

Dosage de l'EDDP urinaire (métabolite de la méthadone) par une méthode CEDIA®. Intérêt dans le suivi des patients sous traitement méthadone

Measurement of urinary EDDP (metabolite of methadone) with a CEDIA® immunoassay method. Usefulness to monitor methadone compliance

Isabelle DENIS^{*(1)}, Martine ROUBILLE⁽²⁾, Bernard POGGI⁽¹⁾,

Fafia DJARDEM⁽³⁾, Christian TREPO⁽³⁾

(1) Service de Biologie, Hôtel-Dieu, 1, place de l'Hôpital - 69288 LYON Cedex 02

(2) Laboratoire de Biologie, Centre Hospitalier Pierre Oudot - 38317 BOURGOIN-JALLIEU

(3) Centre Spécialisé de Soins et de Prévention pour Toxicomanes (C.S.S.T.), Hôtel-Dieu, 1, place de l'Hôpital - 69288 LYON Cedex 02

* Auteur à qui adresser la correspondance : Isabelle DENIS, Service de Biologie, Hôtel-Dieu, 1, place de l'Hôpital 69288 LYON Cedex 02 - Tél : 04 72 41 32 20 - Fax : 04 72 41 31 41 - e-mail : isabelle.denis@chu-lyon.fr

(Reçu le 3 mai 2002 ; accepté le 24 mai 2002)

RÉSUMÉ

La méthadone est un médicament opiacé largement utilisé dans le traitement de substitution de la toxicomanie aux drogues opiacées. En France, la législation impose des contrôles urinaires réguliers, en particulier la recherche de la présence de méthadone dans les urines. Le but de ce travail est d'évaluer l'intérêt du dosage urinaire de l'EDDP (métabolite principal de la méthadone), comparativement à celui de la méthadone. 462 échantillons urinaires provenant de 42 patients du centre de dépistage et de prévention des toxicomanies de l'Hôtel-Dieu de Lyon ont été analysés et les résultats comparés. L'EDDP a été mesurée avec le réactif CEDIA® d. a. u.® (Cloned Enzym Immunodonor Assay) de Microgenics. Le dosage de la méthadone a été réalisé avec la trousse Syva Emit® d. a. u.® (Enzyme Multiplied Immunoassay Technic) de Dade Behring. Les seuils de positivité étaient respectivement de 100 et 300 µg/l.

436 échantillons sur 462 soit 94,4 % étaient parfaitement corrélés. Dans 5,6 % des cas on observait des cas discordants. Dans 1,3 % des cas nous avons trouvé de la méthadone et pas d'EDDP. Ces prélèvements correspondaient pour deux patients à une surcharge urinaire frauduleuse par de la méthadone. Dans 4,3 % des cas nous avons mis en évidence de l'EDDP mais pas de méthadone. Dans ce cas le pH urinaire était élevé pour cinq patients.

L'EDDP apparaît donc comme un marqueur plus fiable que la méthadone dans le suivi des patients sous traitement substitutif par la méthadone. En effet l'excrétion urinaire de la méthadone varie en fonction de nombreux paramètres. L'obtention d'un résultat négatif ne correspond donc pas forcément à une non-observance du traitement. De plus la mesure de l'EDDP permet la détection des fraudes par ajout de méthadone à l'urine.

MOTS-CLÉS

EDDP, méthadone, CEDIA, substitution.

Introduction

La méthadone est un agoniste complet des récepteurs opiacés *mu* du système nerveux central. Elle est largement utilisée en France comme traitement de substitution chez les toxicomanes addictifs à l'héroïne, en raison de ses caractéristiques métaboliques (en particulier sa demi-vie longue) et pharmacologiques. Elle est prescrite dans le cadre du «programme méthadone» depuis 1994, et selon les directives ministérielles, sa prescription nécessite un suivi toxicologique urinaire régulier pour vérifier l'observance du traitement et l'absence de fraudes éventuelles.

Habituellement le suivi des patients est réalisé par la recherche de la méthadone dans les urines, par des méthodes immunologiques.

Le laboratoire de l'Hôtel-Dieu de Lyon assure le suivi toxicologique urinaire des patients du centre méthadone, en particulier le dépistage de la méthadone urinaire. Or pour certains patients adhérant correctement au traitement selon les cliniciens, les recherches de méthado-

SUMMARY

Methadone is an opiate agonist largely used in detoxification treatment for opiate addiction. According to law, patients are regularly submitted to urinary controls, especially methadone screening. The purpose of this study is to evaluate usefulness of EDDP (primary metabolite of methadone) urinary measurement, as compared to methadone assay. A total of 462 urine samples were analysed and compared. These samples were obtained from 42 patients of the Hôtel-Dieu center of methadone maintenance from Lyon. EDDP was measured with the Microgenics CEDIA® d. a. u.® assay. Concentrations of methadone were determined with the Syva Emit® d. a. u.® methadone assay (Dade Behring). The cut-off concentrations were respectively 100 and 300 µg/l. Of the 462 samples, 436 were positive for both methadone and EDDP (94,4 %). In 5,6 % of the cases a discordance was observed. In 1,3 % of the cases, samples were positive for methadone but negative for EDDP. In these specimens there were two patients who had spiked their urine with methadone. In 4,3 % of the cases, EDDP test was positive but methadone test was negative. In these cases urinary pH was high for five patients.

EDDP measurement seems to be more efficient than the methadone assay to monitor methadone compliance. Indeed, urinary excretion of methadone depends on various factors. A negative test result, therefore, is not necessarily due to noncompliance. EDDP measurement is also able to detect specimens who have been spiked with methadone.

KEY-WORDS

EDDP, methadone, CEDIA, substitution.

ne urinaire se sont avérées négatives. Ceci nous a conduit à réaliser le dosage urinaire du métabolite principal de la méthadone, l'EDDP (2-éthylidine-1,5-diméthyl-3,3-diphénylpyrrolidine). L'EDDP résulte de la N-déméthylation et de la cyclisation de la méthadone au niveau hépatique, elle est excrétée dans l'urine avec le médicament non métabolisé et un autre métabolite, l'EMDP (2-éthyl-5-méthyl-3,3-diphénylpyrroline) (figure 1). Après administration chronique de la forme thérapeutique de méthadone (sirop contenant du xylose comme molécule traçeuse), 5 à 50 % sont excrétés sous forme inchangée et 2 à 25 % sous forme d'EDDP (1).

L'EDDP est un paramètre peu utilisé en routine en raison de ses contraintes de dosage. En effet, la mesure de ce métabolite fait appel à des techniques chromatographiques, CLHP (chromatographie liquide haute performance) ou CG/SM (chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse) (2, 3, 4) et ne peut être réalisée que dans des laboratoires spécialisés. Récemment la société Microgenics a commercialisé une trousse de dosage de l'EDDP urinaire utilisant une technique immuno-

enzymatique en phase homogène de type CEDIA®, spécifique et facilement automatisable (5).

Le but de cette étude est d'évaluer les performances diagnostiques de la mesure de l'EDDP urinaire, comparativement à celles de la méthadone, dans le cadre du suivi des patients traités par méthadone.

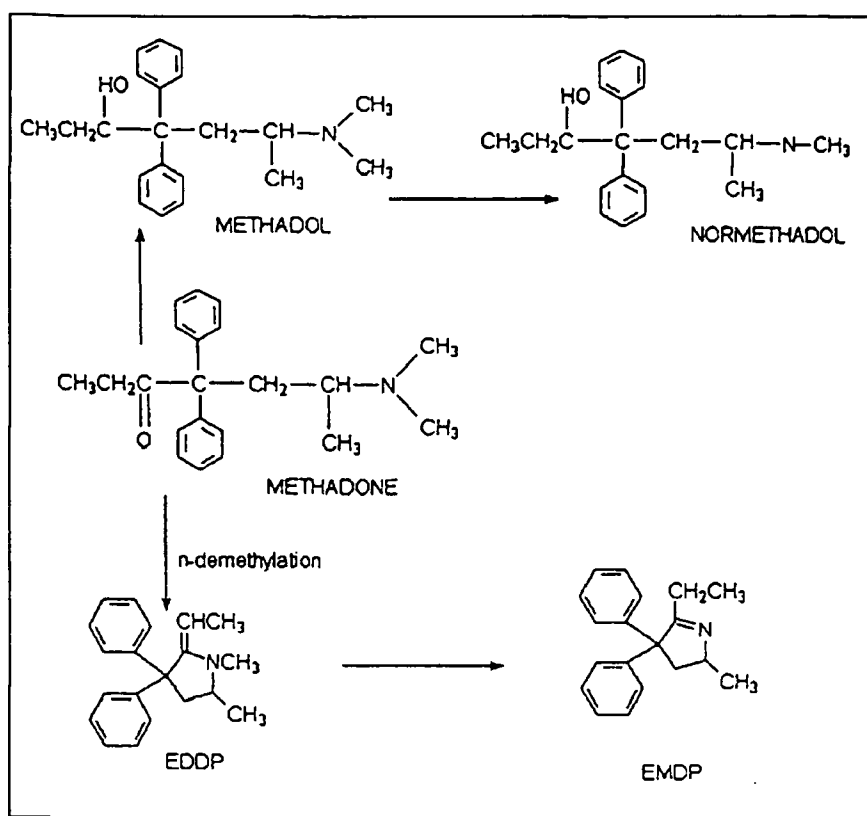


Figure 1 : Métabolisme de la méthadone.

Matériel et méthodes

Patients

Cette étude porte sur 42 patients (29 hommes et 13 femmes) âgés de 35 ans en moyenne (21-54) pris en charge au C.S.S.T. de l'Hôtel-Dieu de Lyon. Pour ces patients, 462 échantillons urinaires ont été analysés sur une période de sept mois. La fréquence des dosages est variable en fonction des toxicomanes, deux fois par semaine en début de traitement, ensuite une fois par mois en moyenne. Les doses journalières se situent entre 5 et 110 mg (doses d'équilibre). La durée du traitement va de 5 à 82 mois.

Prélèvements urinaires

Les urines sont recueillies dans un poudrier, centrifugées à 3000 tours par minute pendant 10 minutes et analysées le jour même. Si l'analyse n'est pas effectuée immédiatement elles peuvent être conservées 3 jours à +4° C .

Les prélèvements urinaires ne se font pas sous contrôle strict de l'équipe médicale qui vérifie seulement la température des urines.

Aussi, avant l'analyse le laboratoire effectue plusieurs examens pour détecter les fraudes éventuelles. Pour chaque prélèvement on note la transparence, la présence de mousse, la couleur, l'odeur et on mesure deux paramètres :

- le pH urinaire (bandelette réactive imprégnée d'un indicateur coloré) : le pH urinaire d'un sujet sain est compris entre 5 et 8. En dehors de cette fourchette il y a acidification ou alcalinisation.

- la densité urinaire (indice de réfraction) : normalement comprise entre 1,007 et 1,035. Si le résultat est inférieur à 1,007 il pourra s'agir d'une fraude par dilution ou prise de diurétique. Une valeur supérieure à 1,035 peut indiquer l'addition de substances étrangères.

Méthodes

La méthadone a été dosée par une technique immuno-enzymatique en phase homogène de type EMIT® (Test Syva Emit® d.a.u.® Methadone de Dade Behring).

La technique est étalonnée selon un mode quantitatif en 5 points (0 à 1000 µg/l) à l'aide des calibrateurs Dade Behring. Dans notre expérience la calibration est stable 1 mois. Le seuil de positivité de la technique est de 300 µg/l.

La détermination de l'EDDP a été effectuée avec la trousse CEDIA® d. a. u.® EDDP (Microgenics). Il s'agit d'une technique immuno-enzymatique en phase homogène par compétition, utilisant une β-galactosidase scindée en deux fragments par génie génétique. L'association des deux fragments donne une β-galactosidase active dont l'activité mesurée est proportionnelle à la concentration de l'analyte dans l'échantillon (figure 2). La technique est étalonnée selon un mode quantitatif en 4 points (0 à 2000 µg/l) à l'aide des calibrateurs multidrogues CEDIA® d. a. u.® (Microgenics). Dans ce cas également, la calibration est stable 1 mois. Le seuil de positivité de la technique est de 100 µg/l. Le réactif CEDIA® d. a. u.® EDDP ne donne pas de réaction croisée avec la méthadone.

Ces trousse ont été utilisées selon les adaptations recommandées du fabricant sur un analyseur Cobas Mira (ABX France). Les résultats ont été exprimés en µg/l, sans correction par rapport au taux de créatinine urinaire, ainsi que sous forme d'un rapport EDDP/méthadone.

Les dosages sont effectués sur l'urine diluée au 1/10 dans de l'eau distillée. En cas de résultat inférieur à 100 µg/l pour la méthadone et l'EDDP les urines sont passées pures. Pour des concentrations supérieures aux limites de linéarité de la technique les échantillons sont dilués au 1/20 ou au 1/50 dans de l'eau distillée.

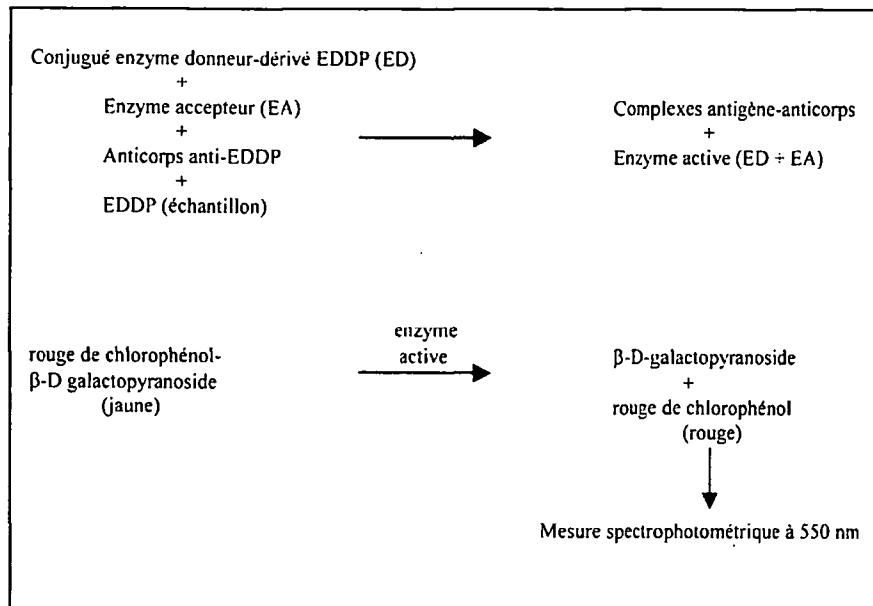


Figure 2 : Schéma de principe de la technique CEDIA®.

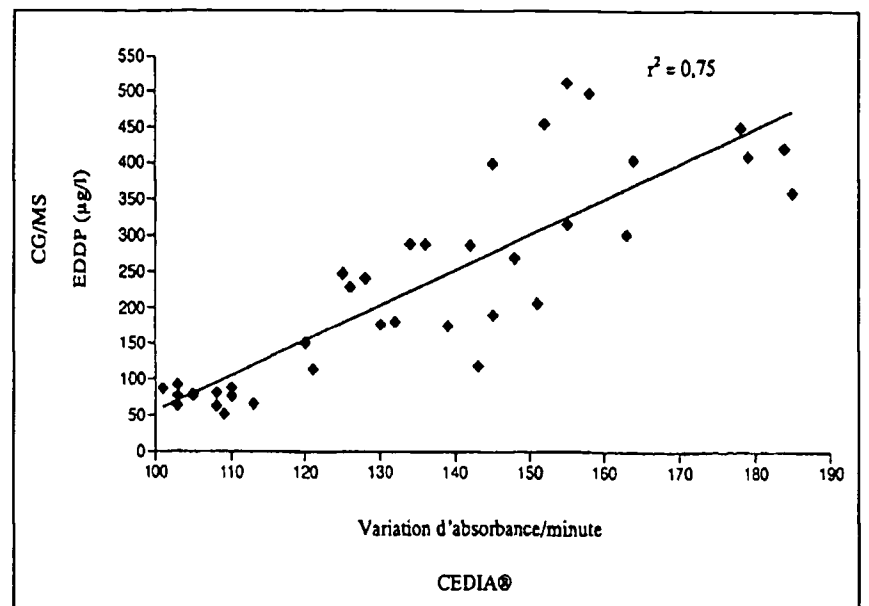


Figure 3 : Corrélation entre la méthode CEDIA® et la CG/SM.

Résultats et discussion

Dans ce travail nous n'avons pas réalisé d'étude comparative de la méthode CEDIA® avec d'autres techniques, l'objectif de ce travail n'étant pas d'évaluer les performances analytiques du réactif CEDIA®. Nous nous sommes tout de même interrogé sur la concordance des résultats avec d'autres méthodes, en particulier la CG/SM, considérée comme la méthode de référence. Dans une étude portant sur 38 échantillons avec des concentrations d'EDDP comprises entre 52 et 515 µg/l George *et al.* ont mis en évidence une corrélation entre la variation d'absorbance de la réaction par minute (test réalisé en mode qualitatif) et les concentrations d'EDDP déterminées par CG/SM (6) (figure 3). Ces auteurs concluent à la bonne fiabilité de la méthode CEDIA®.

Pour chaque urine nous avons réalisé en parallèle le dosage de la méthadone et de l'EDDP et les résultats ont été comparés. Dans le tableau I sont indiqués les résultats obtenus pour les 462 urines analysées. La comparaison des résultats montre que 436 échantillons sur 462, soit 94,4 % sont parfaitement corrélés.

Pour les urines positives en méthadone et en EDDP (92,5 %) les taux de méthadone sont compris entre 307 et 84000 µg/l, ceux de l'EDDP entre 185 et 51000 µg/l. Les urines négatives en méthadone et en EDDP (1,9 %) correspondent à des bilans d'inclusion, pour être sûr que le patient n'est pas suivi dans un autre centre de substitution, ou bien à un arrêt du traitement.

Dans 5,6 % des cas (26/462) on observe des résultats discordants :

- Dans 20 cas on met en évidence la présence d'EDDP mais pas de méthadone.
- Dans 6 cas on met en évidence la présence de méthadone mais pas d'EDDP.

Tableau I : Comparaison des résultats des dosages de méthadone (seuil de 300 µg/l) et d'EDDP (seuil de 100 µg/l).

	Urines négatives en méthadone	Urines positives en méthadone
Urines négatives en EDDP	9 (1,9%)	6 (1,3%)
Urines positives en EDDP	20 (4,3%)	427 (92,5%)

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à ces cas discordants :

1) Urines positives en méthadone et négatives en EDDP :

Ces résultats concernent 4 patients et sont indiqués dans le tableau II.

A noter que pour ces résultats négatifs en EDDP on ne peut pas totalement exclure un faux-négatif analytique par falsification des urines (ajout de substances telles que savon liquide, eau de javel, vinaigre,...). Pour s'en assurer il aurait fallu réaliser un dosage par CLHP ou CG/SM.

- Pour les patients 1 et 2 l'absence d'EDDP montre que la méthadone n'a pas été ingérée et donc pas métabolisée. De plus le taux de méthadone est très supérieur à celui retrouvé habituellement dans les urines de patients correctement traités. Pour ces patients il y a eu probablement fraude, par ajout de sirop de méthadone à une urine «propre», pour masquer une prise d'héroïne par exemple. La figure 4 montre les résultats des différents contrôles urinaires réalisés pendant la période d'étude pour le patient 1 : pour 10 prélèvements sur 12 on note une consommation d'opiacés, les 2 prélèvements négatifs en EDDP sont négatifs en opiacés. Pour

Tableau II : Résultats des patients à urines positives en méthadone (M) et négatives en EDDP.

	Méthadone (µg/l)	EDDP (µg/l)	Rapport EDDP/M	pH	Densité urinaire
Patient 1	457000	70	< 0,01	8	> 1,040
	498000	37	< 0,01	6,5	> 1,040
Patient 2	298000	33	< 0,01	4,5	> 1,040
	426000	26	< 0,01	5	> 1,040
Patient 3	1760	0	< 0,01	7,1	1,003
Patient 4	990	88	< 0,01	6,2	1,004

ces 2 patients la densité urinaire était supérieure à 1,040, ce qui apporte une preuve supplémentaire à la présence de substances additionnelles à l'urine. En mesurant uniquement la méthadone chez ces patients on aurait pu conclure faussement à une bonne observance du traitement.

- Pour les patients 3 et 4 le taux trouvé correspond très probablement à une dilution volontaire des urines (densité urinaire respectivement à 1,003 et 1,004), majorée par l'ingestion récente d'alcool. En effet une alcoolurie demandée simultanément pour chaque patient montre des valeurs importantes, à 1,7 g/l. Il faut souligner également que l'alcool est susceptible d'agir sur le métabolisme de la méthadone et donc de modifier les concentrations urinaires de méthadone et d'EDDP (7).

2) Urines négatives en méthadone et positives en EDDP :

Les résultats concernent 6 patients et sont représentés dans le tableau III, avec le pH et la densité urinaire. Ces résultats correspondent à des faux négatifs, en terme d'efficacité diagnostique, pour le dosage de la méthadone. Comme pour l'EDDP on ne peut pas totalement exclure un faux-négatif analytique.

Pour ces patients, nous voyons que le dosage seul de la méthadone ne permet pas le suivi correct du patient. En effet, au seul vu du résultat du dosage de méthadone urinaire on peut penser que le patient ne suit pas son traitement, ou qu'il s'agit d'urines émises par un tiers abstinent. Plusieurs hypothèses sont envisageables. Il peut s'agir :

a) d'un métabolisme accéléré de la méthadone. En effet, la méthadone est métabolisée par les cytochromes P450 hépatiques, et on observe des variations interindividuelles d'un facteur 1 à 7 suivant que le patient a un métabolisme lent ou rapide (7). De plus un certain nombre de médicaments, en particulier les inducteurs enzymatiques, sont métabolisés par les mêmes enzymes, et sont donc susceptibles d'augmenter le métabolisme de la méthadone. Dans ce cas la

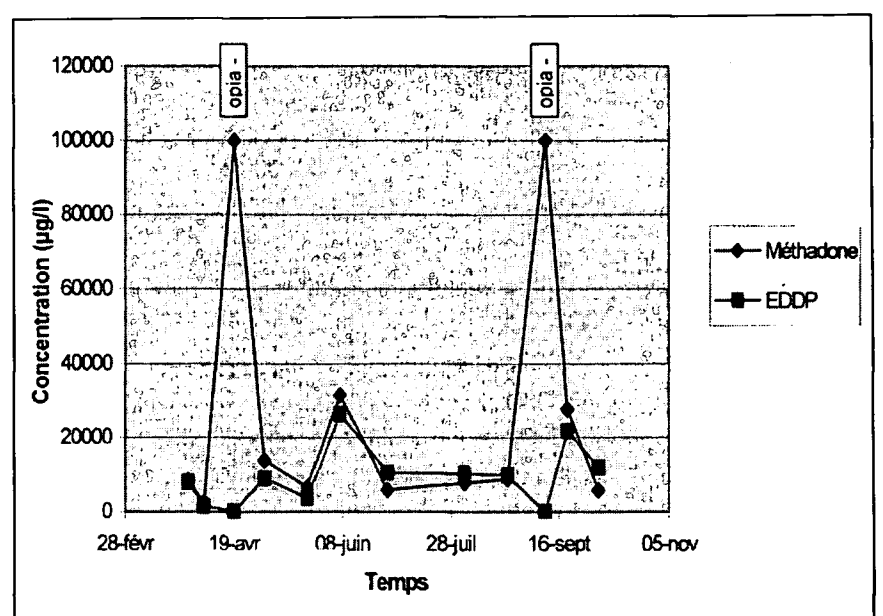


Figure 4 : Résultats des dosages de méthadone et d'EDDP pour le patient 1.

quantité de méthadone urinaire peut être trop faible pour être détectable par un test de dépistage urinaire et on peut s'attendre à une augmentation du rapport EDDP/méthadone.

b) d'une diminution de l'excrétion urinaire de la méthadone. En effet, la méthadone est une base faible (pKa = 8,6) éliminée par filtration glomérulaire. Son excrétion est donc pH-dépendante : un pH alcalin retarde son élimination par augmentation de la réabsorption tubulaire, un pH acide au contraire augmente son élimination (8). L'élimination de l'EDDP, elle, n'est pas modifiée par le pH urinaire.

c) d'une non-observance du traitement (oubli d'une prise par exemple).

d) d'une posologie administrée trop faible. Le dosage de l'EDDP pourrait donc être une méthode plus fiable que la recherche de méthadone, notamment en fin de traitement, lors de la décroissance progressive des doses de méthadone, pour vérifier l'observance du traitement. Mais rappelons qu'il n'y a pas de corrélation entre la dose de méthadone administrée et les concentrations urinaires de méthadone et d'EDDP (4).

Tableau III : Résultats des patients à urines négatives en méthadone (M) et positives en EDDP.

	Méthadone (µg/l)	EDDP (µg/l)	Rapport EDDP/M	pH	Densité urinaire
Patient 5	123	2991	24,32	8,0	1,019
Patient 6	192	3500	18,22	8,0	1,017
	237	4530	19,11	8,0	1,019
	279	5650	20,25	8,0	1,026
Patient 7	121	1283	10,6	8,0	1,017
	131	489	3,73	7,4	1,006
Patient 8	232	1470	6,34	7,7	1,016
	179	1790	10,0	> 8,0	1,020
	253	6150	24,31	7,5	1,014
Patient 9	250	1010	4,04	8,0	1,021
	207	636	3,07	7,4	1,010
Patient 10	155	250	1,61	5,0	1,006
	235	344	1,04	6,0	1,017
	155	694	4,48	6,8	1,016
	213	627	2,94	6,8	1,023
	145	330	2,28	6,2	1,018
	191	740	3,87	5,6	1,022
	227	185	0,81	5,0	1,011
	204	275	1,35	5,0	1,015
	180	1228	6,82	6,5	1,030

Pour chaque échantillon nous avons comparé le rapport EDDP/méthadone, ainsi que le pH urinaire, à des valeurs de référence établies à partir d'urines positives en méthadone et en EDDP chez ces mêmes patients (moyenne pour les 6 patients confondus, soit un total de 59 urines). Le rapport moyen EDDP/méthadone est de $2,93 \pm 2,69$. Cette valeur est similaire à celle déterminée par Lardet *et al.* (3). Le pH urinaire moyen est de $6,62 \pm 0,63$.

Pour les patients 5 à 9 on constate que le pH urinaire est supérieur aux valeurs témoins. Pour ces patients le rapport EDDP/méthadone est significativement plus élevé que la moyenne pour 7 urines sur 11 (rapport supérieur ou égal à 10). On peut expliquer ces résultats par une diminution de l'élimination urinaire de la méthadone liée au pH alcalin. Pour les urines dont le rapport est inférieur ou égal à 10 l'interprétation semble moins évidente.

Pour le patient 10 nous n'avons pas trouvé non plus d'explication évidente. La posologie est de 65 mg par jour, et le rapport EDDP/ méthadone ainsi que les valeurs de pH urinaire se situent dans les valeurs nor-

males. On peut penser à une interaction médicamenteuse (ce patient prend régulièrement de la fluvoxamine et de l'halopéridol). Mais cette hypothèse semble peu probable car les concentrations urinaires d'EDDP sont supérieures au seuil de positivité mais également peu élevées. Pour ce patient qui semble présenter un métabolisme particulier il aurait été intéressant de réaliser des dosages plasmatiques.

Conclusion

Le dosage de l'EDDP urinaire présente plusieurs avantages par rapport à celui de la méthadone. En effet, l'élimination urinaire de la méthadone varie en fonction de nombreux paramètres (pH urinaire, prise concomitante de médicaments, métabolisme individuel, posologie). De ce fait l'obtention d'un taux de méthadone inférieur au cut-off peut faire croire à une non-observance du traitement chez des patients prenant correctement leur méthadone. De plus la mesure de l'EDDP permet de détecter un certain nombre de fraudes, en particulier celles par ajout de méthadone à

une urine «négative», puisque seule la méthadone sera retrouvée dans l'urine, sans son métabolite.

Le test CEDIA® d. a. u.® EDDP de Microgenics est une méthode simple et facile à mettre en œuvre, dans un laboratoire de biologie polyvalente souhaitant développer un secteur de toxicologie urinaire pour le suivi des patients toxicomanes. Elle permet un rendu rapide des résultats dans le service, qui correspond à l'attente des cliniciens, et permet un dialogue efficace avec le patient. Cette technique permet en outre de rendre un résultat à un moindre coût qu'une technique par CLHP ou CG/SM.

Il serait intéressant de compléter ce travail par une étude plus approfondie des rapports EDDP sur méthadone, en particulier pour mettre en évidence des corrélations clinico-biologiques chez un même patient.

Remerciements à l'équipe du C.S.S.T. pour leur collaboration et leur aide précieuse.

Références

1. Pépin G. Opiacées et opioïdes. In: Kintz P., ed. Toxicologie et pharmacologie médico-légales. Paris : Elsevier, 1998 ; 336-430.
2. Pollet J., Daumain P., Sarran A. La chromatographie liquide de haute performance automatisée : son utilisation dans un centre méthadone. *Rev. Franç. Lab.*, 1996 ; 282 : 187-192.
3. Lardet G., Gagnieu M.-C., Pascal P., Moulisma M., Elchardus J.-M., Vallon J.-J. Interprétation des dépistages EMIT des patients sous méthadone. *Toxicorama*. 1997 ; 9 : 29-36.
4. George S., Braithwaite R.-A. A pilot study to determine the usefulness of the urinary excretion of methadone and its primary metabolite (EDDP) as potential markers of compliance in methadone detoxification programs. *J. Anal. Toxicol.* 1999 ; 23 : 81-85.
5. Performance of the CEDIA® EDDP (methadone metabolite) assay. Society of Forensic Toxicologist National Meeting, Albuquerque, NM, September 1998.
6. George S., Parmar S., Meadway C., Braithwaite R. -A. Application and validation of a urinary methadone metabolite (EDDP) immunoassay to monitor methadone compliance. *Ann. Clin. Biochem.* 2000 ; 37 : 350-354.
7. Schlatter J., Madras J. -L., Saulnier J. -L., Poujade F. Interactions médicamenteuses avec la méthadone. *Presse Med.* 1999 ; 28 : 1381-4.
8. Bellward G. -D., Warren P. -M., Howald W., Axelson J. -E., Abbott F. -S. Methadone maintenance : effect of urinary pH on renal clearance in high and low doses. *Clin. Pharm. Ther.* 1977 ; 22 : 92-99.