

CAHIER DE

Formation

N° 09

décembre 97

Biologie médicale

DOSAGE DES MÉDICAMENTS

TOME I



CAHIER DE

Formation

Biologie médicale



Ceci est la VERSION NUMERIQUE des CAHIERS BIOFORMA déjà parus et distribués à l'ensemble des LABORATOIRES D'ANALYSES de BIOLOGIE MEDICALE en FRANCE.

▮

TOUT LE CONTENU DE CE FICHER RESTE LA PROPRIETE DE BIOFORMA.
LES DROITS D'AUTEURS SONT PROTEGES A LA B.N.F.

▮

Toute reproduction, toute utilisation, partielle ou totale, des textes, schémas et photos de cet ouvrage, sans l'autorisation écrite de BIOFORMA, seront poursuivies devant les tribunaux compétents.

▮

Seule une impression pour une copie personnelle (étudiant, interne, biologiste de labm) est permise.





Cher Confrère,

Cette livraison des Cahiers de Formation de Biologie Médicale que Bioforma, en liaison avec la Direction des Contrôles et des Laboratoires de l'Agence du Médicament, édite pour faire suite logique aux contrôles de qualité nationaux auxquels vous avez participé, porte sur « le dosage des médicaments ».

Cette discipline est aujourd'hui essentielle d'autant que les contraintes financières, auxquelles les professions de santé en général et la notre en particulier sont soumises, plaident pour un dialogue biologiste/clinicien en vue de délimiter la thérapie la plus efficace au moindre coût.

Le champ de plus en plus large des toxicités médicamenteuses par surabondance de prises de molécules diverses est également préoccupant. Une information claire et précise vous est proposée dans ce volume. Elle sera complétée par un second cahier qui fera suite au contrôle de qualité national sur ce sujet qui doit avoir lieu prochainement.

Cette action conventionnelle poursuit la série de publications que nous vous proposons comme outil de formation permanente continue.

Bioforma est désormais présent sur Internet ; notre adresse est la suivante

www.bioforma.net

Vous pouvez, à cette adresse, vous renseigner sur toutes les activités de formation conventionnelle.

Nous espérons que ce nouveau cahier vous apportera des informations substantielles et une aide sérieuse dans votre pratique journalière.

Nous vous souhaitons bonne réception et vous prions d'agréer, Cher Confrère, nos confraternelles et cordiales salutations.

**Adrien BEDOSSA
Président**

**Professeur Christian JANOT
Directeur de la Division des
Laboratoires et des Contrôles.
Agence du Médicament**

D O S A G E

D E S M É D I C A M E N T S

T O M E I

LISTE DES AUTEURS

- Claudette BERNY Praticien Hospitalier
Laboratoire des Urgences Biochimiques et Toxicologiques
Centre Hospitalier Lyon Sud
69495 PIERRE BENITE CEDEX

- Alain FEUILLU
Praticien Hospitalier
Laboratoire des Urgences CHU de Pontchaillou
35033 RENNES CEDEX

- Jacques GREFFE
Praticien Hospitalier Service de Biologie Générale et de Neurobiologie
Hôpital du Vinatier
95, boulevard Pinel
69677 BRON CEDEX

- Monique MANCHON
Praticien Hospitalier Laboratoire des Urgences Biochimiques et Toxicologiques
Centre Hospitalier Lyon Sud
69495 PIERRE BENITE CEDEX

- Roland MELEY
Biologiste Laboratoire Clinique Mutualiste de la Croix de l'Orme
94, rue Gabriel Péri
42030 SAINT ETIENNE CEDEX

Depuis une vingtaine d'années, nous disposons dans les laboratoires de techniques fiables et faciles à utiliser qui permettent le dosage d'un grand nombre de molécules médicamenteuses. Ces dosages font partie de la pratique quotidienne ; ils doivent permettre de mieux analyser la situation thérapeutique et de moduler la posologie en fonction du malade pour obtenir une meilleure efficacité du produit prescrit.

Comme pour tous les dosages biologiques, la responsabilité de ceux qui les réalisent, pharmaciens, pharmacologues, biochimistes est d'assurer la qualité des résultats. Les laboratoires qui réalisent les dosages utilisent en général un contrôle de qualité interne qui est le plus souvent directement lié à la méthode de dosage elle-même, les sérums de contrôle de qualité étant directement fournis par le fabricant dans le coffret de réactif (contrôle « captif »).

En 1996, nous avons, avec notre collègue Alain Feuillu, aidé l'Agence du Médicament à organiser, avec le soutien de Bioforma, une opération d'évaluation externe de la qualité des dosages ; cette opération a concerné 6 médicaments: Amikacine, Digoxine, Lithium, Paracétamol, Phénobarbital et Théophylline.

Le nombre de participants a été important pour la Digoxine (plus de 1700) et le Lithium (près de 1500) ainsi que pour la Théophylline (environ 1100) et le Phénobarbital (environ 940) ; il a été beaucoup plus faible pour l'Amikacine et le Paracétamol (moins de 300 dans les deux cas). Pour l'ensemble, la qualité des résultats a été très satisfaisante ; les annales du contrôle de qualité le démontrent. Une seule exception, le dosage du Lithium qui apparaît poser bien des problèmes à beaucoup de laboratoires, en particulier pour les concentrations basses.

Pour ces raisons, nous avons souhaité avec nos collègues faire le point sur les techniques actuelles de dosage des médicaments, et détailler celles qui sont utilisées pour quatre d'entre eux : Amikacine, Digoxine, Lithium et Théophylline. Le texte introductif « Pourquoi et quand doser les médicaments ? » rappelle à juste titre qu'il ne s'agit pas seulement d'un acte technique, mais d'une collaboration indispensable entre biologiste et clinicien, et que ce suivi thérapeutique doit permettre de prendre en charge les différentes susceptibilités individuelles quelles qu'en soit l'origine. La monographie consacrée au Lithium est particulièrement développée car elle nous semble répondre à un besoin réel: les traitements par les sels de lithium sont toujours d'actualité; les méthodologies utilisables pour ce dosage se sont diversifiées et deviennent abordables à moindre coût pour de nombreux laboratoires grâce à l'apparition des électrodes sélectives et des méthodes colorimétriques ; mais la qualité des résultats a tendance à se dégrader...

Le prochain contrôle organisé par l'Agence du Médicament avec le soutien de Bioforma devrait porter sur les médicaments suivants: Acide Valproïque, Carbamazépine, Digoxine, Lithium, Phénytoïne, Salicylates et Vancomycine. Bien entendu, il sera suivi du deuxième tome du cahier de formation consacré aux dosages des médicaments.

D. Grafmeyer

I - POURQUOI ET QUAND DOSER LES MÉDICAMENTS ?	11
II - MÉTHODES ACTUELLES DE DOSAGE DES MÉDICAMENTS	23
III - AMIKACINE	35
IV - DIGOXINE	43
V - LITHIUM	53
VI - THÉOPHYLLINE	79

I - POURQUOI ET QUAND DOSER LES MÉDICAMENTS ?

A. FEUILLU

Le clinicien qui prescrit un traitement s'efforce d'en ajuster la posologie de manière à obtenir l'effet thérapeutique désiré avec le minimum de réactions secondaires. Il est bon avant toute chose de faire un rappel pharmacocinétique, pour ensuite répondre à la question : pourquoi et quand doser les médicaments ?

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

I. PHARMACOCINÉTIQUE D'UN MÉDICAMENT

Entre la prise d'un médicament et son effet thérapeutique se produit tout un ensemble de phénomènes dont une grande partie est tellement dépendante de conditions physiopathologiques à effet imprévisible que seuls des dosages plasmatiques peuvent permettre une adaptation posologique.

Il semble intéressant de tracer un schéma simplifié de tous les phénomènes qui président, après prise d'un médicament à l'obtention d'une concentration optimale au niveau de ses récepteurs.

I.1 Le médicament doit tout d'abord pénétrer dans l'organisme pour y atteindre la circulation générale

Avant toute chose, il doit en premier lieu être résorbé sauf lorsqu'il s'agit de voie parentérale. Pour beaucoup de médicaments la quantité résorbée est inférieure à la quantité administrée.

I.1.1 - Dans le cas d'une prise per os (voie buccale)

a) L'absorption proprement dite (pénétration dans la muqueuse intestinale) appelle les remarques suivantes :

- Le premier obstacle rencontré va être la barrière gastro-intestinale que le médicament devra franchir. Cette dernière, de nature lipidique très marquée, va complexer le médicament.
- Les conditions de franchissement particulier mettent en jeu à la fois les caractéristiques physico-chimiques propres du médicament comme sa masse molaire, sa plus ou moins grande hydrosolubilité, son état d'ionisation (seule la face liposoluble du médicament pouvant être absorbée) et certaines caractéristiques du milieu comme sa vascularisation et son pH.
- Les mécanismes de franchissement sont extrêmement variés ; on trouve :
 - une simple diffusion passive, dans le sens d'un gradient de concentration ;
 - une diffusion facilitée, toujours dans le sens gradient de concentration, mais à vitesse plus élevée que dans la diffusion passive ;
 - enfin un véritable transport actif pouvant s'effectuer contre un gradient de concentration et mettant en jeu un transporteur spécifique dont l'activité nécessite un apport d'énergie et subissant les contraintes de saturation et d'inhibition compétitive inhérente à ce genre de transporteur.

L'analyse de l'ensemble de ces processus conduit à déterminer à la fois par des phénomènes de dissolution (une substance ne pouvant être absorbée que sous forme dissoute), de vitesse de vidange gastrique qui, en contrôlant la vitesse d'arrivée du médicament dans le duodénum, va influencer sur la vitesse d'absorption globale, et de débit sanguin intestinal (par modification du gradient de concentration).

L'analyse de l'ensemble de ces phénomènes conduit à déterminer à la fois une vitesse et un coefficient d'absorption.

b) Traversée de la muqueuse intestinale

Dès que le médicament est absorbé, il pénètre dans la cellule muqueuse intestinale où il va y subir l'action d'un certain nombre d'enzymes pouvant le transformer à la fois :

- soit en métabolites plus ou moins inactifs conduisant donc à une certaine perte de l'activité du médicament absorbé ;
- soit en composés plus hydrosolubles et donc plus facilement éliminés dans les urines ou la bile.

Ces modifications conduisant à définir un coefficient d'extraction intestinal.

c) Passage dans le système circulatoire porte et première traversée hépatique

Dès qu'il a traversé la muqueuse intestinale, le médicament passe directement dans la circulation porte où il va être dirigé vers le foie et y être exposé à l'action des nombreux enzymes hépatiques avec pour conséquence comme au niveau intestinal, d'une perte partielle du produit initial (métabolite inactif), et donc de l'effet thérapeutique.

Un coefficient d'extraction hépatique peut être ainsi défini

d) Passage dans les veines sushépatiques en direction du cœur et des poumons

Le médicament va alors être exposé aux enzymes pulmonaires qui vont constituer le dernier site de perte potentielle du médicament avant l'arrivée dans la circulation générale, un coefficient d'extraction pulmonaire peut alors être défini.

En résumé, dès leur absorption, les médicaments ont traversé successivement la cellule intestinale, le foie, les poumons avant de pénétrer dans la circulation générale. À ces différents niveaux, ils vont y subir l'action de nombreux systèmes enzymatiques et y être progressivement transformés en métabolites plus ou moins inactifs avec pour conséquence lors de l'arrivée dans la circulation générale la perte d'un pourcentage variable du médicament actif selon la substance médicamenteuse absorbée par suite de l'effet thérapeutique recherché par rapport à la dose initiale.

e) Pénétration dans la circulation générale pour y rejoindre ses sites d'actions

Seule donc une fraction ou un pourcentage de la substance acheminée atteint la circulation générale, ce qui permet de déterminer la **biodisponibilité** d'un médicament qui est un des ses principaux paramètres pharmacocinétiques. Cette biodisponibilité va donc être conditionnée à la fois par la quantité de substance médicamenteuse absorbée et par la quantité inactivée par les différents organes traversés. Cette biodisponibilité sera donc directement responsable des taux plasmatiques, juste après l'absorption (taux maximum ou pic).

1.1.2- Cas des autres voies d'administration

- En intra-artériel, le médicament est immédiatement déversé dans la circulation générale, et présente donc une biodisponibilité totale.
- En intraveineux, intramusculaire et sous-cutanée le médicament traverse les poumons avant de rejoindre la circulation générale, sa biodisponibilité peut donc ne pas être totale.
- En administration rectale, le foie peut-être évité, mais pas les poumons ; sans être totale, la biodisponibilité est quand même généralement supérieure à celle d'une prise orale.

I.2- Devenir d'un médicament après avoir pénétré dans la circulation générale

Dès qu'il a pénétré dans la circulation générale, le médicament revêt un comportement identique quelque soit sa voie d'administration.

Il va alors subir deux genres de phénomènes :

1.2.1- Distribution entre différents compartiments qu'on peut systématiquement séparer en :

a) Compartiment sanguin où il va se fixer à la fois :

- sur les hématies ;
- sur les protéines plasmatiques (essentiellement l'albumine pour les médicaments légèrement acides et l' α_1 glycoprotéine acide (orosomucoïde) pour les médicaments légèrement basiques) ;
- ils y sont plus ou moins fortement fixés, de façon réversible, mais avec des phénomènes de saturation. Il existe des possibilités de compétition au niveau des sites de fixation avec d'autres médicaments ou autres substances non médicamenteuses. Cette fixation est de toutes les façons incomplète ce qui se traduit par l'existence d'une forme libre considérée comme la seule active car seule diffusant dans les tissus, contrairement à la forme fixe qui serait une forme non diffusible et donc pharmacologiquement inactive, jouant alors le rôle de forme de transport ou de stockage. Les deux formes libres et liées sont en équilibre réversible, ce qui confère à la forme liée un caractère inactif non définitif.

b) Compartiment tissulaire

- En plus du milieu sanguin, le médicament va se répartir dans l'ensemble des tissus et organes, la quantité susceptible d'être distribuée dépendant en fait de la biodisponibilité. De nombreux facteurs vont influencer cette distribution.
- Les affinités respectives de liaison aux protéines plasmatiques et tissulaires, certains médicaments présentent même un tropisme plus marqué pour les régions où ils sont sensés exercer leur activité.
- Certains caractères physico-chimiques comme par exemple la plus ou moins grande hydrosolubilité ou liposolubilité du médicament.
- Le degré d'irrigation vasculaire de différents organes, ceux bien perfusés captant plus fortement les médicaments que ceux peu perfusés. En outre, la distribution des médicaments au niveau d'organes très particuliers fera intervenir le passage de certaines barrières (hématoencéphaliques et foetoplacentaires par exemple) avec la mise en jeu de tous les mécanismes particuliers présidant à ces traversées très spécifiques.
- La répartition finale du médicament dans un plus grand nombre de compartiments a amené à considérer un paramètre pharmacocinétique très particulier à savoir le **volume de distribution**

qui se définit comme le rapport de la quantité de médicament dans l'organisme à sa concentration plasmatique. Comme les taux tissulaires d'une substance médicamenteuse sont la plupart du temps très supérieurs aux taux sanguins, le volume de distribution peut prendre des valeurs très largement supérieures à celles qui correspondent au volume total de l'organisme. Ce paramètre n'a donc aucune correspondance physiologique et la seule correspondance envisageable est celle de son volume avec l'importance de sa distribution dans l'organisme.

1.2.2- Elimination

Après avoir atteint la circulation générale et avoir été distribué dans ses différents compartiments, le médicament va être appelé à être éliminé par différents processus :

- directs, mettant en jeu les fonctions d'excrétions rénales et biliaires ;
- métaboliques, par l'intermédiaire de biotransformations hépatiques, intestinales, pulmonaires ou autres.

Ce phénomène d'autoépuration de l'organisme se quantifie comme pour les autres substances endogènes sous le nom de clairance.

a) Clairance rénale

Elle fait intervenir en plus des phénomènes de filtration glomérulaire, sécrétion tubulaire et réabsorption tubulaire, des caractéristiques propres aux médicaments comme sa plus ou moins grande fixation aux protéines plasmatiques et ses propriétés physico-chimiques.

b) Clairance hépatique

Elle correspond à la somme des deux clairances métaboliques hépatiques et excrétions biliaires et dépend de nombreux facteurs comme la fixation protéique, le débit sanguin hépatique, l'activité enzymatique des hépatocytes et les caractéristiques physico-chimiques du médicament.

A partir de tous ces processus d'absorption de distribution et d'élimination on déterminera la **demi-vie** du médicament, paramètre important pour déterminer à la fois la posologie et la fréquence des prises.

En fait, dans la réalité, tous les processus pharmacocinétiques ne s'enchaînent pas les uns à la suite des autres comme nous les avons décrits, mais se juxtaposent car dès qu'une fraction du médicament est absorbée, elle se répartit dans l'organisme et est éliminée avant même que la totalité de la dose administrée ait traversé la muqueuse intestinale.

Dans la chaîne des événements qui sépare l'administration d'un médicament et son effet thérapeutique, la concentration plasmatique de ce médicament est beaucoup plus proche de l'effet thérapeutique que ne l'est l'absorption et est donc mieux corrélée à cet effet que la dose administrée. Ceci est à la base de l'utilisation de cette concentration pour tout ajustement posologique, quand on ne peut pas faire autrement.

■ II. POURQUOI DOSER UN MÉDICAMENT?

Si pour certains médicaments, il existe des moyens simples d'apprécier l'effet pharmacologique et d'ajuster éventuellement leur posologie :

- Les antihypertenseurs s'ajustent avec la pression artérielle.
- Les bêtabloquants s'ajustent par la prise du pouls.
- Les anticoagulants s'ajustent sur les tests de coagulation.
- Les hypoglycémiantes s'ajustent sur la glycémie.

En revanche pour la majorité d'entre eux, cet effet pharmacologique est très difficilement quantifiable et pour ceux-ci la justification d'un dosage sanguin reposera sur deux constatations :

1° Les posologies standards déterminées statistiquement nécessitent très souvent de nombreux ajustements de par l'importance des variations inter- et intra-individuelles de réponse au médicament.

2° La relation entre la dose d'un médicament et son effet pharmacologique est moins bien définie que celle entre la concentration plasmatique et la réponse.

Il existe de nombreux modèles mathématiques permettant de prévoir et d'évaluer les différents paramètres pharmacocinétiques et donc de prévoir la concentration d'un médicament au niveau de son récepteur, et par la même son effet pharmacologique, et cela donne des limites relativement étroites en fonction de sa posologie ; ces modèles n'existant que pour des individus normaux, et dès que certaines circonstances vont venir modifier cette « normalité » aucun modèle ne permet ce genre de prévision, il est donc logique de tenter de les mesurer de manière à mieux les appréhender afin d'en déduire des posologies plus adaptées. Pour cela on s'adressera à la concentration sanguine des médicaments, la plus proche de celle au niveau des récepteurs et donc de leur activité.

■ III. QUAND DOSER LES MÉDICAMENTS ?

Le problème est de savoir s'il faut déterminer les concentrations de tous les médicaments utilisés. La réponse est évidemment négative. On ne doit en effet pas considérer le dosage des médicaments comme une « réponse » à tous les problèmes d'un suivi thérapeutique et il serait fâcheux que l'authentique autorité médicale du prescripteur soit supplantée par la fallacieuse sécurité d'opportunités technologiques.

Si les dosages de médicaments sont inutilisés dans la plupart des cas, il est toutefois important de déterminer les circonstances où ces déterminations deviennent indispensables et force va être alors de devoir faire un choix qui devra être le moins arbitraire possible.

Si le clinicien est rarement préparé à faire appel au laboratoire pour un « suivi thérapeutique », la nomenclature peut être une aide à la prescription de tels dosages dans le cadre d'indications bien définies. En effet, ce qui est reconnu comme utile est sensé figurer à la nomenclature. Pour que chaque dosage puisse conduire à une utilisation optimale, il faut respecter scrupuleusement certaines conditions. C'est le cas de l'horaire du prélèvement par rapport à la prise de médicament. Ces dosages sont coûteux et ne doivent être réalisés que lorsqu'ils présentent un réel intérêt pour le suivi thérapeutique. Pour cela le médecin en limitant sa prescription aux seuls cas nécessaires et le biologiste en exécutant les dosages dont les résultats seront exploitables agissent de concert dans le sens d'une optimisation de l'utilisation de cet outil.

III.1- Conditions où les dosages de médicaments sont a priori inutiles

- quand il existe une corrélation entre la dose administrée et l'effet pharmacologique ;
- quand la durée du traitement est trop courte ;
- quand il n'y a pas de corrélation entre effet pharmacologique et concentration plasmatique ;
- quand il n'y a pas d'effet toxique (index thérapeutique élevé) ;
- quand la zone thérapeutique n'est pas reconnue ou est très large ;
- quand l'effet thérapeutique est fortement évaluable (cliniquement et biologiquement).

III.2- Conditions où les dosages des médicaments peuvent être utiles

III.2.1- Quand il existe une corrélation significative entre la concentration sanguine du médicament et ses effets pharmacologiques

Il existe des relations directes et étroites entre la concentration du médicament au niveau du site effecteur et son effet pharmacologique. Cette corrélation existe en général presque toujours sauf s'il y a des différences interindividuelles de sensibilité des récepteurs. Malheureusement, la détermination de cette concentration est très difficile, voire même techniquement impossible à effectuer.

Par contre la concentration plasmatique d'un médicament est facile à obtenir : elle se doit alors, pour être exploitable cliniquement, de refléter de façon suffisamment fidèle la concentration au niveau des sites effecteurs, ce qui se produit généralement de par la distribution du médicament. Cette corrélation est beaucoup plus importante avec la fraction libre du médicament qui est, elle, toujours en équilibre avec celle du site effecteur. Le seul problème réside dans la difficulté analytique que pose l'évaluation de cette fraction non liée du médicament dans le plasma.

La concentration plasmatique du médicament apparaît alors comme un meilleur indice d'efficacité et de toxicité par rapport à la dose administrée.

III.2.2- Lorsqu'il y a une possibilité de développement d'effets toxiques lors de surdosages

Cela concerne des médicaments pour lesquels la marge entre les doses actives et toxiques est très faible. Cette marge s'exprime par un coefficient (index thérapeutique) qui repose sur le rapport entre dose toxique et dose active ; plus ce rapport est faible, et plus les 2 doses sont rapprochées et donc le médicament difficile à manier.

En outre, à cela va venir se surajouter l'existence de variations individuelles d'activité, amenant des doses actives chez certains, à être toxiques chez d'autres, des posologies identiques pouvant entraîner des concentrations plasmatiques différentes et des concentrations plasmatiques identiques des effets différents.

III.2.3- Absence de moyen simple de déterminer l'effet pharmacologique

III.2.4- En cas de doute sur l'observance de la prescription, et pour prendre en compte des facteurs individuels

III.2.5- Existence de facteurs individuels importants de variabilité, aucun d'entre eux n'étant prévisible et entraînant une absence de corrélation entre la dose administrée et l'effet pharmacologique

Facteurs pharmacodynamiques qui concernent la sensibilité propre du malade aux médicaments difficile à prévoir et à quantifier, et dépendant en général du nombre et de la qualité de ses récepteurs pour le médicament administré.

Les facteurs pharmacocinétiques concernent toutes les différences de métabolisme du médicament qui vont conditionner l'existence de concentrations différentes de celui-ci au niveau des récepteurs, en dépit des posologies standards. Tous les paramètres pharmacocinétiques du médicament sont en effet susceptibles de varier non seulement d'un sujet à un autre (variabilité interindividuelle) où une variabilité particulière empêchera désormais de par son importance l'utilisation de modules mathématiques issus de l'étude de sujets normaux ces circonstances peuvent être de 3 ordres.

a) Physiologiques

- En pédiatrie, les transformations physiologiques que subit l'enfant au cours de sa maturation sont complexes et modifient considérablement son métabolisme du médicament.
- Pharmacologiquement, l'enfant n'est pas exactement un adulte en miniature et la simple adaptation des posologies en fonction du poids ne suffit pas car il n'y a pas de simples rapports de proportionnalité entre enfant et adulte. L'utilisation de dosages plasmatiques devient alors indispensable.
- En gériatrie, l'adaptation posologique par le dosage des médicaments est une composante majeure du « bien prescrire ». L'âge en soi ne signifie rien, et il faut savoir que chez un même individu, la vitesse de vieillissement de chaque organe peut-être différente entraînant des perturbations métaboliques différentielles.
- En outre, l'existence fréquente de phénomènes de dénutrition et leur polyopathologies plus ou moins évolutives conduisant à des polyindications perturbatrices rendent souvent indispensables les dosages de médicaments pour tout suivi thérapeutique. De même en obstétrique, la femme enceinte de par des modifications à la fois de ses volumes de distribution, de son métabolisme hépatique et de sa filtration glomérulaire exigera des déterminations plasmatiques pour ajuster toute posologie médicamenteuse.

b) Pathologiques

- Insuffisances hépatiques ou rénales : ces deux principaux organes assurent le métabolisme et l'élimination du médicament leurs perturbations entraînent des modifications pharmacologiques extrêmement complexes des médicaments et en règle générale veut que tout médicament métabolisé par le foie et excrété intact par le rein et dont l'index thérapeutique est faible exige en présence d'une insuffisance rénale ou hépatique une adaptation posologique reposant sur les concentrations plasmatiques.
- Des maladies génétiques peuvent être responsables d'hypersensibilité ou de résistance.
- Des anomalies des protéines plasmatiques modifient des liaisons du médicament.

c) Pharmacologiques

- En cas de polythérapie, certains médicaments vont venir modifier les paramètres pharmacologiques. Les interactions sont difficiles à prévoir du fait de nombreuses combinaisons possibles, et seul le dosage plasmatique du médicament peut dans la plupart des cas prévenir les accidents de surdosage.
- L'activité pharmacologique doit pouvoir être reliée aux composés dosés qui peuvent être
 - soit la substance médicamenteuse initiale,
 - soit son métabolisme actif,

- soit les deux.

Et c'est là qu'intervient la plus ou moins grande spécificité des méthodes de dosage. Une méthode de dosage doit en effet être à la fois

- suffisamment spécifique pour que l'activité plasmatique puisse être reliée au médicament responsable,
- suffisamment non spécifique aussi pour que si le médicament est transformé en métabolites actifs, ces derniers puissent être dosés en même temps.

III.3- Autres intérêts du dosage des médicaments

Même quand une posologie standard conduit à un bon effet thérapeutique, le dosage sanguin des médicaments peut encore revêtir une certaine utilité

- pour constituer une concentration de référence valable pour le malade (personnalisation). Ceci permettra, lors de thérapeutiques chroniques, en cas de modification de son état, d'utiliser cette valeur pour la rééquilibrer ;
- pour optimiser une posologie : certains effets secondaires peuvent en effet évoluer à bas bruit et ne survenir qu'après un temps relativement long de traitement ; leur apparition peut être retardée voire évitée en recherchant la dose minimale efficace par l'analyse des concentrations plasmatiques.

Ils contribuent à la prise de conscience par le patient, de l'importance de son traitement et l'aide psychologiquement à mieux le supporter.

Il permet d'éviter certains gaspillages de médicaments consécutifs à une posologie inadéquate ou certaines associations inutiles.

Un autre intérêt du contrôle des taux sanguins est la vérification de la soumission du patient à la prescription. Ce problème est particulièrement important en neuropsychiatrie, et la discrimination entre l'absence réelle d'effet thérapeutique et le refus de prendre ou de prendre régulièrement le médicament est un élément d'information essentiel pour une conduite rationnelle du traitement. La vérification de la soumission des malades est aussi très importante dans les thérapeutiques prolongées.



■ IV. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Le but d'un « suivi thérapeutique » est d'administrer un médicament de façon rationnelle en ajustant sa posologie à l'aide de sa concentration plasmatique quand il n'existe pas d'autres moyens d'appréciation de son effet thérapeutique et quelquefois que ce médicament présentera un faible index thérapeutique et une grande variabilité métabolique. Pour ceci on tiendra compte à la fois de ses propriétés pharmacocinétiques et des caractéristiques physiopathologiques du malade traité afin de ne plus laisser place à l'empirisme.

Dans ce domaine, le rôle du biologiste ne doit pas se limiter à l'exécution d'un acte analytique et à la fourniture du résultat au clinicien ; avec ce dernier, il devra aller plus loin, sans se limiter non plus à comparer les résultats obtenus à une zone de normalité (ou fourchette thérapeutique) mais à la situer aussi dans son environnement clinique et biologique.

Pour cela, toute interprétation d'une concentration de médicament doit obéir à une demande interprétative stricte et codifiée ; c'est un travail interdisciplinaire qui nécessite une communication claire entre les acteurs impliqués.

IV.1- L'aide initiale que le biologiste apporte au clinicien consiste à vérifier la bonne exécution du dosage

IV.1.1 - Par le respect de contraintes analytiques

- Fiabilité de ses méthodes analytiques.
- Prélèvement correct, à jeun, sur héparine en général (sauf pour les aminosides).
- Conservation limitée, et en général à + 4 °C.

IV.1.2- Par le respect des contraintes horaires du prélèvement

- Jamais avant d'avoir atteint l'état d'équilibre.
- La concentration maximale (ou pic) n'ayant en général d'intérêt que pour mettre en évidence une toxicité.
- La concentration résiduelle (ou vallée) étant un meilleur reflet de l'efficacité thérapeutique.

IV.1.3- Par le respect du recueil d'un minimum de renseignements cliniques

- Raisons pour laquelle le dosage est demandé (manque d'efficacité ou risque de toxicité).
- Âge, sexe, poids du malade.
- Schéma posologique (date et début du traitement ou de la dernière modification posologique dose quotidienne, répartition des prises, heure de la dernière prise heure du prélèvement).
- Traitements associés.
- État clinique particulier.
- Possibilité de non-observation du traitement.

Le biologiste devra alors prévoir une forme de « rendu du résultat » qui intègre toutes les données.

IV.2- Avec le clinicien, le biologiste pourra participer à l'interprétation proprement dite du résultat

En la comparant en général à des valeurs limites (ou fourchette thérapeutique), cette notion de fourchette thérapeutique, c'est-à-dire zone de concentration pour laquelle la majorité des malades est correctement traitée, est une notion statistique qui peut servir d'indice de prédiction d'activité, mais en aucun cas de critère d'efficacité, d'où l'intérêt parfois de pouvoir comparer le taux mesuré à une valeur de référence personnalisée déterminée en période d'efficacité.

IV.3- Seul le clinicien sera habilité à un éventuel ajustement posologique

S'il existe pour certains médicaments des schémas d'ajustement très théoriques, la plupart du temps le clinicien procédera par tâtonnement

- en augmentant ou en diminuant la dose administrée ;

- en augmentant ou en diminuant l'intervalle entre les prises.

De toutes les façons, le suivi thérapeutique ne doit pas être considéré comme une panacée ; ce n'est qu'un outil qui, associé à d'autres données tant analytiques que physiopathologiques et pharmacologiques, ainsi qu'à un bon jugement clinique, permet au clinicien de personnaliser une posologie.

En fait c'est une bonne compréhension de tous les phénomènes pharmacocinétiques qui représente la plus grande contribution des dosages à la médecine.

■ V. CONDITIONS PRATIQUES DU SUIVI THÉRAPEUTIQUE

La mesure des concentrations plasmatiques des médicaments n'est une aide indispensable au clinicien qu'à condition de bien connaître les limites de la pratique réalisée dans des conditions rigoureuses: L'intérêt du suivi thérapeutique ne vaut que ce que vaut le résultat. Ainsi quelle que soit la technique utilisée, même si c'est la plus performante, leur intérêt est subordonné au respect de certaines conditions de prélèvements ; pour que les résultats fournis par le biologiste au clinicien soient exploitables, le dosage des médicaments doit être effectué suivant un protocole rigoureux. La notion de suivi thérapeutique est sans signification si les prélèvements pour les dosages de médicaments sont effectués n'importe quand.

Le but n'est pas de fournir toutes les données éparses de la littérature, relatives aux horaires de chaque médicament, mais de rappeler certains principes généraux qui constituent le fondement de tout suivi thérapeutique.

V.1- Date de prélèvement

Il faut attendre que le sujet ait été traité depuis suffisamment longtemps pour que le médicament ait atteint un état d'équilibre (steady state) qui correspond au moment où le taux plasmatique du médicament atteint un plateau, c'est-à-dire où la quantité éliminée est alors égale à la quantité absorbée pendant un intervalle de temps donné. Le délai est en règle générale égal à 5 à 7 demi-vies du médicament, ce qui peut-être très long pour certains (3 semaines par exemple pour le phénobarbital) et très court pour d'autres (24 heures pour les aminosides).

Lors d'un dosage pour vérifier le changement d'une posologie, ce même délai devra de nouveau être observé.

Toute concentration déterminée avant ce délai n'a pas de signification et est en général ininterprétable, elle devient non seulement inutile mais aussi dangereuse car risquant de conduire à une décision thérapeutique erronée et nuisible.

V.2- Horaires par rapport à la prise du médicament

Il est fonction du médicament que l'on dose et de ce que l'on recherche (toxicité ou efficacité en cas de dosages répétés, il doit toujours être le mieux pour une interprétation comparative.

V.2.1- Concentration maximale (Pic)

Elle est mesurée dès que la phase de distribution est complète. Malheureusement, pour chaque voie d'administration, sauf celle intraveineuse, le moment du pic est la plupart du temps difficile.

à prévoir car il représente des relations complètes entre absorption, distribution et élimination. Dans l'environnement clinique, de nombreuses vertus variables peuvent influencer le pic telle que la voie d'administration, la forme galénique, l'administration avec des aliments et les médications associées. Ces concentrations sont surtout intéressantes pour apprécier une toxicité, parfois une efficacité (aminoside).

V.2.2- Concentration résiduelle (Vallée)

C'est la plus utilisée, car elle est reproductible, c'est la concentration minimum du médicament entre 2 administrations. On la détermine immédiatement avant la prise suivante. Cette concentration est en règle générale utilisée pour déterminer l'efficacité d'un médicament, et pour certains médicaments (aminoside) elle contribue aussi à mettre en évidence une toxicité. On la détermine en règle générale le matin à jeun ; avant la prise suivante du médicament, sauf si l'administration a lieu au cours d'un repas du midi ou du soir.

Le seul problème de l'utilisation de concentrations résiduelles (vallée) est qu'on dispose de concentrations parfois faibles ; dans ces cas, la variation analytique peut être élevée. Fort de la connaissance de ces variations analytiques, les interprétations comparatives du biologiste n'en sont que plus pertinentes.

■ VI. CONCLUSION

Dans certains cas, les dosages de médicaments peuvent être plus dangereux qu'utiles, et leur utilisation très éloignée des finalités thérapeutiques.

- Effectués systématiquement en routine, ils comportent souvent plus d'inconvénients que d'avantages ; beaucoup de médicaments peuvent en effet être efficaces à des taux plasmatiques inférieurs à ceux prévus par la statistique tout comme bien supportés à des taux statistiquement toxiques ; or, le but à atteindre n'est pas le taux efficace, mais le traitement efficace, et il ne faudrait pas que le clinicien finisse par traiter plus le résultat du laboratoire que son patient.
- Un suivi thérapeutique par dosage risque de remplacer la vigilance clinique.
- La prescription repose parfois sur des considérations très éloignées de leur finalité principale dans le mesure ou :
 - une haute technologie a tendance à plus sécuriser le malade qu'un simple suivi clinique ;
 - une interprétation simpliste cartésienne permet souvent au clinicien, sinon de comprendre, du moins d'expliquer à un patient que le médicament marche mal parce que malgré une bonne prescription standardisée, le taux circulant n'était pas suffisant. Dans d'autres cas, si les concentrations du médicament sont dans la fourchette thérapeutique et qu'il n'y a pas d'effet clinique, c'est que le médicament est inadapté.

II - MÉTHODES ACTUELLES DE DOSAGE DES MÉDICAMENTS

M. MANCHON, C. BERNY

CAHIER
DE
Formation
version numérique

La liste des dosages de médicaments actuellement disponibles est longue.

CLASSE	DCI	CLASSE	DCI
ANALGESIQUE	Paracétamol Proposyphène Méthadone Salicylés	ANTI-ARYTHMIQUES	Quinidine Disopyramide Nacétylprocaïnamide Lidocaïne Flécaïnide Propanolol
ANTI-EPILEPTIQUE	Phénobarbital Phénitoïne Carbamazépine Primidone Etoxuximide Valproate	ANTIBIOTIQUES	Amikacine Chloramphénicol Gentamicine Nétilmicine Kanamycine Tobramycine Dibécacine Vancomycine Streptomycine Teicoplanine
ANTIDEPRESSEURS	Amitrimtyline Nortriptyline Imipramine Lithium		
ANTIASTHMATIQUES	Théophylline Caféine	IMMUNO- SUPPRESSEURS	Cyclosporine Tracrolimus Mycophénolate
ANTICANCEREUX	Méthotrexate		
DIGITALIQUES	Digoxine Digitoxine		

Les principes méthodologiques sont nombreux. Après un bref tour d'horizon des principes existants, nous verrons les médicaments les plus souvent dosés, la popularité des techniques et leurs performances.

I. PRINCIPES ANALYTIQUES

Les médicaments ont tout d'abord été dosés avec des méthodes colorimétriques plus ou moins spécifiques puis les méthodes physiques CPG, HPLC ont été développées. Elles sont toujours considérées comme méthodes de référence car elles permettent de séparer la molécule mère de ses métabolites. Pour beaucoup de médicaments, elles restent les seules méthodes disponibles. Une nouvelle méthode physique, l'électrophorèse capillaire, commence à être proposée pour des dosages de médicaments (1, 2).

Il y a une vingtaine d'années sont apparues les premières méthodes immunologiques : méthode ÉMIT, méthode FPIA qui ont permis le développement des dosages médicamenteux dans le cadre du suivi thérapeutique. La molécule médicamenteuse est un haptène contre lequel on peut fabriquer des anticorps (AC) soit monoclonaux, soit polyclonaux. La plupart des méthodes

usuelles utilisent la réaction antigène/anticorps, mais les systèmes de révélation de cette réaction sont très variés.

Dans la majorité des cas, elles sont fondées sur la compétition entre les molécules médicamenteuses présentes dans l'échantillon et des molécules du même médicament marquées (conjuguées) par une enzyme, un fluorophore, un composé luminescent ou des microparticules vis-à-vis d'anticorps spécifiques en quantité limitée. Seuls les digitaliques peuvent être dosés par méthode de type ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay) avec mise en contact de l'échantillon et des anticorps, séparation des complexés puis quantification de la réaction. Les dosages par compétition et par addition séquentielle en deux étapes peuvent être réalisés sur les mêmes analyseurs.

Nous isolerons dans un premier paragraphe les méthodes de type ELISA puis nous présenterons les méthodes par compétition en :

- phase homogène où toutes les étapes se déroulent simultanément dans le milieu réactionnel,
- et en phase hétérogène où il y a séparation des formes libres et des formes liées aux anticorps.

Le lithium, bien que médicament, est dosé par des méthodes spécifiques qui ne seront pas abordées dans ce chapitre. Il fait l'objet d'une monographie particulière.

I.1- Méthodes ELISA pour le dosage des digitaliques

I.1.1- Le conjugué est un digitalique marqué avec une enzyme qui se fixe sur les sites anticorps laissés libres par le digitalique présent dans l'échantillon

- Boehringer sur la série des ES propose une méthode pour la digoxine et pour la digitoxine. Les anticorps sont fixés sur des tubes. L'enzyme est une peroxydase. La lecture est colorimétrique.
- Behring sur Opus dispose de modules ELISA pour digoxine et digitoxine. Les anticorps sont monoclonaux. Le conjugué est la digoxigénine marquée à la phosphatase alcaline (PAL). La lecture est en fluorescence.
- Dade sur Stratus propose également des dosages de la digoxine et de la digitoxine, l'enzyme est une PAL, la lecture est en fluorescence.
- Abbott sur AxSym ou IMX utilise le principe MEIA pour le dosage de la digoxine, l'enzyme est toujours la PAL et la lecture en fluorescence.

I.1.2- Les anticorps sont conjugués à une β galactosidase

- Dade sur Dimension utilise des fragments Fab antidigoxine. Les anticorps en excès sont éliminés grâce à des particules magnétiques recouvertes d'ouabaïne. La lecture est colorimétrique.
- Bayer sur Clinimate TDA ou Seralyser utilise des anticorps monoclonaux. Les anticorps en excès sont éliminés par l'intermédiaire de microbilles sur lesquelles est fixée de la digitoxigénine. La lecture est réflectométrique.

I.2- Méthodes par compétition en phase homogène

I.2.1- Marqueurs enzymatiques

EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technic)

Une des méthodes les plus anciennes développée par Syva et commercialisée par Behring dans laquelle il y a compétition entre les molécules présentes dans l'échantillon et une quantité pré-

cise de molécules marquées avec une enzyme vis-à-vis d'anticorps spécifiques. Lorsque l'anticorps bloque le site antigénique, il bloque également le site enzymatique. On suit une activité enzymatique à 340 nm qui est d'autant plus importante qu'il y a plus de molécules libres dans le milieu réactionnel.

Cette méthodologie est très bien adaptée aux petites molécules médicamenteuses et il existe des coffrets commercialisés pour tous les médicaments de la liste (à noter qu'à côté des dosages spécifiques des médicaments, il existe toute une gamme de toxicologie permettant la recherche des principaux toxiques dans les milieux biologiques). Des améliorations portant sur la qualité des anticorps, la présentation des réactifs, la praticabilité ont été apportées (3).

Les réactifs peuvent être utilisés sur des automates de biochimie, il existe des conditionnements adaptés au Cobas Mira (Roche) et des réactifs conditionnés spécifiquement par Dade pour l'analyseur ACA.

CEDIA (Cloned Enzyme Immunodonor Assay) (4)

Cette technique a été développée par Microgenics Corporation dans les années 80. Le principe est astucieux : il utilise une enzyme en 2 parties, un fragment enzyme accepteur EA qui correspond à 90 % de la séquence de la β galactosidase et un fragment enzyme donneur ED qui correspond à la séquence manquante. L'association spontanée de EA + ED donne une galactosidase active.

La méthodologie utilise une compétition entre les molécules présentes dans l'échantillon et des molécules marquées avec le fragment ED vis-à-vis des anticorps. Lorsque l'anticorps bloque le site antigénique, il bloque le fragment ED qui ne peut plus se lier au fragment EA. L'activité enzymatique mesurée est d'autant plus forte qu'il y a plus de molécules libres présentes dans l'échantillon.

Cette technologie CEDIA est utilisée par Boehringer sur les Hitachi, Chiron, Bayer sur Seralyser et Beckman sur CX pour la digoxine.

1.2.2- Marqueurs fluorescents

FPIA (Fluorescence Polarisation Immuno Assay)

Cette technologie développée par Abbott dans les années 70 utilise d'une part une lumière polarisée et d'autre part un marqueur fluorescent.

Si dans le milieu réactionnel le marqueur fluorescent est fixé sur des molécules de petite taille, l'agitation Brownienne est importante et la lumière est dépolarisée.

Si le marqueur est fixé sur de grosses molécules (AC) l'agitation Brownienne est faible, la lumière reste polarisée.

La méthodologie utilise une compétition entre les molécules présentes dans l'échantillon et des molécules marquées à la fluorescéine vis-à-vis des anticorps. La dépolarisation de la lumière est d'autant plus importante que le nombre de molécules libres pouvant bloquer les AC est important. Cette méthodologie est très bien adaptée aux petites molécules que sont les médicaments. Elle est utilisée par Abbott sur TDX et AxSym (5). Il existe une très grande diversité de dosages possibles : tous les médicaments de la liste sont dosables sur TDX. Une gamme de toxicologie permet la recherche des principaux toxiques dans les milieux biologiques.

Ce principe a été repris par Roche (6) sur l'Integra et par Merck (gamme Thera Track) sur analyseur Éclair ou Élan.

1.2.3- Précipitation en milieu liquide

Il s'agit d'une compétition entre les molécules présentes dans l'échantillon et des molécules fixées sur des microparticules vis-à-vis d'anticorps spécifiques. La précipitation des microparticules par les anticorps est d'autant plus importante qu'il y a peu de molécules libres dans l'échantillon capables de bloquer les sites anticorps.

- La société Beckman propose pour certains dosages une méthode par inhibition de précipitation (7). La lecture se fait en néphélométrie sur l'Array et en turbidimétrie sur les CX.
- Boehringer commercialise une méthode appelée Tina-Quant qui permet le dosage de la digoxine en turbidimétrie.
- Le dosage de la théophylline sur ACA utilise également ce principe d'inhibition de précipitation avec lecture en turbidimétrie (8):
- Une méthodologie identique est utilisée pour le dosage de la digoxine par la société Roche sur Cobas Mira ou Intégra (9). Il existe une gamme toxicologie urinaire basée sur le même principe commercialisée par la société Roche.
- Il existe également des réactifs Bayer pour les dosages de phénobarbital et de théophylline sur la série des RA.
- La diminution de la vitesse d'agglutination est utilisée sur l'Immuno I de Bayer pour les dosages de phénobarbital, phénytoïne, théophylline mais dans ce cas, ce sont les anticorps qui sont fixés sur des particules.

I.3- Méthode par compétition en phase hétérogène

1.3.1- Lecture en Fluorescence FIA (Fluorescence Immuno Assay)

- Stratus de Dade : le support est constitué de tablettes de fibre de verre, l'enzyme est une PAL (10).
- Opus de Behring (11) : le support est un film multicouches, le marqueur est la rhodamine.
- Vidas de bioMérieux : il permet de doser digoxine et théophylline. Le support est un cône recouvert d'anticorps, l'enzyme une PAL.
- TDA de Bayer.

1.3.2- Luminescence

- Access de Sanofi Pasteur permet les dosages de digoxine, théophylline. Le support est constitué de particules magnétiques, l'enzyme une PAL.
- ACS 180 de Chiron : chimiluminescence (12). Le support est constitué de particules magnétiques, le marqueur est l'ester d'acridinium.

1.3.3- Réflectométrie

Les analyseurs Vitros (Ortho-Clinical Diagnostics) utilisent une méthode immunologique par compétition pour les dosages de la digoxine et de la phénytoïne.

I.3.4- Lecture en spectrophotométrie

Bayer sur Immuno 1, Serono sur SR 1, Merck sur Magia proposent des méthodes en phase hétérogène pour doser la digoxine (et la théophylline pour Merck). Le support est constitué par des particules magnétiques, l'enzyme est une PAL.

Les principaux automates réalisant des dosages immunologiques de médicaments sont présents dans un tableau en annexe.

I.4- Méthode immunologique avec marqueurs radioactifs

Il existe des coffrets RIA pour les dosages des digitaliques et de la cyclosporine.

I.5- Méthodes enzymatiques

Quelques médicaments peuvent être dosés par méthode enzymatique : les salicylés grâce à une salicylate monooxygénase, le paracétamol grâce à une aryl acylamidase. Il existe des réactifs commercialisés par les laboratoires Biorea. Ces méthodes sont également utilisées sur les analyseurs Vitros. La théophylline peut être dosée grâce à une théophylline oxydase mais le réactif commercialisé par le laboratoire Impulse n'est pas disponible en France. Les analyseurs Vitros utilisent pour doser la théophylline la propriété qu'a cette molécule d'inhiber la PAL du foie de bœuf à pH 8.

■ II. QUELS SONT LES MÉDICAMENTS LES PLUS DOSÉS DANS LES LABORATOIRES ?

Les éléments donnés sont issus, d'une part du programme de contrôle de qualité régional Pro-Bio-Qual (Lyon), et d'autre part du contrôle national 1996 ; les % de réponse respectifs sont les suivants :

	Pro-Bio-Qual	CQ National
Digoxine	92 %	100 %
Théophylline	88 %	65 %
Carbamazépine	86 %	
Acide valproïque	85 %	
Phénobarbital	83 %	55 %
Lithium	66 %	86 %
Amikacine	46 %	16 %
Phénitoïne	47 %	
Paracétamol	40 %	12 %
Vancomycine	34 %	
Méthotrexate	11 %	

Ils sont illustrés figure 1 page suivante.

Les médicaments les plus dosés sont la digoxine et la théophylline ; on comprend donc le nombre très important de techniques qui existent pour ces deux molécules.

Les laboratoires répondent souvent pour le lithium mais il est difficile de savoir si c'est parce qu'il y a beaucoup de demandes ou si c'est parce qu'ils disposent d'un photomètre de flamme.

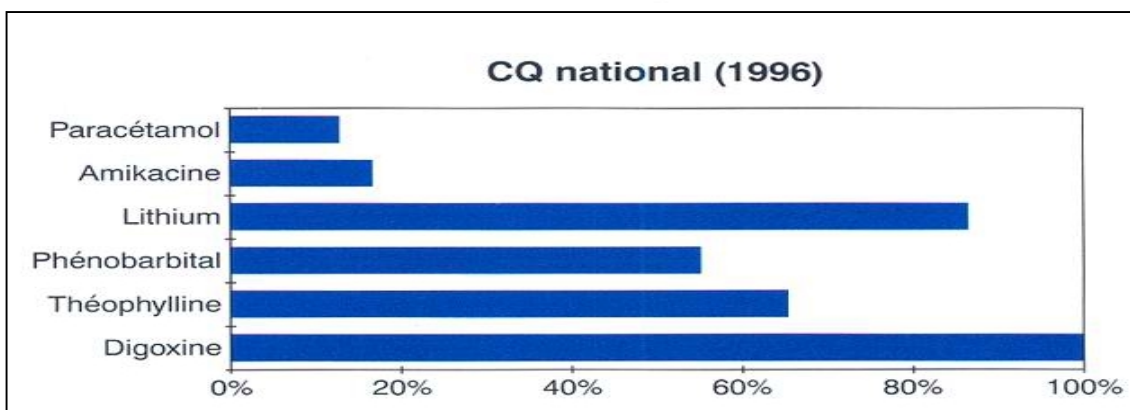
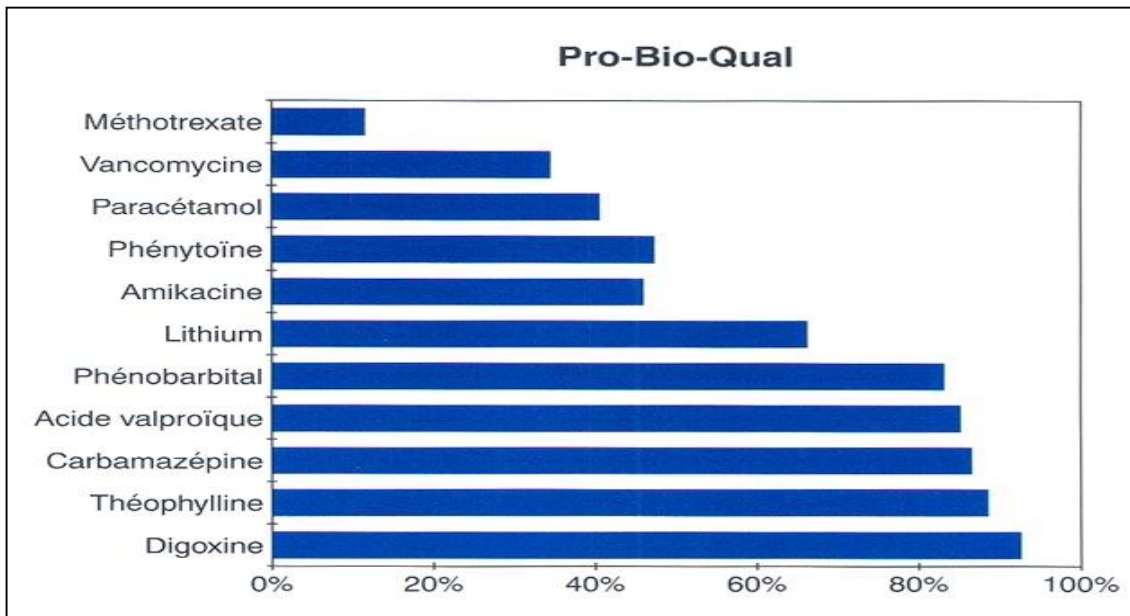


Figure 1 : Médicaments les plus dosés dans les laboratoires ; pourcentages de réponse au Contrôle Pro-Bio-Qual et au Contrôle national (1996).

Trois antiépileptiques sont assez souvent dosés : Carbamazépine, acide valproïque et phénobarbital, la phénytoïne est beaucoup moins utilisée.

Les antibiotiques (Amikacine et Vancomycine) et le Méthotrexate ne sont dosés que par les laboratoires hospitaliers.

Le Paracétamol n'est dosé que par les laboratoires qui font aussi de la toxicologie analytique. Les résultats des dosages médicamenteux sont en général exprimés en mg/l (ou en µg/l pour les digitaliques) et non en mol ou en nmole (sauf pour Lithium et Méthotrexate) car les posologies sont exprimées en g ou en mg et non en mole.

■ III. POPULARITÉ DES TECHNIQUES

Elle est illustrée dans la figure 2 page suivante.

On voit que quelque soit le médicament dosé on retrouve les techniques : FPIA, Emit Behring, Emit sur ACA qui sont les techniques développées pour les dosages de médicaments.

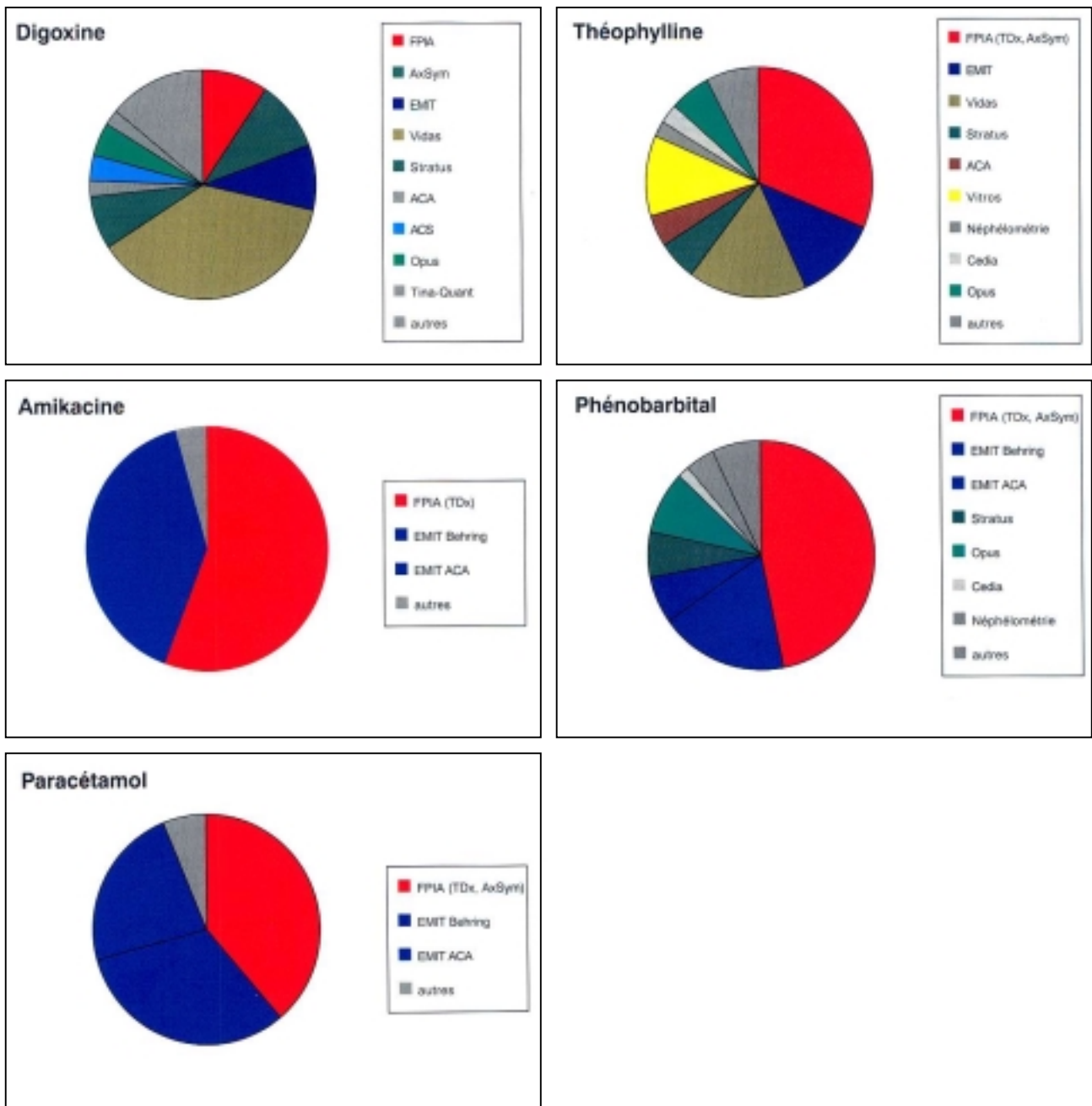


Figure 2 : Utilisation des différentes méthodes pour 5 médicaments.

Pour les médicaments les plus couramment dosés on observe une très grande variété de méthodes : ainsi, plus de dix méthodes sont utilisées pour la digoxine et la théophylline, le Vidas représentant une part importante pour ces deux médicaments. L'Opus permet de doser un assez grand nombre de médicaments. La technique CEDIA dispose également d'une gamme assez large. La néphélométrie Beckman est bien présente pour les antiépileptiques et le Stratus permet le dosage de quatre molécules.

■ IV. PERFORMANCES

IV.1- Précision

La reproductibilité des différentes méthodes est bonne :

Les coefficients de variation (CV) indiqués par les fabricants, sont dans l'ensemble inférieurs à 10 %, assez proches de ceux obtenus en biochimie. La précision est légèrement meilleure pour les analyseurs à réactifs captifs. Elle est également meilleure, pour la digoxine, lorsqu'il n'y a pas de phase de prétraitement.

Par contre, toutes les méthodes ont quelques difficultés pour doser des spécimens à faible concentration de Digoxine. Les CV sont médiocres pour des concentrations en digoxine inférieures à 0,6µg/l.

IV.2- Domaine de mesure

Les domaines de mesure annoncés sont proches d'une technique à l'autre. Ils peuvent pour certaines méthodologies et certains lots de réactifs, être légèrement au-delà des limites de linéarité. Ces limites de linéarité doivent être vérifiées par le biologiste.

IV.3- Hétérogénéité des résultats inter techniques

A priori, toutes les méthodes devraient donner les mêmes résultats sur les sérums de contrôle puisque les étalons des coffrets et les contrôles sont des sérums surchargés en produit pur sans métabolites.

Or on constate quelques différences : les valeurs de l'Opus pour le phénobarbital et l'acide valproïque sont plus élevées que celles des autres méthodologies. Pour la théophylline, on constate que les résultats des analyseurs Vitros sont plus élevés.

Il faut bien garder à l'esprit que ces résultats sont obtenus sur des sérums de contrôle qui sont par définition des matrices artificielles : sérums humains sans drogues, surchargés avec des médicaments, additionnés de conservateurs puis lyophilisés. Ce côté artificiel peut être responsable en partie des écarts observés.

Ces écarts importants n'ont pas été retrouvés sur des sérums de patients dosés en théophylline parallèlement sur Vidas et Vitros et en acide valproïque et phénobarbital sur ACA Dade et Opus.

IV.4- Spécificité des méthodes

La spécificité des méthodes est liée pour les méthodes immunologiques à la nature des anticorps. Les anticorps monoclonaux sont plus spécifiques que les polyclonaux.

Les interférences possibles sont :

- les substances médicamenteuses ou endogènes ayant une structure chimique proche (bases xanthiques pour la théophylline, digitoxine pour la digoxine, substances endogènes digoxine like, fragments Fab antidigoxine etc.),
- et les métabolites actifs ou inactifs (digoxigénine, carbamazépine époxyde, acide 3-méthylurique etc.).

Il est très difficile de tester cette spécificité, il faut

- soit disposer à l'état pur des substances classiquement interférentes,
- soit faire les dosages parallèlement avec une méthode très résolutive type GC-MS ou HPLC.

Les fiches techniques des fournisseurs doivent préciser les spécificités des méthodes en indiquant les pourcentages de réaction croisée obtenue avec toutes les substances pouvant interférer.

IV.5- Interférences

A côté des interférences liées à un manque de spécificité des anticorps, on peut remarquer :

- que des défauts liés aux prélèvements (hémolyse, lactescence, ictère) peuvent gêner certaines méthodes en particulier les méthodes en phase homogène avec lecture turbidimétrique ;
- que la présence de réducteurs perturbent les réactions si le conjugué est marqué avec une peroxydase ;
- que la présence de substances fluorescentes dans l'échantillon gêne la lecture lorsque la méthode est en phase homogène avec lecture en fluorescence ;
- que des anticorps hétérophiles en particulier des anticorps anti-souris peuvent perturber des dosages lorsque les anticorps utilisés sont des anticorps monoclonaux de souris.

■ V. CONCLUSION

Les méthodes usuelles de dosage des médicaments sont performantes et comparables entre elles. Pour doser la digoxine ou la théophylline et dans une moindre mesure, le phénobarbital et les autres antiépileptiques, le biologiste a l'embarras du choix ; il choisira en fonction de l'équipement dont il dispose, du nombre de dosages quotidiens à faire, de la stabilité de la calibration et donc du prix de revient du dosage. Il doit prendre connaissance des interférences et des réactions croisées afin de rendre des résultats interprétables par le clinicien.

Principaux automates réalisant des dosages immunologiques de médicaments

APPAREIL	Roche Cobas Mira	Dade ACA	Abbott TDX FLX	Abbott AXSym	Roche Integra	Merck Éclair	Boehringer Hitachi	Beckman CX	Beckman Array
Nombre de médicaments	27	19	26	10	15	10	9	9	8
Gamme	Digoxine Digitoxine Théophylline Antiépileptiques 6 Antibiotiques 6 Antiarythmiques 5 Méthotrexate Cyclosporine Paracétamol Antidépresseurs 4	Digoxine. Théophylline Antiépileptiques 6 Antibiotiques 4 Antiarythmiques 4 Méthotrexate Paracétamol Salicylés	Digoxine Digitoxine Théophylline Antiépileptiques 6 Antibiotiques 6 Antiarythmiques 6 Méthotrexate Cyclosporine Tacrolimus Paracétamol Salicylés	Digoxine Théophylline Antiépileptiques 4 Antibiotiques Antiarythmiques 1 Paracétamol Salicylés	Digoxine Théophylline Antiépileptiques 5 Antibiotiques 4 Antiarythmiques 4	Digoxine Théophylline Antiépileptiques 4 Antibiotiques 4	Digoxine Digitoxine Théophylline Antiépileptiques 4 Antibiotiques 2	Digoxine Théophylline Antiépileptiques 4 Antibiotiques 2 Salicylés	Théophylline Antiépileptiques 4 Antiarythmiques 1 Antibiotiques 2 (paramètres en développement sur analyseur image)
Principe	phase homogène EMIT Behring	phase homogène EMIT sauf Theo	phase homogène FPIA	phase homogène FPIA sauf Digo	phase homogène FPIA sauf Digo	phase homogène FPIA	phase homogène CEDIA sauf Digo	phase homogène turbidimétrie sauf Digo (CEDIA)	phase homogène néphélométrie
Délai de réponse	< 10 min	< 10 min	< 10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	5 min
Réactifs	lyophilisé	sachets unitaires	liquides	cartouche	cassette	liquides	lyophilisé	liquide	liquide
Stabilité	3 à 12 mois	9 mois		6 mois	6 mois	2 mois	1 mois	2 mois	1 mois
Calibration	15 à 30 jours	par lot	par lot	par lot	par cassette	4 semaines	3 à 5 j. (2 pts)	15 jours	1 mois
Tube primaire	oui (mira S plus)	non	non	oui	oui	non	oui	oui	oui
Prix du test HT et non prix de l'analyse rendue	env. 20 F	45 à 50 F	40 à 65 F (prix catalogue)	40 à 65 F	20 à 23 F	15 à 25 F	20 à 30 F	env. 15 F	env. 15 F
Gamme Toxicologie	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	non
Tests autres	Biochimie Protéines	Biochimie Protéines		Thyroïde Fertilité Cancéro. Infectieux	Biochimie Protéines		Biochimie Protéines	Biochimie Protéines	Protéines
Conclusion	polyvalent	polyvalent	pharmaco-toxico	immuno	polyvalent		polyvalent	polyvalent	protéines

APPAREIL	Bayer Immuno 1	Boehringer ES	Baxter Stratus	Behring Opus	Biomérieux Vidas	Sanofi Access	Chiron ACS	Ortho Vitrosy
Nombre de médicaments	6	2	8	10	2	2	2	6
Gamme	Digoxine Théophylline Antiépileptiques 2 Antibiotiques 2 (paramètres en développement)	Digoxine. Digitoxine	Digoxine Digitoxine Théophylline Antiépileptiques 3 Antiarythmiques 2	Digoxine Digitoxine Théophylline Antiépileptiques 4 Antiarythmiques 3	Digoxine Théophylline	Digoxine Théophylline	Digoxine Théophylline (paramètres en développement)	Digoxine Théophylline Antiépileptiques 1 Paracétamol Salicylés Lithium (paramètres en développement)
Principe	phase homogène Inhib Agglutination sauf Digo	phase hétérogène ELISA	phase hétérogène FIA	phase hétérogène FIA	phase hétérogène FIA	phase hétérogène enz. luminescence	phase hétérogène chimiluminescence	Immuno pour Digo Phénytoïne réflectométrie
Délai de réponse	10 min	45 à 60 min	< 10 min	10 à 20 min	20 min	20 min	15 min	
Réactifs		Lyophilisé	Plaques et rf liquides	Modules unitaires	Barrettes unitaires			plaques
Stabilité	1 mois	15 jours	6 mois	3 à 4 mois		1 mois	40 heures	
Calibration	4 semaines	4 semaines	3 à 6 mois	3 à 4 mois	2 semaines	1 mois	1 à 4 semaines	
Tube primaire	oui	oui	non	non	non	oui	oui	oui
Prix du test HT et non prix de l'analyse rendue		20 à 25 F	env. 40 F	env. 25-35 F	env. 35 F	env. 35 F	env. 15 F	
Gamme Toxicologie	non	non	non	non	non	non	non	non
Tests autres	Thyroïde Fertilité Cancéro	Thyroïde Fertilité Cancéro Infectieux	Thyroïde Fertilité Cancéro Marqueurs IDM	Thyroïde Fertilité Cancéro. Infectieux Marqueurs IDM	Thyroïde Fertilité Cancéro. Infectieux	Thyroïde Fertilité Cancéro. Infectieux	Thyroïde Fertilité Cancéro.	Biochimie Protéines
Conclusion	immuno	immuno	Marqueurs IDM	Immuno	immuno	Immuno/marqu. IDM	immuno	polyvalent

BIBLIOGRAPHIE

- (1) WOLFISBERG H. and al., Assessment of automated capillary electrophoresis for therapeutic and diagnostic drug monitoring: determination of bupivacaïne in drain fluid and antipyrine in plasma, *J. Chromatogr.*, 1993, 652 (2), 407-416.
- (2) CASLAVSKA J. and al., Comparative use of three electrokinetic capillary methods for the determination of drugs in body fluids. Prospects for rapid determination of intoxications, *J. Chromatogr.*, 1993, 638 (2), 335-343.
- (3) LOPEZ GALERA R.M. and al., Evaluation of an enzymeimmunoassay for serum digoxin determination without sample pretreatment, *Rev. Soc. Esp. Quim. Clin.*, 1996, 15 (6), 434-437.
- (4) GASCON-ROCHE N. and al., Evaluation of the technology of Cedia registered immunoanalysis for determination of theophylline, diphenyldantoïn and phenobarbital, *Farm. Clin.*, 1992, 9 (5), 399-403.
- (5) MC GOWAN M. and al., Development of therapeutic drug monitoring assays for the Abbott AxSym registered immunoassay analyser, *Klin. Labor*, 1996, 42 (4), 313-316.
- (6) ZARINOTTO M. and al., Performance of a fluorescence polarization immunoassay system evaluated by therapeutic monitoring of four drugs, *Ther. Drug Monit.*, 1992, 14 (4), 301-305.
- (7) SAMOSZUK M. and al., Serum theophylline assay by rate nephelometric inhibition immunoassay: a comparison with HPLC, *Ther. Drug Monit.*, 1983, 5, 113-116.
- (8) OPHEIM K.E. and al., Particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay for theophylline evaluated with the Dupont ACA, *Clin. Chem.*, 1984, 30 (11), 1870 à 1877.
- (9) RUIZ R. and al., Evaluation of an immunoturbidimetric assay of serum digoxin without sample pretreatment, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1995, 33 (3), 171-175.
- (10) VAN DREAL P. and al., Drug analysis on the Stratus compared with the TDX, *Clin. Chem.*, 1985, 31, 913-919.
- (11) O' COUNELL M.T. and al., A comparison of the OPUS and TDX analysers for antiepileptic drug monitoring, *Ther. Drug Monit.*, 1995, 17 (5), 549-555.
- (12) MILLER J.J. and al., Analytical performance of a monoclonal digoxin assay with increased specificity on the ACS 180, *Ther. Drug Monit.*, 1996, 18, 65-72:

■ I. INTRODUCTION

Les aminoglycosides ou aminosides représentent une classe antibiotique originale et une famille importante en thérapeutique.

La première molécule du groupe est apparue en 1944, la streptomycine. Depuis, de nombreux dérivés ont été mis sur le marché. La dernière molécule synthétisée en 1978 est l'isépamicine, commercialisée depuis 1995 (1).

Cette famille d'antibiotique se caractérise par (2) :

- une néphrotoxicité et une ototoxicité, véritables tares familiales ;
- une activité bactéricide remarquable vis à vis de nombreux germes ;
- un contraste entre une activité sérique élevée et une efficacité parfois limitée dans les tissus ;
- une indication quasi exclusive en association ;
- de nombreuses règles de prescription.

I.1- Structure

L'amikacine est un aminoglycoside synthétique découvert en 1972.

Sa structure est celle d'un sucre aminé lié par un pont glycosidique à un noyau central aminocyclitol, ce qui lui confère une charge positive.

L'amikacine est une base faible, hydrosoluble, son activité antimicrobienne est optimale à pH alcalin. Son poids moléculaire est compris entre 500 et 800 Da, c'est une molécule aisément dialysable.

I.2- Métabolisme - Pharmacologie

L'administration est exclusivement injectable, avec une biodisponibilité voisine de 100 %. Le temps d'obtention du pic sérique est habituellement de 30 minutes (IV) à 90 minutes (IM). L'amikacine n'est pas absorbée par voie entérale (3).

La distribution tissulaire est limitée, malgré un poids moléculaire peu élevé et une liaison aux protéines sériques négligeable.

Les concentrations sont variables aussi bien pour les liquides extracellulaires, les liquides d'ascite et synoviaux, que pour les tissus où domine la sphère pulmonaire et urinaire (4).

L'amikacine n'est pas biotransformée et est éliminée sous forme inchangée, biologiquement active, essentiellement par voie rénale (90 %), l'élimination biliaire étant accessoire (2 %).

La demi-vie est de 2 à 2,5 heures, mais il existe une grande variabilité interindividuelle en fonction de l'âge, de la fonction rénale, de l'obésité, ce qui rend indispensable le contrôle régulier des taux sériques.

La posologie de l'amikacine doit être diminuée chez l'insuffisant rénal, le nouveau-né et le sujet âgé.

I.3- Propriétés pharmacologiques

Le spectre d'action de l'amikacine est large, englobant avant tout les germes à Gram négatif aérobies et également les staphylocoques et les bacilles à Gram positif. En revanche, les streptocoques et les germes anaérobies sont naturellement résistants à l'amikacine (1, 2).

I.4- Mécanismes d'action

Après une traversée passive de la paroi bactérienne, à travers les porines de la membrane externe, l'amikacine se fixe sur les ribosomes par liaisons électrostatiques (la structure 30 S étant chargée positivement) ce qui entraîne une altération de la synthèse protéique (1).

L'amikacine est un antibiotique bactéricide, les concentrations minimales inhibitrices étant proches des concentrations minimales bactéricides.

L'effet bactéricide est

- très intense ;
- très rapide ;
- indépendant de la densité bactérienne ;
- dose-dépendant.

Une des caractéristiques de la famille des aminosides est l'existence d'un effet post-antibiotique, c'est à dire un arrêt passager de la croissance bactérienne persistant alors que l'amikacine n'est plus retrouvée. Cet effet donne la possibilité d'espacer l'intervalle de temps entre deux doses, sans craindre un phénomène de recroissance bactérienne (1).

I.5- Mécanisme de résistance

La résistance à l'amikacine est beaucoup plus fréquente chez les souches nosocomiales que chez les souches communautaires.

Elle a pour origine

- une altération de la cible ribosomale (rare) ;
- une imperméabilité membranaire (Staphylocoques et Pseudomonas) ;
- une inactivation enzymatique, le plus souvent, par des enzymes codées par des gènes d'origine plasmidique ;
- une association de plusieurs mécanismes ci-dessus.

I.6- Utilisation

L'utilisation de l'amikacine se fait pratiquement exclusivement en association :

- association aux β lactamines, pour les bacilles à Gram négatif, les Staphylocoques et les Streptocoques ;

- association aux glycopeptides pour les Staphylocoques résistants à la Méthicilline ;
- association aux fluoroquinolones pour *Pseudomonas aeruginosa*.

I.7- Modalités pratiques d'utilisation

Chez le sujet à fonction rénale normale, la posologie est de 15 mg/kg/j, aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant.

Deux modalités sont utilisées :

- soit classique: deux injections par jour de 7,5 mg/kg ;
- soit en monodose journalière: une injection par jour de 15 mg/kg justifiée par l'effet post-antibiotique, le caractère dose-dépendant de l'amikacine et la diminution de la néphrotoxicité.

I.8- Dosages sériques

Le dosage sérique de l'amikacine est indispensable pour prévoir l'activité antibactérienne l'augmentation de la fréquence des infections hospitalières à germes à sensibilité diminuée aux antibiotiques justifie la pratique des dosages d'antibiotiques.

Compte tenu de l'index thérapeutique faible de l'amikacine, le dosage sérique est la règle au cours d'un traitement.

■ II. CONDITIONS DE PRÉLÈVEMENT ET DE CONSERVATION DES SPÉCIMENS

- Comme pour tout dosage de médicaments, il faut attendre que le sujet ait été traité depuis suffisamment de temps pour avoir atteint l'état d'équilibre, c'est-à-dire le moment où le taux plasmatique du médicament a atteint un plateau, la quantité éliminée étant alors égale à la quantité injectée pendant un même espace de temps. L'état d'équilibre est atteint après 4 demi-vies, soit 24 heures après le début du traitement pour l'Amikacine.
- Le prélèvement est habituellement effectué sur tube sec pour réaliser le dosage à partir du sérum. Un certain nombre de techniques mentionnent également la possibilité d'un dosage plasmatique. Le prélèvement peut-être conservé 24 heures à 4 °C. Au-delà, la congélation reste la règle. L'interprétation doit être prudente si le sérum est ictérique, lipémique ou hémolysé.
- En cas de dosage par techniques microbiologiques, la mention des autres antibiotiques administrés et de leur posologie est indispensable.
- Des dosages dans d'autres liquides biologiques (LCR, ascite, urines) peuvent être réalisés. Ils renseignent sur les niveaux de concentration à un temps donné et peuvent être intéressants lors du traitement des patients à germes multirésistants.
- Combien de prélèvements ?

→ En traitement classique, deux prélèvements doivent être réalisés :

◇ un taux résiduel ou vallée (Cmin) pour rechercher l'absence d'accumulation de l'antibiotique. On prélève juste avant l'injection suivante ;

◇ un pic ou taux sérique maximum (CMax) pour vérifier l'absence de taux toxique. On prélève 30 à 60 minutes après la fin de la perfusion en IV.

→ En monodose journalière, on peut se limiter à un dosage au pic, soit 30 à 60 minutes après la fin de la perfusion, étant entendu que le dosage juste avant l'injection suivante est peu informatif, proche de la limite de détection de la technique. Certains préconisent un dosage 8 heures après l'injection pour mieux contrôler le sur et le sous dosage et autoriser une modification posologique dans des délais acceptables (5).

■ III. PRINCIPES DES MÉTHODES D'ANALYSE ACTUELLEMENT UTILISÉES

Un grand nombre de méthodes de dosage ont été développées. L'évolution est allée des méthodes microbiologiques aux méthodes immunologiques, en passant par les méthodes chromatographiques.

Le choix d'une technique repose sur des critères analytiques, mais aussi sur des critères de mise en œuvre, fiabilité, possibilité de déterminer plusieurs médicaments avec le même appareil, le nombre de dosages réalisé par unité de temps, le volume de prélèvement et bien sûr le coût du dosage.

III.1- Techniques microbiologiques

La méthode microbiologique est la plus ancienne méthode de dosage utilisée. Elle est fondée sur l'activité biologique de l'antibiotique. C'est une technique de diffusion en gel d'agarose, en présence d'un germe test, *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). La zone d'inhibition de culture du germe test, provoquée par l'échantillon, est comparée à celle d'une gamme d'étalonnage.

Les méthodes microbiologiques ont l'avantage d'être de réalisation aisée et peu coûteuse ; cependant, elles demandent un délai de réponse assez long (18 heures) et des manipulations nombreuses. Leur limite de détection est juste suffisante pour le suivi thérapeutique (de l'ordre de 0,5 à 1 mg/l) (7).

Avantages : - Mise en œuvre facile avec un équipement simple.

Inconvénients : - Spécificité limitée par la présence d'autres substances antibiotiques dans le prélèvement ;
- Délai de réponse : 24 heures ;
- Sensibilité modeste.

III.3- Techniques chromatographiques (7, 8, 9)

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) a été introduite au début des années 70. Il s'agit d'une technique physico-chimique qui nécessite une déprotéinisation préalable de l'échantillon, ce qui permet de doser l'intégrité du médicament, forme libre et liée. Après extraction de l'amikacine par un solvant organique, une aliquote de l'extrait est injectée sous haute pression grâce à une phase mobile liquide dans une colonne remplie de microbilles, dont la surface porte des groupements pour lesquels la molécule à doser a une certaine affinité. Du rapport entre l'affinité pour la phase mobile et pour les microbilles dépend le temps de rétention caractéristique de la molécule.

L'utilisation de l'HPLC s'est heurtée à un problème de détection, l'amikacine n'est pas absorbante dans les UV et le visible, et n'est pas fluorescente. La seule possibilité de la détecter repose sur le caractère oxydable de la molécule en utilisant un détecteur ampérométrique (7, 8, 9).

Avantages :

- Sensibilité et spécificité ;
- Possibilité de multiples applications ;
- Possibilité théorique de doser un grand nombre de molécules par harmonisation des méthodes (même colonne, même phase mobile, même détecteur).

Inconvénients :

- Coût du matériel ;
- Demande un personnel qualifié ;
- Temps d'analyse plus long que les techniques immunologiques ;
- Méthodes sensibles aux variations techniques.

III.3- Techniques immunologiques (7, 8, 9)

III.3.1- Techniques avec marqueurs fluorescents

FPIA : Fluorescence Polarisation Immuno Assay (Abbott, Roche)

Il s'agit d'une technique immunologique par liaison compétitive en un temps. L'amikacine présente dans l'échantillon et l'amikacine marquée à la fluorescéine entrent en compétition pour les sites de liaison de molécules d'anticorps. La quantité d'amikacine marquée à la fluorescéine qui se lie à l'anticorps est responsable de la polarisation de fluorescence résultante et varie en sens inverse de la quantité d'amikacine à doser.

Avantages :

- Technique robuste, sensible, spécifique ;
- Absence de prétraitement de l'échantillon ;
- Excellente reproductibilité ;
- Méthode automatisée ;
- Rapidité de mise en œuvre ;
- Volume d'échantillon fiable.

Inconvénient : - Coût des dosages.

III.3.2- Techniques avec marqueurs enzymatiques

Technique en phase homogène

EMIT : Enzym Multiplied Immunoassay Technic (Behring)

Il s'agit d'une technique immunoenzymatique en phase homogène. Le dosage repose sur la compétition entre le médicament dans l'échantillon et celui marqué par une enzyme, la glucose 6 phosphate déshydrogénase (G6PDH) pour l'occupation des sites de liaison à un anticorps. L'activité enzymatique diminue lors de la liaison à un anticorps, la concentration du médicament varie dans le même sens que l'activité enzymatique et elle est mesurée par le biais de la variation d'absorbance à 340 nm lors de la réaction $\text{NAD} \rightarrow \text{NAD H}$.

Avantages :

- Grande sensibilité ;
- Automatisation possible ;
- Bonne reproductibilité.

Inconvénients : - Instabilité de la courbe de calibration.

III.3.3- Technique radioimmunologique RIA (Radio Immuno Assay)

Les anticorps sont simultanément mis en présence de l'amikacine contenu dans l'échantillon et d'une quantité connue d'amikacine marqué par un isotope radioactif. Une compétition entre amikacine « froid » (de l'échantillon) et amikacine marqué se produit lors de la fixation des anticorps. Les complexes amikacine-anticorps sont ensuite précipités par une seconde réaction immunologique et la radioactivité du liquide surnageant est alors mesurée. La radioactivité résiduelle est directement proportionnelle à la quantité d'amikacine présente dans l'échantillon.

Avantages :

- Spécificité ;
- Sensibilité.

Inconvénients :

- Coût ;
- Manipulation de produits radioactifs.

III.4- Technique radioenzymatique REA (Radio-Enzyme Assay) (7)

Cette technique utilise des enzymes qui modifient la structure de l'amikacine (adényltransférase ou acétyltransférase) en présence d'un substrat radioactif ¹⁴C-ATP. On isole secondairement l'amikacine marquée sur papier phosphocellulosique et on réalise un comptage.

Avantages :

- Sensibilité ;
- Spécificité ;
- Reproductibilité.

Inconvénients :

- Manipulation de radioéléments ;
- Un certain nombre d'interférences ont été rapportées.

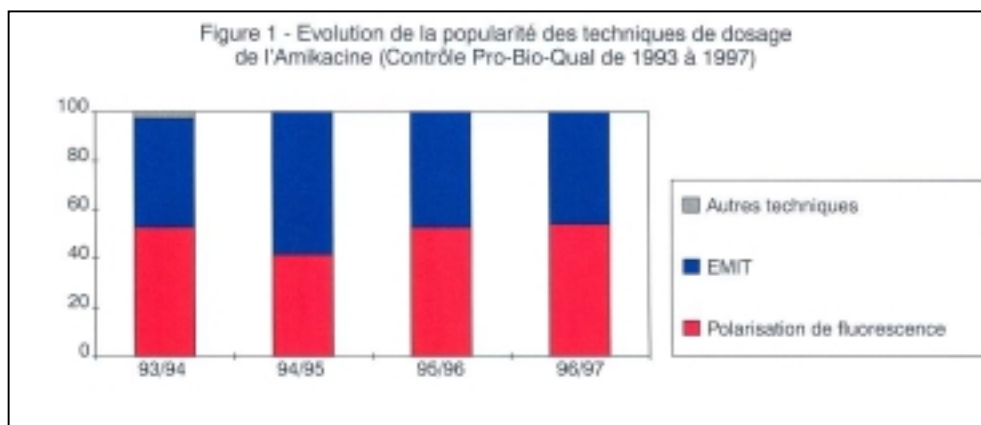
■ IV. TECHNIQUE DE RÉFÉRENCE

Il n'existe pas de technique de référence de dosage de l'amikacine. La méthode de référence pourrait être l'HPLC compte tenu de sa haute spécificité et sensibilité.

■ V. LES CRITÈRES DE CHOIX D'UNE TECHNIQUE

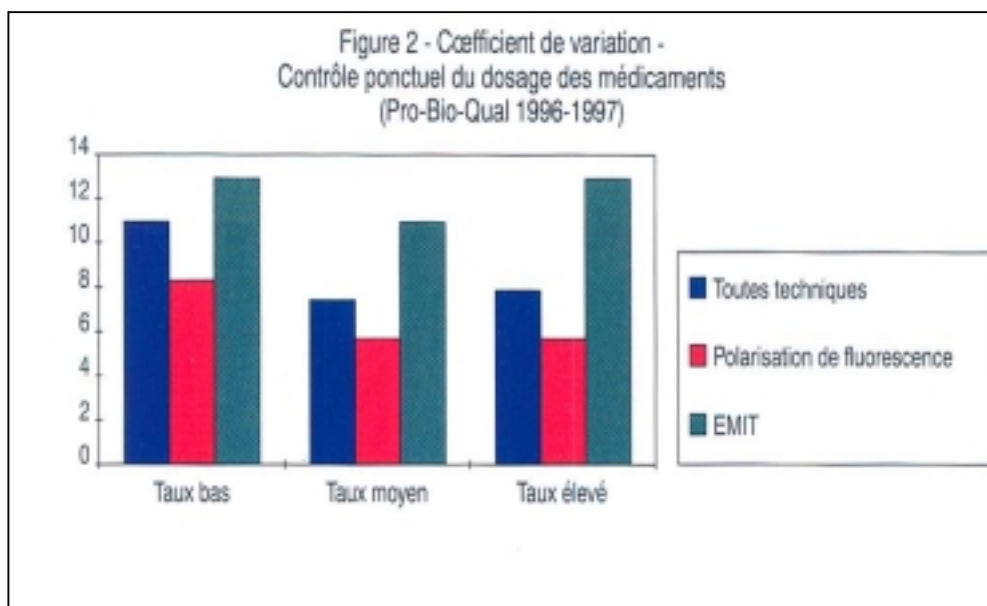
V.1- Popularité des techniques

Deux techniques se partagent les suffrages des biologistes : la technique FPIA sur analyseur TDx et la technique EMIT



V.2- Critères de fiabilité

La reproductibilité d'un jour à l'autre estimée par le coefficient de variation est inférieure à 13 % pour les deux grands groupes de techniques que sont la MA et les techniques EMIT aux moyennes et fortes concentrations, le CV étant plus important aux faibles concentrations et pour les techniques adaptées à une grande diversité d'automates (EMIT) (cf. figure 2).



Les différentes méthodes immunologiques sont bien corrélées entre elles.

V.3- Choix d'une technique

Le choix d'une méthode de dosage dépendra de la praticabilité, du délai de réponse, du coût, mais aussi de la reproductibilité, de la sensibilité et de la spécificité.

Les méthodes immunologiques (MA et EMIT), ainsi que les méthodes chromatographiques (HPLC) sont les techniques qui présentent les meilleures sensibilités et spécificités.

Le choix d'une technique dépendra également du type d'utilisation. D'une manière pragmatique et dans la surveillance d'un traitement, la rapidité de réponse et la praticabilité sont des critères déterminants qui orienteront vers les techniques EMIT et FPIA, alors que dans le cadre d'une étude pharmacocinétique, le seuil de détection et la spécificité sont plus recherchés et orienteront vers une technique type HPLC.

■ VI. ZONE THÉRAPEUTIQUE ET TOXIQUE

Les caractéristiques pharmacocinétiques de l'amikacine sont (6) :

	<u>Vallée (mg/l)</u>	<u>Pic (mg/l)</u>
Traitement classique	< 5	20-30
Traitement monodose/jour	< 3	30-60

La toxicité se manifeste par des concentrations d'amikacine supérieures à 40 mg/l au pic en traitement classique et pour des concentrations résiduelles supérieures à 10 mg/l. La toxicité se manifeste par une atteinte rénale et une atteinte cochléovestibulaire

La toxicité rénale est due à une accumulation d'amikacine dans les cellules de l'épithélium tubulaire proximale du cortex rénal. Cette accumulation est suivie d'une lyse cellulaire qui se traduit par une enzymurie, une protéinurie et une leucocyturie (1). Parfois, survient une nécrose des tubules responsable d'une insuffisance rénale aiguë, le plus souvent à diurèse conservée et cliniquement asymptomatique élévation isolée de la créatininémie. Les membranes basales n'étant pas détruites, une régénération cellulaire est possible, expliquant le caractère réversible des accidents néphrotoxiques.

La toxicité auditive est due à des lésions irréversibles des cellules sensorielles ciliées de l'oreille interne. L'atteinte cochléaire induit une surdité de perception uni ou bilatérale, irréversible et inappareillable.

Pour éviter ces toxicités, il faut respecter la durée maximale de traitement de 10 jours et assurer une surveillance par les dosages sériques.

Les effets secondaires sont nettement diminués par les traitements en monodose journalière.

■ VII. CONCLUSION

Malgré les effets secondaires importants, l'amikacine conserve une activité bactéricide remarquable et a une place de choix dans l'arsenal thérapeutique par sa rapidité d'action et son effet synergique en association notamment avec les Bêta lactamines.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) BOCHATON C., ROCHEGUDE S., ROUBILLE R., Les aminoglycosides, Lyon Pharmaceutique, 1997, 48, 226-39.
- (2) BEUCAIRE G., Rôle actuel des aminosides en thérapeutique, J. of chemotherapy, 1995, 7 (supplément n°2), 111-123.
- (3) MOUTON Y., DEBOSCKER Y., DUBREUIL L., THABAUT A., Antibiotiques, antiviraux, anti-infectieux, Montrouge, Édition John Libbey Eurotext, 1997, 47-51, 63-70.
- (4) BERGOGNE-BEREZIN E., Applications thérapeutiques de la pharmacocinétique tissulaire des antibiotiques, Presse Méd., 1996, 25, 408-18.
- (5) PETITJEAN O., PRÉVOT M., LORTHOLARY O., TOD M., NICOLAS P., Pharmacocinétique comparée des aminosides utilisés en dose unique journalière, Méd. Mal. Infect., 1993, 23, spécial, 22-36.
- (6) KUMANA C.R., YUNG YUEN K., Parenteral Aminoglycoside Therapy, Drugs, 1994, 1994, 47 (6), 902-913.
- (7) TOD M., FAUVELLE F., NICOLAS P., PETITJEAN O., Evaluation comparée des différentes méthodes de dosage des aminosides, Revue Française des Laboratoires, 1989, 188, 57-64.
- (8) FAURISSON F., ROUVEIX B., Pharmacocinétique des antibiotiques: intérêt pratique, La lettre de l'Infectiologue, 1996, tome XI, 17, 555-556.
- (9) JEHL F., MONTEIL H., À propos de l'article : « Les méthodes de dosage des antibiotiques », La lettre de l'Infectiologue, 1996, tome XI, 18, 234-235

■ I. GÉNÉRALITÉS

I.1- Structure

Hétéroside d'origine végétale comportant un noyau génine, la digoxigénine et une chaîne de 3 molécules de digitoxose.

I.2- Métabolisme et pharmacocinétique

C'est un médicament d'action semi-lente et d'élimination semi-prolongée. Absorbée à 70 %, le pic d'action se situe entre 1 et 5 heures ; la digoxine circule liée à l'albumine pour 20-25 % ; les hypoalbuminémies n'ont donc que peu d'incidence sur le résultat d'un dosage. Elle se fixe fortement sur les tissus, préférentiellement sur le cœur, le foie, les reins, le muscle squelettique, son volume de distribution est très important (426 litres). La concentration myocardique est très bien corrélée avec la concentration plasmatique, ce qui participe à l'intérêt de son dosage.

Elle est éliminée pour 90 % par voie rénale, ce qui rend son utilisation dans les insuffisances rénales contre indiquée, ou prudente : espacement des prises et surveillance du taux sérique. La demi-vie moyenne est de 36 heures (1 à 3 jours).

La biotransformation concerne environ 10 % du produit ingéré : la digoxine est dégradée par le foie grâce à une saturation du cycle lactonique produisant la dihydrodigoxine et par hydrolyse des molécules osidiques. Les dérivés digoxigénine mono ou bis digitoxoside conservent une activité pharmacologique alors que la digoxigénine et la dihydrodigoxine sont dépourvues d'effets. La métabolisation peut être importante expliquant parfois la résistance inhabituelle de certains patients au traitement.

I.3- Propriétés pharmacologiques et indications

La digoxine a :

- un effet inotrope positif en renforçant la contraction de la fibre musculaire cardiaque par inhibition de la Na-K ATPase membranaire et augmentation du flux entrant calcique ;
- des effets chronotrope et dromotrope négatifs surtout nets chez l'insuffisant cardiaque ;
- une action natriurétique ;
- elle est indiquée dans les traitements de l'insuffisance cardiaque chronique congestive et de la fibrillation auriculaire

I.4- Posologie et modalités d'administration

Son emploi est difficile étant donné la proximité de la dose efficace et de la dose toxique, et la fréquence des circonstances modifiant sa pharmacocinétique.

Chez l'adulte la dose d'attaque est 0,5 à 1 mg/jour. La dose d'entretien: 0,25 mg/jour en 1 ou 2 prises

La posologie (en µg/kg) est plus importante chez l'enfant: de 10 à 20 µg/kg/jour.

En cas d'insuffisance rénale, la posologie est réduite en fonction de la valeur de la créatininémie. L'arrêt de la digoxine est impératif en cas d'hyperexcitabilité ventriculaire. La posologie est réduite chez les sujets âgés, en cas d'hypothyroïdie, d'hypercalcémie et d'hypokaliémie.

Les interactions médicamenteuses possibles sont :

- les substances à action cardiaque : Vérapamil, Quinidine et βbloquants
- les substances modifiant l'absorption digestive : anti acides, charbon activé, hydroxydes d'aluminium, cholestyramine, salazopyrine
- les inducteurs enzymatiques

I.5- Indications, intérêt du dosage

Indications :

- Non-réponse au traitement : état de résistance vraie, ou faible imprégnation par non observance, interactions médicamenteuses ou faible absorption digestive
- Suspicion de surdosage : en cas de troubles digestifs (anorexie, nausées, vomissements), de céphalées, de vertiges et surtout en cas de troubles cardiaques : troubles de la conduction et de l'excitation (aspect en cupule du segment ST à l'ECG).
- Diagnostic étiologique de troubles du rythme : surdosage ou pathologie cardiaque sous-jacente elle-même
- Adaptation de posologie chez les patients âgés, dysthyroïdiens, insuffisants rénaux
- En cas d'intoxication aiguë : diagnostic positif, quantitatif, et suivi évolutif

Interprétation :

- L'effet hémodynamique est en plateau aux concentrations de 1 à 1,5 µg/l, avec un rapport risque de surdosage/bénéfice minimale ; pour des concentrations supérieures, la corrélation avec l'inotropisme n'est pas prouvée
- Les valeurs usuelles ont été déterminées statistiquement, mais ce dosage ne peut être le seul arbitre du niveau de traitement d'un patient : certaines circonstances augmentent la sensibilité myocardique aux digitaliques et certaines pathologies nécessitent des imprégnations plus intenses.

Valeurs usuelles

Sous dosage	< 0,45 µg/l	c'est-à-dire	< 0,60 nmol/l
Zone thérapeutique	0,8 - 2 µg/l	c'est-à-dire	1,0 - 2,6 nmol/l
Zone de chevauchement	2,1 - 3 µg/l	c'est-à-dire	2,7 - 3,8, nmol/l
Zone toxique	> 3,1 µg/l	c'est-à-dire	> 4 nmol/l

La zone de chevauchement peut correspondre encore à un taux thérapeutique, ou déjà figurer un taux toxique.

Le dosage salivaire semble bien corrélé au dosage sérique mais est peu utilisé (1).

■ II. CONDITIONS DE PRELEVEMENT ET DE CONSERVATION DES SPECIMENS

Une imprégnation digitalique est appréciée à l'état d'équilibre, donc à au moins 3 demi-vies de la première prise (soit une semaine), 6 heures après la prise quotidienne, chez un sujet à jeun.

Analyse sur sérum ou plasma (héparine, éviter EDTA, citrate, oxalate qui peuvent gêner certaines méthodes d'analyse)

Stable 1 semaine au réfrigérateur à + 4°C, 6 mois au congélateur à – 20°C

Ces conditions sont identiques pour toutes les techniques développées ultérieurement.

■ III. METHODES DE DOSAGE

Il existe de très nombreuses méthodes pour doser la digoxine : 22 techniques sont répertoriées au niveau des tables de codage de Bioforma. Leurs principales caractéristiques sont rassemblées dans les tableaux I et II.

III.1- Méthodes immunologiques de type ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay)

La digoxine présente dans l'échantillon se fixe sur des anticorps (AC) anti-digoxine ; après séparation des complexes AG-AC, il y a quantification de la réaction soit en utilisant un conjugué qui se fixe sur les sites AC laissés libres, soit en utilisant des AC marqués par une enzyme qui se fixe sur les sites anticorps laissés libres par le digitalique présent dans l'échantillon.

III.1.1- Le conjugué est un digitalique marqué avec une enzyme

- Boehringer sur la série des ES propose une méthode pour la digoxine et pour la digitoxine. Les anticorps sont fixés sur des tubes. L'enzyme est une peroxydase. La lecture est colorimétrique.
- Behring sur Opus (2) dispose de modules ELISA pour digoxine et digitoxine. Les anticorps sont monoclonaux. Le conjugué est la digoxigénine marquée à la phosphatase alcaline (PAL). La lecture est en fluorescence.
- Dade sur Stratus (2) propose également des dosages de la digoxine et de la digitoxine, l'enzyme est une PAL, la lecture est en fluorescence.
- Abbott sur AxSym ou IMX utilise le principe MEIA pour le dosage de la digoxine, l'enzyme est toujours la PAL et la lecture en fluorescence.

III.1.2- Les anticorps sont conjugués à une β galactosidase

- Dade sur Dimension utilise des fragments Fab antidigoxine. Les anticorps en excès sont éliminés grâce à des particules magnétiques recouvertes d'ouabaïne. La lecture est colorimétrique

- Bayer sur Clinimate TDA ou Seralyser utilise des anticorps monoclonaux. Les anticorps en excès sont éliminés par l'intermédiaire de microbilles sur lesquelles est fixée de la digitoxigénine. La lecture est réflectométrique.

III.2- Méthodes immunologiques par compétition

III.2.1- Radio-Immuno-Assay (RIA)

Dosage radioimmunologique par compétition en 1 temps : l'échantillon à analyser est incubé simultanément avec de la digoxine radio-marquée (125 I) et un anticorps polyclonal de lapin anti-digoxine en quantité limitée. Les immuns-complexes sont précipités par des anticorps anti-lapin couplés au sephadex et, après centrifugation et élimination du surnageant, la radioactivité fixée est mesurée, la concentration en digoxine froide de l'échantillon en est déduite par une courbe d'étalonnage.

Avantages

- ◇ Technique sensible, spécifique et précise
- ◇ Reproductible
- ◇ Utilisable pour de grandes séries, facile de mise en œuvre
- ◇ Inexactitude 1 à 3 %

Inconvénients

- ◇ Technique entièrement manuelle (étalonnage quotidien, reconstitution de réactifs)
- ◇ Utilisant des isotopes radioactifs (autorisation, déchets)
- ◇ Longue (1 h 30 minimum), non utilisable en urgence

III.2.2- Dosages par méthodes non isotopiques en phase homogène

Technique immunologique par polarisation en fluorescence

(adaptée sur TDX, firme Abbott ; réactifs Thera-Trak sur Éclair de Merck)

Il s'agit d'un dosage immunologique par liaison compétitive (réaction en 1 temps) en polarisation de fluorescence. La digoxine présente dans l'échantillon déprotéinisé et la digoxine marquée par la fluorescéine entrent en compétition pour les sites de liaison des molécules d'anticorps : la quantité du complexe traceur-digoxine, qui reste libre, est directement proportionnelle à la quantité du médicament, qui se lie à la molécule d'anticorps. Lors du retour à l'état stable, la fluorescence émise est mesurée par une technique de polarisation de fluorescence mesure en point final. La concentration en digoxine sérique est inversement proportionnelle à la polarisation.

Cette méthode est automatisée, rapide à mettre en œuvre, adaptée à l'urgence ; mais elle nécessite un prétraitement manuel des échantillons

Techniques immuno-enzymatiques

- Méthode ÉMIT - Emit 2000 Behring (3)

Il s'agit là aussi d'une méthode immunoenzymatique en phase homogène par compétition entre le médicament dans l'échantillon et celui marqué par l'enzyme, la glucose-6-phosphate déshy-

drogène (G6PDH) pour l'occupation des sites anticorps. La concentration du médicament est mesurée en terme d'activité enzymatique, en cinétique, par le biais de la variation d'absorbance à 340 nm lors de la réaction NAD/NADH.

Cette technique est adaptée sur Cobas Mira (firme Roche) utilisant le sérum sans traitement préalable, elle est adaptable sur la plupart des analyseurs de biochimie. Elle est également utilisée sur l'ACA de Dade.

- Méthode CEDIA (Cloned Enzyme Immuno Donnor Assay)

Cette méthode utilise 2 fragments d'une enzyme :

- le fragment EA « enzyme acceptor » qui représente 90 % d'une β galactosidase
- et le fragment ED « enzyme donnor » qui représente la séquence manquante.

L'association spontanée EA + ED donne une galactosidase active.

Il y a compétition entre la digoxine présente dans l'échantillon et la digoxine liée à des fragments ED vis-à-vis d'anticorps antidigoxine. Seul les conjugués digoxine-ED non liés à l'anticorps pourront fixer spontanément les fragments EA permettant à l'enzyme d'être active. Plus il y a de digoxine dans l'échantillon, plus l'activité enzymatique β galactosidase est élevée. Cette méthode (Microgenics) est adaptée par Beckman sur les CX. Elle est également commercialisée par Chiron.

Méthodes turbidimétriques

- Méthode Tina Quant Boehringer (4) adaptée sur les analyseurs Hitachi. La digoxine contenue dans l'échantillon réagit avec les anticorps antidigoxine. Puis les anticorps en excès réagissent avec une digoxine fixée sur des particules de latex : l'agglutination qui en résulte est mesurée par turbidimétrie. Plus il y a de digoxine dans l'échantillon, moins l'agglutination est importante.
- Méthode On line Roche (5) adaptée sur Cobas Mira et Integra. Il s'agit d'une technique d'immunocompétition en phase homogène entre la digoxine de l'échantillon et la digoxine recouvrant de très fines particules de polymères en solution vis-à-vis d'un anticorps monoclonal antidigoxine.

III.2.3- Dosages par méthodes non isotopiques en phase hétérogène

Ces méthodes utilisent également le principe de compétition vis-à-vis d'anticorps antidigoxine mais la séparation des complexes digoxine-anticorps précède la mesure.

Technique immunoenzymofluorimétrique adaptée sur Vidas (bioMérieux)

La digoxine de l'échantillon est en compétition avec la digoxine marquée par la PAL vis-à-vis des anticorps fixés sur le cône. Le substrat est le 4 méthyl ombelliferyl phosphate.

La réaction enzymatique commence au moment où est ajoutée la solution de substrat. Il s'agit d'une lecture en cinétique de fluorescence.

Techniques immunoenzymatiques en phase hétérogène avec lecture colorimétrique

- Méthode de Bayer sur Immuno 1. La digoxine est marquée à la PAL, les anticorps sont couplés à la fluorescéine et les complexes antigène-anticorps sont séparés grâce à des particules magnétiques couplées à des anticorps antifluorescéine.

- Méthode Merck sur Magia. La digoxine est également marquée à la PAL, les anticorps sont fixés sur des particules magnétiques. La mesure du paranitrophénol obtenu à partir du paranitrophénylphosphate se fait à 405 nm.

Technique en chimiluminescence

- Sur ACS 180 de Chiron (6). La digoxine de l'échantillon entre en compétition avec de la digitoxine couplée à des particules magnétiques vis-à-vis d'une quantité limitée d'anticorps antidigoxine marqués à l'ester d'acridinium.
- Sur Access de Sanofi Pasteur Il y a compétition entre la digoxine de l'échantillon et de la digoxine marquée par une PAL vis-à-vis d'anticorps antidigoxine de lapin. La séparation des complexes se fait grâce à des particules magnétiques sur lesquelles sont fixées des anticorps anti-lapin. Après lavage, la PAL des complexes est évaluée en chimiluminescence.

111.2.4- Réflectométrie

La méthode utilisée sur les analyseurs Vitros utilise une compétition entre la digoxine de l'échantillon et une digoxine marquée par une peroxydase vis-à-vis d'anticorps immobilisés sur les tablettes.

■ **IV. TECHNIQUE DE RÉFÉRENCE (7)**

HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Cette technique hautement exacte permet une séparation et une quantification de la digoxine et de ses métabolites. Elle sert à étudier la spécificité des méthodes immunologiques mais n'est absolument pas utilisable en routine.

■ **V. LES CRITÈRES DE CHOIX D'UNE TECHNIQUE**

V.1- Critères de fiabilité

V.1.1- Paramètres habituels (selon les données des fabricants)

Précision : la reproductibilité d'un jour à l'autre estimée par le coefficient de variation est de l'ordre de 7 % pour chacune de ces techniques sauf pour les concentrations basses (< 0,6µg/l) où ce coefficient de variation peut être nettement supérieur à 10 %

Les limites de détection sont quasiment identiques pour toutes les techniques, proches de 0,2 µg/l

Les limites de linéarité varient de 4 à 7 µg/l en fonction des méthodes (Cf. tableau)

Toutes les méthodes donnent des résultats proches les uns des autres: les études de comparaison réalisées par les fabricants sur sérum de patients entre leur méthode et les méthodes les plus anciennes comme la FPIA ou le Stratus montrent que les équations des droites de régression sont proches de $y = x$

Les méthodes en phase homogène et particulièrement les méthodes turbidimétriques peuvent être gênées en cas de défaut d'aspect important : hémolyse, lactescence. Les analyseurs Vitros sont également sensibles à l'hémolyse. La présence de réducteurs peut perturber le fonctionnement des méthodes utilisant une peroxydase.

V.1.2- La spécificité

La spécificité est un élément déterminant à bien connaître avant de choisir telle ou telle méthode. Elle doit être évaluée

- Vis-à-vis des substances pharmacologiques apparentées : Digitaline, Cédilanide (Deslanoside)
 - ◊ La digitaline interfère plus ou moins dans toutes les méthodes de dosage. Compte tenu des concentrations plasmatiques habituelles de digitaline, une interférence de seulement 3 % peut conduire à surestimer une digoxinémie de 1 µg/l
 - ◊ La Cédilanide est un digitalique utilisé par voie parentérale et il est intéressant de pouvoir suivre cette thérapeutique par des dosages plasmatiques. Il faut donc que la réactivité de la Cédilanide soit proche de celle de la digoxine. Une réaction croisée de 100 % est souhaitable.
- Vis-à-vis des métabolites inactifs : Digoxigénine, et dérivés dihydrodigoxine. La plupart des méthodes dosent la digoxigénine de la même façon que la digoxine, or il s'agit d'un métabolite inactif qui peut être présent dans certaines circonstances. Les méthodes les plus récentes ne semblent pas doser ce métabolite mais l'information n'est pas toujours indiquée sur les fiches techniques. Les dérivés mono et bis digitoxoside de la digoxigénine qui conservent une activité pharmacologique sont habituellement dosés avec la digoxine (8).
- Spécificité vis-à-vis des substances « digoxine-like » (DLIS) mises en évidence dans les sérums d'insuffisants rénaux, d'insuffisants hépatiques, de nouveau-nés, de femmes enceintes (8). Ces DLIS dépourvus d'activité digitalique perturbent le dosage de la digoxine en surestimant le résultat. Ils sont certainement de nature différente chez les insuffisants rénaux ou hépatiques, les femmes enceintes et les nouveau-nés (substances hormonales) et ils perturbent les tests immunologiques de manière variable. Le comportement des méthodes disponibles vis-à-vis des DLIS doit être considéré. Là encore, les méthodes les plus récentes (Emit 2000, On line, Access...) sont moins sensibles à la présence des DLIS (9) (10).
- Le dernier point à envisager est le comportement des différentes méthodes pour le suivi d'un patient intoxiqué et traité avec les fragments Fab antidigoxine (Digibind) pour lequel il faut mesurer la digoxine libre active, non bloquée par les anticorps thérapeutiques. Toutes les méthodes utilisant une compétition entre digoxine et digoxine conjuguée vis-à-vis d'anticorps, sont complètement perturbées par la présence des fragments Fab et ne sont pas utilisables dans ce contexte. Le TDx nécessite une déprotéinisation avant le dosage. Cette étape libère théoriquement la digoxine liée aux fragments Fab, précipite ces fragments et permet de doser la digoxine totale. Cependant, la libération de la digoxine semble inconstante au cours de cette étape lorsque la concentration en fragments Fab est très importante. Les méthodes immunologiques séquentielles (type Stratus, Opus) semblent pouvoir apprécier la concentration exacte de digoxine restée libre réellement active (11-12). Cette information est malheureusement souvent absente des fiches techniques. En cas d'interférence connue une méthode d'ultrafiltration préalable au dosage a été préconisée mais notre expérience personnelle a montré qu'une certaine quantité de digoxine libre ne passait pas au travers du filtre.

V.2- Critères de praticabilité

La RIA, méthode la plus ancienne, est soumise aux contraintes légales de maniement des isotopes radioactifs, elle est entièrement manuelle, longue et non adaptable à l'urgence.

La méthode Elisa Boehringer est également difficile à utiliser en urgence.

Tableau I : Méthodes immunologiques en phase hétérogène

PRINCIPE FOURNISSEUR CODE APPAREIL	Séquentiel MEIA	Séquentiel FIA	Séquentiel FIA	Compétition ELFA	Compétition LUMINES- CENCE	Compétition ENZ LUMI- NESCENCE	Séquentiel ENZYMA- TIQUE	Compétition ENZYMA- TIQUE	Compétition ENZYMA- TIQUE	Compétition ENZYMA- TIQUE	Compétition REFLEC- TOMETRIE	Séquentiel REFLECTO ARIS
	ABBOTT DJ AXSYM	DADE E2 STRATUS	BEHRING DA OPUS	BIOMERIEU DB VIDAS	CHIRON SI ACS	SANOFI QE ACCESS	DADE VQ DIMENSION	BAYER N7 IMMUN01	SERONO M5 SRI	MERCK MAGIA	ORTHO 3K VITROS	BAYER U7 CLINIMATE
PERFORMANCES répétabilité: CV % reproductibilité: CV % Fonct. de la conc. et des appareils	3,2 à 6 1,4 à 2,9	2,2 à 4,3 2,2 à 6,4	5,5 à 6,4 3,3 à 4	? ?	2,2 à 6,4 3,6 à 8,6	3,2 à 5,7 4 à 7,5	1 à 4,1 1,8 à 5,2	2,4 à 6,4 4,2 à 8,2	3,9 à 4,2 6,3 à 8,1	? ?	3,8 à 5,4 4 à 12,8	3,6 à 7,8 1,5 à 6,7
Limite de détection, µl linéarité, µl	0,3 4	0,3 4	0,25 4	0,2 4	0,1 5	0,2 6	0,06 5	0,04 6	0,2 5	0,4 - 5	0,4 4	0,3 5
exactitude/RTA exactitude/FPIA *	0,95X+0,08	?	?	?	1,02X+0,02	?	1,10X+0,02	1,04X+0,1	1X+0,07	?	0,98X+0,05	0,98X+0,06 1,05X+0,06
INTERFÉRENCES % de réaction croisée												
Digitoxine ou digitaline	2	< 0,1	< 0,1	1,6	< 1	2,9	11	< 0,1	12,4	4	18	+++?
deslanoside ou cedilanide	?	?	30,6	55	?	?	?	?	?	89	?	+++?
met: digoxigénine	< 1	93	36	> 100	< 1	68	> 100	6	5	> 100	8	+++?
met: digoxigénine mono-digitoxoside	< 1	83	31	?	68	?	?	12	71	90	76	?
met: digoxigénine bis-digitoxoside	< 1	77	?	100	90	?	?	82	> 100	90	> 100	?
met: dihydrodigoxine	?	< 0,1	?	?	< 1	?	9	55	0,6	?	2	?
DLIS	+++	+++	+	?	+	++	+++	+++	+++	?	+++	non?
Fab (Digibind)	non?	non	non	+++	+ si Fab+++	?	non?	+++	+++	?	+++	?
autres interférences			Résultats Plasma « sérum						hem+++, Lact +++ PAL..		Hem+++ Ict +++, NAC	
ANTICORPS MONOCLONAUX	non	non	oui	non	oui	non	non	oui	oui	non	oui	oui

* X = meth testée

y = HPLC OU FPIA

Les autres techniques immunoturbidimétriques, polarisation de fluorescence, immunoenzymofluorimétriques, immunoenzymatiques sont facilement automatisées ; elles sont rapides, utilisables au coup par coup, en garde et en urgence à des coûts équivalents. Elles diffèrent par les conditionnements proposés, la fréquence des calibrations, le nombre d'étalons.

■ VI. CONCLUSION

Un laboratoire choisira telle ou telle technique essentiellement en fonction de son équipement un laboratoire de pharmacologie utilisera vraisemblablement une méthode FPIA, Emit ou MEIA alors qu'un laboratoire polyvalent utilisera son équipement de biochimie ou son matériel d'immuno-dosages. En fonction du nombre de dosages par jour, les principaux critères de choix sont la praticabilité et le coût. En effet toutes les techniques d'utilisation courante offrent une sensibilité, une précision comparable ; elles ont toutes une certaine difficulté à mesurer avec précision des concentrations basses. On peut cependant noter que les meilleures performances en terme de précision sont obtenues sur les analyseurs à réactifs captifs.

Dans tous les cas, le biologiste doit connaître parfaitement les limites de la méthode utilisée surtout au niveau de la spécificité afin de rendre des résultats fiables et interprétables.

Tableau II : Méthodes immunologiques en phase homogène

PRINCIPE	Compétition ÉMIT	Compétition EMIT	Compétition FPIA	Compétition FPIA	Compétition TURBIDIMÉTRIE	Compétition CEDIA	Compétition TURBIDIMÉTRIE
FOURNISSEUR	2000 BEHRING	DADE	ABBOTT	Thera trak MERCCK	Tina-Quant BOEHRINGER	BECKMAN	On-line ROCHE
CODE	VB	VQ	IJ	IM	HD	UK	5R/5Z
APPAREIL	<u>MIRA et autres</u>	<u>ACA</u>	<u>TDX</u>	<u>ÉCLAIR</u>	<u>HITACHI</u>	<u>CX</u>	<u>MIRA / INTÉGRA</u>
PERFORMANCES							
répétabilité : CV %	1,7 à 10,1	1,7 à 5,7	2,5 à 6,8	?	?	2,9 à 7,5	2,1 à 2,8
reproductibilité: CV%	2,3 à 10,1	1,9 à 7,8	2,2 à 4,8	?	?	3,9 à 11,7	3 à 9,5
Fonct. de la conc. des appareils							
limite de détection, µl	0,2	0,15	0,2	?	0,15	0,2	0,07
linéarité, µl	5	5	5	5	7,5	4	5
exactitude/RIA			0,90+0,08				
exactitude/FPIA	1,05X - 0,01	1,00X + 0,05		?	?	1,05 x - 0,02	1, x + 0,04
INTERFÉRENCES							
% de réaction croisée							
digitoxine ou digitaline	6	11	3,6	1,9	5,6	11	15
deslanoside ou cedilane	62	?	?	> 100	95	2,6	?
met: digoxigénine	> 100	93	> 100	> 100	6,4	59	7
met: digoxigénine mono-digitoxoside	?	?	> 100	> 100	> 100	> 100	70
met: digoxigénine bis-digitoxoside	?	?	> 100	> 100	> 100	0,1	84
met : dihydrodigoxine	24	27	12	2,1	1,8		4
DLIS	+	++	+++	?	?	+++	+
Fab (Digibind)	+++	+++	+	?	?	+++	+++
autres interférences		si lactescence +++	si lactescence +++	si hem+++, Protéines+++		AC hétérophiles	
ANTICORPS MONOCLONAUX	non	?	non	non	?	oui	oui

BIBLIOGRAPHIE

- (1) MILES M.V. and al., Determination of salivary digoxin with a dry strip immunometric assay, *Ther Drug Monit*, 1992, 14 (3) : 249-254.
- (2) DODDS H.M. and al., Evaluation and comparison of The TDX II, Stratus and Opus :digoxin assays, *Ther Drug Monit*, 1995, 17 (1) : 68-74.
- (3) SACCOIA N.C. and al., Enzyme-multipl ed immunoassay (Émit 2000) digoxin assay compared with fluorescence polarisation immunoassay and amerlex (125) 1 radioimmunoassay at two Australian centers, *Ther Drug Monit*, 1996, 18 (6) : 672-677.
- (4) FISCHER D.C, DRIESCH R., Comparison of différent assays for the détermination of digoxine in human serum, *Lab. Med.*, 1996, 20 (6) 335-340.
- (5) BONAGURA E. and al., Assessment of the immunoreactivity of digoxin metabolites and the cross reactivity with digoxin like immunoreactive factors in The Roche TDM ON LINE digoxin assay *Ther Drug Monit*, 1995, 17 (5) : 532-537:
- (6) MILLER J.J. and al., Analytical performance of a monoclonal digoxin assay with increased specificity on The ACS 180, *Ther Drug Monit*, 1996, 18 65-72:
- (7) TZOU M.C. and al., Specific and sensitive détermination of digoxin and metabolites in human serum by HPLC with cyclodextrin sol d-phase extraction and precolum fluorescence derivatization, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1995, 13 (2) : 1531-1540.
- (8) MARZULLO C. and al., Interférence of digoxin litre immunoreactive substances with four recent reagents for digoxin determination, *Ann. Biol. Clin.*, 1996, 54 (2) : 91-96.
- (9) SASIETA M., JIMENO P., Evaluation of five immunoassays for the determination of digoxin in serum, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1996, 34 (11) : 935-940.
- (10) DATTA P. and al., Effect of antibody specificity on results of selected digoxin immunoassays among various clinical groups, *Clin. Chem.*, 1996, 42 (3) : 373-379.
- (11) HONDA S.A. and al., Problems in determining levels of free digoxin in patients treated with digoxin immune Fab., *J. Clin. Lab. Anal.*, 1995, 9 (6) : 407-412.
- (12) UJHELYI M.R. and al., Determination of free serum digoxin concentrations in digoxin toxic patients after administration of digoxin Fab antibodies, *Ther Drug Monit*, 1992, 14 (2) : 147-154.

■ I. INTRODUCTION

Le Lithium est connu depuis le début du XIX^e siècle, mais ce ne fut qu'en 1949 que John Cade l'utilisa dans le traitement de l'accès maniaque. À la fin de la décade 1960-1970 plusieurs auteurs codifient la conduite du traitement par les sels de lithium, basée sur la mesure des concentrations sériques 12 heures après la prise de lithium du soir. Ce sont les psychiatres Danois Schou et Baastrup et Américains Gershon et Fieve qui furent les pionniers des traitements par les sels de lithium dans la prévention des rechutes de la maladie maniaco-dépressive.

Le lithium fut donc le premier médicament, tout du moins en psychiatrie, pour lequel il est apparu la nécessité de surveiller les concentrations plasmatiques et par la suite intracellulaires pour la conduite des traitements.

En Europe et aux USA environ 1 personne sur 1 000 est traitée par le lithium, ce qui correspond en France à 60 000 patients (10, 37). À raison d'une moyenne de 4 dosages par patient et par an, on peut donc évaluer le nombre de dosages annuels en France à 240 000, mais avec une répartition très inégale selon les laboratoires.

I.1- Indications des sels de lithium

Les troubles de l'humeur sont les seules indications ayant une base pharmacologique établie. L'autorisation de Mise sur le Marché en France (AMM) comporte deux indications : le traitement des accès maniaques et le traitement préventif des troubles maniaco-dépressifs.

Dans la classification des psychotropes le lithium fait partie des médicaments régulateurs de l'humeur : les thymorégulateurs ou normothymiques.

• La maladie maniaco-dépressive (34)

Maladie caractérisée par une perturbation de l'humeur (on entend par humeur, une émotion durable colorant toute la vie psychique) consistant en une alternance de phases d'excitation maniaque et de phases dépressives espacées par des intervalles de temps plus ou moins longs où le sujet est normal.

Le lithium a une action antimaniaque et une action préventive sur la récurrence des accès maniaques chez les sujets bipolaires.

• Les psychoses schizo-affectives ou schizophrénies dysthymiques (34)

Maladie consistant en un trouble chronique de l'humeur, avec accès dépressifs principalement ou d'excitation, associés à un trouble psychotique chronique tel une schizophrénie.

Le lithium est actif sur les accès maniaques, mais est généralement inactif sur les troubles du cours de la pensée, sur le délire et sur les hallucinations dépendants du trouble psychotique qui sont traités par les neuroleptiques.

Il entraîne une diminution des épisodes dépressifs ou maniaques avec cependant des résultats inférieurs à ceux obtenus dans la maladie maniaco-dépressive.

- **Les dépressions résistantes aux antidépresseurs (47)**

Le lithium permet de potentialiser l'effet des antidépresseurs et leur permet d'être actifs chez des patients chez qui ils sont inactifs lorsqu'ils sont utilisés seuls.

Dans un grand nombre d'autres affections psychiatriques ou non psychiatriques le lithium a été proposé par certaines équipes mais les effets bénéfiques n'ont pas encore été prouvés par des essais cliniques (46).

I.2- Les formes galéniques commercialisées en France

- Deux formes conventionnelles le Teralithe® (comprimés à 250 mg de carbonate de lithium) et le Neurolithium® (ampoules buvables à 5 ou à 10 mmol de gluconate de lithium) à absorption intestinale rapide nécessitant deux ou trois prises par jour.

- Une forme à libération prolongée le Teralithe® (comprimés à 400 mg de carbonate de lithium) permettant une seule prise par jour, le soir.

I.3- Pharmacocinétique du lithium (24)

I.3.1- Métabolisme du lithium

L'absorption intestinale, au niveau du duodénum et du jéjunum est rapide. Elle est presque totale en 6 à 8 heures et en l'absence de diarrhées on retrouve dans les selles moins de 5 % de la dose ingérée.

Le lithium circule dans le plasma sous forme libre non liée aux protéines. Après ingestion d'une dose unique de gluconate ou de carbonate de lithium, le lithium plasmatique atteint sa concentration maximale en 1 à 3 heures puis il décroît lentement ; dans les érythrocytes, le maximum est atteint en 5 heures. Après l'ingestion d'une dose unique de carbonate de lithium sous forme à libération prolongée (par exemple le Teralithe®) la concentration plasmatique maximale est atteinte en 4 heures

Le lithium passe mal la barrière hémato-encéphalique ; sa concentration dans le liquide céphalorachidien est de l'ordre de 1/3 de celle du plasma.. La pénétration du lithium dans le système nerveux central est lente et la concentration dans le cerveau reste très inférieure à celle des autres organes ; le maximum est atteint en 24 à 48 heures.

Les concentrations érythrocytaires à l'équilibre, sont un bon reflet des concentrations cérébrales.

Le lithium passe mal la barrière placentaire (les concentrations sanguines fœtales et maternelles sont identiques) et passe dans le lait maternel (la concentration dans le lait est d'environ la moitié de la concentration plasmatique).

La demi-vie varie énormément d'un sujet à l'autre, les valeurs les plus basses sont de l'ordre de 12 heures, les plus hautes de 41 heures, avec une moyenne de 24 heures. L'équilibre en cours de traitement, à posologie constante se fait donc au bout d'une semaine environ (5 à 7 demi-vies).

L'élimination du lithium est principalement rénale et pour la plupart des auteurs, 95 % du lithium ingéré sont éliminés danses urines. Le lithium est filtré à 100 % dans le glomérule et 75 % du lithium filtré est réabsorbé essentiellement au niveau du tube proximal. Le lithium se comporte comme le sodium au niveau du rein. Il existe une réabsorption compétitive du sodium et du lithium au niveau du tube proximal. En l'absence de sodium, le lithium est réabsorbé et inversement.

La clairance du lithium est de 15 à 30 ml/min soit le quart de celle de la créatinine chez le sujet ayant une fonction rénale normale. Elle est indépendante de la lithiémie, sauf pour des concentrations élevées pour lesquelles elle diminue.

1.3.2- Facteurs modifiant la pharmacocinétique du lithium

De nombreux facteurs peuvent modifier la pharmacocinétique du lithium (24) :

- . facteurs physiopathologiques : l'âge, l'insuffisance rénale, la transpiration, les diarrhées et les vomissements, l'exercice physique vont diminuer l'excrétion du lithium, le froid, le repos, la grossesse, lors du troisième trimestre, vont l'augmenter ; l'état psychiatrique peut aussi modifier les concentrations circulantes du lithium ;
- . facteurs alimentaires : un régime désodé entraîne une diminution de l'excrétion du lithium ;
- . interactions médicamenteuses : les salidiurétiques thiazidiques, les diurétiques agissant sur le potassium, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens vont entraîner une augmentation de la lithiémie, tandis que d'autres comme les corticoïdes, l'aminophylline, la caféine et la théophylline entraîneront une diminution.

1.4 Mécanismes d'action du lithium (24,51)

L'absence d'étiologie connue concernant les troubles de l'humeur complique la discussion concernant le mécanisme d'action du lithium dans le traitement de ces troubles.

Les hypothèses pathogéniques des troubles de l'humeur ont amené les chercheurs à s'intéresser aux activités du lithium dans deux principaux secteurs : celui des neuromédiateurs cérébraux et celui des processus membranaires et cellulaires (récepteurs, échanges ioniques, mécanismes transduction). Actuellement aucune de ces hypothèses n'a été confirmée.

Le dosage du lithium dans les milieux biologiques, principalement le sérum ou le plasma, est la clé de voûte de la surveillance des traitements par les sels de lithium. Il permet d'adapter la posologies de chaque patient afin de maintenir des concentrations dans une zone thérapeutique qui est très proche de la zone toxique. La majeure partie des traitements sont à titre préventif des rechutes de la maladie maniaco-dépressive, il n'apparaît donc pas d'effet clinique permettant d'ajuster le traitement (24).

Les modalités de la surveillance du traitement par les sels de lithium, qui dépendent de la forme utilisée, seront décrites dans le chapitre VI.

Les dosages doivent pouvoir être effectués au moins une fois chaque jour dans les laboratoires qui réalisent ce dosage, et 24 h sur 24 dans ceux qui peuvent être amenés à surveiller le traitement des intoxications par les sels de lithium.

Dans cette monographie ne seront détaillés que les dosages de lithium à des concentrations thérapeutiques ou toxiques dans le sérum ou le plasma, les globules rouges, l'urine et le liquide céphalo-rachidien par des méthodologies utilisées actuellement en France. Un certain nombre de données non référencées proviennent de notre expérience personnelle acquise lors d'essais effectués à la demande de la Commission Validation de Techniques (de la S.F.B.C. (Bernard Gouget, Denis Graffmeyer)) ou des fabricants d'automates.

■ II. CONDITIONS DE PRÉLÈVEMENT ET DE CONSERVATION DES SPÉCIMENS (22)

II.1- Le sang

Le prélèvement de sang se fera le matin 12 heures après la dernière prise de lithium de la veille (que l'on utilise une forme galénique conventionnelle ou une forme à libération prolongée). Éventuellement, on peut, pour des malades dont le traitement est difficile à équilibrer ou qui présentent des manifestations de toxicité après chaque prise, faire des prélèvements au cours de la journée avant et trois heures après chaque prise de lithium.

Le sang est recueilli sur des tubes :

sans anticoagulant, si on ne dose que le lithium sérique ;

- avec un anticoagulant ne contenant pas de lithium, ni des quantités importantes de sodium ou de potassium, si on veut doser le lithium plasmatique et le lithium globulaire.

→ sont utilisables

- les héparinoïdes de synthèse type anticlot® (Fumouze) ;
- l'héparinate de sodium ou de calcium.

→ sont à exclure

- l'héparinate de lithium, la quantité contenue dans les tubes augmente les concentrations de 0,6 à 1,5 mmol/l ;
- le citrate de sodium ;
- les sels de sodium ou de potassium de l'EDTA ;
- l'oxalate de potassium.

Lors des dosages avec la photométrie de flamme, avec étalon interne potassium, des concentrations importantes de potassium dans le spécimen vont modifier la concentration de l'étalon interne dans la dilution de travail. Lors des dosages avec les électrodes sélectives et avec la méthode réflectométrique sur l'analyseur Vitros les concentrations en sodium et éventuellement en potassium vont interférer sur les dosages si elles diffèrent fortement de celles rencontrées dans les sérums.

La séparation du sérum ou du plasma des hématies doit être effectuée rapidement, afin d'éviter la diffusion du potassium dans le sérum ou le plasma, et celle du lithium dans les hématies. On dispose de trois à quatre heures après le prélèvement pour effectuer la séparation. Si le prélèvement doit voyager pendant un temps plus long, il est nécessaire de séparer le plasma ou le sérum du culot d'hématies.

La conservation se fait au frais à + 4°C ou par congélation à - 20°C. On évitera absolument la dessiccation des échantillons qui est surtout à craindre lorsque l'on place des tubes en matière plastique dans un congélateur. Il faut noter que pour des dosages avec l'analyseur Vitros il ne faut pas utiliser des spécimens congelés. En effet la congélation précipite certaines protéines ce qui diminue la viscosité des spécimens et entraîne des valeurs plus élevées.

Lorsque l'on effectue le dosage dans le sérum ou le plasma avec un photomètre de flamme à étalon interne potassium, à l'aide d'électrodes sélectives ou avec l'analyseur Vitros l'hémolyse n'est gênante que dans la mesure où elle augmente la concentration en potassium au-dessus de 9 mmol/l, ce qui correspond à environ 6 g/l d'hémoglobine (soit 0,4 mmol/l).

Le dosage du lithium plasmatique sur le sang total est possible avec les appareils à électrodes sélectives en potentiométrie directe. Ce dosage sur sang total avec les appareils actuels est à proscrire pour des raisons qui seront décrites au chapitre III.

Si l'on veut effectuer un dosage dans les hématies, on centrifuge l'échantillon de sang prélevé sur anticoagulant, pendant 15 minutes à 4 000 t/min, puis on élimine la totalité du plasma. Le culot globulaire contient toujours une petite quantité de plasma interstitiel, plasma « trappe » qui est de l'ordre de 3 % (2) : son incidence sur le dosage du lithium érythrocytaire étant faible, on peut ne pas en tenir compte, ce qui évite de laver les hématies, cette manipulation pouvant diminuer leur concentration en lithium.

Lors du dosage du lithium érythrocytaire avec les électrodes sélectives, il faut noter que les spécimens ne devront pas être conservés plus d'une semaine au réfrigérateur ou à - 20 °C, car des substances provenant du sang (principalement l'ion ammonium) ou des thérapeutiques absorbées par les malades (psychotropes : phénothiazines, butyrophénones ; antibiotiques...) peuvent s'altérer et donner une activité majorant ou même parfois diminuant faussement les mesures.

Les mécanismes de ces interférences sont multiples et ne sont pas entièrement connus, il s'agit soit d'une activité électrique identique au lithium au niveau de la membrane ; soit d'une modification transitoire de la sélectivité de la membrane par dissolution des substances interférentes dans celle-ci.

Nous n'avons rencontré ces interférences que rarement, mais elles étaient imprévisibles (23) et leur amplitude augmentait avec le temps de conservation.

II.2- L'urine

Le dosage se fera sur les urines de 24 heures sans conservateur.

Pour présenter un intérêt ce dosage doit se faire chez un malade ayant une posologie constante depuis au moins une semaine.

Si l'urine présente un dépôt, en général de phosphate ou de carbonate, il faut le dissoudre si cela est possible avec de l'acide acétique ou bien le remettre en suspension homogène, car il peut contenir du lithium.

Le dosage du lithium urinaire avec les électrodes sélectives est possible avec certains automates, sur urine fraîche (non alcaline), après dilution dans une solution contenant du sodium de manière à obtenir des concentrations en sodium et en potassium proches de celles du sérum. Certains fabricants proposent des solutions de dilution tamponnées pour le dosage du sodium et du potassium. On ne doit, bien sûr, pas dissoudre le dépôt avec de l'acide acétique car on fausserait les mesures en modifiant le pH.

Pour mesurer la clairance du lithium on peut effectuer le recueil sur 4 ou 6 heures, 3 heures après une prise de lithium, la concentration plasmatique étant alors stable. En effet, après une prise de lithium, on observe un pic de concentration plasmatique situé entre 1 et 3 heures après l'absorption, puis la concentration décroît lentement l'absence de nouvelle prise. Le prélèvement de sang se fait au milieu de la période de recueil de l'urine.

Si pour mesurer cette clairance on recueille les urines sur 24 heures, il faut mesurer la concentration du lithium plasmatique au cours de ces 24 heures sur au moins 6 prélèvements (avant et 3 heures après chaque prise) ; puis, tracer la courbe donnant les concentrations en fonction du temps, et prendre la concentration moyenne déduite de la courbe comme concentration de lithium plasmatique pour calculer la clairance.

II.3- Le Liquide céphalo-rachidien (7)

Le recueil se fait dans un tube sans additif.

Le dosage du lithium dans le liquide céphalo-rachidien ne présente pas d'intérêt pour la surveillance des traitements, mais peut être effectué dans le cadre de travaux de recherche. Les concentrations du lithium dans le liquide céphalo-rachidien sont de l'ordre du tiers des concentrations plasmatiques.

■ III. PRINCIPES DES MÉTHODES D'ANALYSE ACTUELLEMENT UTILISÉES

Les concentrations à mesurer sont comprises entre 0,05 et 10,00 mmol/l correspondant à celles obtenues lors des traitements (0,05 à 1,50) ou lors des intoxications (1,50 à 10,00). La mesure des concentrations physiologiques (12, photométrie de flamme : $3,5 \pm 1,0 \mu\text{mol/l}$; 40, spectrophotométrie d'absorption atomique en four graphite : $0,16 \pm 0,08 \mu\text{mol/l}$) ne présente pas actuellement d'intérêt physiopathologique.

En France, lors du Contrôle National de Qualité des Médicaments de juillet 1996 (1), 1446 laboratoires de Biologie Médicale dosaient le lithium. La répartition selon les principales techniques utilisées était

Émission atomique avec étalon interne	: 54,1 %
Émission atomique sans étalon interne	: 8,3 %
Absorption atomique	: 3,3 %
Potentiométrie directe	: 15,0 %
Potentiométrie indirecte	: 1,3 %
Réflexométrie	: 15,0 %

Lors du Contrôle National de Qualité de Biochimie de mars 1994 le nombre de participants pour le dosage du lithium était de 2900, car beaucoup de laboratoires dosent seulement le lithium et n'ont pas participé au Contrôle National de Qualité des Médicaments de juillet 1996 (1).

La photométrie de flamme par émission atomique est donc la méthodologie la plus utilisée devant les électrodes sélectives et la spectrophotométrie d'absorption atomique. Les premiers appareils pour mesurer les concentrations de métaux furent commercialisés en 1945 pour les photomètres de flamme et en 1955 pour les spectrophotomètres d'absorption atomique.

Actuellement les méthodologies utilisant les électrodes sélectives au lithium se développent et on peut penser que comme pour les autres ions (principalement : sodium, potassium et calcium) elles remplaceront à plus ou moins longue échéance les autres modes de mesure car elles sont d'utilisation plus simple.

Enfin, des techniques de dosages du lithium par colorimétrie ont été récemment proposées (8, 9). Elles sont en général peu sensibles dans la zone des concentrations thérapeutiques, mais leur développement permettra peut-être de simplifier ces dosages qui seront réalisables sur des automates de biochimie. Une adaptation en réflexométrie a été faite sur l'analyseur Vitros avec des résultats acceptables (14). Elle est utilisée par 15 % des laboratoires.

La plupart des méthodologies décrites dans cette monographie sont utilisables pour doser le lithium érythrocytaire moyennant quelques manipulations supplémentaires par rapport au dosage du lithium plasmatique ou sérique (2, 13, 22, 23, 49).

III.1- La photométrie d'émission de flamme (22, 53)

Le dosage du lithium dans les milieux biologiques par photométrie de flamme est la technique de choix, car les atomes de lithium sont facilement excitables dans une flamme. Seligson en 1959 (48) puis Boling en 1964 (5) ont mis en évidence l'intérêt d'utiliser des photomètres de flamme avec un étalon interne pour doser les ions (potassium pour doser le lithium) ce qui élimine ainsi toutes les variations dues à l'appareillage au cours de l'analyse. Kelley en 1978 (27) a mis au point un appareil à étalon interne césium qui élimine lors du dosage du lithium les problèmes de contamination par la solution d'étalon interne lithium, utilisée pour les dosages du sodium et du potassium sur les appareils du type précédent. Cette méthodologie présente actuellement la meilleure reproductibilité interlaboratoire.

III.1.1- Description du principe

Le dosage du lithium se fait sur des photomètres de flamme effectuant le dosage du sodium et du potassium. Ils sont pour la plupart alimentés en propane et sont équipés des filtres interférentiels suivants

- 670 nm, pour le lithium ;
- 766 nm, pour l'étalon interne potassium ;
- 852 nm, pour l'étalon interne césium.



L'affichage des résultats se fait au centième ou au dixième (pour des appareils peu précis) de mmol/l. Le volume d'échantillon nécessaire est compris entre 20 et 200 μ l.

Les étalons et les spécimens sont dilués

- dans le cas d'un étalon interne potassium : du 1/40e au 1/100e, dans une solution de potassium de concentration variant entre 0,75 et 4 mmol/l (suivant le type d'appareil) ;
- dans le cas d'un étalon interne césium : au 1/100e dans une solution de césium de concentration 1,5 mmol/l.

Les solutions d'étalon interne se présentent soit sous forme diluée, soit sous forme concentrée, qu'il faudra diluer de manière manuelle ou automatique avant l'emploi. Ces solutions contiennent des additifs (principalement des tensioactifs) dont le rôle est de prévenir l'encrassement de la chambre d'atomisation et de limiter les contaminations d'un spécimen à l'autre.

La dilution pourra être soit manuelle, soit effectuée avec un diluteur automatique discontinu à seringue ou un diluteur en continu à pompe péristaltique, le diluteur étant souvent incorporé dans l'appareil.

Certains appareils peuvent être équipés d'un passeur automatique d'échantillons.

Dans le cas où l'on utilise un étalon interne potassium, l'installation de l'appareillage et l'organisation du travail devront impérativement empêcher toute contamination du matériel, des réactifs, des étalons et des échantillons par la solution concentrée de l'étalon interne lithium (en général 200 à 3 000 mmol/l) qui est utilisée pour le dosage du sodium et du potassium. Lorsque l'on passe du dosage du sodium et du potassium à celui du lithium le rinçage du système de dilution (si c'est le même) et de la chambre d'atomisations devra être soigneux, afin d'éliminer toute trace de lithium.

III.1.2- Étalonnage

Il s'effectue en général en deux points :

- point de concentration 0,00 mmol/l;
- point de concentration aux environs de 1,00 mmol/l, dont la valeur peut être imposée pour certains appareils.

La calibration est stable 15 minutes.

Les calibrateurs doivent contenir des concentrations en sodium et en potassium proches de celles du plasma normal (en général 140 mmol/l pour le sodium et 4 à 5 mmol/l pour le potassium). On n'utilise donc pas d'étalons primaires. La viscosité des calibrateurs n'intervient pas avec une dilution manuelle ou automatique discontinue, mais avec un diluteur en continu à pompe péristaltique ils doivent être isovisqueux au plasma, les solutions de calibration doivent donc contenir des additifs ou bien être des sérums bovins surchargés en lithium.

III.1.3- Caractéristiques et performances analytiques des appareils

- **Linéarité** : de 0,05 à 5,00 mmol/l pour la plupart et 10 mmol/l pour l'IL 943 à étalon interne césium.
- **Précision** :

◇ Intra laboratoire :

Concentration en lithium mmol/l	0,20 – 0,50	0,50 – 1,00	1,00 – 1,50
CV % intrasérie	3	2,5	2,5
CV % intersérie	4	3	3

Limites acceptables pour la précision intra-laboratoire.

Dans le cas où l'on observerait une mauvaise répétabilité, il faut penser à un mauvais fonctionnement du diluteur et effectuer les mesures en mode prédilué (ce qui est possible sur tous les appareils) afin de mettre en évidence l'éventuel rôle du diluteur dans ce dysfonctionnement.

◇ Inter laboratoire :

Concentration en lithium mmol/l	Photomètres avec étalon interne	Photomètres sans étalon interne
0,37	19,8	13,0
1,17	6,7	6,6

D'après le Contrôle National des Médicaments de juillet 1996 (1),
Tous appareils de chaque type confondus

- **Interférences dues aux concentrations en sodium et en potassium des spécimens**

Le dosage du lithium par photométrie de flamme se fera sur des spécimens contenant, comme les solutions utilisées pour l'étalonnage, des concentrations de sodium et de potassium proches des

concentrations plasmatiques physiologiques, les extrêmes tant pour le sodium de 110 à 170 mmol/l et pour le potassium de 1 à 8 mmol/l. Avec les photomètres à étalon interne potassium, ce sont surtout les concentrations en potassium qui vont avoir une influence en modifiant la concentration de cet étalon interne de manière d'autant plus importante que celui-ci aura une concentration basse dans la dilution de travail et que cette dilution sera faible.

Dans le cas des photomètres sans étalon interne ou à étalon interne césium les interférences dues au sodium et au potassium dépendront de la sélectivité du filtre lithium, sélectivité qui peut varier avec le vieillissement de ce filtre.

III.1.4- Dosage du lithium érythrocytaire

Le dosage dans les hématies est effectué après défécation par l'acide trichloroacétique, ce qui évite d'encrasser le brûleur et diminue la viscosité de la solution, à condition d'utiliser le potassium des hématies comme étalon interne (2, 22). On peut utiliser un photomètre de flamme à étalon interne césium, ce qui simplifie les manipulations car la concentration en potassium des hématies n'intervient plus (22).

III.1.5- Dosage du lithium urinaire

Le dosage dans l'urine est possible à condition de la diluer dans une solution contenant du sodium (les concentrations urinaires du lithium sont élevées) afin d'amener les concentrations du sodium et du potassium à un niveau proche de celles du plasma, ce qui permet d'effectuer un étalonnage avec les solutions utilisées pour le sérum ou pour le plasma.

Il faut noter que le sodium interfère de manière presque négligeable sur le canal lithium et que l'on peut éventuellement ne pas ajuster sa concentration mais ceci doit être testé avec chaque appareil (22).

III.2- La spectrophotométrie d'absorption atomique (53)

Le brûleur fonctionne avec un mélange d'acétylène et d'air (2000°K) ou d'oxygène (3200°K) de façon à obtenir des atomes libres dans la flamme.

L'absorption atomique permet de doser les éléments qui sont thermiquement peu excitables et donc difficiles à évaluer par la photométrie de flamme, ce qui n'est pas le cas du lithium. Elle est cependant applicable au dosage du lithium pour lequel elle a été longtemps la méthode de référence lorsque les photomètres de flamme étaient moins performants. La linéarité de cette méthodologie est moins élevée que celle obtenue en photométrie de flamme (de 0,00 à 3,00 mmol/l) mais la précision intra- et extra-laboratoire est meilleure que celles observées avec les autres.

Cette méthodologie étant de moins en moins répandue nous ne la détaillerons pas.

III.3- Les électrodes sélectives au lithium

Les principes généraux de fonctionnement des électrodes sélectives aux ions sont décrits dans les articles de Gouget et roll. (15), Maas (35), Mollard (41), Sachs (45) et de Xie et Christian (53).

Il est à souligner que l'on ne mesure pas une concentration de l'ion considéré mais une activité, qui n'est pas liée exclusivement à sa concentration mais à celle de tous les ions présents dans le milieu (41). Xie et Christian(53) en 1986 ; Metzger et coll. (39) et Kimura et roll. (29), en 1987 furent parmi les premiers auteurs à décrire des électrodes sélectives au lithium. Ces électrodes

présentaient une membrane sélective constituée d'un fin film de polymère dans lequel un réactif complexant le lithium était retenu. Les membranes sont formées des constituants suivants :

- Un ionophore qui assure la sélectivité au lithium et qui peut être :
 - ◊ un éther-couronne (29) : dodécylméthyl-14-couronne-4 ; dibenzyl-14-couronne-4 ; (diéthylcarbamoylméthyl)dodécyl-14-couronne-4 ;
 - ◊ des molécules complexes référencées sous le terme de ETH (39) : ETH 1810; ETH 2137.

Certaines molécules complexes proches de ces ionophores peuvent être utilisées pour doser le lithium par des méthodes spectrophotométriques car leur spectre d'absorption varie selon qu'elles ont ou non complexé un ion lithium. Elles sont cependant très coûteuses et leur usage est réservé à la recherche (53).

- Un polymère pour retenir le ionophore et qui est en général du chlorure de polyvinyle (PVC).
- Des plastifiants et des additifs qui permettent la polymérisation de la membrane et lui confèrent un certain degré de lipophilie, influent sur le temps de réponse et sur la durée de vie de l'électrode.

D'après Lewenstam (31) et Metzger et coll. (39) une électrode vraiment sélective au lithium n'existe pas. Elles répondent toutes plus ou moins au sodium, voire même au potassium. L'interférence due au sodium est surtout importante pour les concentrations en lithium basses. La mesure du lithium doit donc inclure des corrections en fonction de la concentration en ions sodium présents dans la solution à analyser. Les instruments sont équipés de microprocesseurs qui effectuent des corrections en fonction des concentrations des ions interférents à condition qu'elles restent dans certaines zones de valeurs autour de celles que l'on rencontre normalement dans le plasma. Pour être utilisable une électrode doit être au moins 100 fois plus sensible au lithium qu'au sodium.

Pour les mesures des concentrations de lithium sérique, les études comparant les électrodes sélectives aux ions avec la photométrie de flamme et la spectroscopie d'absorption atomique montrent une bonne corrélation (r proche de 0,99). La répétabilité et la reproductibilité obtenues avec les électrodes sélectives aux ions sont proches de celles obtenues avec la photométrie de flamme et la spectroscopie d'absorption atomique (15, 42)

Birch (3), spécialiste du dosage du lithium en Grande Bretagne, fait l'éloge du dosage du lithium par les électrodes sélectives en insistant sur l'intérêt des mesures du lithium plasmatique sur sang total avec les appareils fonctionnant en potentiométrie directe (seul le compartiment plasmatique est en contact avec la membrane de l'électrode), dans ce cas la centrifugation est supprimée.

Cette praticabilité des mesures sur sang total permet de rendre un résultat au patient venant en ambulatoire lors de la consultation auprès du clinicien, qui peut ainsi ajuster le traitement au cours de celle-ci. Tandis qu'avec les autres techniques de dosage, les concentrations plasmatiques du lithium étaient transmises au médecin au mieux quelques heures après le prélèvement de sang, ce qui imposait une nouvelle consultation pour modifier le traitement.

La surveillance des traitements par les sels de lithium devient donc moins lourde et donc moins coûteuse. Cette praticabilité de la mesure du lithium sur sang total est mentionnée par de nombreux autres auteurs (26, 30, 44).

Nous verrons à partir des observations que nous avons faites que ce n'est pas aussi simple que le disent Birch et coll. et que les dosages de lithium sur sang total sont à proscrire avec les appareils actuellement disponibles en 1997.

III.3.1- Description du principe

Les électrodes à lithium se trouvent sur des automates qui permettent la mesure simultanée du sodium et du potassium (mesures nécessaires à la correction de la valeur en fonction de la concentration en sodium et parfois en potassium). Certains permettent en plus la mesure du chlore, des bicarbonates, du calcium. Ce sont des semi-automates qui nécessitent la présence d'un manipulateur pendant la durée des mesures, mais la plupart peuvent être équipés d'un passeur automatique d'échantillons.

Certains automates multiparamétriques de biochimie mesurant les ions avec des électrodes peuvent recevoir une électrode à lithium qui aura une durée de vie réduite si elle reste en permanence à bord de l'appareil ou qui séchera si on l'enlève.

- L'affichage se fait au centième de mmol/l et les valeurs ne sont rendues qu'au-dessus de 0,10, voire 0,20 mmol/l.

- Les mesures se font, suivant l'appareil, selon deux types de méthodologies

- ◊ soit en potentiométrie directe : l'échantillon non dilué est en contact avec la membrane de l'électrode, c'est le cas sur la majorité des automates qui nécessitent un volume d'échantillon de l'ordre de 80 à 200 μ l la dilution est automatique

- ◊ soit en potentiométrie indirecte : c'est une dilution de l'échantillon qui est en contact avec la membrane de l'électrode, qui doit être plus sensible et donc avoir une surface plus grande que pour les mesures en potentiométrie directe. Cette méthodologie est moins sensible aux interférences comme la concentration en protéines et en lipides de l'échantillon. Le volume d'échantillon nécessaire est de l'ordre de 20 à 50 μ l.

- Les cycles de mesures durent de 30 à 60 secondes suivant le temps nécessaire à l'obtention d'une différence de potentiel stable.

- Chaque mesure sur un spécimen est suivie d'un lavage par une solution de référence (en général un des étalons) puis d'une mesure (sur cette solution de référence) ce qui permet de corriger toute dérive des électrodes au cours des mesures (ce principe se rapproche de la photométrie de flamme avec étalon interne, bien que les mesures soient consécutives et non simultanées) et limite les contaminations d'un spécimen à l'autre.

- Les spécimens, les solutions de calibration (qui sont toujours fournies par les fabricants) et les contrôles doivent avoir un pH et force ionique dont les limites sont plus ou moins importantes selon le type d'appareil principalement en potentiométrie directe. Dans certains cas les mesures sont impossibles sur des solutions sans protéines à moins d'ajouter un tampon dont l'identité est tenue secrète par le fabricant car il entre dans la composition des solutions de calibration ou de dilution pour le dosage du sodium et du potassium dans l'urine.

- Le coût du dosage est représenté par les solutions de calibration (elles servent aussi à calibrer les autres paramètres mesurés par l'appareil) et surtout par l'électrode. La majorité sont sans entretien mais elles ont une durée de vie et un prix très variable d'un fabricant à l'autre. Sur certains appareils, cette durée de vie peut être augmentée en retirant l'électrode, lorsqu'on n'effectue pas de dosage de lithium et en la remplaçant par une électrode fantôme. Lorsque l'on a retiré l'électrode, il faut la placer dans une solution fournie par le fabricant de manière à ce qu'elle ne se dessèche pas.

Au cours de leur vieillissement ces électrodes à lithium ont leur sensibilité au lithium et aux autres ions qui varie parfois de façon importante. Les corrections des valeurs mesurées en fonction des concentrations en sodium et parfois en potassium. sont effectuées avec un algorithme fixe qui ne tient pas compte de ce vieillissement.

Le coût en réactifs et en consommables est de l'ordre de 1 à 3 F par mesure, ce qui n'est pas négligeable.

Les appareils sont simples à utiliser et toujours immédiatement disponibles pour un dosage en urgence. La maintenance est réduite.

III.3.2- Étalonnage

Il s'effectue le plus souvent en deux points :

- point de concentration basse de 0,30 à 0,50 mmol/l,
- point de concentration haute de 1,00 à 5,00 mmol/l.

L'amplitude de l'étalonnage conditionne la zone de linéarité de l'appareil.

Les calibrations sont automatiques (les solutions de calibration étant à bord de l'appareil) et sont stables de 2 à 8 heures suivant l'appareil.

III.3.3- Caractéristiques et performances analytiques des appareils

• **Linéarité:** elle est en général acceptable au moins de 0,20 à 4,00 ou 5,00 mmol/l avec presque toujours une légère distorsion de la courbe qui n'est pas vraiment une droite. Elle est excellente dans la zone de valeurs allant de 0,80 à 2,00 mmol/l. Par addition d'une quantité précise de lithium (1,00 mmol/l) sous un faible volume (1/20e) aux spécimens de basses concentrations on peut augmenter l'exactitude des mesures car les valeurs mesurées se trouvent alors dans la zone de valeurs où la linéarité est la meilleure.

• **Précision :**

◇ Intra laboratoire : Voir le tableau indiqué pour la photométrie de flamme au paragraphe **III.3.3**. Pour des concentrations en lithium basses ces limites sont souvent dépassées.

◇ Inter laboratoire :

Concentration en lithium mmol/l	Photomètres avec étalon interne	Photomètres sans étalon interne
0,37	17,1	11,1
1,17	7,6	11,9

D'après le Contrôle National des Médicaments de juillet 1996 (1),.

• **Corrélation avec la photométrie de flamme**

Elle est le plus souvent excellente, pour des valeurs situées au-dessus de 0,70 mmol/l, mais mauvaise en dessous.

• **Interférences dues au sodium et au potassium**

Les appareils sont programmés pour corriger les valeurs de concentration en lithium en fonction des concentrations en sodium et éventuellement en potassium. La correction est définie une fois pour toutes de manière fixe, elle ne tient pas compte du vieillissement des électrodes sélectives au lithium.

Une interférence peut avoir son site d'action soit sur l'électrode au lithium, soit sur les électrodes au sodium et/ou au potassium, dans ce cas c'est la correction correspondant au sodium et/ ou au potassium qui entraîne l'interférence.

Dans la limite des valeurs plasmatiques physiologiques l'interférence due au sodium et au potassium est faible. Mais dans le cas de mesure dans les globules rouges ou dans l'urine l'interférence due au potassium est loin d'être négligeable et avec l'urine apparaît en plus une l'interférence due à l'ion ammonium sur les trois électrodes.

Il faut noter que lorsque l'on teste l'interférence due au sodium ou au potassium sur la mesure du lithium, on met en évidence la somme de deux ou trois phénomènes

- * l'interférence due à l'ion sur l'électrode à lithium,
- * la correction due au logiciel de l'appareil en fonction de la concentration en sodium et en potassium,
- * l'interférence due à l'ion sur l'autre électrode (à sodium dans le cas de l'interférence due au potassium, et inversement) par la correction qu'elle entraîne.

• **Interférence due à l'ion ammonium**

Elle est en général positive et peut entraîner une augmentation de l'ordre de + 0,10 mmol/l pour une concentration en ions ammonium de l'ordre de 50 mmol/l. Cette concentration est rarement rencontrée dans le plasma, même altéré, mais est fréquente dans l'urine ou se sont développées des bactéries dégradant l'urée.

• **Influence de l'eau plasmatique**

Avec les appareils mesurant le lithium en potentiométrie directe, on observe des différences avec les valeurs mesurées en photométrie de flamme d'autant plus importantes que l'on s'éloigne d'une concentration en protéines de 70 g/l. Ainsi pour une concentration en protéines de 120 g/l, une solution contenant 1,00 mmol/l de lithium donnera une valeur de 1,08 mmol/l: soit + 8 % sur la plupart des appareils. Avec une concentration en protéines de 20 g/l on obtiendra une valeur diminuée de 8 %.

Les appareils mesurent les concentrations en ions rapportées au volume d'eau plasmatique, mais les logiciels corrigent les valeurs mesurées en fonction d'une concentration protéique moyenne de 70g/l, afin d'obtenir des résultats identiques à ceux obtenus en photométrie de flamme.

De même, sauf pour des mesures en potentiométrie indirecte, des concentrations élevées en lipides vont augmenter les valeurs rendues.

Les valeurs mesurées sur des spécimens sans protéines (urine, liquide céphalo-rachidien, bain de dialyse, lors du traitement des intoxications) devraient être majorées de 8 à 10 % pour être comparables à celles obtenues en photométrie de flamme. Certains appareils offrent la possibilité de faire des mesures de sodium et de potassium sans correction (mode urine, bain de dialyse) mais le dosage du lithium n'est pas toujours possible avec ce mode de fonctionnement.

III.3.4- Dosage du lithium plasmatique sur sang total (18, 20)

Les mesures des concentrations de lithium sur sang total ne sont pas aussi simples que le disait Birch. En effet, lorsque l'on effectue des mesures de la concentration du lithium sur sang total, on observe selon la concentration en lithium soit une valeur plus élevée que sur le plasma, pour des concentrations inférieures à 0,40 mmol/l, soit une valeur plus basse que sur le plasma pour des concentrations supérieures à 0,40 mmol/l.

Les essais que nous avons effectués sur plusieurs appareils en faisant varier l'hématocrite pour différentes valeurs de concentration en lithium nous ont permis de décomposer les différents facteurs intervenant dans les mesures de lithium sur sang total, ces observations ont aussi été faites pour les mesures du potassium sur sang total (21).

La valeur de concentration obtenue par la mesure de la différence de potentiel entre l'électrode à lithium et l'électrode de référence lors des mesures sur sang total est la somme de plusieurs phénomènes dont l'intensité est variable selon le type d'appareil et le vieillissement des spécimens

- ◇ activité propre des ions lithium dans le plasma,
- ◇ une interférence positive proportionnelle à l'hématocrite qui est produite par l'action des globules rouges (chargés négativement) sur le système analytique ; le vieillissement des globules rouges augmente cette interférence (On la mesure sur un sang total d'un sujet n'ayant pas pris de sels de lithium) ;
- ◇ une interférence négative due à la présence des globules rouges, qui diminue la quantité d'ions lithium en contact avec la membrane de l'électrode à lithium ; elle est proportionnelle à la concentration en lithium et à l'hématocrite.

Nous avons pu déterminer, pour un appareil et une électrode donnés, une équation donnant la valeur que l'on obtient en mesurant le lithium sur sang total en fonction de la concentration du lithium plasmatique et de l'hématocrite. Cette équation se présente sous la forme suivante

$$\text{LiST} = \text{LiP} + \text{AxHT} - \text{BxLiPxHT} + \text{C}$$

LiST : valeur donnée par l'appareil pour une mesure sur sang total,

LiP : concentration du lithium dans le plasma,

HT : valeur de l'hématocrite,

A, B, C sont des constantes (pour un appareil et une électrode donnés).

Certains appareils mesurent l'hématocrite par résistivité et peuvent faire des dosages de lithium sur sang total de manière exacte si leur logiciel utilise cette équation. En dehors de cette possibilité il ne faut pas effectuer de dosage de lithium (ni de potassium) sur le sang total, cela d'autant plus que même lors des intoxications par les sels de lithium, on a toujours le temps de centrifuger les prélèvements. De plus, comme cela est indiqué dans le chapitre VI, il faut effectuer les prélèvements de sang pour doser le lithium à des horaires précis et non pas à toute heure de la journée comme le suggérait Birch.

III.3.5- Dosage du lithium érythrocytaire (19, 23)

Le lithium est dosé sur un hémolysat de globules rouges obtenu à l'aide de la saponine, correspondant à une dilution au demi ou au tiers. On utilise une solution de saponine contenant 200 (dilution au tiers) ou 260 (dilution au demi) mmol/l de sodium et 1 mmol/l de lithium de façon à ce que le sodium soit proche de 140 mmol/l et le lithium mesuré supérieur à 0,60 mmol/l dans la dilution finale. On effectue un blanc avec des globules rouges provenant d'une personne ne prenant pas de lithium pour tenir compte de toutes les autres interférences, notamment de celle du potassium.

Certains appareils ont un logiciel qui ne permet pas d'effectuer de dosage de lithium si la concentration en potassium est trop élevée, sur d'autres les mesures ne seront exactes que si la concentration en lithium dans la solution hémolysante est plus élevée de l'ordre de 2 mmol/l.

Les faibles concentrations à mesurer (malgré le décalage du zéro) et la soustraction du blanc font que pour un dosage il faudra effectuer plusieurs mesures et faire la moyenne des valeurs obtenues. Bien que les manipulations soient plus simples à réaliser par rapport à celles nécessaires avec la photométrie de flamme, on observe une moins bonne qualité des résultats pour les valeurs basses (les plus fréquentes en surveillance thérapeutique). Ces appareils ne conviennent bien que pour la routine, mais pas du tout pour effectuer des travaux de recherche, car on observe des performances bien moins bonnes qu'avec la photométrie de flamme. En revanche, dans le cadre du diagnostic et de la surveillance des intoxications par les sels de lithium (où les concentrations sont élevées) ces appareils sont performants et les manipulations préalables aux mesures simples et rapides.

III.3.6- Dosage du lithium urinaire

Le dosage dans l'urine est possible si elle contient peu d'ion ammonium, produit par la dégradation microbienne, et si on la dilue de telle manière que la dilution finale contienne les concentrations moyennes en sodium et en potassium du plasma. Pour certains appareils il faut que la force ionique et le pH soient ajustés à ceux du plasma, il faudrait utiliser des urines tamponnées avec les additifs contenus dans les solutions de calibration, mais les fabricants veulent conserver leurs secrets de fabrication. En plus, l'absence de protéines fausse légèrement les mesures. sauf si le mode urine ou bain de dialyse permet de mesurer le lithium.

111.4- La réflectométrie sur appareil Vitros

Le dosage du lithium sur l'automate Vitros est effectué par 15 % des laboratoires ayant participé au Contrôle National des Médicaments de 1996 (1) c'est donc une méthodologie qui de par son nombre d'utilisateur n'est pas négligeable.

III.4.1- Description du principe

Le dosage est effectué, sur les automates multiparamétriques Vitros, par colorimétrie en point final d'un complexe formé par un chromophore crown-éther (ou éther couronne) avec une mesure par réflectométrie à 600 nm. La prise d'essai est de 10 µl Le coût du dosage, représenté seulement par le coût de la plaque, est de l'ordre de 3 F.

III.4.2- Étalonnage

Il s'effectue en trois points, 0,15 - 1,50 - 4,00 mmol/l car la loi régissant la réflectométrie n'est pas linéaire. Seuls les calibrateurs fournis par le fabricant sont utilisables. La calibration est stable pendant 6 mois ou à chaque changement de lot de plaques.

III.4.3- Caractéristiques et performances analytique, des appareils (14)

- **Linéarité** : de 0,20 à 4,00 mmol/l (annoncée).

Aucun résultat n'est rendu en dessous de 0,20 mmol/l malgré un point de calibration à 0,15 mmol/l

• **Précision :**

◇ Intra laboratoire :

Concentration en lithium mmol/l	1,03	2,27
CV % intrasérie	4,6	3,5
CV % intersérie	6,7	4,8

D'après FREZZOTTI et coll. (14)

◇ Inter laboratoire : Le Contrôle National des Médicaments de juillet 1996 (1) a montré que pour le sérum de concentration 0,90 mmol/l (valeur en photométrie de flamme 1,17 mmol/l, mais la valeur en sodium était basse et interférait sur les mesures en réflectométrie sur le Vitros) le coefficient de variation était de 6,9 % identique aux autres méthodologies.

• **Corrélation avec la photométrie de flamme**

Lors d'une étude de corrélation avec la photométrie de flamme sur l'I.L. 943, Frezzotti et coll. (14) ont obtenu pour 80 spécimens de sérums de patients dont les concentrations en lithium allaient de 0,20 à 3,50 mmol/l une droite de régression d'équation

$$y (\text{Vitros}) = 0,96 x (\text{I.L. 943}) + 0,12 \text{ avec un coefficient de corrélation de } 0,97.$$

• **Interférence due au sodium et à l'hémoglobine**

Ces auteurs notent une interférence positive due au sodium de 0,10 mmol/l pour une concentration en sodium de 170 mmol/l et une interférence positive de 0,20 mmol/l pour une concentration de 0,3 mmol/l d'hémoglobine.

III.5- Remarques sur les préparations de contrôle utilisables avec ces différentes méthodologies

• Quelle que soit la méthodologie choisie, la matrice des préparations de contrôle doit se rapprocher des sérums de patients et les concentrations en lithium doivent couvrir la zone des valeurs thérapeutiques, c'est-à-dire :

- concentrations basses de 0,20 à 0,50 mmol/l,
- concentrations moyennes de 0,50 à 1,00 mmol/l,
- concentrations hautes de 1,00 à 1,50 mmol/l,

Les concentrations en sodium devront être comprises entre 110 et 170 mmol/l et celles du potassium entre 1 et 8 mmol/l. Il faut se méfier de certains verres qui peuvent céder du sodium à la solution qu'ils contiennent, ce qui est rare actuellement.

Il faut noter que des solutions de contrôles de concentrations plus élevées, au-dessus de 1,50 mmol/l, dans la zone toxique, présentent peu d'intérêt car on ne rencontre que rarement ces valeurs en pratique courante et parce que les valeurs obtenues sont toujours correctes si elles le sont pour les trois niveaux cités précédemment, du fait de la linéarité des systèmes.

• Avec la photométrie de flamme les solutions de contrôles utilisées sur des appareils équipés d'un diluteur à pompe péristaltique doivent être iso-visqueuses au plasma. On peut utiliser des sérums d'origine bovine surchargés en lithium ou des solutions aqueuses avec des additifs les rendant iso-visqueuses au plasma

- Les différences observées entre les mesures effectuées sur des solutions de contrôle avec la photométrie de flamme et celles effectuées avec la potentiométrie directe ou avec la réflectométrie peuvent s'expliquer

- ◊ pour les électrodes sélectives, par l'influence des concentrations en sodium, en potassium et en plus seulement en potentiométrie directe par la concentration en protéines, par la force ionique et par le pH des solutions ; il faut noter que certaines préparations de contrôles ont un pH qui peut atteindre 10 et une osmolalité parfois proche de 400 milliosmoles obtenue par addition de saccharose ou de lactose.

- ◊ pour la réflectométrie sur l'analyseur Vitros, par l'influence des concentrations en sodium et en potassium, par le pH et par une différence de la viscosité et de la composition en protéines qui même avec des sérums d'origine bovine peut ne pas être identique à celle d'un sérum humain pour lequel la calibration est prévue ;

- ◊ enfin pour les électrodes sélectives et la réflectométrie, par la présence de conservateurs qui vont modifier, par leurs pouvoirs tensioactifs, la perméabilité des membranes des électrodes ou des différents films de la plaque utilisée en réflectométrie.

■ IV. LES CRITÈRES DE CHOIX D'UNE TECHNIQUE

Parmi les 4. principaux types de méthodologies actuellement disponibles :

- * Photométrie de flamme
- * Spectrophotométrie d'absorption atomique
- * Electrodes sélectives
- * Réflectométrie sur analyseur Vitros

pour lesquels les résultats sont théoriquement transférables de l'une à l'autre avec une nette imprécision pour les valeurs basses obtenues avec les deux dernières, le choix d'une d'entre elles est guidé par le nombre de dosages à effectuer chaque jour et bien sûr des moyens financiers que l'on peut y affecter.

Les laboratoires qui effectuent des dosages de métaux en spectrophotométrie d'absorption atomique pourront faire leurs dosages de lithium sur les appareils actuels permettant de passer facilement du dosage d'un métal à celui d'un autre. C'est la seule raison d'utiliser cette méthodologie dont le fonctionnement est lourd.

Les laboratoires qui effectuent au moins 5 dosages par jour et/ou qui veulent des résultats précis quelles que soient les concentrations et qui réalisent des dosages de lithium érythrocytaire pourront choisir la photométrie de flamme, l'appareil permettant de doubler les autres automates en ce qui concerne le dosage du sodium et du potassium qui sont dans la majorité des laboratoires dosés avec des électrodes.

Un photomètre de flamme coûte entre 40 et 60 000 F pour les appareils sans étalon interne ou avec un étalon interne potassium, ITL. 943 à étalon interne césium coûte 120 000 F mais il permet de réaliser facilement et avec précision des dosages de lithium érythrocytaire et urinaire.

Les laboratoires qui reçoivent entre 1 et 5 dosages par jour et exclusivement des dosages de lithium plasmatiques pourront s'équiper d'un automate permettant le dosage des ions équipés d'une électrode à lithium. L'adaptation du dosage sur un appareil multiparamétrique n'est pas judicieuse.

Mais les laboratoires qui ne reçoivent, au plus, que 1 ou 2 dosages par semaine devraient transmettre leurs prélèvements à un laboratoire spécialisé.

■ V. TECHNIQUE DE RÉFÉRENCE

La première technique de référence fût la spectrophotométrie d'absorption atomique, car elle était la plus répandue dans les laboratoires de recherche.

Les performances de la photométrie de flamme sont identiques à celles de la spectrophotométrie d'absorption atomique (4) et les photomètres de flamme ont une linéarité supérieure.

Aussi les sociétés internationales, NBS (National Bureau of Standard) et AACC (American Association for Clinical Chemistry) recommandent la photométrie d'émission de flamme comme technique de référence (52).

On doit donc prendre comme technique de validation pour le dosage du lithium la photométrie flamme avec étalon interne potassium ou mieux avec étalon interne césium.

■ VI. INTÉRÊT DES DOSAGES DU LITHIUM DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES (16,25)

VI.1- Intérêt du dosage du lithium plasmatique ou sérique (33)

Le dosage du lithium plasmatique est à la base de la conduite pratique du traitement car il y a :

- un faible index thérapeutique : les concentrations de lithium associées à des signes d'intoxication sont proches de celles qui produisent un effet thérapeutique ;
- une importante variabilité individuelle dans la relation entre la posologie et les concentrations plasmatiques ;
- un effet thérapeutique cliniquement inapparent ;
- des relations bien définies entre les concentrations plasmatiques et la réponse concernant les effets bénéfiques, les effets secondaires et les manifestations toxiques.

VI.1.1- Principe du traitement préventif de la maladie maniaco-dépressive

Le traitement préventif des rechutes dans la maladie maniaco-dépressive repose sur l'obtention d'une lithiémie plasmatique (ou sérique) comprise dans une fourchette thérapeutique le matin 12 heures après la prise vespérale (de la veille), de manière à être efficace sans voir apparaître des manifestations de toxicité. Elles peuvent apparaître avec des concentrations plasmatiques supérieures à 1,50 mmol/l, mais tout dépend des concentrations érythrocytaires et de la sensibilité propre à chaque patient.

Le matin 12 heures après la prise de lithium du soir

- Avec le Téralithe® ou le Neurolithium® la lithiémie doit être comprise entre 0,50 et 0,80 mmol/l. En 1985, aux USA, un consensus du National Institute of Health et du National Institute of Mental Health indique une fourchette de concentrations plasmatiques actives dans la prévention des rechutes dans la maladie maniaco-dépressive allant de 0,60 à 0,80 mmol/l(28).

- Avec le Téralithe LP 400 mg® la lithiémie doit être comprise entre 0,80 et 1,20 mmol/l. Cette zone de valeurs correspond, du fait de la prise unique du soir et du prélèvement effectué le matin, pour des raisons de commodités, à une lithiémie avant l'unique prise du soir comprise entre 0,50 et 0,80 mmol/l (43, 51).

Chez le sujet âgé une lithémie plus basse d'environ 0,10 mmol/l est souvent suffisante (11). De même, les patients asiatiques répondront à des concentrations plasmatiques plus faibles (comme c'est le cas avec la plupart des psychotropes) (50).

VI.1.2- Principe du traitement curatif des accès maniaques

On utilise dans ce traitement les formes conventionnelles Téralithe® et Neurolithium® un patient en état d'excitation maniaque nécessitera des concentrations de l'ordre de 0,80 à 1,20 mmol/l voire parfois plus élevées, maintenues sous surveillance étroite, en milieu hospitalier, pendant au plus trois semaines (le plus souvent en association avec un neuroleptique). Après cette phase de traitement curatif en aigu, le traitement sera poursuivi à titre prophylactique avec les concentrations plasmatiques citées plus haut.

VI.2- Intérêt du dosage du lithium érythrocytaire (16, 17)



VI.2.1- La prévention des effets toxiques du traitement

On observe une meilleure corrélation entre les effets toxiques du lithium, notamment les perturbations de l'électroencéphalogramme, et les concentrations de lithium érythrocytaire, qu'entre ceux-ci et les concentrations de lithium plasmatique. En effet pour des concentrations de lithium érythrocytaire égales ou supérieures à 0,60 mmol/l, on peut voir apparaître des signes d'intoxication, avec troubles de l'électroencéphalogramme, allant parfois jusqu'au coma (32). Cependant, personne n'a, à notre connaissance, publié la concentration minimale que l'on devait maintenir dans les hématies pour prévenir les rechutes dans la maladie maniaco-dépressive, comme cela a été fait pour le lithium plasmatique.

Par ailleurs, dans le cadre de la prévention des effets toxiques du traitement, le dosage du lithium érythrocytaire est intéressant en cas de discordance entre lithium plasmatique et lithium érythrocytaire. À titre d'illustration, il peut être cité le cas d'un malade qui sur le plan psychiatrique n'allait bien qu'avec une concentration de lithium plasmatique de l'ordre de 1,50 à 1,70: mmol/ l, mais sa concentration de lithium érythrocytaire était alors seulement de l'ordre de 0,60 mmol/l. Dans de tels cas, il faut bien sûr augmenter la fréquence des dosages car on se trouve dans un état d'équilibre précaire et une vérification tous les quinze jours nous semble alors nécessaire.

VI.2.2- La mise en évidence d'une prise irrégulière du traitement

Certains patients mauvais observant, ne prennent leur lithium que quelques heures avant de subir leur prélèvement de sang.: Leur concentration de lithium plasmatique est alors souvent dans la zone thérapeutique, alors que la concentration de lithium érythrocytaire est très basse, voire nulle.

VI.2.3- La surveillance du traitement des intoxications

En cas d'intoxication involontaire avec des concentrations de lithium érythrocytaire comprises entre 1,50 et 3,00 mmol/l, le dosage du lithium érythrocytaire n'est pas capital. Il permet de constater que le lithium plasmatique est à des concentrations proches des concentrations éry-

throcytaires et permet de suivre le retour des concentrations du lithium dans la zone thérapeutique, après arrêt du traitement.

En cas d'intoxications volontaires le dosage du lithium érythrocytaire est capital car il déterminera le traitement à appliquer et le pronostic (6, 17)

Au titre d'exemple, il peut être présenté le cas de deux malades ayant tenté de se suicider en absorbant de grosses quantités de sels de lithium, avec à leur arrivée en service de réanimation, une concentration de lithium plasmatique proche de 5 mmol/l. L'un, ayant été amené en service de réanimation peu de temps après l'ingestion de lithium, avait une concentration de lithium érythrocytaire à 1,50 mmol/l. Il fut traité en 12 heures par une diurèse osmotique au mannitol et fut hors de danger 20 heures après le début du traitement (figure 1). L'autre, découvert 24 heures après l'ingestion de lithium, avait une concentration de lithium érythrocytaire à 5,60 mmol/l et il dut subir une épuration extra-rénale. Il resta dans un état comateux pendant deux jours et ne fut hors de danger que 4 jours après le début des soins (figure 2).

VI.2.4- Le rapport lithium érythrocytaire sur lithium plasmatique

VI.2.4.1 - Valeur du rapport érythroplasmatique

Le rapport érythroplasmatique, pour un échantillon de 1600 déterminations chez nos malades hospitalisés, n'ayant pas de surdosage, est égal à $0,44 \pm 0,03$ (17, 22), valeur proche de celles de Mahuzier et coll. (36) et de Binet et coll. (2) qui donnaient un chiffre moyen de $0,42 \pm 0,05$. Cependant, une grande dispersion peut être observée, les extrêmes allant de 0,12 à 0,86.

En début de traitement les valeurs du rapport érythroplasmatique augmentent légèrement puis se stabilisent par la suite. Cette augmentation correspond à la diffusion du lithium dans les érythrocytes.

Figure 1 : Évolution des concentrations de lithium plasmatique et érythrocytaire au cours d'une intoxication aiguë bénigne

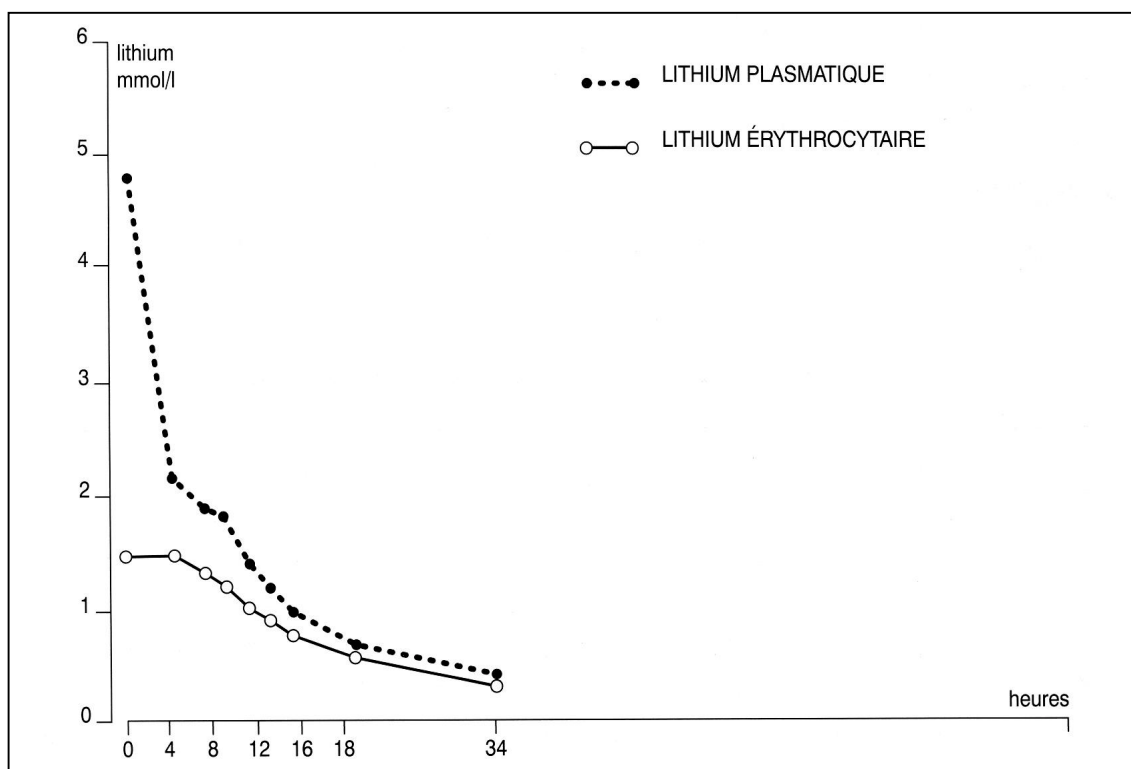
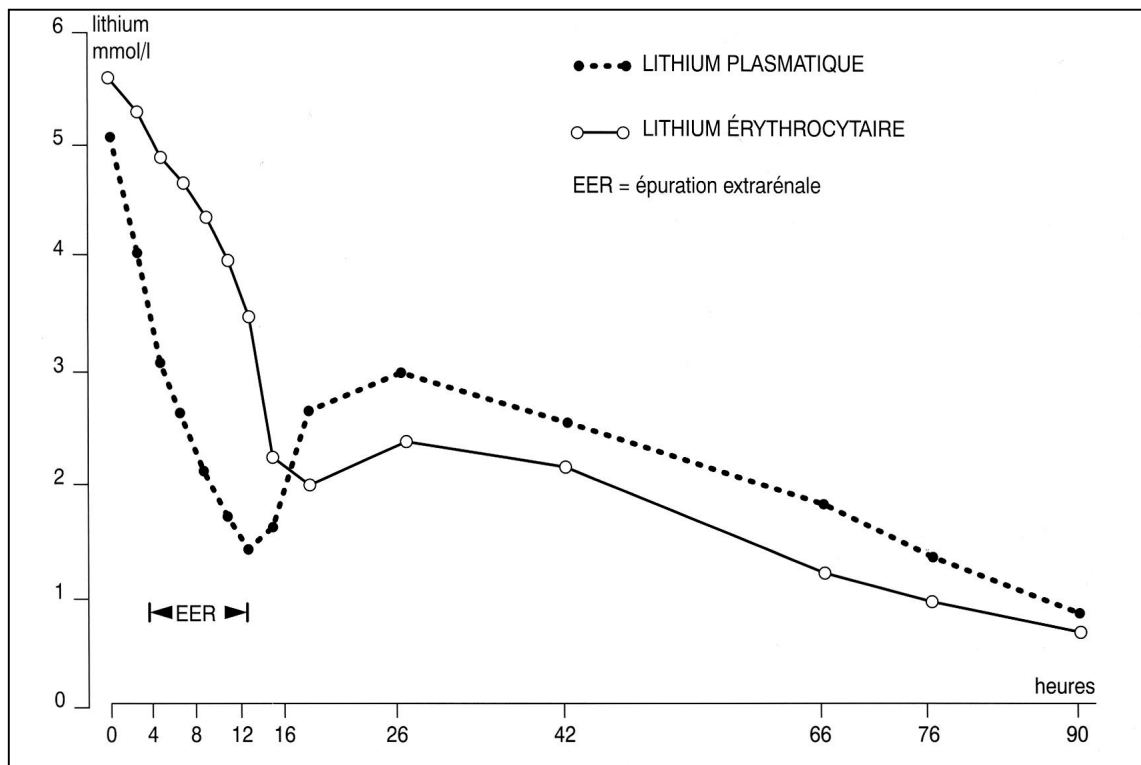


Figure 2 : Évolution des concentrations de lithium plasmatique et érythrocytaire au cours d'une intoxication aiguë grave



VI.2.4.2 - Intérêt pratique

Depuis ces quinze dernières années de nombreuses tentatives de corrélation ont été faites entre ce rapport et :

- les effets préventifs des rechutes dans la psychose maniaco-dépressive,
- le diagnostic psychiatrique,
- l'évolution de la maladie dans ses différentes phases,
- l'âge, le sexe,
- les thérapeutiques associées,
- certains groupes HLA.

Les résultats de ces nombreux travaux étant discordants nous ne les citerons pas et nous nous limiterons à ce qui suit :

Rapport érythroplasmatique et prédiction de la réponse au traitement

Cet index a été utilisé afin de prédire la réponse au traitement lorsque le lithium est prescrit comme agent prophylactique de la psychose maniaco-dépressive. Un rapport élevé pourrait selon Mendels et Frazer (38) prédire une bonne réponse à la lithiothérapie. Pour ces auteurs les bons répondeurs ont un rapport de $0,56 \pm 0,03$ et les non-répondeurs ont un rapport de $0,39 \pm 0,03$. Effectivement, des déterminations effectuées pour nos patients répondant bien au lithium et traités en ambulatoire avec très peu de médicaments associés (neuroleptiques ou antidépresseurs), peuvent donner des valeurs plus élevées de l'ordre de $0,55 \pm 0,16$. (16) très supérieures à celles citées au paragraphe précédent obtenues sur des populations de patients hospitalisés, ayant une réponse moyenne au traitement. Si ce rapport est bas, la réponse au traitement est

mauvaise quelque soit la raison de cette baisse qui met en évidence une mauvaise imprégnation par le lithium : diagnostic de psychose maniaco-dépressive posé à tort, patient mauvais répondeur ou mauvaise observance du traitement.

VI.3- Intérêt du dosage du lithium urinaire (22)

Il peut être utilisé pour calculer la clairance du lithium qui est liée à celle de la créatinine. La détermination de la clairance du lithium en début de traitement n'est pas nécessaire pour établir la posologie, mais peut être utile dans certains cas particuliers où les concentrations thérapeutiques sont difficiles à obtenir. Lors du traitement des intoxications, il permet d'évaluer la quantité de lithium ingérée. On recueille alors la totalité des urines, obtenues par diurèse forcée, ou, si le malade est dialysé, le lithium peut être dosé dans le liquide de dialyse. Mais c'est surtout pour vérifier que le malade prend bien son traitement que le dosage du lithium urinaire est intéressant dans les cas où la posologie semble suffisante et que les concentrations plasmatiques restent basses. Il faut effectuer le recueil plusieurs jours de suite (au moins trois), en surveillant tous les jours la lithiémie. Plusieurs éventualités peuvent se produire :

- On ne retrouve pas chaque jour dans l'urine au moins 80 % de la quantité de lithium prescrite : l'observance du traitement est manifeste.(en l'absence de diarrhée et avec un recueil sans pertes)
- On retrouve la quantité prescrite dans l'urine et les concentrations plasmatiques restent les mêmes : l'observance est bonne.
- On retrouve la quantité prescrite dans l'urine mais les concentrations plasmatiques augmentent: on peut supposer que le malade ne prenait pas régulièrement son traitement avant la série de recueil des urines.

Enfin, lors de l'utilisation de la forme à action prolongée, le dosage du lithium urinaire permet de mesurer la biodisponibilité de cette forme chez des patients ayant un transit intestinal rapide, ce qui diminue l'absorption du lithium.

La surveillance d'un traitement par les sels de lithium repose presque uniquement sur la mesure des concentrations circulantes de lithium à l'aide de diverses méthodologies dont la plus utilisée est la photométrie d'émission de flamme, tandis que l'on assiste à une percée des électrodes sélectives.

Malgré une apparente simplicité analytique, il s'agit d'un dosage comportant de nombreux pièges, tant analytiques que pharmacologiques, il convient donc d'être toujours vigilant et d'être à même d'aider les prescripteurs dans l'interprétation des résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Annales du Contrôle de Qualité National des Médicaments, juillet 1996.
- (2) BINET P., LY R., JEANLOUIS J., Dosage du lithium plasmatique et globulaire par photométrie d'émission de flamme. Détermination du rapport érythroplasmatic, *Pharm. Biol.*, 1981, 15, 221-5.
- (3) BIRCH N.J., FREEMAN M.S., PHILLIPS J.D., DAVIE R.J., The lithium ion-selective electrode and its use in the lithium clinic : real-time monitoring of plasma lithium, *Lithium*, 1992, 3, 133-7.
- (4) BLIJENBERG B.G., LEIJNSE B., The determination of lithium in serum by atomic adsorption spectroscopy and flame emission spectroscopy, *Clin. Chim. Acta*, 1968, 19, 97-9.
- (5) BOLING E.A., A flame photometer with simultaneous digital readout for sodium and potassium, *J. Lab. Clin. Med.*, 1964, 63, 501-10.
- (6) BOUFFARD Y., CLARIS O., GREFFE J., PERROT D., DELAFOSSE B., MOTIN J., Intoxication aiguë au lithium. Intérêt de l'hémodialyse et du dosage du lithium intra-érythrocytaire, *Presse Méd.*, 1984, 13, 1456-7.
- (7) BRACCINI T., DARCOURT G., Corrélations entre la lithorachie et les taux de lithium dans le plasma et dans les érythrocytes, *Encéphale*, 1980, 6, 31-7:
- (8) CHAPOTEAU E., CZECH B., ZAZULAK W., KUMAR A., First practical colorimetric assay of lithium in serum, *Clin. Chem.*, 1992, 38, 1654-7.
- (9) CZECH B.P., KUMAR A., CHAPOTEAU E., Colorimetric assay of lithium, *Lithium*, 1994, 5, 11-6.
- (10) EL-MALLAKH R.S., Acute lithium neurotoxicity, *Psychiatr. Dev.*, 1986, 4, 311-28.
- (11) FOSTER J.R., Use of lithium in elderly psychiatric patients: a review of the literature, *Lithium*, 1992, 3, 77-93.
- (12) FOURNIS Y., CHAZOT G., Détermination du lithium dans les milieux biologiques, *Path. Biol.* 1971,19,787-95.
- (13) FRAZER A., SECUNDA S.K., MENDELS J., A method for determination of sodium, potassium, magnesium and lithium concentrations in erythrocytes, *Clin. Chim. Acta*, 1972, 36, 499-509.
- (14) FREZZOTTI A., MARGARUCCI GAMBINI A.M., COPPA G., DE SIO G., An evaluation of the Ektachern serum lithium method and comparison with flame emission spectrometry, *Scand J. Clin. Lab. Invest.*, 1996, 56, 591-596:
- (15) GOUGET B., GOURMELIN Y., LAGENTE M., FEUILLU A., TRUCHAUD A., BOIGNE J.M., Les analyseurs à électrodes sélectives pour la détermination du sodium et du potassium. In *Instrumentation en biochimie clinique*, Paris, Expansion Scientifique Française, 1989, 35-45.
- (16) GREFFE J., Justification des examens biologiques de surveillance. In: Gay C. *Pratique de la lithiothérapie : consensus et controverses*; Paris, Doin, 1997, 21-29:
- (17) GREFFE J., CHARAZAC P., TERRA J.L., MATHIEU P., Dosages du lithium dans les milieux biologiques et surveillance du traitement, *Encéphale*, 1985, 11, 79-83.
- (18) GREFFE J., GOUGET B., Red cell effects on lithium measurement by ion selective electrode, 15th International Symposium on blood gases and pH electrolytes and other critical analytes, Linköping (Sweden), 1994.
- (19) GREFFE J., GOUGET B., Use of ion selective electrodes (ISE) for measurement of lithium in redcell hemolysates. Electrolytes and blood gaz division symposium American Association for Clinical Chemistry, 47th National Meeting, Waikoloa (HI, USA), Abstract, 1996.

- (20) GREFFE J., GOUGET B., Red tell effects on lithium measurement by ion selective electrode, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1996, 56 (Suppl 224), 187-191.
- (21) GREFFE J., GOUGET B., Red cell effects in direct potentiometric measurement of potassium in whole blood. Electrolytes and blood gaz division symposium American Association for Clinical Chemistry, 47th National Meeting, Waikoloa (HI, USA), Abstract, 1996.
- (22) GREFFE J., LACROIX C., MALEK H., MATHIEU P., Dosage du lithium plasmatique, érythrocytaire et urinaire par photométrie d'émission de flamme avec étalon interne potassium ou césium, *Rev. Fr. Lab.*, 1989, n° 193, 67-77.
- (23) GREFFE J., LACROIX C., MATHIEU P., Dosage du lithium érythrocytaire par potentiométrie directe à l'aide du Microlyte 3+2 de Koné, *Rev. Fr. Lab.*, 1993, n° 253, 121-6.
- (24) GREFFE J., LACROIX C., MATHIEU P., Traitements par les sels de lithium, Ire partie, *Lyon Pharm.*, 1996, 47, 117-129.
- (25) GREFFE J., LACROIX C., MATHIEU P., Traitements par les sels de lithium, 2e partie, *Lyon Pharm.* 1996, 47, 189-200.
- (26) GREIL W., RUNGE H., STELLER B., Sofortbestimmung von Lithium im Blut mittels ionenselektiver Elektrode. Eine neue Lithiumbestimmungsmethode zur Verbesserung der Lithiumtherapie *Nervenarzt*, 1992, 63, 184-6.
- (27) KELLEY T., MORAN B., BERGQUIST C., Césium as The internal standard in a new four-element flame photometer, AACC, San Francisco (CA, USA), 1978.
- (28) KELLER M.B., LAVORI P.W., KANE J.M. et al., Subsyndromal symptoms in bipolar disorder A comparison of standard and low serum levels of lithium, *Arch. Gen. Psychiatry*, 1992, 49, 371-6.
- (29) KIMURA K., OISHI H., MIURA T., SHONO T., Lithium ion sélective électrodes based on crown ethers for serum lithium assay, *Anal. Chem.*, 1987, 59, 2331-4.
- (30) KING J.R., PHILLIPS J.D., ARMOND A.R., CORBETT J.A., BIRCH N.J., Instant lithium monitoring, *Psychiatry Bull*, 1991, 15, 138-9.
- (31) LEWENSTAM A., Ion-sélective électrodes in clinical chemistry : state of the art, *Anal. Proc.*, 1991, 28,106-9.
- (32) LÔO H., OLIÉ J.P., GAY C., GRAVELEAU P., Une nouvelle nécessité dans la surveillance du traitement par le lithium : le dosage du lithium intraglobulaire, *Nouv. Presse Méd.*, 1981, 10, 1845.
- (33) LÔO H., OLIÉ J.P., GAY C., ZARIFIAN E., Le lithium, *Encycl. Méd. Chir., Paris, Psychiatrie*, 37860 D10, 9-1986, 1-16.
- (34) LÔO H., PUECH A.J., BOULENGER J.P., Lithium. In: Giroud J.P., Mathé G., Meyniel G., *Pharmacologie clinique. Bases de la thérapeutique*, 2e édition, Paris, Expansion Scientifique, 1988,1265-73.
- (35) MAAS A.H.J., Problèmes et recommandations pour l'utilisation des électrodes sélectives en biologie clinique, *Biotechnol. Rev. Eur. Méd.*, 1988, 10, 70-3.
- (36) MAHUZIER G., SYLVESTRE G., DEMAISON J., MACCARIO J., VU T.D., Détermination du rapport érythroplasmaticque du lithium. Aspect analytique et intérêt clinique, *Path. Biol.*, 1977, 25, 62936.
- (37) McCREADIE R.G., MORRISON D.P., The impact of lithium in South West Scotland, *Br. J. Psychiatry*, 1985, 146, 70-80.
- (38) MENDELS J., FRAZER A., Intracellular lithium concentration and clinical response : towards a membrane theory of depression, *J. Psychiatr. Res.*, 1973, 10, 9-18.

- (39) METZGER E., DOHNER R., SIMON W., VONDERSCHMITT D.J., GAUTSCHI K., Lithium/ sodium ion concentration ratio measurements in blood serum with lithium and sodium ion sélective liquid membrane électrodes, *Anal. Chem.*, 1987, 59, 1600-3.
- (40) MILLER N.L., DURR J.A., ALFREY A.C., Measurement of endogenous lithium levels in serum and urine by electrothermal atomic absorption spectrometry : a method with potential clinical applications, *Anal. Biochem.*, 1989, 182, 245-9.
- (41) MOLLARD J.F., Dosage de Na⁺ et K⁺ par électrodes sélectives dans les milieux biologiques, *Rev. Fr. Lab.*, 1982, n° 102, 54-64.
- (42) OKORODUDU A.O., BURNETT R.W., McCOMB R.B., BOWERS G.N. Jr, Évaluation of three first-generation ion-sélective analysers for lithium : systematic errors, frequency of random interferences and recommandations based on comparison with flame atomic émission spectrometry, *Clin. Chem.*, 1990,36,104-110.
- (43) OLIÉ J.P., DESLANDES B., MIRABEL V., BEJUIT R., FERRERI M., POIRIER M.F., Pharmacokinetics and clinical interest of a new sustained-release formulation of lithium carbonate in the chronic management of patients with recurrent mood disorders, *Lithium*, 1994, 5, 217-22.
- (44) PHILLIPS J.D., KING J.R., MYERS D.H., BIRCH N.J, Lithium monitoring close to the patient, *Lancet*, 1989, ii, 1461.
- (45) SACHS C., Introduction à l'usage des électrodes sélectives en biologie clinique, *Ann. Biol. Clin.*, 1985, 43, 715-21.
- (46) SCHOU M., Use in non-psychiatric conditions. In: Johnson F.N., *Dépression and mania, modern lithium therapy*, Oxford, IRL Press, 1987, 46-50.
- (47) SCHOU M., Lithium and treatment-resistant depressions a review, *Lithium*, 1990, 1 3-8.
- (48) SELIGSON D., MASON W.B., Improvement of flamme photometer operation by use of an automatic null balance device, *Clin. Chem.*, 1959, 5, 274-80.
- (49) SUMMERTON A.M., HARVEY N.S., FORREST A.R.W., New direct method for measuring red cell lithium, *J. Clin. Pathol.*, 1989, 42, 435-7.
- (50) TAKAHASHI R., Lithium treatment in affective disorders : therapeutic plasma levels, *Psychopharmacol Bull*, 1979, 15, 32-5.
- (51) TERALITHE LP 400 mg, Paris, Éditions Spécia, Rhône-Poulenc Rorer, 1994:
- (52) TIETZ N.W., A model for a compréhensive measurement system in clinical chemistry, *Clin. Chem.*, 1979, 25, 833-9.
- (53) XIE R.Y., CHRISTIAN G.D., Measurement of serum lithium levels. In: Johnson F.N., *Depression and mania, modern lithium therapy*. Oxford, IRL Pres, 1987 : 78-88

■ I. GÉNÉRALITÉS

I.1-Structure

La théophylline fait partie de la famille des xanthines, comme la caféine. C'est la 1,3-diméthylxanthine.

I.2- Propriétés pharmacologiques

C'est

- un bronchodilatateur : elle provoque la relaxation des fibres musculaires lisses. La théophylline s'oppose aux effets des médiateurs bronchoconstricteurs libérés par le mastocyte ;
- un stimulant central aux fonctions analeptiques respiratoires, psychostimulante mais aussi convulsivante à haute dose ;
- un agent relaxant des fibres musculaires lisses des voies biliaires et urinaires.

La théophylline possède en plus une faible action stimulante cardiaque et diurétique.

I.3- Mode d'action

La théophylline inhibe toutes les classes de phosphodiésterases qui dégradent l'AMP cyclique, c'est également un antagoniste des récepteurs de l'adénosine (1).

I.4- Indications

- Traitement de l'asthme de l'enfant et de l'adulte
- Traitement des formes spastiques des broncho-pneumopathies chroniques obstructives
- Traitement de l'apnée du nouveau-né et aide au sevrage de ventilation

I.5- Voies d'administration et Posologie

- Voie orale : il existe deux formes galéniques : une forme normale avec 3 prises par jour et une forme à libération prolongée avec 1 à 2 prises par jour.
- Voie rectale
- Aérosol
- Voie transdermique [2]
- Voie intraveineuse en administration hospitalière uniquement. La posologie quotidienne est de 7 à 10 mg/kg/jour

I.6- Pharmacocinétique

La théophylline est parfaitement absorbée, la biodisponibilité est proche de 100 %, elle est transportée liée aux protéines dans le plasma pour 60 % chez l'adulte (36 % chez le nouveau-né ou en cas de cirrhose). Le métabolisme est hépatique pour 90 % avec élimination rénale sous forme d'acide 1,3 diméthylurique (35 à 45 %), d'acide 1-méthylurique (20 à 25 %) ou de méthylxanthine (20 à 35 %) et sous forme inchangée pour 10 % chez l'adulte et 35 à 50 % chez le nouveau-né. Chez le prématuré 10 % de la théophylline sont transformés en caféine et 4 % en théobromine.

Par ailleurs le métabolisme est influencé :

- par l'insuffisance hépatique ou cardiaque, par la fièvre (augmentation de la demi-vie) [3]
- par le tabac (diminution de la demi-vie de 50 %)
- par certains médicaments

→ Médicaments augmentant la théophyllinémie :

Allopurinol Enoxacine Viloxazine
Ciprofloxacine Macrolides

→ Médicaments diminuant la théophyllinémie :

Barbituriques Phénytoïne
Tous les inducteurs enzymatiques

- par l'âge

La demi-vie de la théophylline

- à 30 heures chez le prématuré
- 24 heures chez le nouveau-né
- 3 à 4 heures de 30 mois à 9 ans
- 5 à 8 heures chez l'adulte non fumeur
- 4 heures chez l'adulte fumeur
- 20 à 30 heures chez le cirrhotique

L'aminophylline (Planphylline) se métabolise immédiatement en théophylline.

I.7- Intérêts du dosage

La pharmacocinétique est variable et la fenêtre thérapeutique est étroite. Le risque d'effets indésirables apparaît pour des concentrations supérieures à 20 mg/l alors que l'efficacité de la théophylline se manifeste à partir de 10 mg/l. Les mesures des concentrations sériques se font à l'état d'équilibre (c'est-à-dire au bout de 3 à 5 demi-vies). Les concentrations plasmatiques résiduelles efficaces sont :

- pour l'adulte : 8 à 20 mg/l
- pour l'enfant de moins de 10 ans : 6 à 11 mg/l
- pour l'enfant de 10 à 16 ans : 8 à 14 mg/l

Au-delà de 20 mg/l apparaissent les premiers signes de surdosage, c'est-à-dire nausées, vomissements, excitation, insomnie, tachycardie et céphalées qui imposent l'arrêt du traitement.

Au-delà de 35 mg/l il y a un risque de convulsions, d'hyperthermie, d'arythmie cardiaque avec risque d'arrêt cardiorespiratoire.

Le dosage plasmatique de la théophylline sera nécessaire dans 3 circonstances :

- Le traitement est inefficace et il faut s'assurer que la concentration plasmatique de théophylline est dans une zone considérée comme efficace.
- Des effets secondaires apparaissent, il faut vérifier qu'ils ne correspondent pas à un surdosage.
- Le patient est particulièrement fragile : patient âgé, souffrant d'insuffisance hépatique, rénale ou cardiaque ; il peut être intéressant de faire des dosages en début de traitement afin de calculer une adaptation des posologies [4].

■ II. CONDITIONS DE PRÉLÈVEMENT

II.1- Milieu

- Sérum de préférence.
- Plasma sur tube hépariné. Il faut éviter les chélateurs du calcium et du magnésium. Il faut de 20 à 500 µl de plasma ou de sérum selon les techniques.
- Salive pour apprécier la concentration des formes libres [5].

II.2- Moment du dosage

Le suivi thérapeutique n'est instauré qu'après un temps égal au moins à 5 fois la demi-vie de la théophylline.

- Voie orale :
 - dosage du taux maximal à 2 heures pour une théophylline rapide, 4 heures pour une théophylline à absorption retardée ;
 - dosage du taux résiduel : juste avant la prise suivante.
- Voie intraveineuse :
 - dosage du taux maximum: 30 minutes après la fin d'une perfusion;
 - dosage avant le début de la perfusion.

II.3- Conservation des échantillons

8 jours à + 4°C ; à - 20°C pour une conservation plus longue.

■ III. MÉTHODES DE DOSAGE

La théophylline est le deuxième médicament le plus dosé après la digoxine mais le nombre de dosages est en diminution depuis la mise sur le marché de la BAMIFYLLINE moins toxique, non métabolisée en théophylline.

La majorité des dosages sont réalisés par des méthodes immunologiques de type compétition, soit en phase homogène, soit en phase hétérogène. Une méthode non immunologique (inhibition d'une phosphatase alcaline) est mise en œuvre sur les analyseurs Vitras. Enfin, des méthodes

séparatives (HPLC, CPG et GC couplée à la spectrométrie de masse) peuvent être considérées comme des méthodes de comparaison.

III.1- Méthode immunologique de type compétition

III.1.1- En phase homogène

- Méthodes avec marqueurs enzymatiques

Techniques EMIT : Enzyme Multiplied Immuno Technic [6] commercialisée par Behring

C'est une technique de compétition entre le médicament à doser et le même médicament marqué à la G6PD vis-à-vis d'un anticorps anti-théophylline et lecture spectrophotométrique du NADH libéré à 340 nm. Quand l'anticorps se fixe à la théophylline marquée, il bloque le site enzymatique, l'activité enzymatique varie dans le même sens que la concentration en théophylline de l'échantillon. C'est une méthode automatisable utilisée sur le Cobas Mira de Roche, et d'autres analyseurs de Biochimie ouverts.

CEDIA, Cloned immunodonor assay [7]

Méthode par compétition en phase homogène basée sur l'utilisation d'une enzyme en 2 parties un fragment E.A. (Enzyme Acceptor) et un fragment E.D. (Enzyme Donor) de la β -galactosidase. Pour être active, la β -galactosidase doit posséder le fragment E.A. et E.D. Il y a compétition entre la théophylline à doser et une théophylline marquée au fragment E.D. de l'enzyme, vis-à-vis d'anticorps anti-théophylline. Quand l'anticorps réagit avec la théophylline marquée l'enzyme ne peut être activée : on mesure donc une activité enzymatique proportionnelle à la concentration en théophylline de l'échantillon. C'est une méthode automatisable utilisée sur les Hitachi de Boehringer et d'autres analyseurs de Biochimie ouverts.

- Méthodes avec marqueurs fluorescents

FPIA : Fluorescence Polarisation Immuno Assay [6]

C'est la méthode de dosage la plus utilisée. Il y a compétition entre la théophylline à doser et la théophylline marquée à la fluorescéine, vis-à-vis d'un anticorps anti-théophylline. Si le marqueur est fixé sur des grosses molécules, comme les anticorps, la lumière reste polarisée : la polarisation varie inversement à la concentration en théophylline de l'échantillon. C'est une méthode automatisée, sur TDX et AxSym d'Abbott, sur Cobas Intégra de Roche. C'est également le principe de la méthode Thera Track de Merck.

- Méthodes par précipitation en milieu liquide [6]

Turbidimétrie

Principe **PETINIA (Particle Enhanced Turbidimetric Inhibition Immuno Assay)**

Il y a compétition entre la théophylline de l'échantillon et la théophylline liée de façon covalente à des particules de latex, vis-à-vis d'un anticorps anti-théophylline monoclonal. On mesure l'agrégation à 340 nm qui varie inversement à la concentration en théophylline de l'échantillon. C'est une méthode automatisée sur les ACA Dade et les CX de Beckman.

Nephélométrie

Il y a compétition entre la théophylline à doser et la théophylline liée à l'apo-ferritine, vis-à-vis d'un anticorps monoclonal anti-théophylline. Seuls les immuns complexes théophylline-apoferritine et anticorps diffusent la lumière. On mesure l'inhibition de la diffusion de la lumière qui

est donc proportionnelle à la concentration en théophylline de l'échantillon. Cette méthode est appliquée sur les Array proteines system de Beckman.

- Méthodes par agglutination

On étudie la diminution de la vitesse d'agglutination en utilisant des anticorps fixés à des microparticules. C'est une méthode en phase homogène : il y a compétition entre la théophylline à doser et de la théophylline conjuguée au Ficoll, vis-à-vis d'anticorps monoclonaux. C'est une méthode automatisée sur Immuno I de Bayer. La diminution de la vitesse d'agglutination est proportionnelle à la concentration en théophylline à doser.

III.1.2- Méthodes en phase hétérogène

- Lecture en fluorescence



Fluorescence Immuno Assay (FIA)

Il s'agit dans les 3 cas de méthodes utilisant la compétition entre la théophylline à doser et la théophylline marquée vis-à-vis d'anticorps anti-théophylline.

Stratus de Dade [6] : la théophylline est marquée par la PAL. Les anticorps polyclonaux de lapin sont fixés sur une tablette en fibre de verre. On mesure la fluorescence après addition du substrat. La fluorescence varie inversement à la concentration en théophylline de l'échantillon.

Opus de Behring : la théophylline est marquée par la rhodamine. Les anticorps polyclonaux sont fixés sur un film multicouches. On mesure une intensité de fluorescence qui varie inversement, à la concentration en théophylline de l'échantillon, après addition du substrat.

Vidas de bioMérieux : la théophylline est marquée par la PAL. Les anticorps monoclonaux de souris sont fixés sur un cône. Après addition du substrat (méthyl-ombelliféryl phosphate), on mesure une fluorescence qui varie inversement à la concentration en théophylline de l'échantillon.

- Lecture en colorimétrie

Magia de Merck : c'est une méthode de compétition entre la théophylline de l'échantillon et la théophylline marquée avec une enzyme la PAL vis-à-vis d'anticorps fixés sur des particules magnétiques.

- Lecture en luminescence

Access de Sanofi Pasteur : c'est une méthode d'enzymo-luminescence par compétition entre la théophylline à doser et la théophylline marquée à la PAL, vis-à-vis d'anticorps fixés sur des particules magnétiques.

ACS de Chiron : les anticorps sont marqués à l'ester d'acridinium. Il y a compétition entre la théophylline de l'échantillon et une théophylline couplée à des particules magnétiques.

III.1.3- Performances des méthodes immunologiques

Toutes ces méthodes immunologiques donnent des résultats comparables entre elles et proches de ceux obtenus par HPLC.

Ce sont des techniques de bonne précision intra et intersérie, au seuil de détection bas et de bonne sensibilité avec linéarité jusque dans les zones de concentrations toxiques. Le seul aspect à considérer est la spécificité des anticorps vis-à-vis des dérivés xanthiques.

En règle générale, la caféine et la théobromine n'interfèrent pas dans les conditions habituelles de consommation de café ou de thé. L'acide urique ne semble pas poser de problème: Les 2 dérivés qui peuvent interférer sont la 8 chlorothéophylline et l'acide 1-3 diméthylurique. La 8 chlorothéophylline est un composant du dimenhydrinate et se retrouve dans les spécialités comme la Dramamine, le Nausicalm ou le Mercalm. Une consommation importante de ces composés peut majorer artificiellement le chiffre de la théophylline. Quant à l'acide 1-3 diméthylurique il peut véritablement fausser un résultat par excès car ce métabolite peut s'accumuler en quantité non négligeable en cas d'insuffisance rénale.

Les méthodes utilisant des anticorps monoclonaux de souris peuvent éventuellement être perturbées par la présence heureusement rarissime d'anticorps hétérophiles présents dans le sérum du patient.

Les méthodes en phase homogène et particulièrement les méthodes turbidimétriques peuvent être gênées en cas de défaut d'aspect important : hémolyse, lactescence.

Quelques tests unitaires existent (doctor's test) mais sont peu diffusés (Biotrack 516, Acculevel, Clinimate TDA).

III.2- Méthodes enzymatiques

Méthode de dosage sur analyseur Vitros Ortho

C'est une méthode non immunologique, utilisant des plaques analytiques unitaires contenant tous les réactifs. Le principe analytique est basé sur l'inhibition de la PAL de foie de bœuf par la théophylline à pH : 8,2: l'inhibition est proportionnelle à la concentration de l'échantillon à doser. La densité réfléchie se mesure à 400 nm.

Les résultats sont plus élevés en cas d'insuffisance rénale par rapport aux autres méthodes, ils sont faussés par la présence de salicylés [8]. Les résultats obtenus sur les solutions de contrôle de qualité sont décalés par rapport aux autres méthodes.

Méthode utilisant une théophylline oxydase « Impulse » qui n'est pas commercialisée en France [9].

III.3- Méthodes séparatives : HPLC et CPG [6]

- La CPG couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) peut être considérée comme la méthode de référence. On réalise une extraction de la théophylline par un mélange chloroforme-isopropanol en milieu tampon acétate à pH : 5,2 puis une dérivation par pentylation. La détection se fait par un spectromètre de masse. C'est une méthode sensible : limite de détection 0,05 mg/l; précise : C.V. : 2,6 % ; mais longue.

- CPG avec détecteur thermoionique.

- HPLC - Il existe un grand nombre de méthodes proposées qui utilisent la chromatographie en phase inverse et la détection UV et qui diffèrent par la préparation de l'échantillon, la nature de l'étalon interne, la composition de la phase mobile. Dans quelques cas, les métabolites en particulier la caféine chez les nouveau-nés peuvent être séparés et quantifiés.

Ce sont des méthodes relativement longues.

La plupart des méthodes et leurs principales caractéristiques sont rassemblées dans les tableaux I et II.

■ IV. CRITÈRES DE CHOIX D'UNE MÉTHODE

La GC-MS peut être considérée comme technique de référence. Il n'existe pas de technique recommandée et le choix d'une technique se fait en fonction :

- de la fiabilité désirée : précision et exactitude ;
- du nombre de dosages ;
- du délai de réponse (notion d'urgence lors de surdosage) ;
- de l'équipement disponible en automates;
- du coût (le prix de revient est à calculer en fonction du prix du test unitaire, du nombre de points de calibration, de la durée de validité de la calibration et du nombre de dosages).

La méthode de comparaison habituelle est la méthode HPLC. Elle est indispensable si l'on veut doser la molécule mère et les métabolites.

En pratique, actuellement, les méthodes les plus utilisées sont la FPIA, la FIA sur Vidas, FEMIT et la Réflectométrie sur VITROS. Si on compare les CV inter-laboratoires, on constate que les résultats sont bons, ils sont dans l'ensemble tous inférieurs à 10 %.

Le biologiste n'a pas de souci majeur face au dosage de la théophylline sérique.

Tableau I : Méthodes immunologiques en phase homogène

PRINCIPE	EMIT 2000	CEDIA	FPIA	FPIA	FPIA	FPIA (thera-trak)	Turbidimétrie	Turbidimétrie	Turbidimétrie	Néphélométrie
FOURNISSEUR	Behring	Boehringer	Abbott	Abbott	Roche	Merck	Dade	Beckman	Bayer	Beckman
CODE	VB	UD	IJ	IJ	IZ	IM	HO	HK	87	GK
APPAREIL	Mira et autres	aut,e et autres	TDX	AXSYM	Intégra	ECLAIR	ACA et dimension	CX	Immunol	Array
PERFORMANCES										
répétabilité : CV %	1,2 à 7,9	< 3	1,4 à 2,5	2,5 à 2,8	1,6 à 1,9	5,6 à 9	1,5 à 2,6	2,1	< 4	2,1 à 5,8
reproductibilité: CV %	2,9 à 8,4	< 5	1,5 à 3,1	1,0 à 1,8	2,6 à 2,8	8,7 à 10,7	2,2 à 3,8	4,6	< 5	5,1 à 6,5
fonct. des conc. et des appareils										
limite de détection, mg/l	0,75	1	0,8	0,82	0,16	0,22	?	?	0,4	?
linéarité, mg/l	40	40	40	40	40	40	40	40	0-40	40
exactitude/HPLC			1,14x -1,34				0,99x + 0,07			
exactitude/FPIA	1,04x - 0,06	1,06x - 0,82		0,99x - 0,24	1,05x - 0,11	?		1,10x -1,2	1,03x + 0,1	1,03x - 0,059
(x = meth. testée ; y = HPLC ou FPIA)										
INTERFÉRENCES										
% de réactions croisées										
acide di-méthyl-urique	< 1	10,8	5,9	2,8	< 0,6	1,3	< 10	< 5	3	< 5
8-chlofo-théophylline	< 4	6,5	10,2	8,1	8,4	11	< 5	< 7,5	??	< 7,5
1-méthyl-xanthine	< 3	?	2,9	?	?	1,6	?	?	< 1	?
3-méthyl-xanthine	< 1	1,3	< 1	2,2	3,4	< 1	< 10	< 1	1,6	< 1
acide 1-méthyl-urique	< 1	1,2	< 1	?	< 1	< 1	< 10	< 0,5	?	< 0,5
caféine	< 1	2,7	9,7	??	0,8	< 1	< 3	< 0,5	< 1	< 0,5
théobromine	< 1	1,5	< 1	??	1,4	< 1	< 10	< 1	??	< 1
							lactescence ⁺⁺⁺ EDTA	hémolyse ⁺⁺⁺ lactescence ⁺⁺⁺ bilirubine ⁺⁺⁺ f. rhumatoïde prot. monocl. anticoagulants	AC hétérophiles	
ANTICORPS MONOCLONAUX	oui	oui	non	oui	oui	non	non	?	oui	?

Tableau II: Méthodes immunologiques en phase hétérogène

PRINCIPE	enz.luminescence	luminescence	ARIS	FIA	FIA	FIA	Immuno-enzymo
FOURNISSEUR	Sanofi Pasteur	Chiron	Bayer	Dade	Behring	Biomérieux	Merck
CODE	QE	SI	U7	E2	DA	DB	
APPAREIL	Access	ACS	Clinimate/ Seralyser	Stratus	Opus	Vidas	Magia
PERFORMANCES							
répétabilité : CV %	4,5 à 5,4	3,1 à 4,8	3,6 à 5,4	2,2 à 4,3	?	3,4 à 5,3	?
reproductibilité: CV %	6,7 à 11	4à6	3,5 à 8	2,2 à 6,4	?	3,3 à 5,1	?
fonct. des conc. et des appareils							
limite de détection, mg/l	0,5	0,2	?	0,1	0,36	0,6	0,15
linéarité, mg/l	40	40	?	40	40	40	40
exactitude/HPLC			1,08x - 0,40				
exactitude/FPIA	?	1,00x - 0,06	0,97x + 0,5	?	?	1,04x - 0,74	?
(x = meth. testée ; y = HPLC ou FPIA)							
INTERFÉRENCES							
% de réactions croisées							
acide di-méthyl-urique	< 1	3,4	oui	??	3,8	8,9	14,3
8-chloro-théophylline	< 5	4,1	oui	6,8	3	5,8	6,7
1-méthyl-xanthine	?	< 1	non	1	?	?	1,6
3-méthyl-xanthine	< 1	2,5	non	0,7	2	< 1	< 1
acide 1-méthyl-urique	< 1	< 1	non	?	< 1	< 1	< 1
caféine	0,5	< 1	non	2,1	< 1	5,5	8,5
théobromine	< 1	< 1	non	0,6	< 1	< 1	1
			ascorbate				
ANTICORPS MONOCLONAUX	oui	oui	?	non	?	?	non

BIBLIOGRAPHIE

- 1- SULLIVAN P., Theophylline : An update of its mechanism of action and clinical use. *Clin. Immunother*, 1995, 4/5, 387-395
- 2- MICALI G. and al. : Evaluation of transdermal theophylline pharmacokinetics in neonates. *Pharmacotherapy* 1993, 13 (4), 386-390.
- 3- KAUFFMAN R.E. and al. : Precautions concerning the use of theophylline. *Pediatrics-USA*, 1992, 89/4, 781-783.
- 4- GREENBERGER P.A. and al. : A prospective evaluation of elevated serum theophylline concentrations to determine if high concentrations are predictable. *Am J. Med.* 1991, 91(1), 67-73.
- 5- BLANCHARD J. and al. : Serum/saliva correlations for theophylline in asthmatics. *J. Clin. Pharmacol.*, 1991, 31 (6), 565-570.
- 6- MOUINE J. and al. : Methods of theophylline assay and therapeutic monitoring of this drug. *Ann. Biol. Clin.*, 1990, 48 (5), 287-293.
- 7- KLEIN G. and al. : Results of the multicenter evaluation of the CEDIA registered theophylline assay. *Wien. Klin. Wochenschr.*, Suppl., 1992, 104 (191), 31-37.
- 8- WALLINDER H. and al. : Assay of theophylline : in vivo and in vitro evaluation of dry chemistry and immunoassay versus high performance liquid chromatography. *Ther Drug Monit.*, 1991, 13 (3), 233-239.
- 9- VAUGHAN L.M., GOTTEHRER A. : Effect of xanthine related compounds on a theophylline assay using theophylline oxidase. *Ann. Pharmacother*, 1992, 26 (12), 1576-1579.

Cahiers de formation déjà parus

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| N° 1 : HÉMATOLOGIE | N° 15 : DÉPISTAGE |
| N° 2 : IMMUNOANALYSE | DE LA TRISOMIE 21 |
| N° 3 : PARASITOLOGIE | N° 16 : IMMUNO-ALLERGIE (2) |
| N° 4 : BACTÉRIOLOGIE | N° 17 : VIRUS DES HÉPATITES |
| N° 5 : HORMONOLOGIE | A (VHA) et E (VHE) |
| GAZOMÉTRIE | N° 18 : DOSAGE DES MÉDICAMENTS |
| N° 6 : G.B.E.A. | TOME II |
| N° 7 : IMMUNO-ALLERGIE (1) | N° 19 : VAGINITES ET VAGINOSES |
| N° 8 : HÉMOGLOBINES GLYQUÉES | N° 20 : HÉMOSTASE ET THROMBOSE |
| LIPIDES | N° 21 : VIRUS DES HÉPATITES |
| N° 9 : DOSAGE DES MÉDICAMENTS | B (VHB), DELTA (VDH), |
| TOME I | C (VHC), AUTRES |
| N° 10 : HÉMATOLOGIE | N° 22 : SYNDROME |
| CAS ILLUSTRÉS | DES ANTI-PHOSPHOLIPIDES |
| N° 11 : AMIBES ET FLAGELLÉS | N° 23 : PARASITES SANGUINS |
| INTESTINAUX | N° 24 : BIOCHIMIE PEDIATRIQUE |
| N° 12 : LES MALADIES A PRIONS | N° 25 : LES MOISSISSURES |
| N° 13 : AUTOIMMUNITÉ | D'INTÉRÊT MÉDICAL |
| ET AUTOANTICORPS | |
| N° 14 : L'EXPLORATION | |
| DE LA THYROÏDE | |

BIOFORMA est la structure nationale qui gère et organise la formation continue conventionnelle des directeurs et directeurs adjoints de L.a.b.m. privés.

Cette formation continue est financée par les trois Caisses Nationales de l'Assurance Maladie (C.N.A.M.T.S., C.C.M.S.A., et C.A.N.A.M.) dans le cadre de la convention passée entre elles et les trois syndicats de biologistes. (S.d.B., S.N.M.B., et S.L.B.C.).

A ce titre, BIOFORMA édite des cahiers de formation comme celui-ci.

Ces ouvrages sont distribués à chaque laboratoire d'analyse de biologie médicale, privés et hospitaliers, aux inspecteurs des DRASS, aux pharmaciens et médecins conseils des CRAM, aux responsables de la DGS et du Ministère de la Santé. Les précédents numéros, ou épuisés en version papier, seront disponibles à la consultation sur le site Internet www.bioforma.net à partir de 2002.

Ces livres ne sont pas en vente dans le commerce et le tirage est de 6 500 exemplaires.