

Toxicocinétique et distribution tissulaire du delta-9-tétrahydrocannabinol : étude chez le porc

Toxicokinetics and tissue distribution of delta-9-tetrahydrocannabinol : a study performed on a pig model

**Bertrand BRUNET^(1,2), Carole DOUCET⁽¹⁾, Nicolas VENISSE⁽²⁾, Thierry HAUET^(1,4),
William HEBRARD⁽³⁾, Yves PAPET⁽²⁾, Gérard MAUCO^(1,4), Patrick MURA^{(2)*}**

(1) INSERM E-0324, Université de Poitiers, Faculté de Médecine et Pharmacie, rue de la Milétrie,
BP 577 - 86021 Poitiers - France

(2) Laboratoire de Toxicologie et Pharmacocinétique, Centre Hospitalier et Universitaire, rue de la Milétrie,
BP 577 - 86021 Poitiers - France

(3) Institut National pour la Recherche Agronomique, GEPA Laboratoire de Chirurgie Expérimentale,
Domaine du Magneraud - 17700 Surgères - France

(4) Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier et Universitaire, rue de la Milétrie,
BP 577 - 86021 Poitiers - France

*Auteur à qui adresser la correspondance : Patrick MURA, Laboratoire de Toxicologie et Pharmacocinétique,
Centre Hospitalier et Universitaire, rue de la Milétrie, BP 577 - 86021 Poitiers - France
Tél : (33) 5 49 44 39 23 - Fax : (33) 5 49 44 38 34 - E-mail : p.mura@chu-poitiers.fr

(Reçu le 23 juin 2006 ; accepté après modifications le 13 décembre 2006)

RÉSUMÉ

Cette étude présente un nouveau modèle animal, le porc de race Large White, utilisé pour mettre en œuvre des expérimentations pouvant aider à mieux connaître la distribution tissulaire du Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC) notamment au niveau du cerveau. Les cinétiques réalisées chez le porc après administration de THC par voie intrajugulaire ont montré une similitude avec l'évolution des concentrations en THC rencontrée chez l'homme. La demi-vie terminale d'élimination du THC a été calculée à 10,6 h ainsi que le volume

SUMMARY

This study presents a new animal model, the Large White pig, which was tested for studying cannabinoids' concentration-effect relationship. The first step has focused on the study of plasma kinetics after injection of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) at different dosages. Results showed that plasma kinetics were comparable to those reported in humans. The elimination terminal half life was 10.6 h and a volume of distribution of 32 L/kg was calculated. In a second step, this model was used to determine the kine-

de distribution à 32 L/kg.

Pour étudier la distribution tissulaire des cannabinoïdes, 8 porcs ont reçu 200 µg/kg de THC par injection. Deux porcs ont été sacrifiés 30 min après injection puis 2 autres après 2, 6 et 24 heures. L'élimination du THC est la plus rapide au niveau du foie, et la plus lente au niveau de la graisse où les concentrations sont encore importantes 24 heures après l'injection. L'élimination au niveau du cerveau semble plus lente que dans le sang total. Après 30 min, au niveau du cerveau la plus forte concentration en THC est retrouvée au sein du cervelet et la plus faible au niveau du bulbe rachidien. Au niveau des autres organes (rein, rate, cœur, muscle et poumon), l'élimination est comparable à celle observée dans le plasma. Cette étude confirme la rétention prolongée du THC dans les tissus lipophiles (graisse et cerveau), déjà observée chez l'homme.

La corrélation entre les résultats obtenus et les données connues chez l'homme montre que le porc est un bon modèle animal en vue d'études plus approfondies sur le métabolisme et la distribution des cannabinoïdes.

MOTS-CLÉS

Cannabinoïdes, toxicocinétique, distribution tissulaire, modèle animal, porc.

Introduction

Le cannabis est devenu un véritable problème de santé publique (1), notamment chez les jeunes où sa consommation ne cesse d'augmenter, particulièrement en France (2). Le cannabis et son principe actif le Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC) représente la drogue illicite la plus souvent retrouvée dans les cas de conduite automobile sous l'emprise de stupéfiants (3, 4) ou lors d'expertises médico-légales. Le cannabis est un produit utilisé depuis plusieurs milliers d'années pour ses effets thérapeutiques ou psychoactifs. Mais bien que ce soit un produit très ancien, il reste encore aujourd'hui une source de questions dans de nombreux domaines. Certains points de la toxicocinétique complexe du THC restent encore à éclaircir. C'est le cas par exemple des relations liant les effets du cannabis aux concentrations sanguines en THC.

De nombreuses études ont été menées dans le but d'établir une corrélation entre les effets psychoactifs du THC et ses concentrations plasmatiques ainsi que celles de ses métabolites 11-hydroxy- Δ^9 -tétrahydrocannabinol (11-OH-THC) et 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC-COOH). Ces études réalisées chez l'homme (5, 6) ont démontré l'existence d'un décalage entre le pic plasmatique du THC et le maximum des effets du cannabis. D'autres études chez l'animal ont cherché à clarifier la toxicocinétique du THC. Dans ces études les animaux utilisés étaient le plus souvent des rongeurs, rats (7), souris (8) ou des lapins (9). Ces modèles animaux ont montré des limites, car ces espèces sont peu

tic profile of cannabinoids distribution in tissues. Eight Large White male pigs received an injection of THC (200 µg/kg). Two pigs were sacrificed 30 min after injection, 2 others after 2, 6 and 24 hours. The fastest THC elimination was noted in liver tissue, where it was completely eliminated in 6 hours. The slowest THC elimination was observed for fat tissue, where the molecule was still present at significant concentrations 24 hours later. THC decreased in brain tissue slower than in blood. After 30 min, THC concentration in different brain areas was highest in the cerebellum and lowest in the medulla oblongata. THC elimination kinetics noted in kidney, heart, spleen, muscle and lung were comparable with those observed in blood.

This study confirms, even after a unique administration, the prolonged retention of THC in brain and particularly in fat. Moreover, these results support the interest for this animal model, which could be used in further studies of distribution of cannabinoids in tissues.

KEY-WORDS

Cannabinoids, toxicokinetics, animal model, pig, tissue distribution.

sensibles aux effets du THC et par conséquent requièrent de grandes quantités de principe actif, incomparables aux doses utilisées par l'homme. De plus ces petits animaux de laboratoires ne permettent pas de réaliser des cinétiques plasmatiques complètes sur un même animal. Les prélèvements sanguins et tissulaires sont limités par la taille de l'animal. Quelques rares études ont été effectuées sur de plus gros mammifères tels que le chien (10) ou le singe (11, 12).

Au delà des problèmes éthiques qu'elles impliquent, ces deux dernières espèces animales restent difficilement accessibles en laboratoire à cause de leur coût élevé. C'est pourquoi il nous a semblé utile de développer un nouveau modèle animal, le porc de race Large White dans le but de clarifier certains points de la toxicocinétique du THC qui restent à élucider. Le porc est un gros animal de laboratoire qui permet d'effectuer des cinétiques plasmatiques complètes sur un même animal sans risque de déplétion sanguine. C'est aussi une race connue pour être physiologiquement très proche de l'homme, particulièrement en ce qui concerne le métabolisme des xénobiotiques (13). Le porc partage avec l'homme de grandes similarités au niveau des enzymes du métabolisme des xénobiotiques et possède les enzymes les plus importantes (cytochromes P450) en quantités semblables (14). L'activité totale des enzymes des cytochromes P450 du porc est comparable à celle observée chez l'homme (15). Le porc est souvent utilisé en recherche biomédicale en raison de ses organes tels que le foie, l'intestin, le cœur, les reins ou les poumons qui sont anatomiquement proches de

ceux de l'homme (16-18). Des publications ont déjà démontré son intérêt lors d'études de pharmacologie ou de toxicologie (19, 20).

Dans un premier temps des cinétiques plasmatiques ont été réalisées chez le porc après administration du THC. Cette première partie du travail a servi de validation du modèle animal en comparant les résultats obtenus avec les données de toxicocinétique du THC connues chez l'homme. La seconde partie des expérimentations consiste en une étude complète de la distribution tissulaire du THC chez le porc, phénomène très rarement étudié chez l'homme.

Matériel et méthodes

Modèle animal

Les animaux utilisés sont des porcs de race Large White, issus de l'élevage à l'INRA du Magneraud à Surgères. Les porcs utilisés sont âgés de 10 à 12 semaines et leur poids se situe entre 29 et 44 kg. Les différents protocoles expérimentaux ont été menés en accord avec le comité d'éthique de l'INRA.

Pose des cathéters

Pour faciliter l'administration du THC et les prélèvements de sang, deux cathéters sont posés au niveau jugulaire, la veille de l'expérimentation. Cette opération s'effectue dans une salle de chirurgie sous anesthésie générale.

- Le porc subit une prémédication intra-nasale par le midazolam à 0,2 mg/kg.
- L'anesthésie est induite grâce au masque de Hunter par un mélange gazeux de Sevorane® (8 puis 4%) dans un mélange O₂/N₂O (50/50%).
- Pose d'une voie veineuse périphérique au niveau de la veine sagittale de l'oreille.
- Curarisation par le bromure de pancuronium (bolus de 0,15 mg/kg) et intubation orotrachéale (sonde endotrachéale de 6,5mm).

L'entretien de l'anesthésie générale est réalisée par du Forène®(isoflurane) à 2% dans un mélange O₂/N₂O 50/50% et la ventilation est réalisée grâce à un respirateur LKB médical ENGSTROM SYSTEM.

Protocole expérimental

Après l'opération de pose des cathéters, le porc est placé dans une cage à métabolisme permettant le prélèvement de sang par le cathéter ainsi qu'un recueil des urines grâce à un bac de rétention. Les administrations de THC ont lieu au minimum 24 heures après l'opération.

Avant l'administration par injection, le produit pur est dilué dans du NaCl à 0,9% de façon à obtenir 2 mL de solution dans une seringue. La quantité de THC injectée est toujours rapportée au poids du porc et trois doses différentes ont été testées : une dose faible de 50 µg/kg (2 porcs), une dose moyenne de 100 µg/kg (2 porcs) et une dose forte de 200 µg/kg (3 porcs). De telles doses sont compatibles avec celles absorbables par l'homme dans un ou plusieurs joints.

L'injection est réalisée avec une seringue directement dans le bouchon de l'un des deux cathéters et dure une dizaine de secondes. Les prélèvements sont réalisés sur le cathéter du coté opposé à l'injection. 4 à 5 mL de sang sont recueillis puis transférés immédiatement dans un tube hépariné. Des prélèvements de sang sont effectués aux temps suivants : 1 prélèvement avant injection, puis à 1, 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360 minutes et à 24 heures après l'injection. Pour le premier porc ayant reçu 200 µg/kg de THC un prélèvement de sang supplémentaire est effectué après 48h. Le recueil urinaire est assuré à chaque miction du porc pendant les six premières heures. Un dernier recueil est effectué au bout de 24 heures et le volume total d'urine est mesuré. Les prélèvements de sang et d'urines sont ensuite placés à +4 °C.

Dissection

Afin d'étudier la distribution tissulaire, le THC est injecté comme précédemment à la dose de 200 µg/kg. Deux porcs sont sacrifiés 30 min après l'injection puis 2 autres à 2 heures, 6 heures et 24 heures. Les porcs sont sacrifiés, après anesthésie au masque, par injection de KCl qui entraîne rapidement la mort par arrêt cardiaque. Chaque porc est ensuite immédiatement placé sur la table d'opération.

L'abdomen du porc est ouvert pour permettre le prélèvement d'une fraction des principaux tissus ou liquides biologiques à savoir : bile, rein, poumon, foie, cœur, rate, graisse, et muscle. L'humeur vitrée est prélevée à l'aide d'une seringue et d'une aiguille.

Pour le prélèvement de différentes zones du cerveau, la peau du crane est découpée au bistouri électrique et le crâne est décalotté en veillant à ne pas endommager le cerveau : le cortex frontal, le cortex occipital, le cervelet et le bulbe rachidien sont prélevés. Tout les prélèvements tissulaires sont conservés dans des flacons en plastique placés immédiatement dans la carboglace puis au congélateur à - 80°C.

Méthodes analytiques

Réactifs : Le Δ⁹-tétrahydrocannabinol (THC) provient du laboratoire Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier

France, Lot N°092K8800, 28 mg/mL dans éthanol). Les standards deutérés (THC-d₃, 11-OH-THC-d₃, et THCCOOH-d₃) proviennent du laboratoire LGC Promochem, Molsheim, France (réf CERT-003; CERH-041; CERT-004). L'hydroxyde de sodium (réf C723287), l'heptane (réf 1.04391), et l'acétate d'éthyle (réf 868) ont été obtenus auprès de Merck, Darmstadt, Allemagne. L'acide chlorhydrique (réf 403871) provient de Carlo Erba, Val de Reuil, France. Le chlorure de sodium à 0,9% est fourni par B.Braun Medical AG, Emmenbrücke, Suisse. Enfin le N,O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide à 1% de triméthylchlorosilane ou BSTFA-TMCS (réf 15238) a été obtenu auprès de Fluka, Buchs, Suisse.

Extraction : La technique utilisée est adaptée de celle décrite par Kemp, et permet de doser les cannabinoïdes dans le plasma et l'urine (21). Le principe d'extraction est le même pour les prélèvements sanguins et urinaires. Après centrifugation des tubes pendant 5 min à 1500 g, 1 mL de plasma ou d'urine est placé dans un tube borosilicaté (pour éviter l'adsorption des cannabinoïdes sur le verre). 20 µL d'étalons internes deutérés (THC-d₃, 11-OH-THC-d₃ et THC-COOH-d₃) à 1 µg/mL sont ajoutés, ainsi que 0,5 mL de NaOH 2N. Les tubes sont agités au vortex et 4 mL d'un mélange d'extraction heptane-acétate d'éthyle 7/1 sont ensuite ajoutés. Les tubes sont agités puis centrifugés et la phase organique est reprise et évaporée. Cette extraction en milieu basique permet d'extraire le THC et le 11-OH-THC.

La phase aqueuse restante est ensuite acidifiée par 1 mL d'HCl 1N puis agitée au vortex. 4 mL du mélange d'extraction sont à nouveau ajoutés. Après agitation et centrifugation, la phase organique est reprise puis évaporée. Cette extraction acide permet d'obtenir le THC-COOH.

Les deux résidus sont repris par 20 µL d'un mélange de dérivation BSTFA à 1% de TMCS puis chauffés pendant 20 minutes à 70°C. Les deux extraits sont ensuite analysés séparément en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

L'humeur vitrée est traitée comme le plasma sans étape préliminaire. La bile est diluée au 1/5 avant extraction avec du sérum physiologique. Pour les tissus solides, 200 mg environ sont aliquotés puis 1,8 mL de tampon Tris pH 7,4 est ajouté. Pour les tissus les plus difficiles à homogénéiser (muscle, cœur, graisse), une étape préliminaire de broyage au thurax est réalisée. Ensuite, comme pour les autres tissus, le mélange est broyé au potter (10 allers-retours à 500 tr/min puis 10 à 1000 tr/min) de façon à obtenir un homogénat. Un mL d'homogénat est enfin extrait comme précédemment pour le plasma.

Cette méthode a été validée pour les différentes matrices utilisées. Les limites de quantification (LDQ) pour le plasma sont de 0,25 ng/mL pour le THC, 0,2 ng/ml pour le 11-OH-THC et 0,5 ng/ml pour le THC-COOH. Pour les tissus, les résultats donnés sont une moyenne de quatre déterminations réalisées sur deux homogénats différents. Les LDQ du THC sont comprises entre 2 et 9 ng/g selon les tissus.

Appareillage de CPG-SM et conditions expérimentales : Le système est composé d'un chromatographe en phase gazeuse (Agilent GC system 6890N) équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (30 m x 0,25 mm i.d., film 0,25 µm). Le chromatographe est relié à un spectromètre de masse (Agilent 5973N) fonctionnant en mode impact électronique. Les conditions chromatographiques sont différentes pour l'extrait basique contenant le THC et le 11-OH-THC et pour l'extrait acide contenant le THC-COOH. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur avec un débit constant de 1 mL/min dans les deux cas.

Pour l'extrait basique, la programmation de température du four commence à 150°C puis augmente de 30°C/min jusqu'à 240°C, cette température étant maintenue pendant 30 secondes puis augmentant à nouveau jusqu'à 280°C à raison de 3°C/min. La température reste à 280°C pendant 1 minute puis monte jusqu'à 300°C à 30°C/min et est maintenue 1 minute. Le temps total de la séparation chromatographique est donc de 20,5 minutes.

Pour l'extrait acide, le gradient de température débute à 200°C pendant 1 minute, puis la température augmente jusqu'à 300°C à raison de 30°C/min. Cette température est ensuite maintenue pendant 5 minutes. Le temps total de la séparation chromatographique est donc de 9,33 minutes.

Les ions produits sont des dérivés triméthylsilylés. L'ion quantifiant et l'ion qualifiant choisis sont respectivement :

- pour le Δ⁹-THC : m/z 386 et 371 ainsi que 389 et 374 pour le Δ⁹-THCd₃,
- pour le 11-OH-THC : m/z 371 et 474 ainsi que 374 et 477 pour le 11-OH-THCd₃,
- pour le THC-COOH : m/z 371 et 473 ainsi que 374 et 476 pour le THCd₃.

Traitement cinétique : les paramètres cinétiques ont été obtenus en effectuant une analyse non compartimentale avec le logiciel WinNonlin V.4.0.1 de Pharsight. Les paramètres calculés sont la demi-vie terminale d'élimination (t_{1/2}) ; l'aire sous courbe (AUC_{0-∞}) ; le volume de distribution apparent (V_d) et la clairance totale (Cl_t).

Résultats

Cinétiques plasmatiques

Sept cinétiques plasmatiques ont été réalisées après injection de THC à trois dosages différents [50 µg/kg (n = 2), 100 µg/kg (n = 2) et 200 µg/kg (n = 3)]. Les cinétiques montrent un pic plasmatique retardé d'environ 2 à 5 minutes. Toutes les courbes ont le même profil avec une forte concentration en THC à 2-5 min puis une baisse rapide des concentrations durant 1 à 2 heures suivie d'une diminution plus lente entre 6 et 24 heures. La figure 1 montre la cinétique plasmatique moyenne issue des sept injections réalisées. Les données des sept cinétiques ont été groupées et la courbe représente les concentrations en THC normalisées pour une dose de 100µg/kg.

Le profil des différentes cinétiques plasmatiques est le même quelle que soit la dose. La figure 2, qui montre les cinétiques réalisées pour les trois doses différentes, permet de remarquer que les pics plasmatiques et les

aires sous la courbe sont corrélées à la dose injectée (Coefficient de corrélation $R_{Dose/Pic} = 0,97$ et $R_{Dose/SSC} = 0,93$). Le tableau I montre les différents paramètres cinétiques obtenus en fonction de la dose de THC injectée par kg. La demi-vie terminale d'élimination est de 10,6 h pour cette voie. Le volume de distribution de 32 L/kg en moyenne reflète la forte lipophilie du THC.

Pour tous les prélèvements, les concentrations plasmatiques en 11-OH-THC restent faibles (entre 0,3 et 0,8 ng/mL). Pour le THC-COOH, les concentrations plasmatiques sont aussi relativement faibles puisqu'elles ne dépassent pas 4 ng/mL. C'est le cas aussi dans les urines où les concentrations en THC-COOH normalisées par la concentration urinaire en créatinine restent à un niveau faible (de 0,7 à 19,6 ng/µmol de créatinine), environ 10 fois inférieur à ce qui est généralement observé chez l'homme (22).

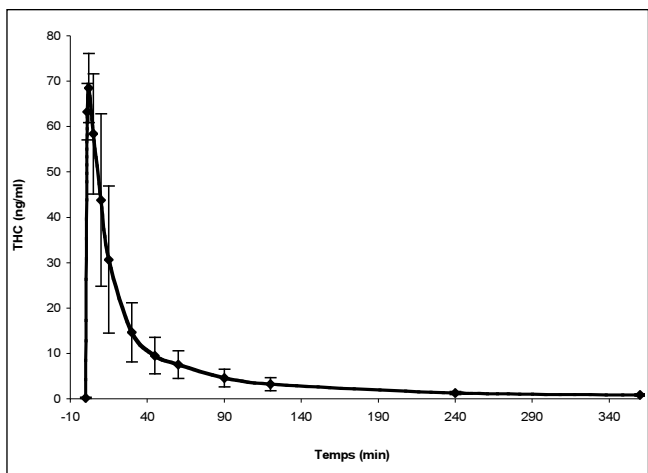


Figure 1 : Cinétique plasmatique moyenne après injection de THC (n = 7).

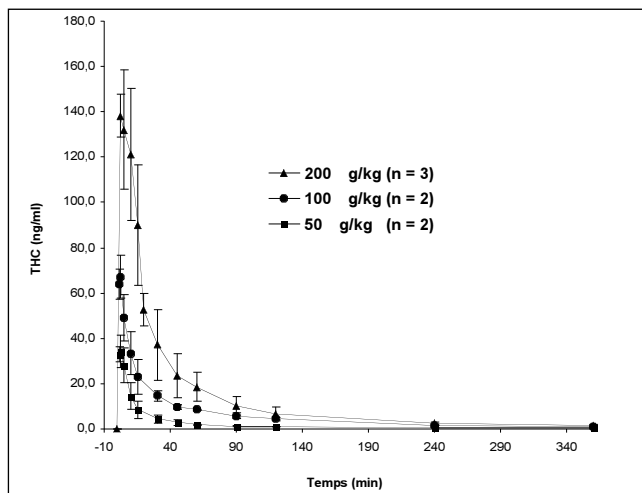


Figure 2 : Comparaison des cinétiques plasmatiques après différentes doses de THC.

Tableau I : Paramètres cinétiques du THC après injection chez le porc.

	Dose	C _{max} (ng/ml)	SSC _{0-∞} (ng.ml ⁻¹ .min)	t _{1/2} (h)	V _d (l.kg ⁻¹)	Cl (l.h ⁻¹ .kg ⁻¹)
Porc 1	200 µg/kg	161,0	8074	8,0	16,5	1,4
Porc 2		140,9	5469	7,4	16,8	2,2
Porc 3		127,6	5134	10,8	24,8	2,3
Porc 4	100 µg/kg	74,0	2958	13,6	34,3	1,7
Porc 5		60,4	2896	11,3	29,8	1,8
Porc 6	50 µg/kg	30,5	799	11,3	54,7	3,3
Porc 7		39,5	1001	12,0	46,9	2,7
Moyenne				10,6	32,0	2,2
Ecart-type				2,2	14,6	0,6

Note : C_{max} : Concentration au pic ; SSC_{0-∞} : Surface sous courbe ; t_{1/2} : Demi-vie terminale d'élimination ; V_d : Volume de distribution ; Cl : Clairance

Distribution tissulaire

Huit porcs ont été sacrifiés après avoir reçu 200 µg/kg de THC par voie intrajugulaire. Deux porcs ont été sacrifiés 30 minutes après l’injection puis deux autres à 2 heures, 6 heures et 24 heures. Les résultats quantitatifs pour les différents organes sont présentés dans le tableau II. Chaque valeur est la moyenne des deux porcs sacrifiés à chaque temps. Les résultats sont présentés en ng/g pour le temps 30 min puis en % de cette valeur pour les temps suivants. Pour le cerveau, la valeur est la moyenne obtenue sur les quatre zones du cerveau prélevées.

Le 11-OH-THC a été retrouvé en quantité importante uniquement dans le foie (LDQ : 2,1 ng/g) et seulement aux temps 30 min (39 ng/g) et 2 heures (24 ng/g). Dans cet organe le 11-OH-THC devient rapidement prépondérant par rapport au THC. Le THC-COOH n’a été retrouvé à un niveau quantifiable dans aucun des organes. Seule la bile présente des quantités de THC-COOH importantes : 3,4 ; 64 et 85 ng/ml respectivement après 2, 6 ou 24 heures (LDQ : 1,5 ng/ml).

Pour l’étude de la distribution tissulaire dans le cerveau, les concentrations en THC ont été mesurées dans quatre zones différentes. La figure 3 représente l’évolution des concentrations en THC en fonction du temps dans ces quatre zones. Des concentrations en THC moyennes ont été retrouvées dans les cortex frontaux et occipitaux. Après 30 minutes le cervelet possède la plus forte concentration en THC. Aux points 30 min et 120 min le bulbe rachidien apparaît comme la zone ayant les plus faibles concentrations, mais les différences entre les zones semblent s’estomper après 120 min.

Discussion

Les rongeurs sont les modèles animaux les plus utilisés en général pour étudier la pharmacocinétique ou la pharmacodynamie des xénobiotiques. Pourtant, bien

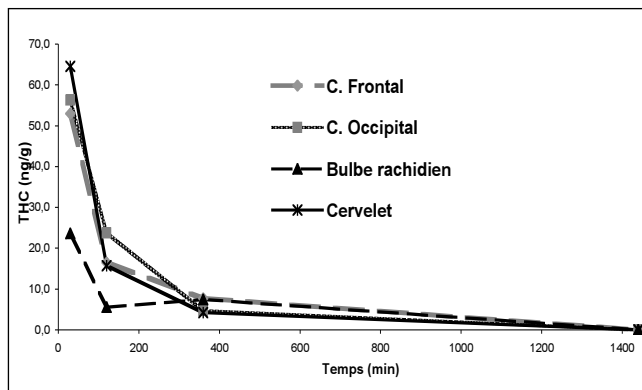


Figure 3 : Concentrations en THC (ng/g) dans les différentes zones du cerveau.

qu’ils soient faciles d’utilisation, ces animaux ne sont pas forcément les mieux adaptés pour pouvoir extrapoler ce que sera le devenir d’un produit dans le corps humain. En effet, il existe de grandes différences physiologiques avec l’homme, susceptibles d’influencer fortement des paramètres comme l’absorption, la distribution, le métabolisme ou l’élimination des xénobiotiques. C’est pourquoi cette étude de toxicocinétique et de distribution tissulaire a été entreprise chez le porc, en émettant l’hypothèse qu’il s’agit d’un modèle animal pertinent pour l’étude du THC. Le porc présente effectivement des similitudes physiologiques et anatomiques avec l’homme. Il a préalablement démontré son intérêt lors d’études de pharmacocinétique ou de toxicocinétique, car l’activité enzymatique des cytochromes P450 est similaire chez le porc ou le miniporc et chez l’homme (15). C’est de plus un modèle animal avantageux qui permet de réaliser de nombreux prélèvements sanguins sans provoquer de déplétion importante, ou d’entreprendre un étude de distribution tissulaire avec suffisamment de matériel biologique à disposition.

Des données sur le métabolisme du THC chez le porc n’étant pas disponibles dans la littérature, le premier

Tableau II : Distribution du THC dans les tissus (ng/g) et cinétiques d’élimination (en pourcentage de THC restant). Les valeurs pour chaque point sont une moyenne sur deux porcs.

	Sang	Rein	Cœur	Poumon	Muscle	Rate	Graisse	Foie	Cerveau	Bile	Humeur vitrée
Concentration à 30 min (ng/g)	24	272	178	1888	55	34	91	155	49	0,4	1,2
Pourcentage de THC restant (%)											
30 min	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2h	20,3	21,4	9,8	20,5	25,6	45,6	54,9	2,7	29,7	350	21,7
6h	6,8	*<LDQ	<LDQ	2,5	<LDQ	<LDQ	37,2	<LDD	9	675	<LDQ
24 h	0,8	<LDD	<LDD	2,5	<LDD	<LDD	34,7	<LDD	<LDD	275	<LDD

* Valeur inférieure à la limite de quantification (<LDQ) ou de détection (<LDD) pour la matrice biologique concernée.

intérêt de cette étude réside dans l'exploration du profil métabolique. Les deux métabolites principaux chez l'homme (11-OH-THC et THC-COOH) sont aussi retrouvés chez le porc. Cependant les proportions relatives de ces métabolites diffèrent entre les deux espèces. Chez le porc, les concentrations en THC-COOH restent inférieures à 5 ng/mL quelque soit le temps, alors que chez l'homme ce métabolite devient prépondérant dès 30 à 60 min quelle que soit la voie d'administration (23). La cinétique du THC chez le porc montre, après un pic légèrement retardé (entre 2 et 5 min) à cause d'une distribution très lente en raison de sa forte lipophilie, une décroissance rapide des concentrations, correspondant à la phase de distribution tissulaire, puis une longue demi-vie terminale d'élimination (10,6 (2,2 h). Cette longue demi-vie se retrouve aussi chez l'homme (20 à 36 h), où elle peut être encore plus prolongée notamment dans le cas de consommateurs réguliers (24). Le volume de distribution est très important, chez l'homme (de 4 à 14 L/kg) (25) comme chez le porc (32 L/kg). Toutefois il faut noter une tendance à l'augmentation de ce volume de distribution avec la dose injectée. Cette non linéarité des divers paramètres, surtout notable au niveau du volume de distribution peut s'expliquer en partie par le protocole utilisé ainsi que par la méthode de dosage. Le manque de points dans la partie terminale des différentes courbes dû aux contraintes horaires et à la sensibilité de la méthode peut créer une certaine incertitude dans le calcul des surfaces sous courbes. Cela a pu entraîner une légère sous estimation des valeurs de SSC pour la dose 50 µg/kg dont les valeurs à 24 h sont inférieures à la limite de quantification. Le calcul de la demi-vie d'élimination du THC chez l'homme a fait l'objet de nombreuses publications avec une certaine variabilité dans les résultats. Les méthodes de dosage les plus sensibles (avec administration de THC radiomarké par exemple) conduisant toujours à des demie-vies plus longues et sans doute plus proches de la réalité. Les injections à différentes doses chez le porc ont démontré une très forte corrélation entre la dose administrée et le pic plasmatique et entre la dose et l'aire sous la courbe. Ce phénomène a aussi été mis en évidence chez l'homme (23).

Les concentrations plasmatiques et urinaires en THC-COOH sont restées faibles au cours de cette étude alors que c'est le métabolite prédominant chez l'homme. Chez le porc, à la lumière des résultats obtenus, il n'est pas impossible qu'il existe un autre métabolite acide terminal qui soit plus important en quantité que le THC-COOH. Il existe de nombreux métabolites mineurs qui ont été identifiés chez l'homme ou l'animal et qui ont des fonctions acides ou hydroxyl sur des positions différentes (26). Des études *in vitro* sur des microsomes hépatiques vont être entreprises, associées

à des techniques d'identification par spectrométrie de masse ou par résonance magnétique nucléaire, pour déterminer s'il existe d'autres métabolites d'importance chez le porc. Quoiqu'il en soit, cela ne remet pas en cause la validité du modèle animal, car la cinétique du THC, principal constituant psychoactif du cannabis ne s'en trouve pas affectée. Celle-ci, est en effet similaire aux données rapportées chez l'homme.

La distribution tissulaire du THC a été très peu étudiée chez l'homme, une seule publication décrivant des dosages tissulaires réalisés à l'issue d'une autopsie (27). Pour mieux appréhender ces phénomènes de distribution tissulaire, il existe donc un intérêt à développer un modèle animal physiologiquement proche de l'homme. La distribution tissulaire d'un xénobiotique résulte en grande partie de ses caractéristiques physico-chimiques et des règles générales concernant la lipophilie et les flux sanguins dans les différents organes. Le THC est un composé alcalin (pKa 10,6), très lipophile (Log P_{octanol/eau} 7,6) qui gagne rapidement les tissus adipeux, le cerveau et les poumons (28). La forte concentration de THC observée dans les poumons chez le porc, est une constante dans de nombreuses études de distribution tissulaire pour différents composés (29). Ceci s'explique par le fait que les poumons sont les organes les mieux perfusés du corps, ce qui facilite l'accumulation de divers produits dans ces tissus. Le THC est de plus un composé basique qui peut être impliqué dans un transport actif au sein des tissus pulmonaires (30).

Le métabolisme des cannabinoïdes est majoritairement catalysé par l'intermédiaire des enzymes monooxygénases à cytochrome P450 chez l'homme comme chez l'animal. La voie métabolique majeure du THC par les microsomes hépatiques est l'hydroxylation sur une position allylique, en (de la double liaison (31). Pour la plupart des espèces, les isoenzymes appartenant aux sous-familles 2C et 3A des CYP, jouent un rôle prépondérant. Les variations du profil métabolique du THC entre ces espèces animales reflètent les différences qui existent au niveau de la teneur relative en isoenzymes des CYP de chaque espèce. Dans cette étude chez le porc, l'activité des CYP se manifeste au niveau des résultats des dosages tissulaires pour le foie. Le foie apparaît nettement comme l'organe majeur du métabolisme du THC, puisqu'il possède une cinétique d'élimination beaucoup plus rapide que les autres organes. De plus, le foie est le seul organe où des concentrations importantes de 11-OH-THC ont été mesurées, ce qui est encore le reflet du métabolisme oxydatif qui a lieu à ce niveau. Des études à venir au sein du laboratoire ont pour but d'identifier la nature des isoenzymes des CYP impliqués dans le métabolisme du THC chez le porc.

Le phénomène le plus remarquable de cette étude de

distribution tissulaire est la très lente élimination du THC au niveau de la graisse. En effet, avec un modèle d'administration unique, la graisse apparaît déjà comme un lieu de séquestration du THC. Ce phénomène, qui existe aussi chez l'homme, est d'importance puisqu'il pourrait être à l'origine de l'élimination prolongée du THC-COOH dans l'urine des fumeurs réguliers (32) ou encore, des phénomènes de flash-back liés au cannabis (33).

Au niveau du cerveau, la distribution tissulaire montre des différences de concentrations en THC en fonction des zones. Ces différences qui sont nettes à 30 et 120 min semblent se minimiser avec le temps. Une forte concentration en THC est mesurée à 30 min au niveau du cervelet (64,6 ng/g), du cortex occipital (56,1 ng/g) et du cortex frontal (53,0 ng/g). En revanche, le bulbe rachidien à 30 et 120 min montre des concentrations en THC bien inférieures aux autres zones (23,6 ng/g à 30 min et 5,6 ng/g après 120 min). La faible concentration observée pour le bulbe rachidien est cohérente avec l'absence de toxicité aiguë du THC puisque cette région contrôle les fonctions cardiovasculaires et respiratoires.

La seule étude de distribution tissulaire du THC disponible chez l'homme a été réalisée par Kudo en 1995, au décours d'une autopsie. Les dosages tissulaires de cette étude ont été effectués sur une personne qui s'est suicidée après avoir fumé du cannabis. Les résultats sont présentés dans le tableau III. Il apparaît ici aussi une forte concentration en THC dans la graisse, le poumon, des concentrations moyennes dans le muscle, le rein et la rate et enfin une faible concentration au niveau du foie.

Globalement les résultats de cette étude sont proches de la distribution tissulaire du THC chez le porc. Mais quelques précisions manquent pour pouvoir analyser cette étude. Les habitudes de consommation de la per-

sonne décédée ne sont pas précisées, il est toutefois concevable à la vue du résultat très élevé dans la graisse que c'était un consommateur régulier. De plus le temps écoulé entre la mort de la personne et la réalisation des prélèvements n'est pas indiqué. Des phénomènes de redistribution post-mortem sont susceptibles d'avoir modifié les concentrations effectives au moment de la mort. Le résultat le plus intéressant à retenir de cette étude est la forte concentration en THC au niveau du cerveau par rapport à celle du sang total. Chez le porc, l'étude de distribution tissulaire a aussi montré que les concentrations cérébrales sont supérieures aux concentrations sanguines jusqu'à 6 h post-dose. C'est un point très important puisque cela signifie qu'une personne avec une très faible concentration sanguine en THC peut avoir des concentrations cérébrales nettement plus élevées et éventuellement être encore sous influence du cannabis. De telles constatations ont récemment été faites chez l'homme (34).

Conclusion

Cette étude montre que le porc de race *Large White* peut être un modèle intéressant pour l'étude de la toxicocinétique des drogues et notamment du cannabis. Malgré des différences relatives au niveau du profil métabolique observé, la cinétique du THC chez le porc s'avère être proche de celle observée chez l'homme. L'étude de distribution tissulaire entreprise a d'ores et déjà montré des résultats encourageants puisque la seule étude humaine publiée à ce jour amène des conclusions similaires à celle réalisée chez le porc. De nouvelles expérimentations sont d'ailleurs envisageables pour étudier un phénomène encore méconnu chez l'homme qui est la redistribution *post-mortem* des cannabinoïdes.

Tableau III : Résultats des dosages tissulaires du THC chez l'homme (étude d'un cas, d'après Kudo et coll., 1995).

	Sang	Foie	Rein	Rate	Poumon	Muscle	Cerveau	Graisse
THC (ng/g)	1,85	1,85	7,42	6,37	110	16,2	9,78	657

Références

1. Anonyme. OMS : Programme on substance abuse. Cannabis - A health perspective and research agenda. Organisation Mondiale de la Santé, Genève, Suisse, 1997.
2. Beck F., Legleye S., Spilka S. Atlas régional des consommations de produits psychoactifs des jeunes Français. Exploitation régionale de l'enquête ESCAPAD 2002/2003. OFDT, Saint Denis, France, 2005 : 224 p.
3. Kelly E., Darke S., Ross J. A review of drug use and driving: epidemiology, impairment, risk factors and risk perceptions. *Drug Alcohol Rev.* 2004 ; 23 : 319-44.
4. Mura P., Kintz P., Ludes B., Gaulier J.M., Marquet P., Martin-Dupont S., Vincent F., Kaddour A., Goullé J.P., Nouveau J., Moulsmas M., Tilhet-Coartet S., Pourrat O. Comparison of the prevalence of alcohol, cannabis and other drugs between 900 injured drivers and 900 control subjects: results of a French collaborative study. *Forensic Sci. Int.* 2003 ; 133 : 79-85.

5. Cocchetto D.M., Owens S.M., Perez-Reyes M., DiGiuseppi S., Miller L.L. Relationship between plasma delta-9-tetrahydrocannabinol concentration and pharmacologic effects in man. *Psychopharmacology (Berl)*. 1981 ; 75 : 158-64.
6. Chiang C.W., Barnett, G. Marijuana effect and delta-9-tetrahydrocannabinol plasma level. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1984 ; 36 : 234-8.
7. Leighty E.G. Metabolism and distribution of cannabinoids in rats after different methods of administration. *Biochem. Pharmacol.* 1973 ; 22 : 1613-21.
8. Harvey D.J. In vivo metabolism of (+)-trans-delta-9-tetrahydrocannabinol in the mouse. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1988 ; 15 : 117-22.
9. Leuschner J.T., Harvey D.J., Bullingham R.E., Paton, W.D. Pharmacokinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in rabbits following single or multiple intravenous doses. *Drug Metab. Dispos.* 1986 ; 14 : 230-8.
10. Garrett E.R., Hunt C.A. Pharmacokinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in dogs. *J. Pharm. Sci.* 1977 ; 66 : 395-407.
11. Perlin E., Smith C.G., Nichols A.I., Almirez A., Flora K.P., Craddock J.C., Peck C.C. Disposition and bioavailability of various formulations of tetrahydrocannabinol in the rhesus monkey. *J. Pharm. Sci.* 1985 ; 74 : 171-4.
12. Charalambous A., Marciniak G., Shiue C.Y., Dewey S.L., Schlyer D.J., Wolf A.P., Makriyannis A. PET studies in the primate brain and biodistribution in mice using (-)-5'-18F-delta 8-THC. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1991 ; 40 : 503-7.
13. Kvetina J., Svoboda Z., Nobilis M., Pastera J., Anzenbacher P. Experimental Goettingen minipig and beagle dog as two species used in bioequivalence studies for clinical pharmacology (5-aminosalicylic acid and atenolol as model drugs). *Gen. Physiol. Biophys.* 1999 ; 18 : 80-5.
14. Anzenbacher P., Soucek P., Anzenbacherova E., Gut I., Hruby K., Svoboda Z., Kvetina J. Presence and activity of cytochrome P450 isoforms in minipig liver microsomes. Comparison with human liver samples. *Drug Metab. Dispos.* 1998 ; 26 : 56-9.
15. Skaanild M.T., Friis C. Characterization of the P450 system in Gottingen minipigs. *Pharmacol. Toxicol.* 1997 ; 80 : 28-33.
16. Flye M.W. (1992). Orthotopic liver transplantation in outbred and partially inbred swine. In : Swindle M.M., ed. *Swine as model in biomedical research*. Ames : Iowa State University Press, 1992 ; 44-56
17. Richer J.P., Silvain C., Rouffineau J., Pechier F., Caritez J.C., Kamina P., Carretier M. Anatomic and radiologic bases of combined transplantation of liver and small intestine in the pig. *Surg. Radiol. Anat.* 1994 ; 16 : 245-51.
18. Hauet T., Goujon J.M., Baumert H., Petit I., Carretier M., Eugene M., Vandevallé A. Polyethylene glycol reduces the inflammatory injury due to cold ischemia/reperfusion in autotransplanted pig kidneys. *Kidney Int.* 2002 ; 62 : 654-67.
19. Hilberg T., Ripel A., Smith A.J., Slordal L., Morland J., Bjorneboe A. *Postmortem* amitriptyline pharmacokinetics in pigs after oral and intravenous routes of administration. *J. Forensic Sci.* 1998 ; 43 : 380-7.
20. Prémaud A., Rousseau A., Gicquel M., Ragot S., Manceau J., Laurentie M., Marquet P. An animal model for the study of chronopharmacokinetics of drugs and application to methotrexate and vinorelbine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2002 ; 183 : 189-97.
21. Kemp P.M., Abukhalaf I.K., Manno J.E., Manno B.R., Alford D.D., Abusada G.A. Cannabinoids in humans. I. Analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and six metabolites in plasma and urine using GC-MS. *J. Anal. Toxicol.* 1995 ; 19 : 285-91.
22. Fraser A.D., Worth D. Urinary excretion profiles of 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol: a delta-9-THCCOOH to creatinine ratio study. *J. Anal. Toxicol.* 1999 ; 23 : 531-4.
23. Huestis M.A., Henningfield J.E., Cone E.J. Blood cannabinoids. I. Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THC-COOH during and after smoking marijuana. *J. Anal. Toxicol.* 1992 ; 16 : 276-82
24. Agurell S., Gillespie H., Halldin M., Hollister L.E., Johansson E., Lindgren A., Ohlsson A., Szirmai M., Widman, M. A review of recent studies on the pharmacokinetics and metabolism of Δ -1-THC, cannabidiol and cannabinol in man. In : Harvey D.J., ed. *Marihuana '84, Proceedings of the Oxford symposium on cannabis*. Oxford : IRL Press, 1985 ; 49-62.
25. Baselt R.C., Cravey R.H. Tetrahydrocannabinol. In : Baselt R.C., Cravey R.H., ed. *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*. Foster city : Chemical Toxicology Institute, 1995 : 713-7.
26. Agurell S., Halldin M., Lindgren J.E., Ohlsson A., Widman M., Gillespie H., Hollister L. Pharmacokinetics and metabolism of delta 1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids with emphasis on man. *Pharmacol. Rev.* 1986 ; 38 : 21-43.
27. Kudo K., Nagata T., Kimura K., Imamura T., Jitsufuchi N. Sensitive determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in human tissues by GC-MS. *J. Anal. Toxicol.* 1995 ; 19 : 87-90.
28. Harvey D.J. Absorption, distribution, and biotransformation of the cannabinoids. In : Nahas G.G., Sutin K.M., Harvey D.J., Agurell S., ed. *Marihuana and medicine*. Totowa : Humana Press, 2001 ; p. 91.
29. Hilberg T., Morland J., Bjorneboe A. *Postmortem* release of amitriptyline from the lungs, mechanism of *postmortem* drug redistribution. *Forensic Sci. Int.* 1994 ; 64 : 47-55.
30. Yoshida H., Okumura K., Kamiya A., Hori R. Accumulation mechanism of basic drugs in the isolated perfused rat lung. *Chem. Pharm. Bull.* 1989 ; 37 : 450-3.
31. Yamamoto I., Watanabe K., Narimatsu S., Yoshimura H. Recent advances in the metabolism of cannabinoids. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1995 ; 27 : 741-6.
32. Huestis M.A. Cannabis - Effects on human behavior and performance. *Forensic Sci. Rev.* 2002 ; 14 : 15-59.
33. Niveau G. Cannabis related flash-back, a medico-legal case. *Encéphale* 2002 ; 28 : 77-9.
34. Mura P., Kintz P., Dumestre V., Raul S., Hauet T. THC can be detected in brain while absent in blood. *J. Anal. Toxicol.* 2005 ; 29 : 842-3.