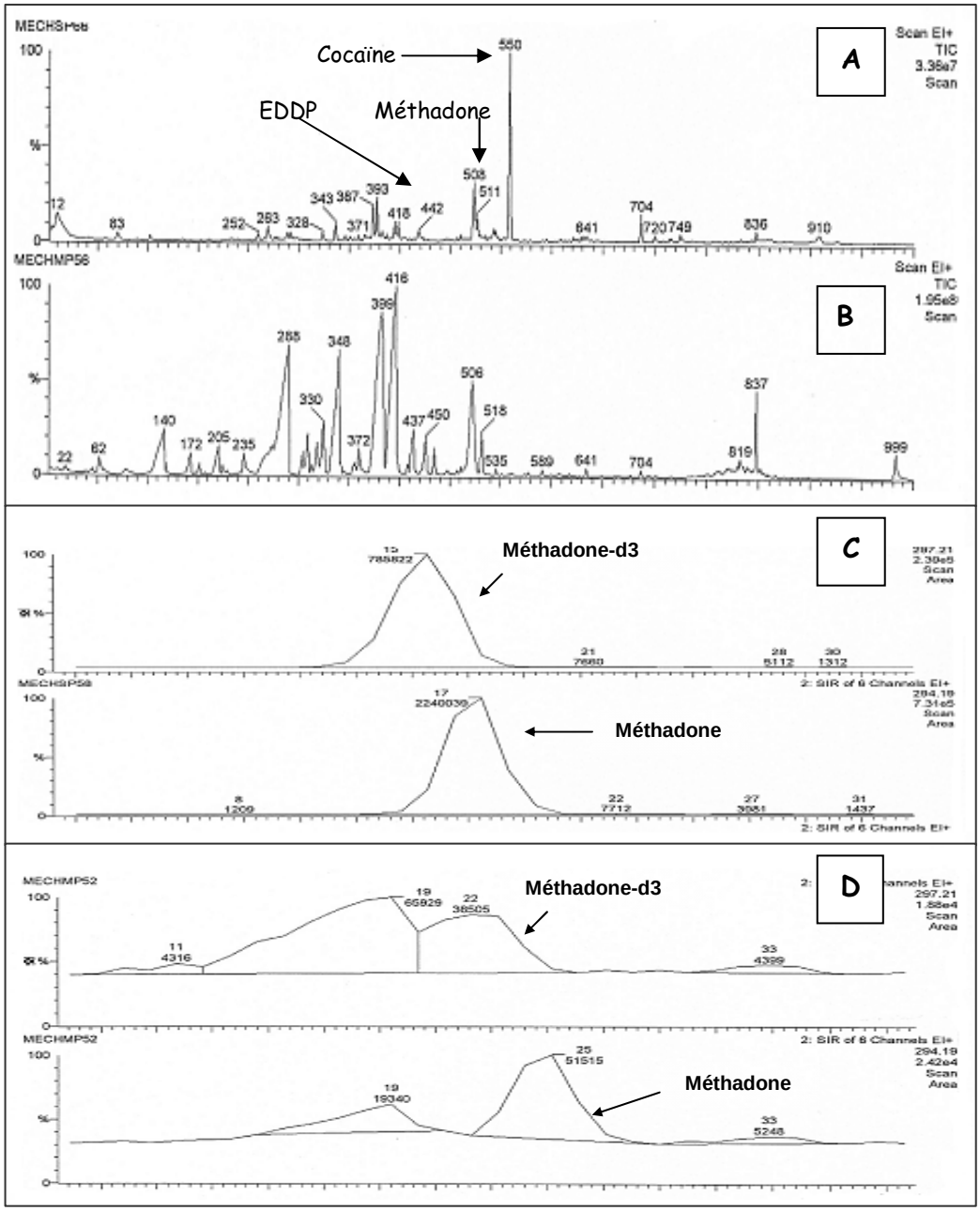



**Figure 13 : Sur 30 mg de cheveux broyés.** Extrait SPE : A = mode SCAN, C = mode SIM. Extrait méthanol : B = mode SCAN, D = mode SIM. Chromatogrammes sur l'appareil FISON

Par ailleurs (tableau X), les valeurs absolues de concentrations capillaires de méthadone obtenues après une incubation méthanolique sont inférieures à celles obtenues après notre technique incubation en milieu acide puis SPE, pour un même homogénat de cheveux broyés ou découpés au ciseau. Cependant, l'incubation par le

méthanol proposée par Paterson (Paterson *et al*, 2001, Paterson and Cordero, 2003) est séduisante car elle est de réalisation simple et rapide, peu consommatrice de réactifs, de matériels et de temps technique. La technique SPE décrite et utilisée au laboratoire pour d'autres analyses de stupéfiants au niveau sanguin, urinaire ou capillaire, est, quant à elle, de réalisation plus complexe et plus longue.

Nous avons répété trois fois ces tests et conclu que la méthode SPE était plus performante en termes de qualité de chromatogrammes, de sélectivité, de résolution, de sensibilité, et de répétabilité.

Grâce à l'optimisation des conditions techniques, un bon rendement d'extraction et une prise d'essai réduite, nous avons pu aisément segmenter les cheveux par portion de 1 à 2 cm afin de connaître le profil de consommation des individus rétrospectivement.

En conclusion, la méthode d'analyse retenue comporte les conditions suivantes :

- une segmentation de la mèche de cheveux par portion de 1 cm (si possible),
- un découpage fin au ciseau,
- une prise d'essai de 20 mg (minimum)
- une incubation en milieu acide suivie d'une extraction en phase solide.

L'utilisation des cheveux comme moyen d'investigation permet d'obtenir une plus longue fenêtre de détection des xénobiotiques que les matrices biologiques les plus usitées comme le sang, l'urine et le liquide gastrique ou l'humeur vitrée. Le suivi urinaire des patients recevant de la méthadone au long cours n'offre qu'une période de détection de quelques jours, alors que l'analyse des cheveux permet d'augmenter la fenêtre à plusieurs semaines selon la quantité de prélèvement disponible (Kintz, 2004b).

Grâce à la réduction de la prise d'essai, il est possible de réaliser une analyse segmentaire des cheveux sur une portion de 1 cm ou plus, mais aussi, si nécessaire, de re-extraire l'homogénat restant ou de réaliser d'autres analyses. En effet, suivant les molécules à rechercher, l'incubation peut différer telle qu'une incubation en milieu basique pour le cannabis et ses métabolites ou l'amphétamine, acide ou dans un tampon

pour les benzodiazépines (Deveaux *et al*, 2000 ; Musshoff and Madea, 2007). C'est pourquoi certains auteurs préfèrent une extraction méthanolique dite "universelle" (Pragst, 2005), même si les extraits obtenus nous semblent plus souillés et de moindre rendement d'extraction que ceux obtenus avec une SPE dans nos conditions d'analyse pour des dérivés opiacés.

### 1.1.2 Courbes de calibration (avant 2005)

Pour chaque série d'extraction, une courbe de calibration sur 50 mg de cheveux a été réalisée dans les conditions de préparations des échantillons (broyés ou coupés) (figure 14). Nous avons vérifié la linéarité des concentrations de méthadone et d'EDDP allant de 0 à 40 ng/mg de cheveux. La limite de détection est de 0,4 ng/mg et de quantification de 0,4 ng/mg avec la méthode utilisée avant 2005.

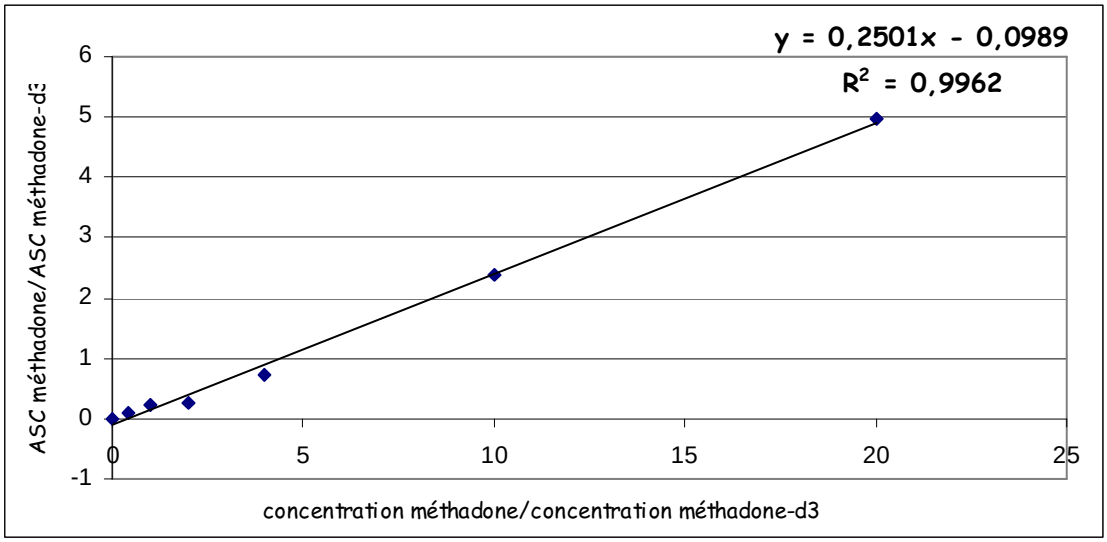



Figure 14 : Courbe de calibration de la méthadone en ng/mg de cheveux.
Prise d'essai de 50 mg de cheveux négatifs coupés. Régression linéaire.

## 2- Prélèvements de cheveux des patients du Centre de Substitution de Grenoble.

Pour chaque prélèvement des patients du Centre de Substitution, il a été répertorié les posologies journalières de méthadone, la date d'instauration du traitement et les modifications éventuelles, la longueur et la couleur de la mèche et le patient a volontairement cité les traitements associés (données non montrées). Les concentrations capillaires d'EDDP et de méthadone sont reportées avec des données des patients, en fonction du segment et de la longueur du segment de cheveux étudiés (tableau XI).

| N° prélèvement Masculin/Féminin | | Posologie début traitements | | Couleurs cheveux | Segment à partir de la racine | [Méthadone] ng/mg cheveux coupé | [EDDP] ng/mg cheveux coupé |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | M | 12,5 mg/j | 08.04.05 | Gris | 0-2 cm | **10,1** | **1,3** |
| | | | | | 2-4 cm | **10,7** | **1,3** |
| 2 | M | 60 mg/j | 03.06.04 | brun foncé | 0-2 cm | **51,6** | **3,1** |
| 3 | M | 5 mg/j | 23.07.04 | blond gris | 0-2 cm | **1,2** | **traces** |
| | | | | | 2-4 cm | **0,9** | **traces** |
| 4 | F | 80 mg/j | 16.05.05 | Brun clair coloré dessus | 0-1 cm | **6,5** | **0,8** |
| | | | | | 1-2 cm | **5,8** | **0,6** |
| | | | | | 2-3 cm | **5,4** | **0,7** |
| 5 | F | 120 mg/j | 11.08.03 | brun foncé | 0-2 cm | **142,3** | **3,3** |
| | | | | | 2-4 cm | **139,9** | **3,0** |
| | | | | | 4-6 cm | **133,6** | **3,5** |
| 6 | M | 10 mg/j | 03.03.03 | chatain clair | 1,5 cm | **4,9** | **0,6** |
| 7 | F | 60 mg/j | 18.10.02 | blond | 0-2 cm | **87,3** | **1,2** |
| | | | | | 2-4 cm | **66,0** | **1,4** |
| 8 | M | 70 mg/j | 20.04.05 | brun gris | 0-2 cm | **11,0** | **1,0** |
| | | | | | 2-4cm | **3,9** | **3,5** |
| 9 | F | 45 mg/j | 07.03.01 | noir | 0-2 cm | **31,9** | **3,1** |
| | | | | | 2-4 cm | **32,4** | **3,4** |
| 10 | M | 25 mg/j | 22.10.03 | chatain | 1,5 cm | **19,7** | **2,1** |
| 11 | M | 100 mg/j | 17.07.02 | chatain foncé | 1,5 cm | **15,3** | **1,0** |
| 12 | M | 80 mg/j | 23.03.05 | chatain clair | 0-2 cm | **17,6** | **0,7** |
| | | | | | 2-4 cm | **9,8** | **0,5** |
| 13 | M | 20 mg/j | 03.02.00 | chatain foncé | 0-1,5 cm | **4,1** | **0,5** |
| | | | | | 1,5-3 cm | **2,9** | **0,4** |
| 14 | M | 20 mg/j | 03.06.98 | chatain foncé | 0-1 cm | **18,5** | **1,6** |
| | | | | | 1-2 cm | **21,1** | **2,0** |
| 15 | M | 60 mg/j | 13.12.94 | brun | 0-2 cm | **103,4** | **3,9** |
| | | | | | 2-4 cm | **86,7** | **2,6** |
| 16 | M | 30 mg/j | 10.09.97 | chatain foncé | 0-1,5 cm | **10,4** | **0,9** |
| | | | | | 1,5-3 cm | **9,5** | **1,0** |
| 17 | F | 40 mg/j | 22.03.00 | brun | 0-2 cm | **31,5** | **2,3** |
| | | | | | 2-4 cm | **34,8** | **2,8** |
| 18 | M | 10 mg/j | 12.09.01 | brun coloré | 0-2 cm | **12,3** | **1,4** |
| | | | | | 2-4 cm | **7,6** | **1,4** |
| | | | | | 4-6 cm | **5,3** | **1,2** |
| 19 | F | 80 mg/j | 11.07.03 | Chatain clair **colorée** | 0-2 cm | **68,4** | **2,8** |
| | | | | | 2-4 cm | **62,7** | **2,7** |
| 20 | M | 20 mg/j | 27.10.99 | chatain | 0-2 cm | **5,5** | **traces** |
| | | | | | 2-4 cm | **5,8** | **traces** |
| 21 | F | 80 mg/j | 04.09.02 | brun | 0-2 cm | **88,2** | **7,1** |
| | | | | | 2-4 cm | **83,7** | **7,2** |
| 22 | F | 10 mg/j | 23.08.01 | noir | 0-2 cm | **19,6** | **1,7** |
| | | | | | 2-4 cm | **25,6** | **2,4** |
| 23 | F | 60 mg/j | 07.09.99 | brune **colorée** | 0-2 cm | **33,3** | **1,4** |
| | | | | | 2-4 cm | **37,0** | **1,2** |
| 24 | M | 7,5 mg/j | 22.11.00 | Chatain | 0-2 cm | **1,7** | **traces** |
| | | | | | 2-4 cm | **2,1** | **traces** |
| 25 | M | 30 mg/j | 18.10.04 | Chatain clair | 0-2 cm | **8,1** | **traces** |
| | | | | | 2-4 cm | **7,5** | **traces** |
| 26 | F | 15 mg/j | 04.04.01 | Chatain **colorée** | 0-2 cm | **10,7** | **1,4** |
| | | | | | 2-4 cm | **12,2** | **1,9** |

**Tableau XI : Patients Unité de Substitution de Grenoble.** Concentrations capillaires de méthadone et EDDP, Prise d'essai = 20 mg, cheveux coupés. Extraction SPE. Absence de variations de posologies dans les 6 semaines avant le prélèvement. Traces < 0,4 ng/mg

Une lettre d'explication sur les motifs et les objectifs de l'étude a été remise à chaque participant. Le consentement éclairé du patient a été consigné dans son dossier patient (annexe 2). Le prélèvement capillaire est anonymisé avec un numéro connu uniquement par le personnel médical du centre de substitution.

L'ensemble des prélèvements présente des concentrations de méthadone et EDDP qui varient mais restent dans une fourchette homogène entre 2 segments de cheveux non colorés pour un même patient. Cependant il y a de grandes variations inter-individuelles des concentrations capillaires, d'un patient à l'autre, pour la méthadone (l'EDDP dans une moindre mesure) pour des posologies identiques les 6 semaines précédent le prélèvement. Il n'y a pas assez de patients pour chaque catégorie de couleurs de cheveux pour réaliser une étude statistique sur l'homogénéité des concentrations en fonction de la posologie journalière. Par ailleurs, nous n'avons aucunes notions concernant la compliance du sujet à son traitement.

Sur les quelques patients présentant une coloration récente des cheveux, une diminution des concentrations de méthadone en fonction de l'état de coloration est observable, ce phénomène est surtout constaté avec le prélèvement 18 (tableau XII) (Wilkings *et al*, 1998).

| **Posologie journalière** | **Coloration** | **[méthadone] en ng/mg cheveux** | **[EDDP] en ng/mg cheveux** |
|---|---|---|---|
| **10 mg/j** instauré depuis 2001 | très faiblement coloré | 12,3 | 1,4 |
| | plus ou moins coloré | 7,6 | 1,4 |
| | très fortement coloré | 5,3 | 1,2 |

**Tableau XII : Prélèvement 18 : Diminution de la concentration dans les cheveux de méthadone en fonction de l'importance de la coloration**

Pour le prélèvement 7, seul vrai patient "blond" de l'étude, ses concentrations de méthadone dans les cheveux sont plus importantes que celles supposées attendues, au regard des données de la littérature (Wilkings *et al*, 1998). En effet, Wilkings *et al* décrit, chez le rat, que les concentrations capillaires de méthadone sont plus importantes dans les cheveux pigmentés que non pigmentés. Cette pigmentation correspond à la prédominance d'un type de mélanine qui "complexerait" mieux la

méthadone. D'autres travaux sur la codéine abondent dans l'importance de la pigmentation pour l'incorporation des molécules (Kronstrand *et* al, 1999). Cependant l'étude de Uhl and Scheufler conclue que la couleur naturelle des cheveux n'induit pas de biais substantiel quant à l'incorporation des xénobiotiques (Uhl and Scheufler, 2005).

L'étude de la corrélation entre la concentration de méthadone dans les cheveux (figure 15) et la posologie journalière par voie orale montre une variabilité entre les sujets, confirmée par le coefficient de corrélation de cette régression linéaire simple est de r = 0,64 pour la méthadone et de r = 0,44 pour l'EDDP (données non montrées). Le coefficient de détermination de la régression linéaire est $r^2$ = 0,41 pour la méthadone et $r^2$ = 0,19 pour l'EDDP.

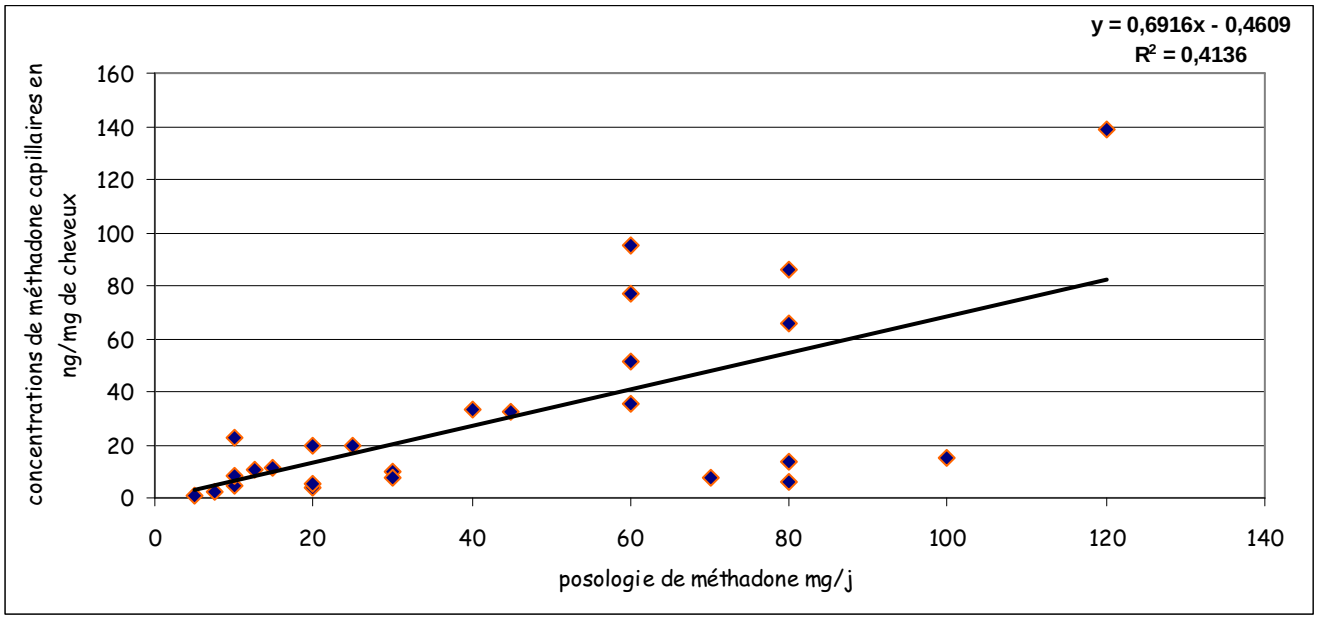



**Figure 15 : Corrélation entre les concentrations de méthadone dans les cheveux et la posologie journalière de méthadone**. Coefficient de détermination $r^2$ = 0,41. Prise d'essai = 20 mg de cheveux coupés, SPE.

Ces résultats confirment ce qui était déjà décrit par Girod en 2001 et par Paterson en 2003 (Girod *et al*, 2001 ; Paterson *et al*, 2003). Dans le cadre d'un suivi d'exposition d'un traitement de substitution par la méthadone, il n'y a pas "vraiment" de corrélation entre les concentrations de méthadone retrouvées dans les cheveux et la posologie journalière. De plus, Girod démontrait qu'il n'y avait pas de corrélation significative entre les concentrations sanguines et la posologie journalière de méthadone. Plusieurs explications sont possibles :

- un mode d'incorporation saturable du fait d'un nombre de sites limités pour fixer la méthadone dans les cheveux (Paterson *et al*, 2003),
- un rôle de la pigmentation (Wilkings *et al*, 1998 ; Ulh and Scheufler, 2005).

Pour les prélèvements de l'Unité de Substitution de Grenoble, nous observons des concentrations capillaires de méthadone beaucoup plus élevées que celles décrites dans l'étude de Paterson et de Girod (tableau XIII), pour des posologies journalières en moyenne inférieures aux autres (Girod *et al*, 2001 ; Paterson and Cordero, 2003). Ceci témoigne que les concentrations capillaires varient en fonction de la préparation d'échantillon et peuvent différer d'un laboratoire à l'autre.

| **Etudes** | **Centre Méthadone Grenoble (2005)** | **Paterson 2003** | **Girod 2001** |
|---|---|---|---|
| [Méthadone] cheveux (ng/mg) | [0,9 – 142,3]<br>moyenne = 30,12 | [4,2 – 63,2]<br>moyenne = 15,50 | [0,7 - 43]<br>moyenne = 8,23 |
| posologie per os mg/jour | [5 - 120]<br>moyenne = 44,3 | [20 - 165]<br>moyenne = 77,9 | [15 - 230]<br>moyenne = 92,0 |
| Effectifs | 26 | 50 | 26 |
| Analyse | - PE = 20 mg<br>- cheveux coupés<br>- SPE | - PE = de l'échantillon<br>- cheveux coupés<br>- extraction méthanol | - PE = 50 mg<br>- de cheveux broyé - SPE |

**Tableau XIII : Comparaison de nos résultats avec 2 études publiées.**

Ces analyses de prélèvements de cheveux des patients issus de l'Unité de Substitution de Grenoble ont permis de confirmer :

- qu'un segment de 1 cm suffit pour avoir une prise d'essai de 20 mg de cheveux coupés, et permet d'autres analyses sur ce même homogénat.
- que pour des posologies constantes de méthadone sur plusieurs mois, les concentrations capillaires extraites chez un même patient sont du même ordre de grandeurs mais pas identiques. Or dans les cas de coloration la diminution peut être importante du fait d'une dégradation des molécules due aux traitements capillaires.
- que de faibles posologies quotidiennes (5 mg/jour) permettent d'être supérieures à la limite de détection obtenue, dans nos conditions d'analyse.

- que nous pouvons quantifier la méthadone et l'EDDP en mode SIM, la limite de quantification est pour ces 2 produits de l'ordre de 0,05 ng/mg de cheveux actuellement.

Cette cohorte de patients nous a permis d'estimer qu'une expression quantitative des résultats est d'un intérêt limité car :

- il y a une absence de corrélation inter-individu, entre les concentrations capillaires et les posologies ou les concentrations sanguines (Notre étude ; Paterson and Cordero, 2003 ; Girod *et al*, 2004)
- les méthodes d'analyses d'un laboratoire à l'autre donnent des résultats divergents (inefficacité de la décontamination du prélèvement, hydrolyse inadéquate, temps d'extraction insuffisant, décomposition du xénobiotique, absence d'utilisation de standards deutérés, prise en compte de la présence du principe actif et de son métabolite…)
- les variations physiologiques et pharmacocinétiques de l'incorporation d'un xénobiotique (drogues, métaux lourds, autres) sont propres à chaque individu et peuvent varier dans le temps (croissance capillaire inhomogène, cheveu frisé/lisse, modèle d'incorporation de la sueur, traitements capillaires, métabolisme hépatique) (Kintz, 2004a ; Pragst, 2005).
- la rémanence de certains xénobiotiques dans les cheveux même après plusieurs mois d'abstinence peut exister, pour exemple l'héroïne (Pragst, 2005).
- L'incorporation du xénobiotique en cause varie selon ses propriétés biochimiques (liposolubilité, pka…),
- le respect des bonnes pratiques de prélèvement de la mèche de cheveux et son traitement peuvent modifier le profil des résultats (figure 12) (Konstrand and Druid, 2007)

En conclusion, dans le cadre du suivi de prise de la méthadone, cette analyse capillaire segmentée n'est pas suffisante pour confirmer la compliance au traitement, tout comme il n'est pas réaliste d'estimer quelle dose a été consommée et/ou prescrite (Paterson and Cordero, 2003). Bien que nous ayons pu mettre en évidence que chez

des patients consommateurs chroniques, d'un segment à l'autre, les concentrations capillaires de méthadone étaient dans un même ordre de grandeurs pour des cheveux non colorés, nous ne pouvons pas exclure qu'il y ait eu des périodes d'abstinences (prise intermittente ou volontairement arrêtée sur plusieurs jours) dans le traitement pour la période étudiée.

L'interprétation des résultats, d'autant plus dans le cadre d'une expertise médico-légale, est un enjeu qui appelle une attention particulière, c'est pourquoi nous avons choisi qu'une expression qualitative serait plus appropriée et prudente dans les cas de décès médico-légaux. Certes cela limite, voire empêche, la possibilité de discuter quantitativement sur la différence (augmentation ou diminution) entre deux segments consécutifs, ou sur une éventuelle évolution de la tolérance pharmacodynamique du sujet à la méthadone, à un opioïde de manière plus générale.

## 3- Prélèvements de cheveux de cas médico-légaux

Depuis 1999 à aujourd'hui, le laboratoire de Médecine Légale de Grenoble a recensé 21 cas de décès impliquant la méthadone au niveau sanguin. Il s'agit de 6 femmes (30%) et 15 hommes (70%). Excepté deux sujets dont l'âge n'est pas connu, la moyenne d'âge est de 30,25 ans de 46 ans à 19 ans. Les cas grenoblois sont proches des valeurs retrouvées dans les enquêtes annuelles DRAMES de 2005 à 2007 soit un âge moyen de décès dans les 33 ans pour 80 % d'hommes et 20% de femmes. En moyenne, le laboratoire de Médecine Légale de Grenoble observe un à deux décès par an impliquant la méthadone dont un seul impliquait des gélules de méthadone. Or en 2004, il y a eu une augmentation sensible du nombre de décès, huit au total.

Seuls neuf prélèvements post-mortem de cheveux ont été exploitables pour une utilisation à des fins d'expertise ou à des fins de recherches scientifiques. D'après les données du TIAFT que nous utilisons en pratique courante pour la rédaction de nos rapports d'expertises (tableau III) (TIAFT web site), leur référentiel indique que des concentrations sanguines d'ordre thérapeutique sont comprises entre 50 et 500 µg/L et peuvent aller jusqu'à 1000 µg/L. En analgésie, elles sont comprises entre 100 et 300

µg/L et au cours d'un traitement de substitution, elles sont comprises entre 200 et 750 µg/L. On estime comme potentiellement létales, des concentrations comprises de 200 à 1000 µg/L. Il existe une grande variabilité aux effets dépresseurs respiratoires et à la toxicité cardiaque selon l'état de tolérance des individus.

Les concentrations sanguines post-mortem de méthadone rencontrées pour ces 21 décès sont reportées dans le tableau suivant ainsi que les interprétations toxicologiques du rapport médico-légal (tableau XIV).

| Année décès N° | Homme/ Femme | Age | [MTD] sg µg/L | [EDDP] sg µg/L | Interprétation sur concentration sanguine | Médicaments associés * concentration sanguine toxique |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1998 - 1 | F | NC | 1418 ¤ | NR | Létal | alcool, méprobamate/ acépro-métazine, desméthyldiazépam |
| 2000 - 2 | H | 30 | 1265 ¤ | NR | Létal | diazepam, oxazépam, miansérine, dextropopoxyphène |
| 2000 - 3 | H | 31 | 303 ¤ | NR | Thérapeutique / Toxique | diazépam, oxazépam, témazépam, cocaïne |
| 2001 - 4 | F | NC | 1715 | 259 | Létal | cocaïne et métabolites bupivacaïne ou lidocaïne dextropropoxyphène-paracétamol |
| 2002 - 5 | H | 19 | 530 | 100 | Thérapeutique / Toxique | alcool |
| 2002 - 6 | H | 36 | 132 | 23 | Thérapeutique | lorazépam, flunitrazépam |
| 2004 - 7 | H | 28 | 1475 | 265 | Létal | zopiclone* alprazolam* cyamémazine alimémazine |
| 2004 – 8 | F | 25 | 297 | 129 | Thérapeutique / Toxique | alcool |
| 2004 – 9 | H | 36 | 216 | 29 | Thérapeutique / Toxique | |
| 2004 – 10 | H | 20 | 285 | 48 | Thérapeutique / Toxique | étifoxine |
| 2004 -11 | H | 28 | 592 | 35 | Thérapeutique / Toxique | cyamémazine, alimémazine, diazépam, nordiazépam, dextropropoxyphène, alcool, halopéridol, tropatépine, traces paracétamol |
| 2004 – 12 | F | 45 | 280 | 83 | Thérapeutique / Toxique | alcool, acétone, oxazépam, codéine, méprobamate |
| 2004 -13 | H | 24 | 502 | 40 | Thérapeutique / Toxique | bromazépam, alprazolam, alcool, traces cyamémazine, sous influence cannabis |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2004 - 14 | F | 40 | 320 | 75 | Thérapeutique / Toxique | bromazépam*, alimémazine* MDMA, trace THC-COOH, |
| 2005 - 15 | H | 35 | 155 | 13 | Thérapeutique | diazépam, nordiazépam, THC-COOH prise > 12h |
| 2007 - 16 | H | 19 | 50 | < 5,8 | Thérapeutique | clonazépam, 7-aminoflunitrazépam, milnacipran, paroxétine, cyamémazine, THC-COOH (prise > 24h avant décès) |
| 2007 - 17 | H | 34 | 682 | 72 | Thérapeutique / Toxique | clonazépam et métabolites, 7-aminoflunitrazépam, cyamémazine, olazapine* |
| 2008 - 18 | H | 37 | 558 | 45 | Thérapeutique / Toxique | Valproate de sodium, trihexyphénidyle, lévomépromazine, traces halopéridol / 7-aminoflunitrazépam / alimémazine |
| 2008 - 19 Prise de gélule | H | 26 | 617 | 129 | Thérapeutique / Toxique | Mirtazapine, paracétamol, THC-OH et THC-COOH (prise < 5h). Prise d'héroïne > 8h (codéine/morphine urine). Prise cocaïne entre 24 et 48h |
| 2009 - 20 | H | 29 | 547,5 | 61,5 | Thérapeutique / Toxique | bromazépam, traces de cétirizine / miansérine / cyamémazine / Benzylecgonine (12-48h avant décès) et traces de buprénorphine sans métabolites |
| 2009 - 21 | F | 46 | 496,3 | 65,7 | Thérapeutique / Toxique | alcool, traces paracétamol, cyamémazine, nordiazépam, oxazépam, morphine* / codéine car prise Héroïne entre 2 et 8h avant le décès, buprénorphine urinaire prise à distance du décès |

**Tableau XIV : Ensemble des cas médico-légaux grenoblois de 1999 à 2009** pour lesquels des concentrations sanguines post-mortem de méthadone sont retrouvées. [MTD] : concentration de méthadone, [EDDP] : concentration EDDP. N° : numéro, *** concentration sanguine toxique.**

¤ analyse par TDX résultat semi-quantitatif. NR : Analyse non réalisé, NC : non communiqué, sg : sang

Suite à ce tableau, sans la discussion des autres concentrations de méthadone dans les milieux biologiques que sont les urines et la bile (qui nous renseignent sur la distribution post-mortem du produit), sans les résultats de l'autopsie et de

l'anapathologie et en se basant uniquement sur les concentrations sanguines cardiaques post-mortem nous avons donc recensé trois groupes dont :

- 4 cas avec des concentrations sanguines post-mortem létales de méthadone supérieures à 1000 µg/L
- 14 cas avec des concentrations sanguines interprétables comme étant toxiques si le sujet est dit naïf ou consommateur récent de méthadone (introduction d'un traitement, reprise suite à un sevrage) OU étant thérapeutiques si le sujet est un consommateur régulier de méthadone
- 3 cas avec des concentrations sanguines dites thérapeutiques quel que soit le niveau de consommation du sujet soit inférieur à 200 µg/L.

Il est à noter que pour 76% des cas grenoblois de décès médico-légaux, il y a association de méthadone et de benzodiazépines (qui sont soit à des concentrations de traces, d'ordre thérapeutique voire toxique) seules et/ou en association avec d'autres médicaments psychoactifs ou stupéfiants. Pour 33% des cas nous avons constaté la présence d'alcool et de méthadone dont 23% une poly-intoxication avec des benzodiazépines. Nous avons relevé aussi qu'environ 30 % des cas présentaient aussi une prise concomitante d'antidépresseurs inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et/ou de la noradrénaline, de même 30% pour une prise de cyamémazine (TERCIAN®), soit en association ou pas avec d'autres traitements ou stupéfiants. Il est reconnu que la prise associée de dépresseur du système nerveux central tel que l'alcool, les neuroleptiques, les antidépresseurs, ou les benzodiazépines, majorent le risque de décès par obstruction des voies aériennes et/ou toxicité cardiaque (Caplehorn and Drummer, 2002 ; Darke 2009)

Le chevauchement des concentrations sanguines de méthadone entre les valeurs thérapeutiques / toxiques / létales rend difficile l'interprétation seule de ces valeurs post-mortem, il est intéressant de pouvoir déterminer l'état de tolérance du sujet. En effet, si la concentration sanguine post-mortem de méthadone est très élevée, supérieure à 1 000 µg/L, celle-ci est compatible avec un décès toxique, pour des concentrations létales, pour laquelle la méthadone a pu jouer un rôle dans la survenue du

décès. Si les concentrations sanguines sont très faibles, inférieures à 150 µg/L, il est envisageable de supposer que la méthadone, sans autre association médicamenteuse, n'est pas une cause directe du décès. Le plus délicat est donc d'interpréter des valeurs sanguines de méthadone intermédiaires (150 à 1 000 µg/L) car selon l'état de tolérance du sujet, elles sont considérées soit comme toxiques, soit comme thérapeutiques. Pouvoir déterminer, grâce une analyse segmentaire des cheveux, la consommation passée de méthadone, et/ou d'autres opiacés, apporte des éléments complémentaires sur l'état de tolérance pharmacodynamique du sujet avant sa mort.
Les conclusions obtenues avec les prélèvements du centre de substitution de Grenoble, nous ont permis d'estimer qu'il est préférable d'exprimer les résultats de manière qualitative plutôt que quantitative.

Nous avons classé en 4 groupes principaux la présence ou l'absence de méthadone dans les segments de cheveux (tableau XV) (Kronstrand and Druid, 2007).

| **Profil pharmacodynamique** | **Segments récent / passé**<br>**0-1cm / 1–2 cm** |
|---|---|
| Consommateur chronique | + / + |
| Consommateur récent | + / -<br>+ / 0 |
| Sujet abstinent | - / + |
| Sujet naïf | - / - |

**Tableau XV: Profil de tolérance en fonction de l'analyse segmentaire des cheveux.**
(+) : présence, (-) : absence, (0) : non disponible

Pour les neuf cas de sujets décédés, dont les prélèvements de cheveux étaient exploitables, pour deux d'entre eux le rapport des autopsies et de l'anapathologie ont écarté des signes cliniques impliquant un surdosage de méthadone (Wolff, 2002 ; Corkery *et al*, 2004). Pour les sept autres nous avons étudié l'apport de l'analyse des cheveux comme aide à l'interprétation des concentrations sanguines post-mortem de méthadone (tableau XVI).

| Méthadone capillaire Segment récent/ passé H/F N° - âge | [MTD] sang en µg/L | Conclusion de l'autopsie et des analyses anatomopathologiques | Interprétation proposée des [MTD] sang | Xénobiotiques présents dans le sang * = seuil toxique | Xénobiotiques présents dans les cheveux Segment récent / passé |
|---|---|---|---|---|---|
| **A + / +** F – N°1 âge inconnu | 1418 | Données absentes | létale | alcool + flunitrazépam + clorazépate + méprobamate / acéprométazine | Opiacés : - / - |
| **B + / +** H – N°10 20 ans | 285 | Syndrome d'asphyxie après une dépression respiratoire toxique Sujet non traité pour son asthme | thérapeutique ✋ | étifoxine | Cocaïne : + / + Opiacés : - / - |
| **C + / +** H – N°15 35 ans | 155 | Œdème pulmonaire et ischémie cardiaque | thérapeutique | métabolites du cannabis + nordiazépam + diazépam | Cocaïne : + / + Morphine, codéine : + / + |
| **D + / -** H – N°5 19 ans | 530 | Œdème pulmonaire œdème séro-hématique | toxique ✋ | alcool | Morphine : + / - |
| **E + / 0** H – N°7 28 ans | 1475 | Syndrome d'asphyxie après une inhalation du contenu gastrique | létale | zopiclone* + cyamémazine + alprazolam* + alimémazine | Cyamémazine : +/ 0 Opiacés : - / 0 |
| **F + / 0** H – N°19 26 ans gélules | 617 | Œdème pulmonaire et congestion, particules alimentaires dans la trachée et cardiomégalie | toxique ✋ | Mirtazapine + métabolites du cannabis moins 5h + morphine + codéine | Paracétamol : + / 0 Mirtazapine : + / 0 Morphine, 6-MAM, Codéine : + / 0 Cannabis : + / 0 Cocaïne : + / 0 |
| **G - / -** F – N°8 25 ans | 297 | Œdème et congestion pulmonaire | toxique ✋ | alcool | Morphine, 6-MAM, Codéine, Pholcodine : + / - |
| *Signes cliniques de l'autopsie écartant un décès toxique à la méthadone* | | | | | |
| **H + / +** F – N°4 | 1715 | Septicémie + atteinte hépatique virale | ? "thérapeutique" ✋ | Cocaïne-BE-EME + Bupivacaïne ou lidocaïne + dextro-propoxyphène/ paracétamol | Cocaïne + / + Opiacés : - / - |
| **I + / -** H – N°6 | 132 | Pneumopathie aigüe et cirrhose hépatique | thérapeutique | Lorazépam + flunitrazépam | Opiacés : - / - |

**Tableau XVI : Décès médico-légaux classés suivant le profil de consommation de la méthadone dans les cheveux. + : présence, - absence et 0 : pas de prélèvement disponible. H : Homme, F : Femme, N° référence au tableau XIV.** ✋ Interprétation de la concentration sanguine de méthadone modifiée en tenant compte des résultats de l'analyse capillaire. La présence ou l'absence de l'EDDP suit le même profil que celui de la méthadone.

La recherche de méthadone dans les cheveux des neuf cas de décès médico-légaux, nous a permis pour cinq d'entre eux (B, D, F, G et H) d'aider à "l'interprétation" d'une concentration sanguine pouvant être considérée comme faible ou d'ordre thérapeutique.

Seul B présente des concentrations de méthadone d'ordre thérapeutique du fait de la présence de méthadone et d'EDDP dans les deux segments consécutifs de cheveux, en absence d'autres opioïdes, il s'agit donc d'un consommateur chronique. Pour le cas D, la concentration sanguine est considérée comme toxique chez une personne récemment consommatrice de méthadone et de dérivés morphiniques, Ce patient était connu comme étant un toxicomane. Pour le cas F, décès sous gélule, les données d'autopsies sont en faveur d'un décès d'origine toxique et/ou cardiaque par ingestion de méthadone associée à des dépresseurs du système nerveux central (héroïne, mirtazapine et cannabis), chez un sujet récemment consommateur de méthadone et d'héroïne, de plus le sujet était porteur d'une anomalie cardiaque.

Pour le cas H, non retenu comme étant un décès imputable à une overdose de méthadone, la concentration post-mortem de méthadone pourrait être compatible avec des concentrations d'ordre létal or les causes du décès sont d'origines infectieuses. Cette personne a pu développer dans le temps une extrême tolérance à la méthadone, de plus elle était en suivi de traitement au centre de substitution de Grenoble.

Pour décrire le cas d'abstinence, l'auteur Karch définit que les concentrations capillaires les plus faibles, en principe actif et/ou métabolites, sont retrouvées dans le segment le plus proche de la racine. Cette diminution de concentration confirme une utilisation décroissante du produit ou une absence totale de prise ou un stockage des médicaments par non compliance (Karch, 2002). Pour le cas G, les résultats capillaires sont négatifs pour la méthadone. Or cela n'exclu pas l'absence de prise ou de l'initiation d'un traitement (Pragst, 2005). La prise d'essai n'était que de 12 mg de cheveux coupés ; nous avons testé cette quantité chez les patients du centre de substitution et la présence de méthadone dans les segments capillaires était positive. Par ailleurs, les cheveux présentaient une coloration importante qui a pu détériorer la méthadone et son métabolite. La présence récente dans les cheveux de métabolites de l'héroïne (morphine et 6-MAM) pourrait être compatible avec une absence de développement d'une

tolérance croisée entre ces morphiniques et la méthadone. Pour finir, la consommation concomitante d'alcool favorise l'effet dépresseur du système nerveux central et a pu diminuer la vigilance de la patiente lors de son épisode pulmonaire fatal.

Ainsi, en plus des 4 catégories que nous avons décrites pour la méthadone, il faudrait ajouter les effets d'une tolérance croisée aux opioïdes, selon leur présence ou leur absence sur les différents segments de cheveux et leur rôle au niveau post-mortem. Bien qu'il n'existe pas de marqueurs biologiques ou radiologiques pour mesurer la tolérance d'un individu, la mise en évidence d'une utilisation répétée de drogues peut contribuer à évaluer au développement d'une tolérance [Paterson S. *et al*, 2009 ; Corkery *et* al, 2004).

Ainsi nous pouvons proposer plusieurs cas de figure concernant l'interprétation de l'état de tolérance du sujet en tenant compte de la tolérance à la méthadone ou croisée aux autres opioïdes.

| **Molécules**<br>**Interprétation tolérance** | **Sang post-mortem µg/L**<br>> 200 | > 750 | **Cheveux**<br>**Segment récent / segment passé** | **Interprétation consommation** |
|---|---|---|---|---|
| « **T. chronique** » Méthadone<br>Héroïne et/ou autres opioïdes | | + | **+ / +**<br>**+/+ ou -/-** | **Chronique** |
| Méthadone<br>Héroïne et/ou autres opioïdes | + | | **+/- ou +/0**<br>**+/+** | **Récent** |
| « **T. Croisée** » Méthadone<br>Héroïne et/ou autres opioïdes | + | | **-/-**<br>**+/+** | |
| « **T. Croisée** » Méthadone<br>Héroïne et/ou autres opioïdes | + | | **+/- ou +/0**<br>**+/- ou +/0** | |
| Méthadone<br>Héroïne et/ou autres opioïdes | + | | **+/- ou +/0**<br>**-/+ ou -/0** | |
| Méthadone<br>Héroïne et/ou autres opioïdes | + | | **-/-**<br>**+/-** | **Naïf** |
| Méthadone<br>Héroïne et/ou autres opioïdes | + | | **-/- ou -/0**<br>**-/- ou -/0** | |
| Méthadone<br>Héroïne et/ou autres opioïdes | + | | **-/-**<br>**-/+** | |
| « **Abstinent** » Méthadone<br>Héroïne et/ou autres opioïdes | + | | **-/+**<br>**-/-** | |

**Tableau XVII : Propositions de catégorisation de l'état de tolérance en fonction de la méthadone, de l'héroïne ou d'autres opioïdes**, après une analyse segmentaire des cheveux. Concentrations sanguines post-mortem de méthadone comprises entre 200 et 750 µg/L. T : Tolérance

Dans les recherches des causes de la mort, l'analyse toxicologique des cheveux est complémentaire de celle du sang et des autres milieux biologiques. En cas d'implication de la méthadone, nous avons pu démontrer son intérêt tout particulier dans l'évaluation de l'état de tolérance pharmacodynamique. Les résultats des analyses toxicologiques doivent toujours être confrontés aux résultats d'autopsie et de découverte du corps, aux données cliniques (ancien héroïnomane ou sujet non "toxicomane") et aux renseignements anamnestiques (suivi CSST, usage illicite / obtention au marché noir, demande de remboursement à la CPAM, instauration ou réintroduction de traitement connu).

Cependant les analyses dans les cheveux peuvent être liées à de nombreux biais, ce qui oblige à avoir une certaine critique envers les résultats obtenus (Wennig, 2000 ; Kintz, 2008).

## 4- Intérêts et limites de l'utilisation des cheveux

### *4.1 Intérêts*

Les cheveux représentent une matrice non conventionnelle non invasive par rapport aux fluides et matrices usuelles que sont le sang, l'urine, l'humeur vitrée ou les tissus. La collecte des cheveux est simple, renouvelable pour d'éventuelle confirmation des résultats d'origine. La manipulation des prélèvements est peu risquée car il y a un faible risque de transmission de maladie.

Leur intérêt majeur est la possibilité d'avoir une vue rétrospective ou fenêtre de détection plus importante, de l'ordre de plusieurs semaines à plusieurs mois, vis-à-vis du sérum ou de l'urine pour lesquels les drogues sont rapidement dégradées et éliminées sur une courte période de temps (quelques heures à quelques jours) (Kintz, 2004a) (figure 16).

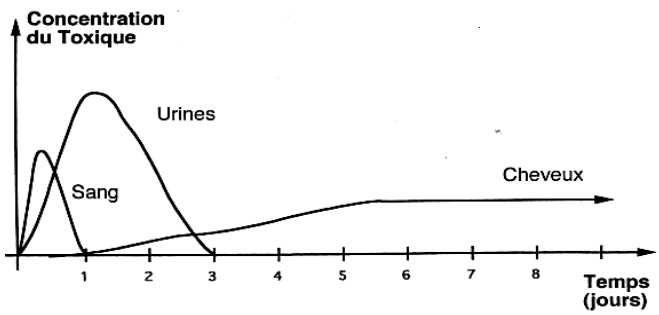



**Figure 16 : Concentrations des toxiques dans les matrices sanguines, urinaires et capillaires en fonction du temps d'élimination et de présence des molécules.** Schéma H. Eysseric.

Les informations obtenues ne sont pas uniquement utilisables en toxicologie médicolégale mais aussi pour des applications cliniques : suivi de traitements épileptiques, psychiatriques ou absence de prise en cas de traitement de sevrage au tabac, à l'alcool ou aux stupéfiants (Balikova, 2005).

Du point de vue de la molécule recherchée, le principe actif et ses métabolites restent séquestrés dans la tige du cheveu sans temps de dégradation observable en absence de tous traitements capillaires. Les échantillons prélevés sont stables indéfiniment, facilement conservables à température ambiante. Il est très difficile de les manipuler pour altérer leur contenu en xénobiotiques d'où un faible potentiel de perte du produit ou de manipulation des résultats.

Les résultats d'analyse de cheveux peuvent permettre une distinction entre des sujets naïfs, récemment ou chroniquement consommateurs d'une substance spécifique grâce à une analyse segmentaire d'une mèche de cheveux. En effet, la croissance des cheveux étant une moyenne de 1 à 1,3 cm par mois, il est théoriquement possible d'extrapoler un usage d'éventuelle drogue en réalisant cette analyse segmentaire (en absence de tout biais et contamination). Par ailleurs, il n'y a pas que les substances médicamenteuses ou stupéfiantes qui sont détectables mais aussi l'exposition à son environnement personnel ou de travail : tabagisme passif, métaux lourds, médication ou consommation de stupéfiants in utéro… (Balikova, 2005)

### *4.2 Limites, précautions et biais dont il faut tenir compte*

Tout d'abord des difficultés liées à la matrice "cheveu" elle-même. Chaque molécule va avoir un mode d'incorporation au sein de la matrice propre à ses propriétés biochimiques (polarité, biodisponibilité, temps de demi-vie, rapports des concentrations de métabolites comme facteurs limitants ou favorisants l'incorporation au niveau des cheveux) (Kidwell and DeLauder, 2000).

Pour les variations physiologiques et pharmacocinétiques de l'incorporation d'un xénobiotique (drogues, métaux lourds, autres), elles sont propres à chaque individu et peuvent varier dans le temps (croissance capillaire inhomogène, cheveu frisé/lisse, ethnicité, couleur / pigmentation, longueur, taux de croissance, site de prélèvement,

traitements cosmétiques (décoloration, permanente, radiation UV) qui altèrent les molécules et leurs fixations, métabolisme hépatique) (Kintz, 2004a ; Pragst, 2005)

La contamination de la matrice cheveu, où initialement les molécules sont incorporées passivement par voie sanguine, leur excrétion au niveau de la sueur ou par dépôt le long des cheveux modifient les teneurs en principe actif et en métabolites. Kintz P. a décrit des phénomènes de contamination externe par des liquides corporels après une mise en contact plus ou moins longues (Kintz, 2008). Les contextes de vie sociale et les informations apportées par les familles n'ont pas conduit à suspecter l'usage chronique de produits stupéfiants ou médicamenteux. Dans tous les cas décrits par kintz en 2008, les concentrations détectées (principe actif et métabolites) se sont révélées homogènes dans l'ensemble des segments testés. Ceci peut être considéré comme un bon indicateur de contamination extérieure potentielle en absence d'un contexte de toxicomanie ou de suivi de traitements (Kintz, 2008).

Ainsi un test capillaire unique ne permet pas de conclure à une exposition de longue durée à un produit. La détection d'un métabolite, qui peut aussi être présent dans les fluides de putréfaction, ne permet pas non plus de conclure dans ce sens (Kintz, 2008). Malgré les procédures de décontamination standard, il est nécessaire d'analyser les solutions de lavages pour éliminer les éventualités d'une contamination extérieure, dans un contexte post mortem, par dépôt du produit sur les cheveux.

De plus certains xénobiotiques présentent un phénomène de rémanence dans les cheveux même après plusieurs mois d'abstinence, exemple de l'héroïne (Pragst, 2005).

L'absence de corrélation inter-individus pour certaines molécules entre les concentrations capillaires et les posologies ou les concentrations sanguines (notre étude, Paterson and Cordero, 2003 ; Girod *et al*, 2004] ne permettent pas d'extrapoler les quantités consommées auparavant, car l'interprétation entre la dose/posologie et le temps d'incorporation au sein de la matrice capillaire est controversée parmi les spécialistes.

Le respect des bonnes pratiques de prélèvement de la mèche de cheveux et de son traitement (figure 12) (Konstrand and Druid, 2007), nécessite d'avoir une quantité minimale de prélèvement pour pouvoir réaliser si besoin des contrôles ou de nouvelles

extractions. Or nous avons mis en évidence que le rendement d'extraction à partir d'un fragment de cheveu, est fonction de la technique utilisée et de l'appareillage d'analyse. Les méthodes d'analyses d'un laboratoire à l'autre donnent des résultats divergents (inefficacité de la décontamination du prélèvement, hydrolyse inadéquate, temps d'extraction insuffisant, décomposition du xénobiotique, absence d'utilisation de standards internes deutérés, prise en compte de la présence du principe actif et de son métabolites…). Il est difficile de réaliser des contrôles de qualité interne précis propre au laboratoire (Kintz, 2004a). La mise en place par la Society of Hair Testing de contrôles qualité externe permet de valider un "label qualité" pour les laboratoires procédant à ce type d'analyse (Kidwell and DeLauder, 2000 ; Society of Hair Testing, 2004).

Or le problème crucial est de pouvoir différencier une exposition passive d'une consommation avérée, contrôlée et consciente, notamment dans les drogues fumées ; de pouvoir différencier une prise continue d'une prise intermittente.

# CONCLUSIONS

**THESE SOUTENUE PAR : Soline CHAMBERT**

**TITRE : Apport de l'analyse toxicologique des cheveux dans le diagnostic de décès toxique impliquant la méthadone.**

# CONCLUSIONS

L'utilisation de la matrice "cheveu" est de plus en plus usitée pour déterminer le rôle des drogues dans les causes de survenue de la mort, les cas de soumission chimique, la responsabilité criminelle (empoisonnement), l'exposition prénatale et postnatale chez les nouveau-nés, le suivi de traitement thérapeutique (méthadone, psychotropes, épilepsie, arrêt du tabac) ou s'assurer de l'abstinence de prise afin de lever une suspension de permis de conduire (alcool, stupéfiants) (Balikova, 2005).

Au laboratoire de Médecine Légale de Grenoble, nous avons pu mettre au point une méthode sensible, présentant une extraction efficace de la méthadone, dans les cheveux de patients sous traitement de substitution par méthadone, même pour une faible posologie (inférieure à 10 mg / jour). Ceci nous a permis de réduire la prise d'essai, de 200 mg à 20 mg de cheveux coupés. Nous avons choisi de réaliser des analyses segmentaires des prélèvements en se basant sur la croissance moyenne des cheveux de l'ordre de 1 à 1,3 cm par mois, estimant qu'il est possible d'extrapoler un usage d'éventuelle drogue dans les semaines précédent le prélèvement. Par ailleurs, grâce aux patients de l'Unité de Substitution de Grenoble, nous avons pu déterminer, dans nos propres conditions analytiques, des concentrations capillaires usuellement rencontrées pour la méthadone et son principal métabolite l'EDDP dans le bassin grenoblois.

Cet outil mis au point est utilisé dans la pratique courante du laboratoire de médecine légale, dans le cas de décès impliquant la méthadone et d'autres opioïdes. L'interprétation des concentrations capillaires de méthadone en valeur absolue est très délicate. D'une part l'absence de corrélation entre les concentrations dans les cheveux de méthadone et la posologie journalière, d'autre part les concentrations retrouvées sont dépendantes des techniques de purification et d'extraction. Puisque les concentrations capillaires mesurées sont à interpréter avec précaution, nous avons choisi de les interpréter de manière qualitative. Nous avons démontré leur intérêt pour déterminer le profil de consommation chronique, récent ou l'absence de prise du sujet décédé c'est-à-dire d'en évaluer son état de tolérance pharmacodynamique. L'analyse segmentaire des cheveux permet aussi de mettre

en évidence les consommations croisées avec des molécules absentes au niveau sanguin au moment du décès et qui renseignent sur les habitudes de consommation d'un individu. Plusieurs profils ont été décrits dans ce travail et l'ensemble des résultats des analyses toxicologiques doivent toujours être confrontés aux résultats toxicologiques, d'autopsie, aux données cliniques (ancien héroïnomane ou sujet non "toxicomane") et aux renseignements anamnestiques (suivi CSST, usage illicite / obtention au marché noir, demande de remboursement à la CPAM, instauration ou réintroduction de traitement connu).

Le suivi des décès sur le plan national par l'enquête DRAMES ou Décès en Relation avec l'Abus de Médicaments Et de Substances impliquant notamment un traitement de substitution aux opiacés peut avoir des conséquences en terme réglementaire. Pour exemple, une modification de la notice peut être nécessaire sur la surveillance clinique si une surmortalité des patients en début de traitement s'avère en augmentation. La mise sur le marché depuis 2008 de la forme gélule de méthadone est extrêmement surveillée pour prévenir les cas d'usage détourné ou de mésusage avéré (tentative d'injection, usage illicite), de revente au marché noir. Dans de tels cas un retrait de la forme gélule pourrait être décidé par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé.

Nos perspectives sont de maintenir le prélèvement des cheveux des cas médico-légaux de décès à la méthadone et autres opioïdes pour lesquels les seuils sanguin toxique sont définis selon l'état de tolérance du sujet. Ainsi, leur analyse systématique, dans le cas de décès impliquant un opioïde, permettrait d'apporter des informations essentielles et complémentaires dans l'appréciation de l'état de tolérance pharmacodynamique aux opiacés du sujet, au moment de la survenue du décès.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 06/10/2009

LE DOYEN

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER U.F.R. DE PHARMACIE GRENOBLE 1

Professeur Renée GRILLOT

LE PRESIDENT DE LA THESE

Professeur Vincent DANEL

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**A**

AFSSAPS site internet – URL :
http://www.afssaps.fr/var/afssaps_site/storage/original/application/73264eb4429990c0dcede7f912d7580b.pdf - consulté en octobre 2009

Alvarez JC. Le dépistage immunochimique des médicaments substitutifs de l'héroïne et autres opioïdes. *Ann Toxicol Anal*. 2009, **21**(1):13-19

**B**

Balikova M. Hair analysis for drugs of abuse. Plausibility of interpretation. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub*. 2005, **149**(2):199–207

**C**

Cairns T, Hill V., Schaffer M. and Thistle W. Removing and identifying drug contamination in the analysis of human hair. *Forensic Sci Int*. 2004, **145**:97-108

Caplehorn JR and Drummer OH. Fatal methadone toxicity: signs and circumstances, and the role of benzodiazepines. *Aust. N. Z. J. Public Health.* 2002, **26**(4):358-362; 362-363

Cone E.J and Joseph R.E., The potential for bias in hair testing for drugs of abuse, *In: P. Kintz. - Drug Testing in Hair*, eds CRC Press, Boca Raton, 1996: 69-93

Corkery J.M., Schifano F., Ghodse A.H. and Oyefeso A. The effects of methadone and its role in fatalities, *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.*, 2004, **19**:565-576

**D**

Darke S., Dufloua,J. and Toroka M. The comparative toxicology and major organ pathology of fatal methadone and heroin toxicity cases. *Drug Alcohol Depend.* 2009, article *in press*.

Deveaux M., Kintz P., Goullé J.P., Bessard J, Pépin G., Gosset D. The hair analysis proficiency testing program of the French Society of Analytical Toxicology. *Forensic Sci. Int.* 2000, **107**:389-394

Dictionnaire Vidal, site hoptimal – URL : http://www.hoptimal.net – consulté en octobre 2009

**E**

Eap C.B., Buclin T. and Baumann P. Interindividual variability of the clinical pharmacokinetics of Methadone. Implications for the treatment of opioid dependence. *Clin Pharmacokinet.* 2002, **41**(14):1153-1193

Etape web site – URL : http://www.etape.qc.ca/drogues/methadone.htm - consulté en octobre 2009

**F**

FDA web site – URL :
http://www.fda.gov/cder/foi/label/2004/21624slr001_methadone_hcl_lbl.pdf - site consulté en octobre 2009

Ferrari A., Pio Rosario Coccia C., Bertolini A., Sternieri E., Methadone – metabolism, pharmacokinetics and interaction. *Pharmacol. Res.* 2004, **50**:551-559

Ferrer-Alcon M. Modulation et mécanismes régulateurs du récepteur μ-opioïde, des voies de signalisation associées et des neurofilaments dans l'addiction aux opiacés. 2002, thèse de l'université de Genève disponible sur le lien URL :
http://www.unige.ch/cyberdocuments/theses2002/FerrerAlconM/these.html - site consulté en octobre 2009

Vincent F. Bessard J., Vacheron J., Malleret M. and Bessard G. Determination of buprenorphine and norbuprenorphine in urine and hair by gas chromatography-mass spectrometry (CPG-SM). *J. Anal Toxicol.* 1999, **23**(4):270-9

**G**

Gaveriaux-Ruff C. Récepteurs opioïdes mu / delta et analgésie. *Douleurs*. 2007, **8**:1S28

Girod C. and Staub C. Methadone and EDDP in hair from human subjects following a maintenance program: results of a pilot study. *Forensic. Sci. Int*. 2001,**117**:175-184

**H**

Harkey M.R. Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci. Int*. 1993, **63**:9-18

Henderson G.L., Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Sci. Int.* 1993, **63**:19-29

**I**

Illustrations du LEEM – URL : http://www.leem-media.com/leem/Mediatheque/Photos/Illustrations-et-Iconographies/Douleur - site consulté en octobre 2009

**J**

Joo D. Mechanisms of opioid tolerance: emerging evidence and therapeutic implications. *Can. J. Anesth*. 2007, **54**(12):969–976

Jung BF, Reidenberg, M. Interpretation of opioid levels: Comparison of levels during chronic pain therapy to levels from forensic autopsies. *Clin. Pharmacol. Therapy*. 2005, **77**:324-34

**K**

Karch S.B. Opiates. *In: KARCH S.B.,* Boca Raton, CRC Press, 2002:313-455

Kidwell D.A. and Blank D.L. Environmental exposure – the stumbling block of hair testing, *In: Drug testing in hair.* eds Kintz P. CRC Press, Boca Raton, 1996:17-68

Kidwell D.A. and DeLauder L. Evidence for bias in hair testing and procedures to correct bias, *Forensic Sci. Int.* 2000, **107**:39-61

Kidwell D.A. and Smith F.P. Passive Exposure, decontamination procedures, cutoffs, and bias: pitfalls in the interpretation of hair analysis results for cocaine use. *In:.Analytical and pratical aspects of drug testing in hair*. eds Kintz Pascal. CRC Press. 2007, Broken Sound Park Way: 25-72

Kieffer BL. and Gavériaux-Ruff C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol.* 2002, **66**:285-306

Kintz P. Hair Analysis, *In: Clarke's Analysis of drugs and poisons.* Eds Pharmaceutical Press. Moffat A.C., Osselton M.D. and Widdop B. 2004a. Londres: 124–133

Kintz P. Value of hair analysis in postmortem toxicology. *Forensic Sci. Int.* 2004b, **142**:127–134

Kintz P, Villain M. and Cirimele V. External post mortem artefact: a key issue in hair result interpretation. *Ann. Toxicol. Anal.*. 2008, **20**(3):121-125

Konstrand R, Forstberg-Peterson S, Agedal BK, Ahlner J and Larson G. Codeine concentrations in hair after oral administration is dependent on melanin content. *Clin Chem.* 1999, **45**:1485–94

Kronstrand R., Nyström I, Strandber J. and Druid H. Screening for drugs in hair with ion spray LC-MS-MS. *Forensic Sci. Int.* 2004, **145**:183-190

Kronstrand R. and Scott K. Drug incorporation into hair. Chap 1. *In:.Analytical and pratical aspects of drug testing in hair*. eds Kintz Pascal. CRC Press. 2007, Broken Sound Park Way: 1-24

Konstrand R. and Druid H. Hair in postmortem Toxicology. Chap 10 *In:.Analytical and pratical aspects of drug testing in hair*. eds Kintz Pascal. CRC Press. 2007, Broken Sound Park Way: 223-239

**L**

Lambert D. The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. *Nature Rev. Drug Discov.* 2008, **7**:694-710

**M**

Marie N. Molecular mechanisms of tolerance to opioids and cannabinoids. *Réanimation.* 2009, Article *in press*.

Martz R., Donnelly B., Fetterolf D., Lasswell L. The use of hair analysis to document a cocaine overdose following a sustained survival period before death. *J. Anal. Tox.* 1991, **15**:279-281

Muller A, Koch B., Rerk F., Boutillier A.F., See V., Loeffler J.P. Mécanismes de la tolérance et de la dépendance aux opioïdes. *Ann Fr Anesth Réanim* 1999 (**18**): 866-95

Musshoff F and Madea K. Analytical pitfalls in hair testing. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, **388**:1475–1494

**O**

OFDT site internet – URL : http://www.ofdt.fr/BDD_len/seristat/00028.xhtml - consulté en octobre 2009

**P**

Paterson S., McLachlan-Troup N., Cordero R., Dohnal M. and Carman S., Qualitative screening for drugs of abuse in hair testing using GC-MS. *J. Anal. Toxicol.* 2001, **25**:203-208

Paterson S. and Cordero R. Interindividual dose/concentration relationship for methadone in hair. *J. Anal. Tox.* 2003, **27**:20-23

Paterson S., Cordero R. and Stearns E. Chronic drug use confirmed by hair analysis: Its role in understanding both the medical cause of death and the circumstances surrounding the death. *J. Forensic Leg. Med.* 2009, **16**:143–147

Pépin G. Opiacés et opioïdes, *In: Kintz P.* eds scientifiques et médicales Elsevier, Amsterdam, 1998 :336-430

Pragst F. Pitfalls in hair analysis. *TIAFT Bulletin*. 2005, **35**:10-17

**S**

Society of Hair Testing, Recommendations for hair testing in forensic cases. *Forensic Sci. Int.* 2004, **145**:83–84

SFTA web site – URL : http://www.sfta.org/commissions/COFRAC168/TOX280clin.pdf - consulté en aout 2009

**T**

Thériaque site internet – URL : http://www.theriaque.org/InfoMedicaments/home.cfm? – site consulté en octobre 2009

TIAFT web site – URL : http://www.tiaft.org/tmember/ttv/ttv_all.html - consulté en décembre 2004

**U**

Uhl M and Scheufler F. Effects of hair color on the drug incorporation into human hair. *Annal. Toxicol. Anal.* 2005, **XV**(11):279–84

**W**

Wilkings D.G., Valdez A.G., Nagasawa P.R, Gygi S.P. and Rollins D.E. Incorporation of drugs for the treatment of substance abuse into pigmented and nonpigmented hair. *J. Pharm. Sci.* 1998, **87**:435-440

Wolf B., Lavezzi W., Sullivan L., Flannagan L. Methadone-related deaths in Palm Beach County. *J Forensic Sci*. 2004, **49**:1-4

Wolff K. Characterisation of methadone overdose: clinical considerations and the scientific evidences. *Ther. Drug Monit.* 2002, **24**(4):457-70

White JM., Irvine RJ. Mechanisms of fatal opioid overdose. *Addiction*. 1999, **94**:961–972.

**Z**

Zaveri N., Jiang F., Olsen C., Polgar W and Toll L. Small molecule agonists and antagonists of the opioid receptor-like (ORL1, NOP): ligand-based analysis of structural factors influencing intrinsic activity at NOP. *APPS J.* 2005, **7**(2):E345-52

# ANNEXES

# Annexe 1

Préparation des réactifs : (conservation 3 mois à température ambiante)

- HCl 0,1 M : fiole jaugée de 250 ml : 150 ml eau distillée + 2,1 ml HCl 36%, ajuster à 250 ml

- KOH 1 M : peser 5,6 g de KOH dans une fiole jaugée de 100 ml, dissoudre et ajuster par de l'eau distillée.

- Tampon phosphate 0,1 M pH = 6 : peser 13,61 g de $KH_2PO_4$ dans un bécher + 900 ml eau distillée, ajuster le pH au pHmètre à 6 avec KOH 1 M, puis ajuster le volume total à 1 L

- Solvant d'élution : préparer extemporanément, pour 25 ml = 20 ml de dichlorométhane + 5 ml de propan-2-ol, homogénéiser, prélever 0,5 ml du mélange et les jeter puis ajouter 0,5 ml d'ammoniaque 25%, homogénéiser. Agiter au moment de l'utilisation.

- NaOH 1 N : peser exactement 15,4 g de NaOH pur, ajuste à 100 mL avec de l'eau distillée.

# Annexe 2

## Dosage de la METHADONE dans les cheveux

Objectif

Etude préliminaire pour évaluer l'intérêt complémentaire d'un dosage de METHADONE dans les cheveux, par rapport aux analyses urinaires pour le suivi thérapeutique des patients en cours de traitement de substitution.

En pratique

Il s'agit d'un prélèvement au vortex postérieur d'une mèche de cheveux de la taille d'une section de crayon (environ 0,5 cm) coupée au ciseau au raz du cuir chevelu. Dont l'extrémité près de la racine est tenue par une ficelle.

Cette étude est **anonyme**, les seules informations requises sont :

- un consentement oral
- la date de prélèvement
- la posologie de METHADONE (mg/j)
- la date de début du traitement
- la couleur des cheveux et s'il y a eu des colorations, permanentes, etc…

En vous remerciant pour votre participation à cette étude

Si vous souhaitez connaître le résultat du dosage, il sera communiqué aux infirmières du centre méthadone.

**N° Prélèvement** :

**Date prélèvement** :

**Posologie de METHADONE** : mg/j

**Date de début du traitement** :

Couleur naturelle des cheveux : coloration, permanente… :

# SERMENT DES APOTHICAIRES

Faculté de Pharmacie de Grenoble

# Serment des Apothicaires

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine : en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les moeurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobe et méprisé de mes confrères si j'y manque.

**Thèse soutenue par : Soline CHAMBERT**

**Titre :** Apport de l'analyse toxicologique des cheveux dans le diagnostic de décès toxique impliquant la méthadone.

**Résumé :**

En 2004, le laboratoire de Médecine-Légale de Grenoble a observé une augmentation sensible des cas de décès impliquant la méthadone avec des concentrations sanguines relativement faibles. Les seules concentrations sanguines de méthadone sont souvent insuffisantes pour établir le rôle possible de la méthadone dans la survenue du décès. En regard de l'analyse toxicologique, il est nécessaire de connaître l'anamnèse et les informations cliniques.

Les cheveux constituent une matrice biologique très intéressante en toxicologie car ils permettent d'obtenir des informations rétrospectives, jusqu'à plusieurs semaines, sur l'exposition chronique à un xénobiotique.

L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'apport de l'analyse toxicologique des cheveux pour déterminer l'état de tolérance pharmacodynamique du sujet pour la méthadone pour aider à l'interprétation des concentrations sanguines de méthadone dans les "recherches des causes de la mort". Nous avons développé un outil analytique pour analyser les opiacés, et en particulier la méthadone, dans les cheveux. Nous nous sommes appuyés sur des résultats obtenus à partir de cheveux de patients traités à la méthadone, et des cas d'expertises médico-légales où la méthadone a été impliquée. Ces dosages capillaires ont été réalisés par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse après une étape de purification.

Leur analyse systématique, dans chacun des cas de décès impliquant un opioïde, permettrait d'apporter une information essentielle dans l'appréciation de l'état de tolérance pharmacodynamique aux opioïdes du sujet, au moment de la survenue du décès. Ces dosages capillaires sont des éléments d'informations complémentaires dans les recherches des causes de la mort.

**Mots clés :** méthadone, cheveux, décès, tolérance pharmacodynamique, chromatographie phase gazeuse couplée spectrométrie de masse

**Jury :**

| | |
|---|---|
| Mr le Professeur Vincent DANEL | Président |
| Mr le Docteur Michel MALLARET | Directeur de thèse |
| Mr le Professeur Luc BARRET | |
| Mme le Docteur Hélène EYSSERIC | |
| Mr le Professeur Jérôme GUITTON | |