

# L'apport des cheveux dans la toxicologie médicale comme biomarqueurs d'exposition

R. EL JAUDI<sup>1</sup>, L. HUMBERT<sup>2</sup>, C. BRASSART<sup>2</sup>, M. DRAOUI<sup>1</sup>, N. HOUDRET<sup>2</sup>, B. FONTAINE<sup>3</sup>, L. FAYE<sup>3</sup>, Y. CHERRAH<sup>1</sup>, M. LHERMITTE<sup>2</sup>.

1- Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.

2- Laboratoire de Biochimie & Biologie moléculaire, UF de Toxicologie, Hôpital Calmette, Lille (France).

3- Comité pour le Développement de la Médecine du Travail Lille.

## Résumé :

L'analyse segmentaire des cheveux est un outil très utile pour connaître la nature des expositions ultérieures aux xénobiotiques. En effet, le poil représente une matrice stable qui garde dans ses systèmes kératinisés une partie des substances étrangères ayant circulé dans l'organisme. Ainsi, la réalisation d'un calendrier rétrospectif d'exposition en fonction de la longueur du poil est possible.

A travers un exemple d'expertise toxicologique, en utilisant les cheveux comme base d'investigation, nous allons expliquer les différentes étapes de traitement de l'échantillon et les lignes directrices pour l'interprétation des résultats.

La méthode utilisée est la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse à analyseur quadripolaire.

*Mots-clés* : cheveux, exposition, analyse, CLHP.

Les cheveux représentent une matrice d'intérêt majeur en toxicologie, comme marqueur d'exposition chronique (ou témoin d'une prise unique) aux xénobiotiques. En effet, les cheveux peuvent au cours de leur croissance incorporer et piéger les xénobiotiques par des mécanismes actifs par la circulation sanguine, les glandes sébacées et les glandes sudoripares ou passifs par l'environnement. Les substances incorporées se trouvent ainsi piégées et conservées longtemps dans la structure kératinisée du poil avec une concentration de la molécule mère supérieure à celle des métabolites. La croissance moyenne du poil étant de un centimètre par mois, il est aussi

possible d'établir un calendrier rétrospectif d'exposition, en fonction de la longueur des cheveux (1-5).

Dans ce travail, nous rapportons le cas d'un salarié connu héroïnomane et cocaïnomane depuis 1994, sous traitement substitutif à la méthadone depuis 1997, qui au cours d'une visite de médecine du travail, a été dépisté positif aux stupéfiants et aux benzodiazépines en Juillet 2003. Ce salarié n'avouant pas la prise de ces substances, un prélèvement des cheveux a été effectué.

Article reçu le 26 Novembre 2005

Adresse de correspondance et de tirés à part : Dr. Rachid EL JAUDI,  
Laboratoire de Toxicologie Pharmacologie, Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat.  
Tel : 061477796 - e-mail : eljaoudi\_rachid@menara.fr

## Matériel et méthodes

### 1- Le prélèvement :

Le laboratoire a reçu, dans une enveloppe, une mèche d'une centaine de cheveux avec une longueur moyenne de 4 cm et un poids de 150 mg. La mèche est prélevée en vortex postérieur et orientée racine-extrémité au moyen d'une cordelette fixée à 1 cm au dessus du niveau de la racine. Le prélèvement est fait le plus près possible de la peau et coupée au ciseau.

### 2- Matériel

Les analyses sont faites par une chaîne HPLC (2695 WATERS). La colonne utilisée pour la séparation est une XTerra MS C18 2,1 mm x 150 mm 3,5  $\mu$ m couplée à un spectromètre de masse équipé d'une interface électrospray (ZQ WATERS). Une acquisition multicanaux est réalisée en mode électrospray positif et négatif à plusieurs tensions de cône différentes.

### 3- Traitement de l'échantillon :

Le prélèvement a subi plusieurs traitements avant l'analyse :

#### • *Décontamination :*

Elle a pour but d'éliminer les contaminants externes, elle se fait par un cycle de lavage de 2 fois 5 min au dichlorométhane.

#### • *Découpage :*

La mèche est découpée en trois segments égaux identifiés racine, milieu et pointe.

#### • *Broyage :*

Les segments sont broyés séparément par un broyeur à boulet jusqu'à avoir une poudre.

#### • *Hydrolyse :*

Les poudres des trois segments sont hydrolysées par une solution de HCl 0,1 N pendant 18 heures à 60°C en présence des standards internes. Les standards internes sont les homologues deutérés de la cocaïne, l'ecgonine méthylester (EME) (métabolite de la cocaïne), la morphine, codéine, 6 monoacétyl morphine (6MAM) (métabolite de l'héroïne), la méthadone et l'EDDP (2-éthylidène - 1,5 - diméthyle - 3,3- diphenyl pyrrolidine) (métabolite de la méthadone).

#### • *Extraction :*

Sur les hydrolysats, on a fait des extractions par le dichlorométhane à pH 8,4.

La phase organique est séchée sous courant d'azote et reprise par 100  $\mu$ l de la phase mobile (tampon formiate pH 3/acétonitrile : 90/10), 20  $\mu$ l de l'extrait ont été injectés dans le système chromatographique

## Résultats

La séparation chromatographique a duré 25 minutes. Le résultat trouvé est un spectre chromatographique du courant total d'ionisation (figure 1).

De ce spectre chromatographique on a extrait les rapports masse sur charge (m/z) des ions correspondant aux molécules recherchées, à savoir : la cocaïne (MH<sup>+</sup>: 304), l'EME (MH<sup>+</sup>:197), la morphine (MH<sup>+</sup>:286), la codéine (MH<sup>+</sup>:300), la 6MAM (MH<sup>+</sup>: 328), la méthadone (MH<sup>+</sup>:310) et son métabolite EDDP (MH<sup>+</sup>:278). Les molécules sont identifiées à la fois par leurs temps de rétention et par leurs spectres de masse qu'on peut avoir à plusieurs tensions de cône. La quantification est faite en utilisant les étalons internes en calculant les rapports des aires sous la courbe après la

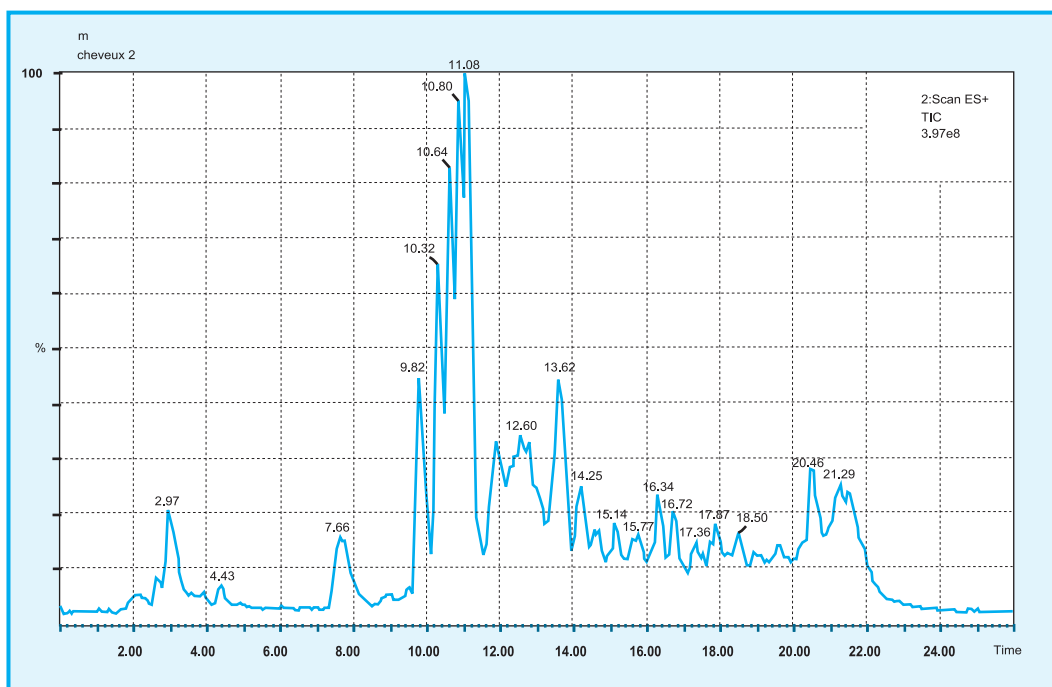


Figure 1 : Le chromatogramme de l'analyse (courant total d'ionisation)

réalisation d'une gamme d'étalonnage. Les figures 2a et 2b montrent l'exemple de la cocaïne.

Les résultats trouvés sont donnés par le tableau I

## Discussion

L'utilisation du couplage HPLC-SM nous a permis d'identifier et de doser avec beaucoup de précision les molécules recherchées dans le prélèvement (2).

L'analyse segmentaire des cheveux permet de tracer l'historique de l'exposition de l'organisme aux xénobiotiques. Considérant que la vitesse moyenne de pousse d'un cheveu correspond à un centimètre par mois, il est alors possible de réaliser un calendrier rétrospectif d'exposition en fonction de la longueur du cheveu. La longueur de notre échantillon a été

de 4 cm ce qui correspondrait aux 4 derniers mois. Chaque segment (racine, milieu et pointe) correspond alors à environ 5 semaines (4, 6-9). Les résultats montrent que pour dans les trois segments il y a présence de la cocaïne et de son métabolite EME témoin d'un passage dans l'organisme. Les concentrations dans les trois segments sont assez proches, ce qui signifie une continuité de prise pendant les quatre derniers mois. La même chose peut être dite pour la morphine et la codéine dont les concentrations sont proches dans les trois segments.

La 6MAM, témoin irréfutable de la prise de l'héroïne, est trouvée à des concentrations décroissantes de la pointe vers la racine. Cela nous permet de dire que le sujet a diminué les doses consommées durant les 4 derniers mois sans sevrage total.

Pour la méthadone, qui est le traitement substitutif de l'héroïne, elle est trouvée avec son

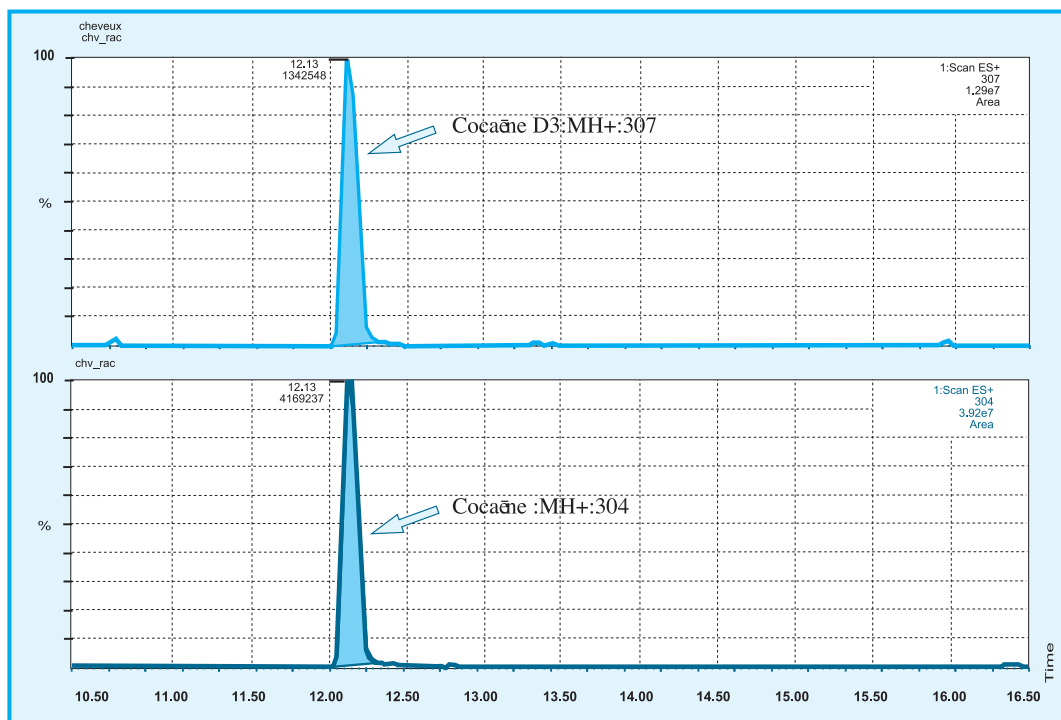


Figure 2 a: Sélection des ions MH+ 304 et 307 correspondant respectivement à la cocaïne et à l'EME.

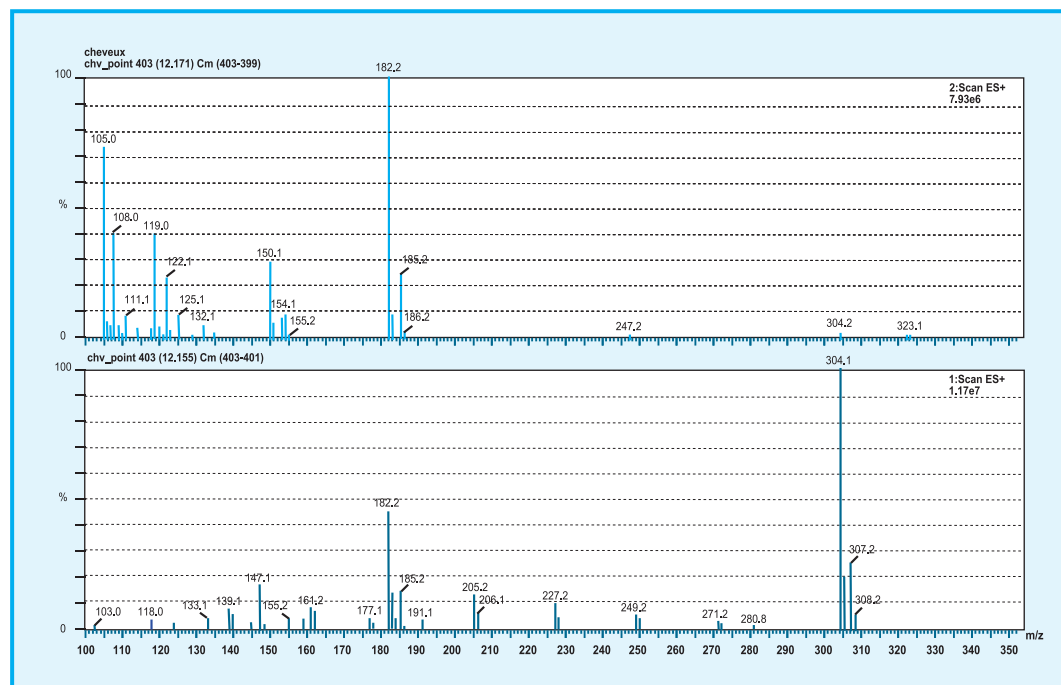


Figure 2 b: Spectre de fragmentation de la cocaïne à 15V (canal 1) et 30V (canal 2)

|           | Racine<br>(ng/mg) | Milieu<br>(ng/mg) | Pointe<br>(ng/mg) |
|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Cocaïne   | 17,3              | 21                | 23,7              |
| EME       | 0,7               | 0,77              | 3,95              |
| Morphine  | 1,4               | 1,32              | 1,7               |
| Codéine   | 0,66              | 0,66              | 0,46              |
| 6MAM      | 1,5               | 2,4               | 3,5               |
| Méthadone | 2,6               | 1,82              | 0,15              |
| EDDP      | 0,8               | 0,19              | 0,26              |

**Tableau I :** Résultat d'analyse dans les trois segments

métabolite (EDDP) dans tous les segments à des concentrations croissantes de la pointe vers la racine. Ces résultats nous permettent de dire que les doses prises récemment sont supérieures à celles prises il y a 4 mois. La différence des concentrations entre les segments montre aussi que le sujet suit mal son traitement sachant que les doses prescrites étaient les mêmes durant au moins les 8 derniers mois.

L'analyse segmentaire de ce prélèvement nous a permis d'avoir une idée claire sur les conduites addictives de notre sujet durant les 4 derniers mois. Cependant, la complexité des mécanismes d'incorporation des xénobiotiques dans les cheveux qui dépend de plusieurs paramètres (la substance, l'état physiologique, la nature du poil...) rend la corrélation entre les concentrations trouvées dans les cheveux et celles dans le sang très difficile, ainsi il est très délicat de prédire la concentration sanguine d'un xénobiotique en se basant sur sa concentration dans les cheveux (10-11).

Les résultats positifs dans les cheveux des substances recherchées, avec leurs métabolites,

sont une preuve analytique solide de la consommation de ces substances. Cette analyse nous a permis de répondre aux questions posées sur les habitudes toxiques de notre sujet en retraçant un calendrier d'exposition durant les quatre derniers mois :

- Prise continue de la cocaïne,
- Prise continue de la codéine avec présence de la morphine,
- Prise continue de l'héroïne avec une diminution des doses prises,
- Le non respect du traitement à la méthadone.

## Conclusion

L'analyse des cheveux comme matrice alternative en toxicologie représente un moyen analytique de grande valeur pour connaître les expositions rétrospectives aux xénobiotiques. Le cheveu est une matrice stable, facile à prélever,

à conserver et qui concentre mieux la substance mère.

Cette analyse est devenue aussi importante, surtout avec l'avènement des nouvelles techniques d'analyse comme les couplages CPG - SM, HPLC-SM, CPG-SM-SM et HPLC-SM-SM.

## Summary

### Hair contribution in Medical toxicology as an Exposure biomarkers

The segmentary analysis of the human hair is a very useful tool to know ulterior exposures to xenobiotics. Indeed, hair is a stable matrix which keeps in its keratinized systems a part of the exogenic substances that have circulated in the organism. Thus the realization of a retrospective calendar of exposure according on the basis of hair's length is possible.

Through a toxicological expertise example using the hair analysis, we will explain the various stages of treatment of the sample and the guidelines for the interpretation of the results. The method used is liquid chromatography coupled with mass spectrometry.

*Keywords: hair, exposure, analysis, HPLC.*

## Références

- 1- Kintz P., Vilain M., Cirimele V., Janey C., Ludes B. Décret n° 2003-293 du 31 mars 2003. Restitution de permis de conduire à partir d'analyse de cheveux. *Ann. Toxicol. Anal.* 2003 ; vol 15, n°2 : 117-122.
- 2- Cheze M., Vayssette F., Pepin G. Dosage du LSD dans les phanères par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ou par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem. *Ann. Toxicol. Anal.* 2001 ; vol 13, n°2 : 63-68.
- 3- Kintz P., Goulle P., Fornes P., Ludes B. Une nouvelle série d'analyse des cheveux de Napoléon confirme une exposition chronique à l'arsenic. *Ann. Toxicol. Anal.* 2001 ; vol 13, n°4 : 243-246.
- 4- Traqui A. Le poil : structure et physiologie. *Rev. Fr. Lab.* 1996 ; 282 : 19-23.
- 5- Samyn N., Areschka V., Kintz P. Place de la salive et des cheveux dans le dépistage d'un usage de stupéfiants en milieu professionnel. *Ann. Toxicol. Anal.* 2002 ; vol 14, n°1 : 33-42.
- 6- Cone E. Legal, workplace, and treatment drug testing with alternate biological matrices on a global scale. *Forensic Sci. Int.* 2001; 121: 7-15.
- 7- Verstraete A. Fenêtre de détection des xénobiotiques dans le sang, les urines, la salive et les cheveux. *Ann. Toxicol. Anal.* 2002 ; vol 14 : 390-4.
- 8- Pepin G., Gaillard Y. Applications médico-légales du dépistage dans les cheveux des conduites toxicophiles par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. *Rev. Fr. Lab.* 1996; 282 : 65-8.
- 9- Deveaux M., Kintz P., Goulle J.P., Bessard J., Pepin G., Gosset D. The hair analysis proficiency testing program of the French Society of Analytical Toxicology. *Forensic. Sci. Int.* 2000 ; 107 : 389-94.
- 10- Nakahara Y., Kikura R., Takahashi K., Foltz R.L., Mieczkowski T. Detection of LSD and metabolite in rat hair and human hair. *J. Anal. Toxicol.* 1996 ; 20, 5 : 323-329.
- 11- Kintz P. Toxicologie et pharmacologie médico-légale. *ELSEVIER* 1998 ; 431-463.