

CAHIER DE

Formation

N° 18 **Biologie médicale**

Janvier 2000

DOSAGE DES MÉDICAMENTS

TOME II



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,

BIOFORMA a le plaisir de vous présenter le Cahier de Formation de Biologie Médicale numéro 18, qui fait suite au Cahier numéro 9.

Le dosage des molécules médicamenteuses, autrefois réservé à des laboratoires spécialisés, devient aujourd'hui, grâce au progrès des techniques d'analyse, une activité quotidienne du biologiste.

Les enjeux, dans ce domaine, sont importants puisqu'il s'agit : d'abord d'efficacité thérapeutique : régler au meilleur niveau la posologie ensuite d'assurer la sécurité du patient en évitant les prises multiples et/ou toxiques, enfin d'économie au plan du volume de médicament prescrit.

La collaboration praticien-biologiste se doit être étroite et permanente pendant la durée du traitement afin d'éviter que les spécificités individuelles des patients ne soient prises en défaut par des prescriptions courantes.

Dans le cadre de la formation continue conventionnelle, ce deuxième fascicule sur cette discipline vous apportera une information claire et utile.

Nous espérons que ce Cahier vous permettra une mise à jour de vos connaissances sur ces molécules.

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

Adrien BEDOSSA
Président

**DOSAGE
DES MÉDICAMENTS**

TOME II

LISTE DES AUTEURS

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

- Philippe BOUCHER
Assistant de Biologie
Laboratoire de Biochimie, Pharmaco-Toxicologie et Analyse des Traces
Hôpital Édouard-Herriot, Place d'Arsonval
69437 LYON CEDEX 03

- 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

- Anne MIALON
Praticien Hospitalier
Laboratoires des Urgences Biochimiques et Toxicologiques
Centre Hospitalier Lyon-Sud
69495 PIERRE-BÉNITE CEDEX

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

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

DOSAGE DES MÉDICAMENTS – TOME II

I - LE CONTRÔLE DE QUALITÉ DES DOSAGES DE MÉDICAMENTS (A. FEULLU)	11
II - LES ANTALGIQUES MINEURS (M. MANCHON) :	11
II.1 – Paracétamol	15
II.2 – Salicylés	22
III - LES ANTIÉPILEPTIQUES	31
III.1 - Acide Valproïque (A. MIALON)	31
III.2 - Carbamazépine (A. MIALON)	43
III.3 - Phénobarbital (C. BERNY)	58
III.4 - Phénytoïne (C. BERNY)	69
IV - INTÉRÊT DES DOSAGES SANGUINS DES PSYCHOTROPES (J. GREFFE)	81
V - INTÉRÊT ET APPLICATIONS DE LA PHARMACOGÉNÉTIQUE EN BIOLOGIE CLINIQUE (Ph. BOUCHER)	111
VI - LA VANCOMYCINE (R. MELEY)	125

PRÉFACE

A la fin de l'année 1997, nous avons coordonné un cahier de formation (n° 09, décembre 1997) consacré au dosage des médicaments. Le président BEDOSSA a très amicalement mais très fermement insisté pour que ce cahier ait une suite.

Tout d'abord, nous avons demandé à Alain FEUILLU de rappeler en quelques mots le fonctionnement général des programmes de contrôle de qualité des médicaments. Puis, nous avons sollicité nos collègues de la région Lyonnaise, qui ont bien voulu rédiger des monographies suite à l'opération de contrôle organisée par l'Agence du Médicament au premier trimestre 1998. Il s'agit de Monique MANCHON, associée de ses collaboratrices, Claudette BERNY et Anne MIALON, et de Roland MELEY avec qui nous organisons un contrôle de qualité depuis de nombreuses années. C'est ainsi que vous trouverez des revues générales particulièrement orientées sur la description des techniques actuelles de dosage ; elles concernent des antalgiques majeurs : Paracétamol et Salicylés ; des antiépileptiques : Acide Valproïque, Carbamazépine, Phénobarbital et Phénytoïne ; ainsi que la Vancomycine. Le lecteur attentif constatera un certain nombre de répétitions concernant la description des techniques ; il s'agit d'un choix volontaire pour que ces monographies puissent être lues d'une manière autonome.

En ce qui concerne les psychotropes, le problème est particulier et complexe, et un simple dosage ne suffit pas à permettre l'adaptation thérapeutique ; après en avoir discuté longuement avec notre ami Jacques GREFFE, celui ci nous a proposé un papier particulièrement intéressant et qui apporte une multitude d'informations sur cette problématique.

Enfin, une nouvelle discipline est en plein développement et devrait prendre une place importante dans le domaine du contrôle thérapeutique : il s'agit de la pharmacogénétique, et notre jeune collègue Philippe BOUCHER nous propose une revue prospective passionnante.

Nous espérons que les lecteurs Biologistes confirmés ainsi que nos collègues en formation - je veux parler des internes en Biologie dont je m'occupe beaucoup à Lyon - trouveront des informations intéressantes et utiles dans leur exercice quotidien.

D. Grafmeyer

I - LE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ DANS LE DOMAINE DU DOSAGE DES MÉDICAMENTS

A. FEUILLU

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

I. INTRODUCTION

Le suivi thérapeutique est une donnée importante dans la surveillance des traitements médicamenteux. Le but du contrôle de qualité est de s'assurer de la justesse des valeurs trouvées pour une molécule donnée ceci à partir d'un sérum traité dans les mêmes conditions qu'un échantillon de patient. Effectivement dans ce type de contrôle il faut tenir compte non seulement du principe actif mais aussi de ses métabolites.

Nous en décrivons le principe et le mode d'interprétation statistique.

II. MATÉRIEL – MÉTHODES

Il existe 2 façons d'appréhender la participation à un contrôle de qualité, le GBEA exige le contrôle de qualité interne et externe.

a) Le contrôle de qualité interne

Le laboratoire utilise des sérums de contrôle de composition donnée, correspondant à son activité. Il transmet selon un calendrier établi les différentes valeurs de ce contrôle. Il s'agit dans ce cas d'une adhésion volontaire. Ceci permet de situer un laboratoire par rapport aux autres adhérents tant sur le plan de l'exactitude que de la précision.

b) Le contrôle de qualité externe

Il s'agit d'un contrôle de qualité obligatoire interlaboratoire, son caractère ponctuel le différencie du précédent. Celui-ci correspond à une obligation réglementaire à laquelle doit se soumettre tout laboratoire ayant déclaré réalisé ce type d'examens. Bien que ponctuel, il est un indicateur intéressant, celui-ci indique la fréquence des paramètres contrôlés réalisés, les techniques les plus utilisées ainsi que leur performance les unes par rapport aux autres.

Le matériel de contrôle : il est variable selon le type de molécule contrôlé

- Les sérums : cette trame pratique est la plus utilisée. Il s'agit de sérums lyophilisés d'origine bovine le plus souvent dont les concentrations des différentes molécules sont ajustées de façon à couvrir au maximum des situations thérapeutiques. Ceci permet de vérifier l'exactitude des valeurs aux taux usuels d'efficacité (valeur résiduelle) et d'évaluer aussi la limite de toxicité de la zone thérapeutique. D'une façon générale, les valeurs de ces échantillons se rapprochent de celles que l'on rencontre dans la pratique quotidienne.

Il n'existe pas de sérums véritablement polyvalents, car il y a certains croisements entre molécules médicamenteuses, comme digoxine-digitoxine par exemple. Les médicaments retrouvés dans ce type de contrôle sont :

- les anticonvulsivants : carbamazépine, phénobarbital, acide valproïque, phénytoïne
- les analeptiques respiratoires : théophylline, caféine
- les cardiotoniques : digoxine, digitoxine, quinidine, hydroquinidine, amiodarone
- les antibiotiques : classe des aminosides, la vancomycine
- les antituberculeux : isoniazide
- les antalgiques et anti-inflammatoires, comme salicylate-paracétamol
- cytostatique : Méthotrexate
- normoleptique : lithium, clomipramine et psychotropes

Ceci pour citer les plus couramment rencontrés.

• Le sang : plus rare compte-tenu en particulier des problèmes de conservation, son usage ne se présente que dans les cas incontournables. C'est celui des immunosuppresseurs comme la cyclosporine qui est le contrôle avec le plus d'adhérents tant sur le plan national, qu'international, on peut raisonnablement penser qu'à l'avenir le contrôle de qualité verra un grand développement pour ce genre de molécules. La surveillance dans ce domaine est importante compte-tenu de l'utilisation de ces molécules aux effets secondaires non négligeables pour les patients utilisateurs de ces produits. La difficulté repose sur le matériel de contrôle comme nous l'avons indiqué plus haut.

L'intérêt de l'utilisation de ces produits de contrôle ressort par l'étude statistique des résultats qui en est faite.

■ III. TRAITEMENT STATISTIQUE DU CONTRÔLE DE QUALITÉ

La transmission des résultats par les laboratoires suit l'évolution du développement des communications ; outre des bordereaux de résultats classiques, maintenant des liaisons directes pour tous les systèmes de transmission existant permettent dans certaines organisations notamment aux USA la gestion en temps réel de ce contrôle de qualité.

La première condition est que tous les laboratoires participants utilisent le même lot de spécimen de contrôle de qualité, ceci pendant un temps suffisamment long (1 an par exemple) de façon à faciliter l'exploitation du traitement des résultats exprimés soit en unités conventionnelles (le plus fréquemment) soit en unités SI.

Différents codages pour caractériser l'unité, les réactifs, l'analyseur employés permettent l'identification et une interprétation en fonction de la technique utilisée.

Le traitement statistique quelque soit le paramètre ou le niveau de concentration permet à chaque laboratoire de noter la précision et l'exactitude de ses résultats. Chaque message comporte la moyenne des résultats transmis par la laboratoire, la reproductibilité intralaboratoire (écart-type) ainsi que la moyenne des résultats obtenus par les utilisateurs de la même technique et la moyenne générale calculée avec l'ensemble des participants. Très

souvent utilisé, le diagramme de Youden sert à recueillir les valeurs de diverses origines, y compris celles d'un échantillon utilisé par deux méthodes différentes ou à comparer deux échantillons différents dosés par de nombreux laboratoires ; il est largement utilisé lors des enquêtes interlaboratoires.

Calcul de l'écart-type : les valeurs servant à calculer l'écart-type sont recueillies sur une période de 20 à 30 jours au choix du laboratoire. Effectivement, plus le nombre de dosage est grand pour un analyte donné, plus la moyenne concordera avec la moyenne absolue et plus la distribution (écart-type) sera étroite. Il faut éviter un trop petit nombre de résultats pour le médicament et un niveau donné, car cela peut donner une déviation inconsciente importante et une erreur systématique élevée.

Certains laboratoires utilisent des graphiques pour recueillir des résultats trouvés sur les sérums de contrôle de qualité. L'observation des graphiques peut être erronée si on n'a pas l'expérience et la connaissance du dosage à étudier.

Le recueil des valeurs obtenues et leur transposition sur le graphique du contrôle peut être source d'erreur, c'est la raison pour laquelle cette pratique doit être fortement déconseillée.

■ IV. CONCLUSION

Alors que le contrôle est universel et repose sur l'emploi de bonnes techniques et de bonnes notions analytiques, le contrôle de qualité pour ce domaine, comme pour les autres, est une demande personnelle de chaque laboratoire dans son choix de réalisation.

Le GBEA en souligne l'obligation ; le contrôle de qualité dans le domaine du dosage des médicaments peut être pratiqué non seulement par les sites impliqués dans le suivi thérapeutique, mais aussi au niveau des laboratoires de toxicologie.

D'une façon générale, le contrôle de qualité n'est pas une pratique ennuyeuse, il fait appel à l'ingéniosité de l'analyste dans la mesure où celui-ci interprète correctement des renseignements fournis par le traitement statistique. C'est une occasion de perfectionnement qui, bien acceptée, devient indispensable et améliore considérablement le travail de tout le personnel du laboratoire.

ORGANISMES PRATIQUANT LE CONTROLE DE QUALITÉ :

ASQUALAB : Anne VASSAULT - Alain FEUILLU
HÔPITAL CORENTIN-CELTON
37, bd Gambetta
92130 ISSY-LES-MOULINEAUX
Tél. : 01.46.38.01.11
E-mail : asqualab@wanadoo.fr

PROBIOQUAL : Monique MANCHON - Roland MELEY - Denis GRAFMEYER
BP 4016
69615 VILLEURBANNE CEDEX
Tél. : 04.72.65.34.90
E-mail : probioqual@easynet.fr

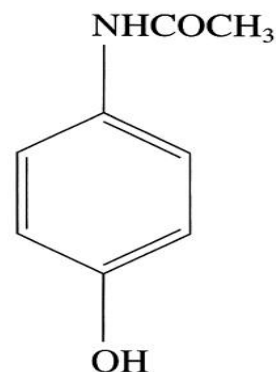
I. RAPPELS PHARMACOLOGIQUES (9)

I.1- Structure : Para acétyl aminophénol

On le trouve sous la forme de comprimés, gélules, comprimés effervescents, de solution buvable et de solution injectable.

Il existe 15 spécialités dont le Dafalgan, le Doliprane, et l'Effergal.

NB : Il existe une forme injectable le prodafalgan qui est un ester de diéthyl glycine, cette fonction ester est rapidement hydrolysée par les estérases plasmatiques avec libération de paracétamol.



Paracétamol

I.2- Posologie 1 à 3 g/24h

I.3- Pharmacologie

Antipyrétique par action centrale, inhibition d'une prostaglandine synthétase cérébrale.

Antalgique par inhibition de la synthèse de prostaglandines ; il modifie le seuil de la douleur, en bloquant la formation de l'influx douloureux au niveau des chémorécepteurs périphériques.

I.4- Pharmacocinétique

Absorption digestive : elle est rapide et quasi totale ; la biodisponibilité est supérieure à 90 % ; le taux plasmatique maximum est atteint en 15 à 25 minutes. La prise au cours du repas retarde l'absorption d'environ une heure.

Distribution : la diffusion est rapide dans tout l'organisme ; le volume de distribution est d'environ 0,95 l/kg.

Demi-vie plasmatique : 2 à 3 heures.

La liaison aux protéines plasmatiques est négligeable aux concentrations thérapeutiques ; elle peut atteindre 20 à 40 % lors d'intoxication.

Le métabolisme est essentiellement hépatique : glycuo et sulfoconjugaison sur le groupement OH pour former des dérivés inactifs, très hydrosolubles éliminés par le rein. Toujours au niveau hépatique, le paracétamol peut être hydroxylé et oxydé par action d'un cytochrome P450 microsomial puis desacétylé en un métabolite la N-Acétyl para benzoquinoneimine (NABQI). Ce métabolite est inactivé au fur et à mesure de sa libération par conjugaison immédiate au glutathion hépatocytaire. Quantitativement négligeable à l'état

normal mais potentiellement toxique pour la cellule hépatique par sa faculté d'établir des liaisons covalentes avec certaines macromolécules hépatocytaires, ce métabolite conduit en cas de surdosage à une nécrose cellulaire (7). 2 à 3 % du paracétamol est éliminé sans avoir été métabolisé.

La concentration plasmatique thérapeutique 1 heure après la prise est d'environ 10 à 20 mg/l ; le paracétamol est retrouvé dans la salive avec un bon coefficient de corrélation par rapport aux taux plasmatiques mesurés simultanément (4).

I.5- Effets secondaires (13)

Rares manifestations allergiques sous forme d'éruptions cutanées.

Excellente tolérance.

■ II TOXICOLOGIE (3,14)

II.1- Surdosage

Toxicité hépatique à partir d'une ingestion de 150 mg/kg. On observe d'abord une phase de latence sans signes spécifiques ou évocateurs allant de 2 à 24 h. Les premiers signes sont peu spécifiques : nausées, vomissements, diarrhée, douleurs abdominales. Au 3^e jour ictère avec tableau de cytolyse et d'insuffisance hépatique pouvant aller jusqu'à l'encéphalopathie hépatique avec coma, hyper-ammoniémie. Le syndrome hémorragique se manifeste vers le 4^e jour. Le décès peut survenir en 3 à 10 jours mais l'évolution vers la guérison sans séquelles est également possible.

Les signes biologiques sont : perturbation en 12 à 24 heures des ASAT, ALAT, LDH ; augmentation de la bilirubine et des PAL au 2-3^e jour. On note également dès la 24^e heure une diminution des facteurs de coagulation II, V, VII, X ; ainsi qu'une hyper-ammoniémie en cas d'encéphalopathie. L'importance de la cytolyse hépatique est en relation avec la concentration plasmatique de paracétamol analysée en fonction du temps écoulé depuis l'ingestion.

Il existe un diagramme (11) permettant de prévoir le risque d'hépatotoxicité entre la 4^e et la 16^e heure après l'ingestion (Cf. diagramme ci-joint) : pour des concentrations au-dessous de la ligne C, inférieures à 150 mg/l à la 4^e heure ou à 25 mg/l à la 15^e heure, le risque d'atteinte hépatique est pratiquement nul. Pour des concentrations au-dessus de la ligne A supérieures à 200 mg/l à la 4^e heure ou à 30 mg/l à la 15^e heure, il existe un risque important d'hépatite sévère. Il faut toujours utiliser une marge de sécurité dans l'interprétation des résultats car le moment de l'ingestion n'est pas souvent connu avec précision. Si ce moment n'est pas connu du tout, il faut répéter le dosage 2 heures plus tard pour apprécier la demi-vie plasmatique d'élimination ; la demi-vie, normalement de 2 à 3 heures, est augmentée en cas d'intoxication ; l'hépatite est probable lorsqu'elle dépasse 4 heures (12).

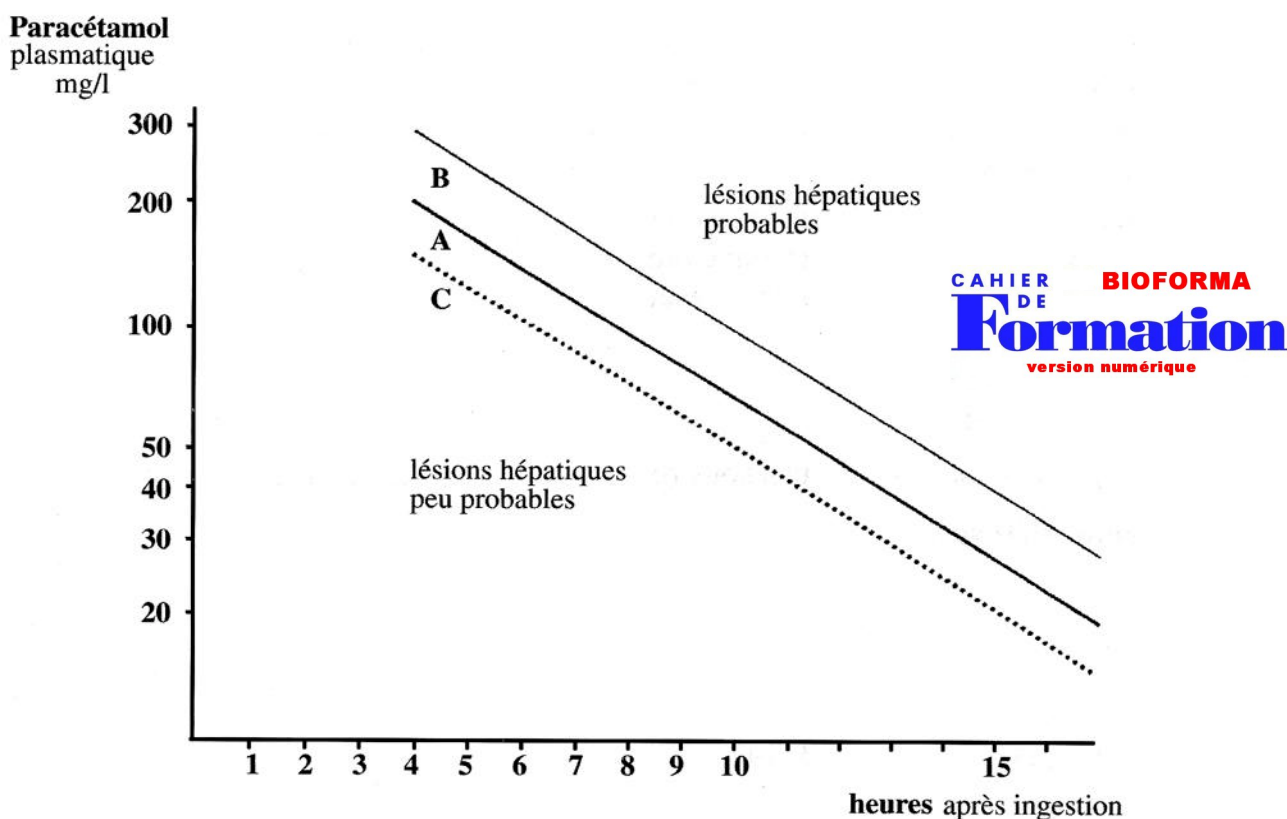


Figure 1: Diagramme de PRESCOTT

II.2 Traitement (5)

Evacuation digestive si le délai de prise en charge est court (inférieur à 4 h). Administration systématique de charbon végétal activé.

L'antidote est la N Acétyl Cystéine (NAC) ; administrée par voie orale ou IV, c'est un précurseur du glutathion, elle permet une détoxification de la NABQI. Une dose de charge de 150 mg/kg est administrée en 15 min puis 50 mg/kg en 4 h, puis 100 mg/kg en 16 h. L'administration parentérale de NAC est susceptible de provoquer, dans 2 à 3 % des cas, une réaction anaphylactoïde (nausées, vertiges, bronchospasme, tachycardie, urticaire, œdème, collapsus). La NAC administrée précocement, avant la 10^e heure suivant l'ingestion est le meilleur traitement pour prévenir la survenue d'une hépatite.

Le traitement de l'insuffisance hépatocellulaire est uniquement symptomatique ; une indication de transplantation hépatique peut être posée (1).

L'aspect prédictif du dosage du paracétamol plasmatique, le silence clinique de l'intoxication précoce et l'existence d'un antidote efficace font que le dosage de paracétamol doit être prescrit au moindre doute d'ingestion d'un composé contenant du paracétamol.

III. DOSAGES PLASMATIQUES

III.1 Prélèvement

Le dosage est réalisé sur sérum ou plasma hépariné prélevé au moins 4 heures après l'ingestion. Les dosages effectués moins de 4 heures après l'ingestion ne sont pas fiables car

l'absorption peut être incomplète. Il est recommandé de pratiquer le dosage en urgence compte tenu des conséquences thérapeutiques. Le paracétamol est stable 24 heures à température ambiante. Les sérums ou plasmas doivent être congelés si le dosage est décalé de plus de 24 heures.

III.2 Méthodes de dosage du paracétamol

• Méthodes chimiques colorimétriques

- Une méthode utilise la formation d'un indophénol obtenu par réaction du phénol en milieu hypobromite sur le para aminophénol. Le paracétamol doit au préalable être transformé en para aminophénol par hydrolyse chlorhydrique. Cette méthode est non fiable pour quantifier la concentration plasmatique de paracétamol (10).

- La méthode commercialisée par Sigma utilise la formation d'un nitro dérivé jaune en milieu alcalin après réaction de l'acétaminophène sur l'acide nitreux.

• **Méthode enzymatique** : en présence d'aryl acyl amidase, le paracétamol est hydrolysé en para aminophénol et acétate. La révélation se fait par l'intermédiaire de l'indophénol bleu mesuré à 615 nm. Cette méthode est automatisée sur Dimension de Dade Behring ou sur Intégra de Roche ; des réactifs commercialisés par Bioréa peuvent être adaptés sur des analyseurs multiparamétriques. Sur les analyseurs Vitros, le para aminophénol réagit avec du ferricyanide et de la tétrahydroquinoline pour former un composé coloré.

• **Méthodes immunologiques** : EMIT ou FPIA ; elles sont automatisables, rapides et fiables. Elles ont un seul défaut, le coût élevé des anticorps.

• **Méthode HPLC** : peu utilisée en pratique quotidienne (2).

• **Electrophorèse capillaire** : méthode récente encore confidentielle (6).

Un tableau comparatif de toutes les méthodes commercialisées figure en annexe.

III.3 Popularité et performances des méthodes

Selon les données du contrôle de qualité Pro-Bio-Qual, 3 appareils sont utilisés pour le dosage du paracétamol :

Le TDX (Abbott) par 52 % des laboratoires

L'ACA (Dade Behring) par 25% des laboratoires et

Le Cobas Mira avec réactifs E:MIT par 14 % des laboratoires

Les résultats sont satisfaisants : il n'y a pas de différence entre ces 3 méthodes et la dispersion des résultats est très faible (CV moyen = 5,9 %). Les méthodes enzymatiques semblent, pour l'instant, être peu utilisées. Le point important à tester pour ces méthodes est une éventuelle interférence négative de la N Acétylcystéine (8).

BIBLIOGRAPHIE

- 1- BERNAL W., WENDON J., RELA M., HEATON N., WILLIAM R. Use and outcome of liver transplantation in acetaminophen induced acute liver failure. *Hepatology* 1998, 27:14: 1050-1055
- 2- CAMPANERO M.A., CALAHORRA B., GARCIA-QUETGLAS E., LOPEZ OCARIZ A., HONORATO J. Rapid liquid chromatographie assay for the determination of acetaminophen in plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999, 20/1-2: 327-334
- 3- GARNIER R. Intoxications aiguës par le paracétamol et l'aspirine. *Rev. Prat.* 1997, 47 : 736-741
- 4- GLYNN J. P., BASTAIN W. Salivary excretion of paracétamol in man. *J. Pharm. Pharmacol.* 1973, 25 : 420-421
- 5- JONES A.L., LHEUREUX P. Progrès récents dans le traitement des intoxications au paracétamol. *Réanim. Urgences* 1998, 7/6 : 643-658
- 6- KUNKEL A., GUNTER S., WATZIG H. Quantitation of acetaminophen and salicylic acid in plasma using capillary electrophoresis without sample treatment. *J. Chromatogr. A* 1997, 768:11 :125-133
- 7- LARREY D., PERRIGAULT P.F. Mécanismes d'hépatotoxicité des médicaments dans l'insuffisance rénale aiguë en réanimation. L'insuffisance hépatique aiguë. *JEPU*, Éd. Arnette Blackwell, 1996 : 138-148
- 8- MAYER M., SALPETER L. More on interference of N Acetylcysteine in measurement of Acetaminophen. *Clin. Chem.* 1998, 44:14 : 892-893
- 9- MOULIN M. *Abrégés de Pharmacologie*. Éd. Masson 1998: 323-336
- 10- NOVOTRY P.E., ELSER R.C. Indophenol method for acetaminophen in serum examined. *Clin. Chem.* 1984, 30:16 : 884-886
- 11- PRESCOTT L.F. Paracetamol overdose. *Drugs* 1983, 25 : 290-314
- 12- SPORER K.A., KHAYAM -BASHI H. Acetaminophen and salicylate serum levels in patients with suicidal ingestion or altered mental status. *Am. J. Emerg. Med.* 1996, 14/5 443-447
- 13- VIAL T., BERGERET A., DELATRE D., DESCOTES J. Les effets indésirables du paracétamol. *Lyon Pharm.* 1988, 39 : 187-191
- 14- WILLIAMS R.H., ERICKSON T. Evaluating acetaminophen and salicylate poisoning in an emergency setting. *Lab. Med.* 1998, 29:11 : 33-37

PARACÉTAMOL

MÉTHODES DE DOSAGE

Fournisseur	ABBOTT	ABBOTT	ABBOTT	DADE BEHRING	DADE BEHRING
Appareil	TDX	ADX	AxSym	Mira ou appareil ouvert multiparamétrique	ACA
Principe	Immuno-FPIA	Immuno-FPIA	Immuno-FPIA	Immuno-Emit	Immuno-Emit
Codage	IJ	IJ	IJ	VB	VQ
Performances :					
Répétabilité : CV %	< 5 %	< 5 %	< 5 %	?	
Domaine de mesure mg/l	1 - 200	1 - 200	1 - 200	? - 200	10 - 200
Comparaison *	HPLC $y = 1,04 x - 1,16$ $r = 0,997$	TDX $y = 1,06 x + 0,18$ $r = 0,998$	TDX $y = 0,97 x + 4,5$ $r = 0,994$?	?
Interférences	Salicylamide - Acétanilide Acétophénétidine	Salicylamide - Acétanilide Acétophénétidine	?	?	?
Praticabilité :					
Réactifs prêt à l'emploi	Oui	Oui	Oui	Non Conservation 3 mois + 4 °C	Oui
Nombre de tests / unité de vente	100	50	100	150	50
Calibration / Nombre de points / Fréquence	6 points changement de lot	6 points changement de lot	6 points 2 si précalibration de lot	6 points CQ hors fourchettes	3 points changement de lot
Durée de l'analyse	10 minutes	10 minutes	10 minutes	5 minutes	8 minutes

* La méthode de comparaison est précisée dans chaque tableau

PARACÉTAMOL

MÉTHODES DE DOSAGE

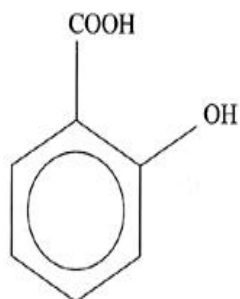
Fournisseur	ORTHO	DADE BEHRING	ROCHE	BIOREA	SIGMA
Appareil	Vitros	Dimension	Integra	Spectrophotomètre ou Automate Biochimie	Spectrophotomètre
Principe	Enzymatique	Enzymatique	Enzymatique	Enzymatique	Chimique après déprotéinisation
Codage	3K	9Q	9Z	9A	SS
Performances :					
Répétabilité : CV %	< 5 %	< 5 %	?	< 5 %	< 5 %
Domaine de mesure mg/l	10 - 200	2 - 300	1,6 - 300	2 - 453	? - 600
Comparaison *	HPLC $y = x - 3$ $r = 0,991$	EMIT ACAy = $1,04 x - 3$ $r = 0,998$	TDX $y = 1,04 x - 4,6$ $r = 0,994$?	?
Interférences	Protéines oxalate Fluorure citrate	?	?	Bilirubine	Salicylate DL Dopa Salicylamide DL Adrénaline Acide p. aminosalicylique
Praticabilité :					
Réactifs prêt à l'emploi	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Nombre de tests / unité de vente	?	?	150	60 (+ si adaptation sur multiparmétrique)	?
Calibration / Nombre de points / Fréquence	3 points changement de lot 3 mois	3 points changement de lot 3 mois	6 points changement de lot	1 point à chaque dosage	1 point à chaque dosage
Durée de l'analyse	< 10 minutes	< 10 minutes	< 10 minutes	30 minutes	20 minutes

* La méthode de comparaison est précisée dans chaque tableau

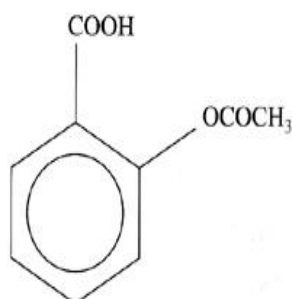
SALICYLÉS

M. MANCHON

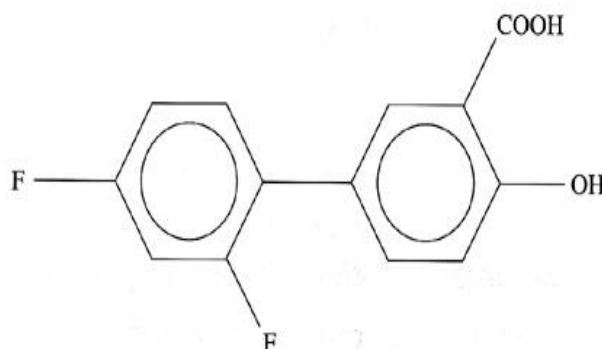
CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique



Acide salicylique



Acide acétyl-salicylique



Diflunisal = DOLOBIS

Les propriétés antipyrétiques de l'écorce de saule étaient connues depuis des siècles lorsque LEROUX isola en 1829 la salicyne, un glycoside dont l'hydrolyse fournit l'alcool salicylique oxydé en acide salicylique introduit en thérapeutique en 1875.

L'acide acétyl salicylique fut introduit à son tour ; il est rapidement transformé dans l'organisme en acide salicylique.

■ I. RAPPELS PHARMACOLOGIQUES

I.1 - Spécialités

Il existe 19 spécialités qui contiennent de l'aspirine, sous forme de :

Poudre pour solution buvable :	Aspégic, Catalgine
Comprimés effervescents :	Aspirine UPSA, Aspro, Solupsan
Comprimés :	Aspirine
Comprimés à croquer :	Aspirisucré
Gastro résistants :	Rhonal
Solution injectable :	Aspégic

Autres dérivés salicylés :

Diflunisal (Dolobis) :	dérivés difluorophenylé de l'acide salicylique
Éthenzamide (Cephyl) :	méthyl ester du salicylamide
Benorilate (Salipran) :	combinaison chimique d'aspirine et de para-cétamol avec libération dans le sang des deux constituants actifs

I.2- Pharmacologie

- Mécanisme d'action : effet inhibiteur des prostaglandines, effet inhibiteur de la cyclooxygénase plaquettaire bloquant ainsi la production de thromboxane A2 qui est le facteur de l'agrégation plaquettaire et effet inhibiteur de la synthèse de cytokines (2).

- Effets observés :

- Action anti-inflammatoire pour des posologies supérieures à 3 g/jour chez l'adulte.

- Action analgésique : sa puissance est égale à environ le 1/10^e de celle de la codéine et le 1/100^e de la morphine. Elle s'exerce de préférence sur les douleurs de faible intensité, plutôt superficielles que profondes, soit diffuses (céphalée, arthralgies, myalgies) soit bien localisées. Posologie : 1 à 2 g/jour. L'acide salicylique est le principe actif de nombreuses préparations analgésiques à usage externe.

- Action antipyrétique. Posologie : 1 à 2 g/jour.

- Effet anti agrégeant plaquettaire à des doses très faibles de 160 à 320 mg/j .

Effet uricosurique à doses très élevées supérieures à 4 g/jour ; à doses de 1 à 2 g/jour, l'aspirine diminue l'excrétion de l'acide urique.

I.3- Pharmacocinétique

- Résorption dans l'estomac et dans l'intestin grêle : dans l'estomac, le pH acide diminue l'ionisation et favorise l'absorption, mais dans le grêle, l'alcalinisation favorise une meilleure solubilisation et c'est à ce niveau que l'absorption est la plus importante. Le début de l'action survient en 30 min et le pic de concentration a lieu en 2 h. L'absorption est retardée lorsque les comprimés sont à délitement entérique. La biodisponibilité est excellente.

- Distribution dans tout l'organisme : volume de distribution 0,15 l/kg (aux doses thérapeutiques).

- Fixation aux protéines (albumine) importante : 80 à 90 %.

- Métabolisme et élimination : l'aspirine est rapidement transformée en acide salicylique (15 min). Une faible part (10 à 30 %) est éliminée dans les urines telle quelle (l'alcalinisation des urines augmente la fraction ionisée et diminue la réabsorption tubulaire). Le reste est métabolisé par le foie : conjugaison avec la glycine pour former l'acide salicylurique ou glycuronoconjugaison. Une faible quantité est hydroxylée en acide gentisique. Ces mécanismes de conjugaison sont saturés lorsque la concentration en salicylés est importante (11). La demi-vie est normalement de 2 h mais elle peut s'allonger considérablement (jusqu'à 40 h) lorsque la posologie augmente. Ce qui fait que les concentrations toxiques peuvent être rapidement atteintes.

- Les concentrations plasmatiques thérapeutiques sont comprises entre 150 et 250 mg/l. La zone toxique commence à 300 mg/l.

I.4- Effets secondaires (5)

- Troubles gastriques fréquents : douleurs, hyperacidité, gastrite, hémorragie digestive.

- Accidents allergiques rares : crise d'asthme, œdème de Quincke, état de choc.

- Le Syndrome de Reye survient chez l'enfant de 6 mois à 15 ans après un épisode infectieux traité par l'aspirine, il associe la survenue d'un ictère grave et d'une encéphalopathie convulsive. Ce syndrome est mortel dans 20 % des cas dans un tableau d'insuffisance hépato-cellulaire. Il est fréquent dans les pays anglo-saxons et a fait interdire l'aspirine aux enfants. En France, ce syndrome est rare et malgré plusieurs enquêtes sérieuses, l'aspirine n'a pas été jugée responsable.
- L'aspirine potentialise les effets dépresseurs de l'alcool, des antihistaminiques, des tranquillisants et des hypnotiques. Chez l'enfant à jeun ou qui vomit, l'aspirine peut provoquer une hypoglycémie et des convulsions.
- L'aspirine favorise les hémorragies par diminution de l'agrégabilité plaquettaire.

■ II. TOXICOLOGIE

II.1 Intoxication (6, 12)

- Fréquence : les intoxications volontaires sont assez rares, de 8 à 12 % des intoxications médicamenteuses volontaires en fonction des pays. Elles sont pour la plupart bénignes moins de 5 % des intoxications volontaires aux salicylés sont des intoxications graves. L'étiologie est en général soupçonnée par l'interrogatoire du patient ou de la famille. Les intoxications accidentelles ne sont pas rares en particulier chez les enfants par erreur de conditionnement. On peut noter aussi la possibilité d'intoxication par usage important d'applications cutanées de pommade à base de salicylés (1).
- Clinique : le délai d'apparition des premiers signes est très variable en fonction de la forme galénique absorbée, de quelques dizaines de minutes à plusieurs heures.
 - Hyperpnée : C'est le principal symptôme avec odeur acétonique de l'haleine. Ce symptôme est due à la stimulation directe des centres respiratoires, il apparaît lorsque la salicylémie dépasse 350 mg/l.
 - Troubles neuro-sensoriels : bourdonnements d'oreille, céphalées, vertiges, confusion. Chez l'adulte, les troubles de conscience se limitent à une somnolence, ils sont plus profonds chez les enfants et peuvent s'accompagner de convulsions.
 - Hyperthermie avec sueurs abondantes et vasodilatation périphérique.
 - Troubles digestifs quasi systématiques : nausées, vomissements, douleurs épigastriques.
 - Troubles de l'équilibre acido basique : ils sont constants, l'hyperventilation est d'abord responsable d'une alcalose respiratoire compensée par une fuite urinaire de bicarbonate. Cette phase est brève chez, l'enfant. A un stade ultérieur apparaît une acidose métabolique avec hyperlactacidémie, cétonurie et aminoacidurie. En cas d'intoxication massive, on peut voir apparaître une acidose mixte par épuisement respiratoire du malade.
 - Perturbations hydroélectrolytiques : hypokaliémie, déshydratation extra cellulaire.

- Autres anomalies métaboliques : hyperglycémie ou hypoglycémie dans les intoxications sévères. Troubles de la coagulation liés essentiellement à l'effet antiagrégant plaquettaire ; hypoprothrombinémie modérée.
- Troubles hémodynamiques uniquement au stade tardif des intoxications sévères, ils sont secondaires à la déshydratation et à l'acidose.

L'absorption d'une dose supérieure à 10 g chez l'adulte, à 100 mg/kg chez l'enfant peut être responsable d'une intoxication sévère.

II.2 Traitement (10)

Traitement évacuateur gastrique indiqué chez tout intoxiqué hospitalisé moins de 6 heures après une prise massive. Administration systématique de charbon activé.

Traitement symptomatique : réhydratation, rééquilibration hydroélectrolytique. Alcalinisation des urines qui permet d'accélérer l'élimination urinaire. Épuration extra rénale si nécessaire.



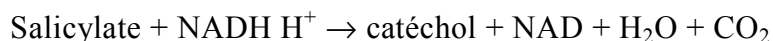
III. DOSAGES PLASMATIQUES

III.1- Prélèvement

Sérum ou plasma hépariné. Le dosage doit se faire en urgence en cas de contexte toxicologique. Le prélèvement est stable 8 heures à température ambiante, 48 heures à + 4°C. Si le dosage est différé, l'échantillon doit être congelé.

III.2 Méthodes de dosage

- Méthode chimique de TRINDER : elle est basée sur la réactivité entre les salicylates et les ions ferriques pour former un composé violet. Le diflunisal Dolobis® réagit également avec les ions ferriques (9). Cette méthode est utilisable pour le sang, les urines et les liquides de lavage gastrique après hydrolyse. Sa sensibilité et sa spécificité sont satisfaisantes mais elle est difficilement automatisable car les réactifs sont corrosifs. Cette méthode est cependant retrouvée sur deux automates Dade Behring, l'ACA et le Dimension.
- Méthode immunologique de type FPIA. Cette méthode utilise des anticorps spécifiques et la détection se fait en polarisation de fluorescence. Elle est automatisée sur les appareils Abbott TDX, Ax Sym. Elle est rapide, fiable mais relativement coûteuse.
- Méthode enzymatique ; cette méthode utilise une salicylate mono oxygénase



La diminution d'absorbance à 340 nm est proportionnelle à la quantité de salicylate. Cette méthode est automatisée sur les Synchron Beckman, et sur l'Intégra Roche. Des réactifs commercialisés par Bioréa peuvent être adaptés sur des analyseurs multiparamétriques. Sur les analyseurs vitros, le catéchol produit est oxydé par une tyrosinase en o.quinone qui réagit avec une hydrazone pour donner un composé rouge.

- Méthode HPLC (7) ; des méthodes HPLC existent mais elles ne sont que rarement utilisées car plus longues à mettre en œuvre que les méthodes précédemment citées.
- Electrophorèse capillaire (4).

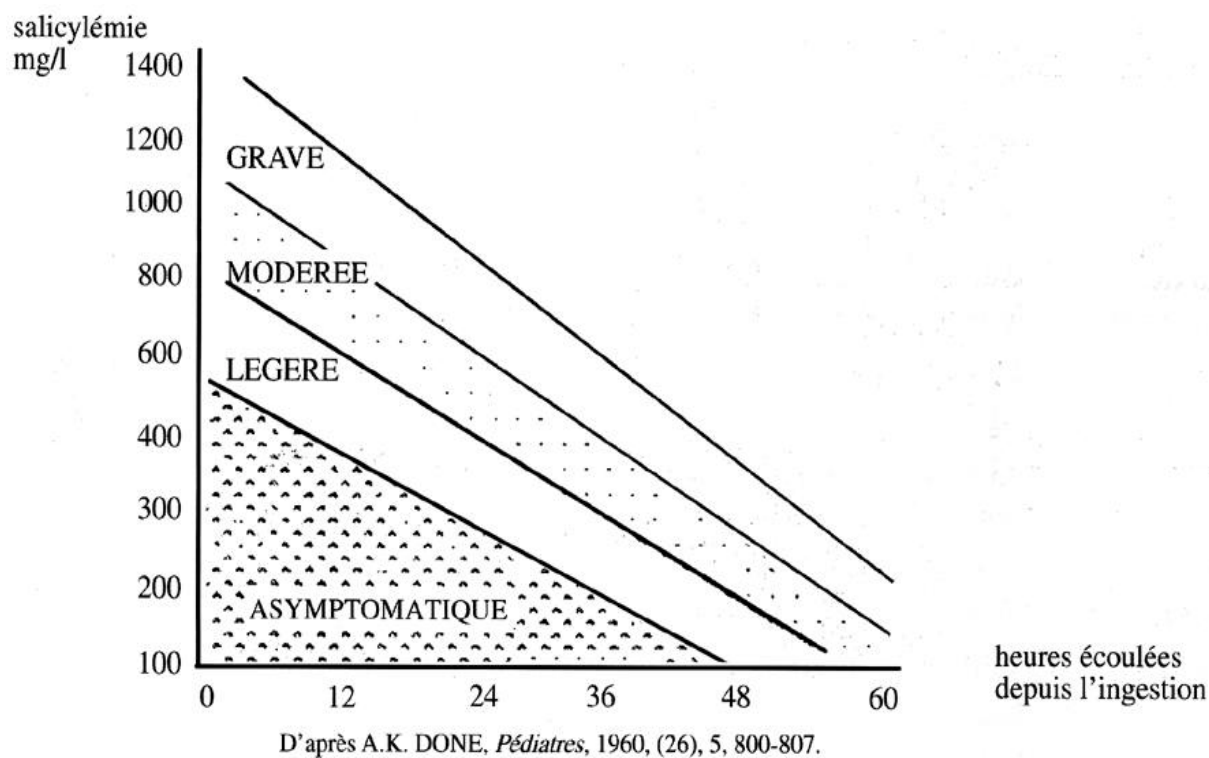
Un tableau comparatif des différentes méthodes de dosage commercialisées figure en annexe.

III.3- Interprétation des dosages

La zone thérapeutique de la salicylémie est comprise entre 100 et 200 mg/l. Au cours des intoxications aiguës avec symptômes, la salicylémie dépasse 250 mg/l, la survenue de troubles sévères est possible si elle est supérieure à 500 mg/l. Au-dessus de 900 mg/l, il peut être nécessaire d'envisager une épuration extra rénale.

Au cours des intoxications graves, la salicylémie doit être déterminée toutes les 4 heures jusqu'au retour à la normale.

Le nomogramme de Done (diagramme ci-dessous) quelquefois utilisé pour prédire la sévérité de l'intoxication en fonction de la concentration semble surestimer cette évaluation. Il doit être remplacé par un suivi clinique et une interprétation des résultats plasmatiques en fonction du délai écoulé entre ingestion et prélèvement (3).



■ IV. POPULARITÉ ET PERFORMANCES DES MÉTHODES

Selon les données du Contrôle National, 4 fournisseurs se partagent le marché des 177 laboratoires pratiquant ce dosage :

Abbott sur TDX ou ADX :	32 %
Dade Behring sur ACA ou Dimension :	18 %
Sigma (méthode colorimétrique) :	7 %
Bioréa (méthode enzymatique) :	6 %

Plus de 30 % des laboratoires n'utilisent aucune de ces 3 méthodes. Ils utilisent et fabriquent eux-mêmes leurs réactifs.

Les résultats de l'ensemble des laboratoires sont satisfaisants : il n'y a pas de différence d'exactitude entre les techniques, les linéarités sont bonnes et la dispersion des résultats pour chaque technique est tout à fait acceptable (< 10 %).

BIBLIOGRAPHIE

- 1- CHIARETTI A., SCHEMBRI WISMAYER D., TORTOROLO L., PIASTRA M., POLIDORI G. Salicylate intoxication using a skin ointment ? *Acta. Paediatr. Int. J. Paediatr.* 1997, 86/3 : 330-331
- 2- CLARKE R.J., MAYO G., PRICE P., FITZGERALD G.A. Suppression of thromboxane A2 but not of systemic prostacyclin by controlled-release aspirin. *New. Engl. J. Med.* 1991, 325/16 : 1137-1141
- 3- DUGANDZIC R.M., TIERNEY M.G., DICKINSON G.E, DOLAN M.C., MC KNIGHT D.R. Evaluation of the validity of the Done nomogram in the management of acute salicylate intoxication. *Ann. Emerg. Med.* 1989, 18/11 : 1186-1190
- 4- GOTO Y., MAKINO K, KATAOKA Y., SHUTO H., OISHI R. Determination of salicylic acid in human serum with capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 1998, 706/2 : 329-335
- 5- KARSH J. Adverse reaction and interactions with aspirin. Considerations in the treatment of the elderly patient. *Drug Saf.* 1990, 5/5 : 317-327
- 6- KRAUSE D.S., WOLF B.A, SHAW L.M. Acute aspirin overdose : mechanisms of toxicity. *Ther. Drug Monit.* 1992, 14 : 441-451
- 7- MC MAHON G.P., KELLY M.T. Determination of aspirin and salicylic acid in human plasma by column switching liquid chromatography using on line solid phase extraction. *Anal. Chem.* 1998, 70/2 : 409-414
- 8- MOULIN M. *Abrégés de Pharmacologie.* Éd. Masson 1998, 323-336
- 9- NORDT S.P. Diflunisal cross reactivity with the Trinder method for salicylate determination. *Ann. Pharmacother.* 1996, 30/9 : 1041-1042
- 10- NOTARIANNI L. A reassessment of the treatment of salicylate poisoning. *Drug Saf.* 1992, 7/4 : 292-303
- 11- PATEL D.K., HESSE A., OGUNBONA A., NOTARIANNI L.J., BENNETT P.N. Metabolism of aspirin after therapeutic and toxic doses. *Hum. Exp. Toxicol.* 1990, 9/3 131-136
- 12- YIP L., JASTREMSKI M.S., DART R.C. Salicylate intoxication. *J. Intensive Care Med.* 1997, 12/2 : 66-78

SALICYLÉS

MÉTHODES DE DOSAGE

Fournisseur	ABBOTT	ABBOTT	BECKMAN	ROCHE	BIOREA
Appareil	TDX	AxSym	Synchron	Intégra	Spectrophotométrie ou Analyseur de biochimie
Principe	Immuno-FPIA	Immuno-FPIA	Enzymatique Lecture 340 nm	Enzymatique Lecture 340 nm	Enzymatique Lecture 340 nm
Codage	IJ	IJ	9V	9Z	9E
Performances :					
Répétabilité : CV %	< 10 %	< 10 %	< 10 %	< 10 %	< 10 %
Domaine de mesure mg/l	5 - 800	5 - 800	4 - 1 000	3 - 1000	22 - 690
Comparaison *	HPLC $y = 0,98 x + 2,5$ $r = 0,982$	HPLC $y = x - 2,3$ $r = 0,995$	TDX $y = 1,06 x - 2,08$ $r = 0,996$	TDX $y = 0,947 x + 7$ $r = 0,978$	Trinder $y = 0,975 x - 25$ $r = 0,999$
Interférences	Ac. p. aminosalicylique - Chloroxazone Ac. Benzoïque - Diflunisal Ac. Gentisique - Salsalate		?	Ac. p. aminosalicylique Salicylate de méthyle Ac. homogentisique	Ac. p. aminosalicylique
Praticabilité					
Réactifs prêt à l'emploi	Oui	Oui	Non	Oui	Non
Nombre de tests / unité de vente		100	20		?
Calibration / Nombre de points / Fréquence	6 points changement de lot	6 points 2 si précalibration changement de lot	1 point tous les 7 jours	2 points changement de lot ou toutes les 8 semaines	1 point
Durée de l'analyse	10 minutes	10 minutes	10 minutes	10 minutes	10 minutes

* La méthode de comparaison est précisée dans chaque colonne

SALICYLÉS

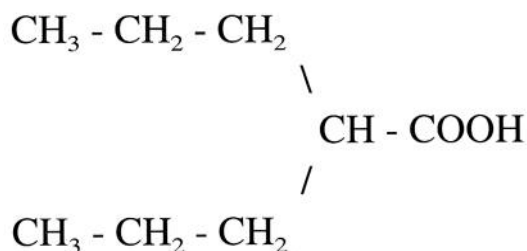
MÉTHODES DE DOSAGE

Fournisseur	ORTHO	DADE BEHRING	DADE BEHRING	SIGMA
Appareil	Vitros	Dimension	ACA	Spectrophotomètre
Principe	Colorimétrique Nitrate ferrique	Colorimétrique Nitrate ferrique	Colorimétrique Nitrate ferrique	Colorimétrique Nitrate ferrique
Codage	3K	SD	SD	SS
Performances :				
Répétabilité : CV %	<10%	<10%	<10%	<10%
Domaine de mesure mg/l	10 – 500	28 - 1000	23 - 1000	?
Comparaison *	HPLC $Y = x - 3$ $r = 0,991$	TDX $y = 1,01 x - 0,02$ $r = 0,997$		Trinder $y = 0,98 x$ $r = 0,999$
Interférences	N Acétylcystéine++ ↓ Benzothiazolethiol ↓ Thiosulfate ↓	Ac. salicylurique	Bilirubine ↓ Azide de sodium	?
Praticabilité :				
Réactifs prêt à l'emploi	Oui Conservation à -18°C	Oui	Oui	Oui
Nombre de tests / unité de vente			50	?
Calibration / Nombre de points / Fréquence		3 points changement de lot ou tous les 3 mois	3 points changement de lot	1 point à chaque dosage
Durée de l'analyse	10 minutes	10 minutes	10 minutes	10 minutes

* La méthode de comparaison est précisée dans chaque colonne

I. GÉNÉRALITÉS

I.1- Structure



C'est la structure d'un acide gras ramifié, l'acide dipropylacétique, dont les propriétés antiépileptiques ont été découvertes fortuitement, cette molécule étant utilisée comme solvant. L'acide valproïque est utilisé sous forme de sel, le valproate de sodium.

I.2- Propriétés pharmacologiques

L'acide valproïque est une molécule à propriété anticonvulsivante, efficace contre des types très variés de crises convulsives, en particulier les crises d'épilepsie.

I.3- Mode d'action (9)

L'acide valproïque exerce ses effets pharmacologiques essentiellement au niveau du système nerveux central par deux mécanismes : tout d'abord un effet pharmacologique direct, lié aux concentrations en valproate du plasma et du cerveau. Le deuxième mécanisme fait intervenir l'acide gamma amino-butyrique (GABA) : la crise d'épilepsie, au plan neurochimique, se traduit par un excès de neurotransmetteurs excitateurs provoquant une dépolarisation prolongée et extensive d'un groupe de neurones, et par une diminution des neurotransmetteurs inhibiteurs (GABA et glycine).

L'acide valproïque et certains de ses métabolites majorent l'effet inhibiteur du GABA par inhibition des enzymes de dégradation du GABA, en particulier la GABA-transaminase.

I.4- Indications cliniques (12)

Cette molécule est utilisée comme antiépileptique majeur (seul ou en association), efficace dans toutes les formes d'épilepsie (crises généralisées et crises partielles). Par ailleurs, l'acide valproïque est indiqué dans le traitement des convulsions fébriles de l'enfant, chez les nourrissons ou les jeunes enfants à haut risque et ayant déjà présenté au moins une convulsion. En outre, il exerce une action favorable sur les troubles caractériels de l'épileptique.

I.5- Voies d'administration - Posologies (12)

Le valproate de sodium (Dépakine® - Dépakine® chrono 500 mg) est présenté sous forme de comprimés gastrorésistants à 200 mg ou 500 mg, de comprimés à libération prolongée à 500 mg (enfant de plus de 6 ans compte tenu du dosage), de solution buvable à 200 mg/ml, de sirop à 200 mg par cuillère-mesure, de préparation pour usage parentéral IV à 400 mg/4 ml, réservée à l'usage hospitalier.

La posologie orale moyenne par 24 heures est de 30 mg/kg pour le nourrisson et l'enfant en 2 ou 3 prises, de 20 à 30 mg/kg pour l'adolescent et l'adulte en 2 ou 3 prises ou en 1 ou 2 prises pour les formes à libération prolongée.

L'administration se fait de préférence au cours des repas.

I.6 Caractéristiques pharmacocinétiques (9, 12)

- **Biodisponibilité** : après administration par voie orale, 100 % de la dose ingérée de valproate de sodium est absorbée par le tube digestif et atteint la circulation générale.
- **Pic plasmatique** : en fonction des formes galéniques et des individus, il est obtenu en 1 à 2 heures (comprimés) et 4 à 8 heures (comprimés à libération prolongée).
- **Volume de distribution** : de 0,1 à 0,4 litre/kg. Le valproate de sodium diffuse dans le sang, le LCR, le tissu nerveux en raison de sa liposolubilité mais aussi le placenta, le lait.
- **Liaison aux protéines** : il s'agit d'une molécule acide fortement liée aux protéines plasmatiques (80 à 90 % de taux de liaison), en particulier à l'albumine. La liaison est diminuée dans l'insuffisance rénale, ce qui augmente les effets de la molécule, puisque la forme active est la forme libre non liée aux protéines. Ce phénomène se retrouve en cas d'ictère ou d'association avec des médicaments fortement liés.
- **Métabolisme hépatique (3)** : comme les autres antiépileptiques majeurs, le valproate de sodium est fortement métabolisé au niveau du foie (le pourcentage de transformation hépatique est d'environ 90 %) avec glucuroconjugaison ou bêta-oxydation liée à la structure de l'acide valproïque. De nombreux métabolites sont retrouvés dont certains sont légèrement actifs. L'acide 3 céto-valproïque est le métabolite majeur. Par contre, à la différence des autres antiépileptiques majeurs, le valproate de sodium n'a pas d'effet inducteur sur les enzymes hépatiques. Il présente même une action inhibitrice enzymatique de type compétition, pour le métabolisme d'autres médicaments dont il peut élever la concentration sanguine.
- **Élimination** : elle est essentiellement rénale (80 %), mais on ne retrouve que très peu de forme inchangée dans les urines (< 10 %) : il s'agit essentiellement de métabolites inactifs.
- **Demi-vie** : elle est très variable d'un individu à l'autre (8 à 15 heures), parfois allongée chez le jeune enfant (18 à 20 heures), soit un état stable atteint après 3 à 4 jours de traitement. Elle diminue au cours du temps : plus le traitement est prolongé, plus la demi-vie diminue. Cette variabilité peut nécessiter l'adaptation du nombre de prises quotidiennes, en fonction de la durée du traitement.

I.7- Intérêt du dosage sanguin (1)

Le dosage du valproate de sodium peut être nécessaire car le rapport posologie / concentration plasmatique à l'équilibre varie selon la dose et l'individu.

Le dosage est indiqué :

- en cas de non efficacité du traitement ;
- en cas d'association de plusieurs antiépileptiques : l'effet inducteur de la carbamazépine, du phénobarbital, de la phénytoïne, de la primidone entraîne une diminution de la concentration sérique en valproate de sodium ;
- en cas d'association avec des médicaments non antiépileptiques, pouvant modifier le métabolisme de l'acide valproïque ;
- en cas d'insuffisance hépatique car l'acide valproïque est fortement métabolisé par le foie ;
- en cas de modification de la liaison de l'acide valproïque aux protéines : la fraction libre active est alors augmentée par :
 - baisse de l'albumine,
 - compétition avec la bilirubine en cas d'ictère,
 - insuffisance rénale (diminution de la liaison aux protéines),
 - compétition avec d'autres médicaments fortement liés aux protéines (phénytoïne, carbamazépine, anti-inflammatoires non stéroïdiens, salicylés),
 - l'état du sujet : chez le sujet âgé, la fraction libre circulante est augmentée, pendant la grossesse, il en est de même ;
- en cas d'apparition de signes de surdosage (ataxie, nystagmus, somnolence, confusion, vertiges, troubles visuels).

Les dosages plasmatiques permettent une meilleure adaptation de la posologie et sont nécessaires compte-tenu de la complexité et de la variabilité inter et intra-individuelle de la pharmacocinétique du valproate de sodium, même s'il est l'antiépileptique le plus facile à utiliser.

I.8- Intoxication aiguë au valproate de sodium

Les intoxications aiguës se traduisent par un coma calme, hypotonique, avec dépression respiratoire.

■ II. CONDITIONS DE PRÉLÈVEMENT ET DE CONSERVATION DES SPÉCIMENS

II.1- Milieux biologiques (1, 5)

Le dosage de l'acide valproïque peut être effectué sur sérum ou sur plasma hépariné. L'utilisation de la salive chez les enfants n'est pas possible pour l'acide valproïque car il n'y a pas de corrélation entre les concentrations salivaires et plasmatiques.

II.2- Conditions de prélèvement

Le prélèvement doit être fait à l'état d'équilibre pharmacocinétique, obtenu après 5 demi-vies, ce qui pour l'acide valproïque correspond à un prélèvement réalisé après 3 ou 4 jours de traitement. Le prélèvement doit être fait, juste avant la prise suivante d'acide valproïque. En cas de suspicion de surdosage, le prélèvement accompagne la survenue des signes cliniques d'intoxication.

II.3 Conservation des échantillons

24 heures à température ambiante ; 7 jours entre 2 et 8°C. Pour une conservation d'une durée supérieure à 7 jours, les échantillons doivent être congelés à - 20°C.

■ III. MÉTHODES DE DOSAGE

III.1 Méthodes chromatographiques (2)

La **chromatographie en phase gazeuse** a été la première technique utilisée pour le dosage de l'acide valproïque, en raison de la structure et de la grande volatilité de cette molécule.

La **chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse** est proposée par quelques auteurs.

Par contre la **chromatographie liquide haute performance** est moins facile d'emploi, car l'acide valproïque a une faible absorbance UV, ce qui rend la détection UV difficile et nécessite un prétraitement des échantillons.

Différentes techniques d'extraction préalables sont proposées par les auteurs.

Ces techniques permettent la mise en évidence de la molécule-mère et de ses nombreux métabolites.

Avantages et inconvénients des méthodes chromatographiques

- Avantages :

- Méthodes spécifiques, permettant de distinguer dans un spécimen la molécule-mère et ses métabolites, permettant de doser plusieurs molécules anti-épileptiques simultanément.
- Méthodes peu coûteuses en réactif.
- Méthodes très sensibles.

- Inconvénients :

- Méthodes délicates nécessitant un opérateur spécialisé, coûteuses en « temps personnel ».
- Méthodes à délai d'exécution important non adaptées au travail au coup par coup.

Actuellement, les méthodes chromatographiques manquant de praticabilité, sont délaissées au profit des méthodes immunologiques. Elles sont cependant toujours considérées comme les méthodes de comparaison, en l'absence de méthodes de référence.

III.2 Méthodes immunologiques (6, 8, 10)

Il existe de nombreuses méthodes immunologiques commercialisées pour le dosage de l'acide valproïque. C'est en effet un haptène contre lequel on peut fabriquer des anticorps soit monoclonaux, soit polyclonaux. Il s'agit de méthodes utilisant la réaction antigène/anticorps, fondées sur la compétition entre les molécules d'acide valproïque présentes dans le spécimen et des molécules d'acide valproïque marquées (conjugué) par une enzyme, un fluorophore, un composé luminescent ou des microparticules, vis-à-vis d'anticorps anti acide valproïque en quantité limitée.

III.2.1 - Méthodes par compétition, en phase homogène

Toutes les étapes de la réaction se déroulent simultanément dans le milieu réactionnel.

a) Marqueurs enzymatiques

- **EMIT : Enzyme Multiplied Immunoassay Technic.** L'acide valproïque du spécimen entre en compétition pour l'anticorps avec l'acide valproïque marqué à la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PDH). Lorsque l'anticorps bloque le site antigénique du conjugué, il bloque également le site enzymatique donc l'activité G-6-PDH du conjugué. L'activité enzymatique résultante est donc directement proportionnelle à la quantité d'acide valproïque présente dans le spécimen. L'activité de la G-6-PDH est mesurée par la vitesse d'oxydation de son substrat, le glucose-6-phosphate et par la vitesse de réduction simultanée du NAD en NAD réduit absorbant à 340 nm. Cette méthode développée par Syva est commercialisée par Dade Behring (ACA, Cobas Mira) et Bayer (Immuno 1). Les réactifs peuvent être adaptés sur d'autres automates de biochimie.

- **CEDIA : Cloned Enzyme Immuno Donor Assay.** Cette méthode est basée sur l'utilisation d'une enzyme bêta-galactosidase bactérienne scindée en 2 fragments inactifs par génie génétique : un fragment enzyme accepteur (EA) qui correspond à environ 90 % de la séquence de la bêta-galactosidase et un fragment enzyme donneur (ED) qui correspond à la séquence manquante. L'association spontanée des deux fragments donne une bêta-galactosidase active. L'acide valproïque du spécimen entre en compétition pour l'anticorps avec l'acide valproïque marqué avec le fragment enzyme donneur. Lorsque l'anticorps bloque le site antigénique du conjugué, il bloque également le fragment enzyme donneur qui ne peut plus se réassocier au fragment enzyme accepteur. L'activité enzymatique résultante, liée à la réassociation des fragments inactifs EA et ED est donc directement proportionnelle à la quantité d'acide valproïque présente dans le spécimen. L'activité de la bêta-galactosidase est mesurée par action sur son substrat, le rouge de chlorophénol-bêta-D-galactopyranoside : le produit de réaction, le bêta-galactoside du rouge de chlorophénol est mesuré à 570 nm. Cette méthode développée par Microgenics Corporation est commercialisée par Roche Boehringer (Hitachi). Les réactifs peuvent être adaptés sur d'autres automates de biochimie.

b) Marqueurs fluorescents

- **FPIA : Fluorescence Polarisation Immuno Assay.** Lorsqu'une molécule fluorescente est irradiée par de la lumière de longueur d'onde appropriée (longueur d'onde d'excitation), une partie de cette lumière est absorbée. La lumière absorbée est émise quelques

nanosecondes plus tard, mais à une longueur d'onde plus élevée (longueur d'onde d'émission). La polarisation éventuelle de la lumière émise dépend de la liberté de rotation du fluorophore en solution. Une petite molécule, telle que la fluorescéine peut effectuer une rotation rapide avant l'émission de la lumière, entraînant ainsi une dépolarisation de cette lumière émise. Par contre une macromolécule fluorescente effectuera une rotation beaucoup plus lente et la lumière émise restera polarisée. L'acide valproïque du spécimen entre en compétition pour l'anticorps avec l'acide valproïque marqué à la fluorescéine. Lorsque l'anticorps bloque le site antigénique du conjugué, le complexe antigène-anticorps obtenu, de taille importante ne permet pas une dépolarisation de la lumière. Lors du retour à l'état stable, la fluorescence émise est mesurée par une technique de polarisation de fluorescence, en point final. La concentration en acide valproïque est inversement proportionnelle à la polarisation. Cette méthode, développée par Abbott est commercialisée par Abbott (TDX, AXSYM) et par Roche Boehringer (INTÉGRA).

c) Précipitation en milieu liquide

Les méthodes proposées correspondent à une inhibition d'immunoprécipitation. L'acide valproïque du spécimen entre en compétition pour l'anticorps avec l'acide valproïque fixé sur des microparticules. Lorsque l'anticorps bloque le site antigénique du conjugué, il y a formation de complexes antigène-anticorps qui précipitent. La précipitation des microparticules par les anticorps est d'autant plus importante que le spécimen contient peu d'acide valproïque : la réaction est révélée par inhibition d'immunoprécipitation, proportionnelle à la quantité d'acide valproïque présente dans le spécimen. Les méthodes proposées par Beckman sont classées en fonction du principe de lecture : Synchron CX : lecture en turbidimétrie ; Array et Image : lecture en néphélométrie cinétique.

III.2.2- Méthodes par compétition, en phase hétérogène

Il y a séparation des formes libres et des formes liées aux anticorps.

- **FIA : Fluorescence Immuno Assay.** Il s'agit d'une méthode immunologique utilisant un support réactionnel constitué d'un film multicouches : trois couches sont fixées sur un film polyester : une couche filtrante contenant des tampons et des surfactants, une couche écran contenant de l'oxyde de fer empêchant les haptènes fluorescents libérés d'être excités par le rayon lumineux, une couche réactive contenant les haptènes marqués aux anticorps et un film polyester servant de support de base aux 3 autres couches. Il y a compétition au niveau de la couche réactive entre l'acide valproïque marqué par un fluorochrome (dérivé de la rhodamine) et l'acide valproïque du spécimen pour l'anticorps anti-acide valproïque fixé sur le film. Seul le conjugué fixé à l'anticorps reste au niveau de la couche réactionnelle : il est séparé des molécules de conjugué libre par une couche écran. L'intensité de fluorescence émise est inversement proportionnelle à la quantité d'acide valproïque de l'échantillon.

III.2.3- Performances des méthodes immunologiques (Tableaux I, II, III)

a) Performances techniques : fiabilité (données extraites des fiches techniques obtenues auprès des fournisseurs)

Précision : toutes les méthodes proposées ont une bonne reproductibilité ; les coefficients de variation indiqués par les fournisseurs sont toujours inférieurs à 10 %.

Domaine de mesure : ils sont proches d'une technique à l'autre et bien adaptés au suivi thérapeutique des patients, avec une linéarité permettant de détecter des concentrations toxiques.

La limite de détection, très basse pour les techniques EMIT sur Cobas Mira (0,5 mg/l) et FPIA sur TDX ou AXSYM (0,7 mg/l), permet d'appliquer en particulier la technique FPIA sur TDX au dosage de la fraction libre d'acide valproïque.

Comparaison des résultats : toutes les méthodes donnent des résultats proches les uns des autres. Les études de comparaison sont faites le plus souvent par rapport à la FPIA ou à une technique chromatographique (GC, HPLC).

Spécificité

- Interférences liées au prélèvement : Une interférence notable est à prendre en compte en FIA sur Opus Dade : la présence de bilirubine en quantité importante conduit à une surestimation des concentrations en acide valproïque.

- Interférences des métabolites de l'acide valproïque : l'acide valproïque fortement métabolisé conduit à une véritable série de métabolites, de structure proche de la molécule-mère. L'ensemble des fournisseurs propose une étude des réactions croisées de ces métabolites, en particulier de l'acide 3 cétovalproïque métabolite majeur, sur le dosage de l'acide valproïque : cependant d'un fournisseur à l'autre, les modalités pratiques d'étude de ces réactions croisées sont très variables (concentrations et pourcentage de réaction croisée ne sont pas toujours donnés avec précision).

- Interférences des autres molécules anti-épileptiques : ces interférences, à connaître en cas de polythérapie anti-épileptique, sont également répertoriées par l'ensemble des fournisseurs. Les résultats sont satisfaisants.

- Interférences liées à la structure d'acide gras ramifié de l'acide valproïque : des interférences liées à l'usage de plastifiants et à la présence d'acide gras se déposant sur les cuvettes sont rapportées pour la technique FPIA sur TDX.

Interférence liée à l'espèce animale productrice d'anticorps : des anticorps hétérophiles présents dans le spécimen, en particulier des anticorps anti-souris perturbent le dosage lorsque les anticorps utilisés sont des anticorps monoclonaux de souris.

b) Praticabilité

Toutes ces méthodes sont automatisables, d'exécution simple, utilisables au coup par coup ou, en série. Les délais d'exécution sont courts. Par contre, les réactifs sont onéreux, les conditionnements, la durée de stabilité des réactifs, la fréquence de calibration ne sont pas toujours adaptés au volume d'activité des laboratoires, ce qui génère un surcoût lié aux calibrations et à la perte en réactif. Certaines des techniques proposées ne sont utilisables que sur des systèmes fermés. Enfin ces méthodes immunologiques ne permettent pas de distinguer la molécule-mère d'acide valproïque de ses nombreux métabolites, comme le font les méthodes chromatographiques.

III.3 Cas particulier du dosage de l'acide valproïque libre

Le dosage de la forme libre est peu pratiqué. Il nécessite une filtration préalable des échantillons à travers un filtre retenant les protéines et les molécules fixées aux protéines.

L'étape de filtration doit être fiable et reproductible, et la méthode de dosage utilisée parfaitement sensible compte-tenu des faibles concentrations mesurées.

Une technique est proposée par Abbott sur TDX avec une ultrafiltration (dispositifs AMICON).

■ **IV. CRITÈRES DE CHOIX D'UNE MÉTHODE (4)**

Les méthodes d'immunoanalyses, compte tenu de leurs performances sont les plus employées par les laboratoires. Parmi ces méthodes, le choix est lié à l'équipement, au volume d'analyses et au mode de fonctionnement (travail en série, au coup par coup).

Le dosage de l'acide valproïque est fréquemment réalisé par les laboratoires, comme le montrent les enquêtes réalisées par Probioqual. La popularité et l'évolution des techniques (données Probioqual - 1998) montrent la prédominance de la FPIA (50 %) et des techniques EMIT (30 %), avec apparition de nouvelles techniques CEDIA, OPUS, Néphélométrie Beckman depuis 1996, au détriment des techniques EMIT.

L'exactitude des résultats, obtenue sur les enquêtes des 5 dernières années (données Probioqual - 1998) montre des résultats homogènes à l'exception de la technique OPUS qui donne des résultats légèrement supérieurs ; alors que les corrélations OPUS/FPIA de la littérature sont satisfaisantes. La société Dade Behring explique cet écart par un effet matrice des spécimens de contrôle sur les tests OPUS, tout particulièrement pour le dosage de l'acide valproïque. Cet effet a été signalé auprès de l'Agence du Médicament.

Les méthodes chromatographiques, seules, permettent l'analyse des métabolites.

■ **V. MÉTHODE DE RÉFÉRENCE**

La GC et l'HPLC sont les méthodes de comparaison pour étudier de nouvelles méthodes. Il n'existe pas de méthode de référence ou recommandée actuellement.

■ **VI. VALEURS USUELLES**

Zone thérapeutique à l'état d'équilibre : 400-100 mg/l.

Zone toxique : > 130 mg/l.

■ **VII. CONCLUSION**

Les méthodes immunologiques usuelles sont parfaitement adaptées au suivi thérapeutique des patients traités par l'acide valproïque. Leurs performances sont très satisfaisantes.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- ANDANSON M., BUREAU C., DERHAROUTUNIAN C., DEVYS C., SANTOLARIA N. Suivi thérapeutique des dosages sanguins des anti-épileptiques, des digitaliques et de la théophylline : modalités pratiques et interprétation des résultats. Lyon Pharmaceutique, 1997, 48, 29-41
- 2- BURKE J.T., THÉNOT J.P. Determination of antiepileptic drugs. Journal of Chromatography, 1985, 340, 199-241
- 3- COTARIA D., ZAIDMAN J. Valproic acid and the liver. Clin. Chem., 1998, 34, 5, 890-897
- 4- EYNARD J.C., GRAFMEYER D., MANCHON M., MELEY R. Contrôle ponctuel des médicaments : exploitation longitudinale de 5 années de contrôle sur 3 analytes : acide valproïque, carbamazépine, paracétamol. Probioqual, Juin 1998
- 5- GORODISCHER R., BURTIN P., VERJEE Z., HWANG P., KOREN G: Is saliva suitable for therapeutic monitoring of anticonvulsants in children : an evaluation in the routine clinical setting. Ther. Drug Monit., 1997, 19, 6, 637-642
- 6- HENDERSON D.R., FRIEDMAN S.B., HARRIS J.D., MANNING W.B., ZOCCOLI M.A. CEDIA, a new homogeneous immunoassay system. Clin. Chem., 1986, 32, 1637-1641
- 7- LEVY R., KOCH K. Drug interactions with valproic acid. Drug, 1982, 24, 543-556
- 8- MC GOWAN M., BANERJI A., BAER T., CORCORAN M., DAVIDSON C., KAUTIAINEN T., OSIKOWICZ G., NAGERSHETH C. Development of therapeutic drug monitoring assays for the Abbott AXSym registered immunoassay analyser. Klin. Labor., 1996, 42, 4, 313-316
- 9- MOULIN M. Pharmacologie. Editions Masson, 1998
- 1.0- O'CONNELL M.T., RATNARA J.N., ELYAS A.A., DOHENY M.H., DARSOT S., PATSALOS P.N. A comparison of the OPUS and TDX analysers for antiepileptic drug monitoring. Ther. Drug Monit., 1995, 17, 5, 549-555
- 11- REIDENBERG M., DRAYER D. Alteration of drug-protein binding in renal disease Clinical Pharmacokinetics, 1984, 9, 18-26
- 12- VIDAL 1998. Dépakine® - Dépakine® Chrono. Editions du Vidal (Paris), 1998 (74^e édition)

ACIDE VALPROÏQUE

MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES EN PHASE HOMOGÈNE

Tableau I

PRINCIPE	EMIT	EMIT	EMIT	CEDIA H	FPIA
Fournisseur	Dade Behring	Dade Behring	Bayer	Roche Boehringer	Abbott
Code technique	VQ	VB	V7	UD	IJ
Appareil	ACA	Mira - Mira Plus	Immuno 1	Hitachi	TDX - TDX-FLX
Précision (reproductibilité) *	4,1 % à 5 %		4,5 % à 6,8 %	1,8 % à 3,4 %	3,4 % à 3,7 %
Domaine de mesure	10 à 150 mg/l	0,5 à 150 mg/l	1,1 à 150 mg/l	3 à 150 mg/l	0,7 à 150 mg/l
Exactitude / FPIA**	TDX/y = 1,07x - 4/r = 0,99/ n=121	/	TDX/y = 0,97x + 3,5/r = ,985/ n=208	FPIA/y = 1,06x + 0,20/r = 0,994/ n=109	/
Exactitude / EMIT**	y=1,07x-3,5/r=0,99/ n =121	/	/	/	y=0,98x+0,33/r=0,962/ n =115
Exactitude / HPLC-GC**	GC/y=1,02x-2,4/r=0,99/ n =121	/	/	/	HPLC/y=0,97x+1,14/r=0,962/ n=41 GC/y =1,09 x + 2,061 r = 0,969 / n=49
Interférences liées au prélèvement ***					
Bilirubine	200 mg/l : < 10 %	300 mg/l : NS	300 mg/l ; NS	600 mg/l : NS	50 mg/l : < 5 %
Hémoglobine	5 g/l < 10 %	3 g/l : NS	3 g/l : NS	10 g/l : NS	10 g/l : < 5 %
Triglycérides	10 g/l : < 10 %	2 g/l : NS	3 g/l : NS	10 g/l : NS	5 g/l : < 5 %
Spécificité/ Métabolites ***					
Acide 2 propyl 4 pentenoïque	10 mg/l : 15 %	10 mg/l : NS		NP : 22,3 %	/
Acide 2 propylglutarique	500 mg/l : < 10 %	100 mg/l : NS		NP : < 0,4 %	Concentration thérapeutique 0 %
Acide 5 OH valproïque	100 mg/l : 12 %	50 mg/l : NS		NP : 5,8 %	Concentration thérapeutique 0 %
Acide 4 OH valproïque	100 mg/l : < 10 %	100 mg/l : NS		NP : 4,4 %	Concentration thérapeutique 0 %
Acide 3 OH valproïque	100 mg/l : 15 %	100 mg/l : NS		NP : 4,4 %	Concentration thérapeutique 0 %
Acide 3 cetoalproïque	100 mg/l : < 10 %	100 mg/l : NS		NP : 3,8 %	16 mg/l : < 10 %
Spécificité/ Autres antiépileptiques ***					
Carbamazépine	120 mg/l : < 10 %	1 g/l : NS	1 g/l : 0 %	NP : < 0,1 %	NP : < 1 %
Phénobarbital	150 mg/l : < 10 %	750 mg/l : NS	750 mg/l : 0 %	NP : < 0,1 %	NP : < 1 %
Phénytoïne	100 mg/l : < 10 %	1 g/l : NS	1 g/l : 0 %	NP : < 0,1 %	NP : < 1 %
Nature anticorps	NP, Mouton	Monoclonal, Souris	Monoclonal, Souris	Monoclonal, Souris	Polyclonal, mouton
Reconstitution réactif	Prêt à l'emploi	À reconstituer - remise A T° ambiante 20minutes	À reconstituer, consignes strictes	À reconstituer, consignes strictes	Liquide, prêt, à l'emploi
Conservation réactif ouvert	Sans objet	3 mois	4 semaines	45 jours	180 jours ou péremption
Nombre de tests / coffret	50 tests / boîte	300 tests	2 x 100 tests	77 tests	100 tests
Nombre de points de calibration	5 (10 ; 25 ; 50 ; 100 ; 150)	6 (0 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 ; 150)	6 (0 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 ; 150)	2	6 (0 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 150)
Fréquence de calibration	3 mois, ou nouveau lot	Changement de réactif	2 semaines ou nouveau lot	5 jours	Nouveau lot
Prélèvement préconise	Sérum ou plasma hépariné	Sérum ou plasma	Sérum ou plasma hépariné	Sérum ou plasma	Sérum ou plasma
Volume spécimen*	40 µl	6 µl	?	3-4 µl	2 µl
Date fiche technique	1996	1997	1998	1996	1997

* Fourchettes fonction des concentrations testées

*** Concentration de substance « interférente » et % réaction croisée

** y = méthode testée ; x = Autre méthode

• : Volume de la prise d'essai, volume mort non pris en compte

NS : Non significative cliniquement

NP : Non précisés

ACIDE VALPROÏQUE

MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES EN PHASE HOMOGÈNE

Tableau II

PRINCIPE	FPIA	FPIA	TURBIDIMETRIE	NEPHELOMETRIE	NEPHELOMETRIE
Fournisseur	Abbott	Roche	Beckman Couper	Beckman Couper	Beckman Couper
Code technique	IJ	IZ	HK	GK	GK
Appareil	AxSym	Integra	CX 7	Image	Array
Précision (reproductibilité) *	4 % à 4,7 %	2,1 % à 2,4 %	2,7 % à 4,6 %	1,8 % à 2,5 %	2,6 % à 5,1 %
Domaine de mesure	0,7 à 150 mg/l	3,2 à 150 mg/l	10 à 150 mg/l	10 à 150 mg/l	10 à 150 mg/l
Exactitude / FPIA **	TDX/y = 1 x - 0,01/r = 0,983/ n=100	y = 0,956 x + 0,243/r = 0,997/ n=207	TDX/y = 1,04 x + 1,996/r = 0,986/ n=104	TDX/y = 0,971 x + 2,62/r = 0,997/ n=129	TDX/y = 1,04 x - 0,37/r = 0,99/ n=67
Exactitude / EMIT **		y = 1,041 x - 1,365 r = 0,998 n = 207	/		
Exactitude / HPLC-GC **			/		
Interférences liées au prélèvement ***					
Bilirubine	200 mg/l : < 10 %	384 mg/l : < 10 %		480 mg/l : < 8 %	150 mg/l < 5 %
Hémoglobine	10 g/l : < 10 %	10 g/l : < 10 %		6 g/l : < 8 %	1,3 g/l : < 5 %
Triglycérides	11 g/l : < 10 %	19 g/l : < 10 %		7 g/l < 8 %	5 g/l : < 5 %
Spécificité / Métabolites ***					
Acide 2 propyl 4 pentenoïque	/	100 mg/l : 27 %	25 mg/l : NS	8 mg/l : < 8 %	> 10 mg/l : > 30 %
Acide 2 propylglutarique	Concentration thérapeutique 0 %	100 mg/l : 9,5 %	50 mg/l : NS	75 mg/l : < 8 %	> 500 mg/l : > 30 %
Acide 5 OH valproïque	Concentration thérapeutique 0 %			25 mg/l : < 8 %	> 50 mg/l : > 30 %
Acide 4 OH valproïque	Concentration thérapeutique 0 %			100 mg/l : < 8 %	> 100 mg/l : > 30 %
Acide 3 OH valproïque	Concentration thérapeutique 0 %			20 mg/l : < 8 %	> 100 mg/l : > 30 %
Acide 3 cetoalproïque	16 mg/l : < 10 %		150 mg/l : NS	50 mg/l : < 8 %	> 100 mg/l : > 30 %
Spécificité / Autres antiépileptiques ***					
Carbamazépine		140 mg/l : 0 %		40 mg/l : < 8 %	> 1 g/l : 30 %
Phénobarbital		400 mg/l 0 %		160 mg/l : < 8 %	> 750 mg/l : 30 %
Phénytoïne		200 mg/l : 0 %		100 mg/l : < 8 %	> 1 g/l : 30 %
Nature anticorps	Polyclonal, Mouton	Monoclonal, Souris	Monoclonal, Souris	Polyclonal, chèvre	NP, chèvre
Reconstitution réactif	Liquide, prêt à l'emploi	Liquide, prêt à l'emploi	Liquide, prêt à l'emploi	Liquide, prêt à l'emploi	Liquide, prêt à l'emploi
Conservation réactif ouvert	336 heures d'utilisation	8 semaines,	30 jours	14 jours avec bouchon	30 jours avec bouchon
Nombre de tests/ coffret	100 tests	200 tests	2 x 100 tests	150 tests	100 tests
Nombre de points de calibration	6 (0 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 150)	6 (0 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 150)	6	Étalonnage usine-calage de la courbe sur 1 point	Étalonnage usine-calage de la courbe sur 1 point
Fréquence de calibration	Nouveau lot	en double 8 semaines, ou nouveau lot	14 jours	14 jours, ou nouveau lot	nouveau lot
Prélèvement préconisé	Sérum ou plasma	Sérum ou plasma	Sérum ou plasma	Sérum ou plasma	Sérum
Volume spécimen	44 µl	(héparine) 2 µl	3 µl	(héparine) EDTA 0,33 µl	20 µl
Date fiche technique	1997	1995	1997	1998	1996

* Fourchettes fonction des concentrations testées

*** Concentration de substance « interférente » et % réaction croisée

** y = méthode testée ; x = Autre méthode

• : Volume de la prise d'essai, volume mort non pris en compte

NS : Non significative cliniquement

NP : Non précisé

TABLEAU III
ACIDE VALPROÏQUE

MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES EN PHASE HÉTÉROGÈNE

PRINCIPE	FIA
Fournisseur	Dade Behring
Code Technique	DA
Appareil	Opus
Précision (reproductibilité)*	4,9 % à 8,5 %
Domaine de mesure	3,9 à 150 mg/l
Exactitude / FPIA**	$y = 1 x + 1,9/r = 0,98/n = 100$
Exactitude / EMIT ***	
Exactitude / HPLC-GC **	
Interférences liées au prélèvement*** Bilirubine Hémoglobine Triglycérides	Interfère positivement 10 g/l : NS 6,6 g/l : NS
Spécificité / Métabolite Acide 2 propyl 4 penoïque Acide 2 propylglutarique Acide 5 OH valproïque Acide 4 OH valproïque Acide 3 OH valproïque Acide 3 Cetoalproïque	NP : 50,4 % NP : 17,3 % NP : 27,5 % NP : 11,7 % NP : < 2 % /
Spécificité / Autres antiépileptiques*** Carbamazépine Phénobarbital Phénytoïne	NP : < 1 % NP : < 1 % NP : < 1 %
Nature anticorps	Monoclonal, Souris
Reconstitution réactif	Prêt à l'emploi, remise à température ambiante
Conservation Réactif ouvert	Sans objet
Nombre de tests / coffret	50 et 10 tests
Nombre de points de calibration	6 (0 ; 12,5 ; 25 ; 100 ; 150)
Fréquence de calibration	8 semaines ou nouveau lot
Prélèvement préconisé	Sérum ou plasma (héparine, EDTA)
Volume spécimen•	10 µl
Date fiche technique	1996

* Fourchettes fonction des concentrations testées

** y = méthode testée ; x = Autre méthode

*** Concentration de substance "Interférente" et % réaction croisée

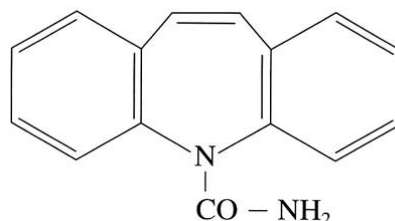
• : Volume de la prise d'essai, volume mort non pris en compte

NS : Non significative cliniquement

NP : Non précisé

I. GÉNÉRALITÉS

I.1- Structure



La carbamazépine est un dérivé imino-stilbène, à structure dibenzoazépine (5-carbamyl-5H-dibenzoazépine), apparenté chimiquement aux antidépresseurs tricycliques.

I.2- Propriétés pharmacologiques

La carbamazépine est une molécule à propriété anticonvulsivante ; elle est aussi normothymique ou thymoéquilibrante.

I.3- Mode d'action (10)

La carbamazépine est un antiépileptique dont le mode d'action est particulier. La crise d'épilepsie, au plan neurochimique se traduit par un excès de neurotransmetteurs excitateurs provoquant une dépolarisation prolongée et extensive d'un groupe de neurones, et par une diminution des neurotransmetteurs inhibiteurs. La carbamazépine s'oppose à la dépolarisation prolongée par un effet stabilisant de la membrane neuronale : à l'échelon cellulaire, elle agit sur les canaux sodiques voltage-dépendant (modifications des gradients ioniques cellulaires intéro-externes concernant en particulier les ions sodium, provoquant un effet hyperpolarisant). Elle exerce une action spécifique sur les neurones concernés sans modifier l'activité normale des neurones environnants.

Le mécanisme de son action normothymique est mal connu.

I.4- Indications cliniques (15)

- Cette molécule est utilisée comme antiépileptique : elle est indiquée dans le traitement des crises généralisées tonico-cloniques (« grand mal » associé ou non à des troubles psychiques), dans le traitement des crises partielles en particulier à manifestations psychomotrices. Elle a une action favorable sur les troubles de la personnalité, fréquents chez l'épileptique. Par contre elle n'a aucune action sur le « petit mal » (crises généralisées par

perte de connaissance, sans phénomène moteur, ni végétatif : absences typiques) ni sur « l'état de mal » .

- La carbamazépine, en raison de son action normothymique est utilisée dans la prévention des rechutes de dépression psychique au cours de la psychose maniaco-dépressive, en particulier dans les formes résistant au lithium ou présentant des contre-indications au lithium. Elle est indiquée dans le traitement des états d'excitation maniaque ou hypomaniaque.
- Enfin elle constitue aussi un traitement efficace de la névralgie faciale.

I.5- Voies d'administration - Posologies (15)

La carbamazépine (Tégrétol® - Tégrétol® LP 200 et 400 mg) est présentée sous forme de comprimés sécables à 200 mg, de comprimés sécables à libération prolongée à 200 mg et 400 mg, de suspension buvable à 100 mg/5 ml (cuillère-mesure).

La forme comprimé n'est pas adaptée à l'enfant de moins de 6 ans.

La posologie est strictement individuelle selon la réponse clinique. Elle dépend en outre de l'indication

- **Épilepsie** : la sécabilité des comprimés permet une mise en place du traitement très progressive, par paliers de 2 à 5 jours, pour atteindre la dose optimale en 2 semaines environ ; la posologie moyenne par 24 heures est de 10 à 20 mg/kg pour l'enfant, de 10 à 15 mg/kg pour l'adulte ; la carbamazépine est administrée en 2 ou 3 prises et pour les formes à libération prolongée en 2 prises ; l'administration est faite au moment des repas.

- **En psychiatrie** :

prévention des rechutes maniaco-dépressives : 400 à 800 mg/24 heures ; traitement des états d'excitation maniaque : 600 à 1 200 mg/24 heures.

- **Névralgie faciale** : la posologie initiale est de 200 à 400 mg/24 heures. Les doses sont augmentées jusqu'à suppression de la douleur.

I.6- Caractéristiques pharmacocinétiques (10, 15)

- **Biodisponibilité** : après administration par voie orale, 75 à 85 % de la dose ingérée est absorbée par le tube digestif et atteint la circulation générale. L'absorption est lente et irrégulière.

- **Pic plasmatique** : en fonction des formes galéniques et des individus, il est obtenu en 2 heures (suspension), 12 heures (comprimé), 24 heures (comprimé à libération prolongée) .

- **Volume de distribution** : de 0,8 à 1,9 litre/kg. La carbamazépine diffuse dans le sang, le LCR, le tissu nerveux mais aussi le placenta, le lait.

- **Liaison aux protéines** : la carbamazépine est fortement liée aux protéines plasmatiques (75 à 85 % de taux de liaison), en particulier à l'albumine.

- **Métabolisme hépatique** (2, 12, 16) : cette molécule est comme les autres antiépileptiques majeurs fortement métabolisée au niveau du foie (98 % de transformation hépatique). Le métabolite principal obtenu par oxydation est le 10,11 époxyde pharmacologiquement actif. L'époxyde serait responsable des effets secondaires (action anti-diurétique, thromboembolies, troubles de conduction, syndrome cholinergique). Sa concentration est

variable en fonction des traitements associés et de la durée du traitement. L'auto-induction du métabolisme de la carbamazépine explique que la proportion d'époxyde augmente en cas d'administration répétée. L'époxyde est ensuite transformé en 10,11 dihydroxyle inactif qui est éliminé dans les urines. Par un autre mécanisme mal élucidé, la carbamazépine est aussi métabolisée en 9-hydroxyméthyl-1-carbamoyl-acridan qui semblerait actif et qui est éliminé dans les urines.

En outre, la carbamazépine est un puissant inducteur enzymatique au niveau du foie : par stimulation des microsomes hépatiques, elle accélère le catabolisme de tous les médicaments dégradés par un mécanisme oxydatif y compris le sien. C'est pourquoi de très nombreuses interactions médicamenteuses sont décrites. Cet effet se manifeste biologiquement par une augmentation des transaminases et surtout de la gamma-GT.

- **Élimination** : la carbamazépine est éliminée à 70 % par le rein, essentiellement sous forme de métabolites, en particulier le 10,11-dihydroxyle. On retrouve dans les urines moins de 1 % de carbamazépine inchangée ; par ailleurs il existe une élimination biliaire (30 %).
- **Demi-vie** : elle est très variable d'un individu à l'autre. En monothérapie, elle est d'environ 24 à 26 heures. Elle peut être abaissée en cas d'association avec d'autres antiépileptiques inducteurs enzymatiques. La demi-vie diminue au cours du temps : plus le traitement est prolongé, plus la demi-vie diminue. Cette variabilité peut nécessiter l'adaptation du nombre de prises quotidiennes, en fonction de la durée du traitement.

I.7- Intérêt du dosage sanguin (1)

Le dosage de la carbamazépine est nécessaire car le rapport posologie/concentration plasmatique à l'équilibre varie selon la dose et l'individu (résorption aléatoire, induction enzymatique, métabolisme hépatique important et variable).

Le dosage est indiqué :

- En cas de non efficacité du traitement.
- En cas d'association de plusieurs antiépileptiques : l'effet inducteur de la carbamazépine, du phénobarbital, de la phénytoïne entraîne une diminution de la concentration sérique de carbamazépine. L'association avec l'acide valproïque conduit à une diminution de la concentration sérique d'acide valproïque par effet inducteur de la carbamazépine et à une augmentation de la concentration en 10,11 époxyde de carbamazépine par effet inhibiteur d'enzyme de l'acide valproïque.
- En cas d'association avec des médicaments non antiépileptiques, pouvant modifier le métabolisme de la carbamazépine (les mentions du Vidal concernant ces interactions médicamenteuses sont abondantes).
- En cas d'insuffisance hépatique car la carbamazépine est fortement métabolisée par le foie.
- En cas de modification de la liaison de la carbamazépine aux protéines : la fraction libre active est alors augmentée par :
 - baisse de l'albumine,
 - compétition avec la bilirubine en cas d'ictère,

- compétition avec d'autres médicaments; fortement liés aux protéines,
 - l'état du sujet : pendant la grossesse, la fraction libre circulante est augmentée.
- En cas d'apparition de signes de surdosage (sommolence, vertiges, ataxie, troubles visuels, sécheresse de la bouche).

Les dosages plasmatiques permettent une meilleure adaptation de la posologie et sont nécessaires compte tenu de la complexité et de la variabilité inter et intra-individuelle de la pharmacologie de la carbamazépine.

I.8- Intoxication aiguë à la carbamazépine

Elle s'accompagne 1 à 3 heures après l'ingestion de symptômes neuromusculaires : agitation, secousse musculaire, tremblements, mydriase, nystagmus.

On observe ensuite des troubles de conscience pouvant aller jusqu'au coma, des troubles cardiovasculaires : tachycardie, troubles de conduction, hypotension.

Chez l'enfant, on met en évidence des convulsions.

■ II. CONDITIONS DE PRÉLÈVEMENT ET DE CONSERVATION DES SPÉCIMENS

II.1 Milieux biologiques (13, 14)

Le dosage de la carbamazépine peut être effectué sur sérum ou sur plasma hépariné.

L'utilisation de la salive, en particulier chez les enfants est possible car pour la carbamazépine, la corrélation entre la concentration salivaire et la concentration plasmatique est bonne ; elle est encore meilleure entre la concentration salivaire et la concentration plasmatique de la fraction libre.

L'utilisation des cheveux pour le dosage de la carbamazépine permet de vérifier l'observance du traitement, ce qui pour ce type de traitement au long cours, peut être intéressant.

II.2 Conditions de prélèvement

Le prélèvement doit être fait à l'état d'équilibre pharmacocinétique, obtenu après 5 demi-vies, ce qui pour la carbamazépine correspond à un prélèvement réalisé après 5 ou 6 jours de traitement. Le prélèvement doit être fait juste avant la prise suivante de carbamazépine.

En cas de suspicion de surdosage, le prélèvement accompagne la survenue des signes cliniques d'intoxication.

II.3 Conservation des échantillons

- 24 heures à température ambiante ;
- 7 jours entre 2 et 8°C ;
- pour une conservation d'une durée supérieure à 7 jours, les échantillons doivent être congelés à - 20°C.

III.1- Méthodes chromatographiques (3, 4, 6)

- La **chromatographie en phase gazeuse** est d'usage délicat pour le dosage de la carbamazépine car il s'agit d'une molécule instable thermiquement dégradée en iminostilbène et en 9-méthylacridine. Des conditions opératoires adaptées permettent néanmoins l'usage de cette méthode.
- La **chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse** est proposée. Elle est utilisée en particulier pour l'étude du métabolisme hépatique de la carbamazépine.
- La **chromatographie liquide haute performance** est la méthode chromatographique la plus adaptée au dosage de la carbamazépine ; la détection UV est aisée compte tenu des caractéristiques spectrales de la molécule. Différentes techniques d'extraction préalable sont proposées par les auteurs.
- **Avantages et inconvénients des méthodes chromatographiques.**
 - Avantages : méthodes spécifiques, permettant de distinguer dans un spécimen la molécule-mère et ses métabolites, permettant de doser plusieurs molécules anti-épileptiques simultanément ; ce sont des méthodes sensibles et peu coûteuses en réactif.
 - Inconvénients : méthodes délicates nécessitant un opérateur spécialisé, coûteuses en « temps personnel », dont le délai d'exécution important fait qu'elles sont non adaptées au travail au coup par coup.

Actuellement, les méthodes chromatographiques manquant de praticabilité, sont délaissées au profit des méthodes immunologiques. Elles sont cependant toujours considérées comme les méthodes de comparaison, en l'absence de méthodes de référence.

III.2- Méthodes immunologiques (7, 9, 11)

Il existe de nombreuses méthodes immunologiques commercialisées pour le dosage de la carbamazépine. C'est en effet un haptène contre lequel on peut fabriquer des anticorps soit monoclonaux, soit polyclonaux. Il s'agit de méthodes utilisant la réaction antigène/anticorps fondées sur la compétition entre les molécules de carbamazépine présentes dans le spécimen et des molécules de carbamazépine marquées (conjugué) par une enzyme, un fluorophore, un composé luminescent ou des microparticules, vis-à-vis d'anticorps anti-carbamazépine en quantité limitée.

III.2.1 - Méthodes par compétition, en phase homogène

Toutes les étapes de la réaction se déroulent simultanément dans le milieu réactionnel.

a) Marqueurs enzymatiques

- **EMIT : Enzyme Multiplied Immunoassay Technic** : la carbamazépine du spécimen entre en compétition pour l'anticorps avec la carbamazépine marquée à la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PDH). Lorsque l'anticorps bloque le site antigénique du

conjugué, il bloque également le site enzymatique donc l'activité G-6-PDH du conjugué. L'activité enzymatique résultante est donc; directement proportionnelle à la quantité de carbamazépine présente dans le spécimen. L'activité de la G-6-PDH est mesurée par la vitesse d'oxydation de son substrat, le glucose-6-phosphate et par la vitesse de réduction simultanée du NAD en NAD réduit absorbant à 340 nm.

Cette méthode développée par Syva est commercialisée par Dade Behring (ACA, Cobas Mira) et Bayer (Immuno 1). Les réactifs peuvent être adaptés sur d'autres automates de biochimie.

• **CEDIA : Cloned Enzyme Immuno Donor Assay** : cette méthode est basée sur l'utilisation d'une enzyme bêta-galactosidase bactérienne scindée en 2 fragments inactifs par génie génétique : un fragment enzyme accepteur (EA) qui correspond à environ 90 % de la séquence de la bêta-galactosidase et un fragment enzyme donneur (ED) qui correspond à la séquence manquante. L'association spontanée des deux fragments donne une bêta-galactosidase active. La carbamazépine du spécimen entre en compétition pour l'anticorps avec la carbamazépine marquée avec le fragment enzyme donneur. Lorsque l'anticorps bloque le site antigénique du conjugué, il bloque également le fragment enzyme donneur qui ne peut plus se réassocier au fragment enzyme accepteur. L'activité enzymatique résultante, liée à la réassociation des fragments inactifs EA et ED est donc directement proportionnelle à la quantité de carbamazépine présente dans le spécimen. L'activité de la bêta-galactosidase est mesurée par action sur son substrat, le rouge de chlorophénol-bêta-D-galactopyranoside : le produit de réaction, le bêta-galactoside du rouge de chlorophénol est mesuré à 570 nm.

Cette méthode développée par Microgenics Corporation est commercialisée par Roche Boehringer (Hitachi). Les réactifs peuvent être adaptés sur d'autres automates de biochimie.

b) Marqueurs fluorescents

• **FPIA : Fluorescence Polarisation Immuno Assay** : lorsqu'une molécule fluorescente est irradiée par de la lumière de longueur d'onde appropriée (longueur d'onde d'excitation), une partie de cette lumière est absorbée. La lumière absorbée est émise quelques nanosecondes plus tard, mais à une longueur d'onde plus élevée (longueur d'onde d'émission). La polarisation éventuelle de la lumière émise dépend de la liberté de rotation du fluorophore en solution. Une petite molécule, telle que la fluoresceïne peut effectuer une rotation rapide avant l'émission de la lumière, entraînant ainsi une dépolarisation de cette lumière émise. Par contre une macromolécule fluorescente effectuera une rotation beaucoup plus lente et la lumière émise restera polarisée.

La carbamazépine du spécimen entre en compétition pour l'anticorps avec la carbamazépine marquée à la fluoresceïne. Lorsque l'anticorps bloque le site antigénique du conjugué, le complexe antigène-anticorps obtenu, de taille importante ne permet pas une dépolarisation de la lumière. Lors du retour à l'état stable, la fluorescence émise est mesurée par une technique de polarisation de fluorescence, en point final. La concentration en carbamazépine est inversement proportionnelle à la polarisation.

Cette méthode, développée par Abbott est commercialisée par Abbott (TDX, AXSYM) et par Roche Boehringer (INTEGRA).

c) Précipitation en milieu liquide

Les méthodes proposées correspondent à une inhibition d'immunoprécipitation.

- **Techniques Beckman** : la carbamazépine du spécimen entre en compétition pour l'anticorps avec la carbamazépine fixée sur des microparticules. Lorsque l'anticorps bloque le site antigénique du conjugué, il y a formation de complexes antigène-anticorps qui précipitent. La précipitation des microparticules par les anticorps est d'autant plus importante que le spécimen contient peu de carbamazépine : la réaction est révélée par inhibition d'immunoprécipitation, proportionnelle à la quantité de carbamazépine présente dans le spécimen.

Les méthodes proposées par Beckman sont classées en fonction du principe de lecture Synchron CX : lecture en turbidimétrie, Array et Image : lecture en néphélométrie cinétique.

- **Technique PETINIA** : Particule Enhanced Turbidimetric Inhibition Immunoassay : la carbamazépine du spécimen entre en compétition pour l'anticorps avec la carbamazépine fixée sur des particules de latex. La diminution de la vitesse d'agrégation est inversement proportionnelle à la concentration de carbamazépine de l'échantillon. La vitesse d'agrégation est mesurée en turbidimétrie. Cette technique est proposée par Dade Behring (Dimension).

III.2.2- Méthodes par compétition, en phase hétérogène

Il y a séparation des formes libres et liées aux anticorps.

a) FIA : Fluorescence Immuno Assay

Il s'agit d'une méthode immunologique utilisant un support réactionnel constitué d'un film multicouches : trois couches sont fixées sur un film polyester : une couche filtrante contenant des tampons et des surfactants, une couche écran contenant de l'oxyde de fer empêchant les haptènes fluorescents libérés d'être excités par le rayon lumineux, une couche réactive contenant les haptènes marqués aux anticorps et un film polyester servant de support de base aux 3 autres couches.

Il y a compétition au niveau de la couche réactive entre la carbamazépine marquée par un fluorochrome (dérivé de la rhodamine) et la carbamazépine de l'échantillon pour l'anticorps anti-carbamazépine fixé sur le film.

Seul le conjugué fixé à l'anticorps reste au niveau de la couche réactionnelle : il est séparé des molécules de conjugué libre par une couche écran. L'intensité de fluorescence émise est inversement proportionnelle à la quantité de carbamazépine de l'échantillon.

b) Luminescence

La carbamazépine contenue dans l'échantillon du patient entre en compétition avec un dérivé de la carbamazépine marqué à l'ester d'acridinium pour une quantité limitée d'anticorps couplé à des particules magnétiques (phase solide). Après une étape de séparation et de déclenchement de la réaction chimiluminescente, on mesure le nombre d'unités relatives de lumière (RLU) inversement proportionnel à la quantité de carbamazépine de l'échantillon. Cette méthode est proposée par Chiron sur ACS 180.

III.2.3- Performances des méthodes immunologiques (Tableaux I, II, III, IV)

a) Performances techniques : fiabilité (données extraites des fiches techniques obtenues auprès des fournisseurs)

- **Précision** : toutes les méthodes proposées ont une bonne reproductibilité ; les coefficients de variation indiqués par les fournisseurs sont toujours inférieurs à 10 %.
- **Domaine de mesure** : ils sont proches d'une technique à l'autre et bien adaptés au suivi thérapeutique des patients, avec une linéarité permettant de détecter des concentrations toxiques.
- **La limite de détection**, très basse pour les techniques EMIT sur Immuno 1 (0,2 mg/l) et FPIA sur Integra (0,12 mg/l), permet d'appliquer en particulier la technique FPIA sur TDX au dosage de la fraction libre de carbamazépine.
- **Comparaison des résultats** : toutes les méthodes donnent des résultats proches les uns des autres. Les études de comparaison sont : faites le plus souvent par rapport à la FPIA ou à une technique chromatographique (GC, HPLC).
- **Spécificité** :
 - Interférences liées au prélèvement : une interférence notable est à prendre en compte en FIA sur Opus Dade : la présence de bilirubine en quantité importante conduit à une surestimation des concentrations en carbamazépine.
 - Interférences des métabolites de la carbamazépine : l'ensemble des fournisseurs propose une étude des réactions croisées de ces métabolites, en particulier de l'époxyde actif, sur le dosage de la carbamazépine : cependant d'un fournisseur à l'autre, les modalités pratiques d'étude de ces réactions croisées sont très variables (concentrations et pourcentages de réaction croisée ne sont pas toujours donnés avec précision).
 - Interférences des autres molécules antiépileptiques : ces interférences, à connaître en cas de polythérapie antiépileptique, sont également répertoriées par l'ensemble des fournisseurs. Les résultats sont satisfaisants, sauf pour l'association phénobarbital (à concentration toxique 100mg/l)-carbamazépine sur Beckman Array.
 - Interférences liées à la structure de la carbamazépine : les antidépresseurs tricycliques ont été testés par les fournisseurs en raison de leur parenté structurale avec la carbamazépine. Il n'y a pas d'interférence notable.
 - L'utilisation de solution lipidique pour alimentation parentérale conduit à des résultats erronés.
 - Interférence liée à l'espèce animale productrice d'anticorps : des anticorps hétérophiles présents dans le spécimen, en particulier des anticorps anti-souris perturbent le dosage lorsque les anticorps utilisés sont des anticorps monoclonaux de souris.

b) Praticabilité

- Toutes ces méthodes sont automatisables d'exécution simple, utilisables au coup par coup ou, en série ; les délais d'exécution sont courts.
- Par contre, les réactifs sont onéreux, les conditionnements, la durée de stabilité des réactifs, la fréquence de calibration ne sont pas toujours adaptés au volume d'activité des labo-

ratoires, ce qui génère un surcoût lié aux calibrations et à la perte en réactif. Certaines des techniques proposées ne sont utilisables que sur des systèmes fermés.

- Enfin ces méthodes immunologiques ne permettent pas de distinguer la molécule-mère de carbamazépine de ses nombreux métabolites en particulier l'époxyde, comme le font les méthodes chromatographiques.

III.3- Cas particulier du dosage de la carbamazépine libre

Le dosage de la forme libre est peu pratiqué. Il nécessite une filtration préalable des échantillons à travers un filtre retenant les protéines et les molécules fixées aux protéines. L'étape de filtration doit être fiable et reproductible, et la méthode de dosage utilisée parfaitement sensible compte tenu des faibles concentrations mesurées.

Une technique est proposée par Abbott sur TDX avec une ultrafiltration (dispositifs AMICON).

III.4- Cas particulier du dosage salivaire (13)

Dans la salive, on retrouve environ 24 % de la concentration plasmatique. La corrélation obtenue avec la forme libre de carbamazépine sérique est bonne puisque cette forme libre est évaluée à 23 % de la concentration plasmatique totale.

III.5- Méthodes par électrophorèse capillaire (8)

Ces méthodes permettent la mesure simultanée de plusieurs antiépileptiques. Elles sont encore du domaine de la recherche et semblent bien corrélées à la FPIA.

■ IV. CRITÈRES DE CHOIX D'UNE MÉTHODE (5)

Les méthodes d'immunoanalyses, compte-tenu de leurs performances sont les plus employées par les laboratoires. Parmi ces méthodes, le choix est lié à l'équipement, au volume d'analyse et au mode de fonctionnement (travail en série, au coup par coup).

Le dosage de la carbamazépine est fréquemment réalisé par les laboratoires, comme le montrent les enquêtes réalisées par Probioqual.

La popularité et l'évolution des techniques (données Probioqual - 1998) montrent la prédominance de la FPIA (50 %) et des techniques EMIT (35 %), avec apparition de nouvelles techniques CEDIA, OPUS, Néphélométrie Beckman depuis 1996, au détriment des techniques EMIT.

L'exactitude des résultats, obtenue sur les enquêtes des 5 dernières années (données Probioqual - 1998) montre des résultats homogènes à l'exception de la technique OPUS qui donne des résultats légèrement supérieurs alors que les corrélations OPUS/FPIA de la littérature sont satisfaisantes. La société Dade Behring explique cet écart par un effet matrice des spécimens de contrôle sur les tests OPUS, tout particulièrement pour le dosage de la carbamazépine. Cet effet a été signalé auprès de l'Agence du Médicament.

Les méthodes chromatographiques, seules, permettent l'analyse des métabolites.

■ V. MÉTHODE DE RÉFÉRENCE

L'HPLC est la méthode de comparaison pour étudier de nouvelles méthodes. Il n'existe pas de méthode de référence ou recommandée actuellement.

■ VI. VALEURS USUELLES

Zone thérapeutique à l'état d'équilibre : 4-12 mg/l.

Zone toxique : > 15 mg/l.

■ VII. CONCLUSION

Les méthodes immunologiques usuelles sont parfaitement adaptées au suivi thérapeutique des patients traités par la carbamazépine. Leurs performances sont très satisfaisantes. Cependant les techniques chromatographiques gardent un intérêt particulier pour cette molécule : elles permettent la mesure de l'époxyde métabolite actif, en partie responsable des effets secondaires.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- ANDANSON M., BUREAU C., DERHAROUTUNIAN C., DEVYS C., SANTOLARIA N. Suivi thérapeutique des dosages sanguins des anti-épileptiques, des digitaliques et de la théophylline : modalités pratiques et interprétation des résultats. *Lyon Pharmaceutique*, 1997, 48, 29-41
- 2- BERTILSSON L., TOMSON T. Clinical pharmacokinetics and pharmacological effects of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide. An update, *Clinical Pharmacokinetics*, 1986, 11, 177-198
- 3- BURKE J.T., THENOT J.P. Determination of antiepileptic drugs. *Journal of Chromatography*, 1985, 340, 199-241
- 4- CHOLLET D., CASTELLA E., COMBE P., ARNERA V. High-peed liquid chromatographie method for the monitoring of carbamazepine and its active métabolite, carbamazepine-10,11 epoxide in human plasma. *Journal of Chromatography*, 1996, 683, 237243
- 5- EYNARD J.C., GRAFMEYER D., MANCHON M., MELEY R. Contrôle ponctuel des médicaments : exploitation longitudinale de 5 années de contrôle sur 3 analytes : acide valproïque, carbamazépine, paracétamol. *Proobioqual* - Juin 1998
- 6- HALLBACH J., VOGEL H., GUDER W.G. Determination of lamotrigine, carbamazepine and carbamazepine epoxide in human serum by gaz chromatography mass spectrometry. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1997, 35, 755-759

- 7- HENDERSON D. R., FRIEDMAN S. B., HARRIS J. D., MANNING W. B., ZOCCOLI M.A. CEDIA, a new homogeneous immunoassay system. *Clin. Chem.*, 1986, 32, 1637-1641
- 8- KATAOKA Y., MAKINO K., OISHI R. Capillary electrophoresis for therapeutic drug monitoring of antiepileptics, *Electrophoresis*, 1998, 19, 2856-2860
- 9- MC GOWAN M., BANERJI A., BAER T., CORCORAN M., DAVIDSON C., KAUTIAINEN T., OSIKOWICZ G., NAGERSHETH C. Development of therapeutic drug monitoring assays for the Abbott AXSym registered immunoassay analyser. *Klin. Labor.*, 1996, 42, 4, 313-316
- 10- MOULIN M. *Pharmacologie*, Editions Masson, 1998
- 11- O' CONNFI L MT., RATNARA J.N., ELYAS A.A., DOHENY M.H., DARSOT S., PATSALOS P.N. A comparison of the OPUS and TDX analysers for antiepileptic drug monitoring. *Ther. Drug Monit.*, 1995, 17, 5, 549-555
- 12- POTTER J.M., DONNELLY A. Carbamazepine-10,11 epoxide in therapeutic drug monitoring. *Ther. Drug Monit.*, 1998, 20, 652-657
- 13- ROSENTHAL E., HOFFER E., BENARYEH H., BADARNI S., BENDERLY A., HEMLI Y. Use of saliva in home monitoring of Carbamazepine levels. *Epilepsia*, 1995, 36, 72-74
- 14- TSATSAKIS A. M., PSILLAKIS T. K., TZATZARAKIS M., KOURTOPOULOS H., PARITSIS N. Carbamazepine levels in the hair of patients under long-term treatment: a preliminary study. *Clin. Chem. Acta*, 1997, 25, 187-195
- 15- VIDAL 1998. *Tégrétol®*, *Tégrétol® LP*, Editions du Vidal (Paris), 1998 (74^e édition)
- 16- WAD N., GUENAT C., KRAMER G. Carbamazepine : detection of another metabolite in serum, 9 hydroxymethyl- 10-carbamoyl acridan. *Ther. Drug Monit.*, 1997, 19, 314-317

CARBAMAZÉPINE

MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES EN PHASE HOMOGÈNE

Tableau I

PRINCIPE	EMIT	EMIT	EMIT	CEDIA II	TURBIDIMÉTRIE
Fournisseur	Bayer	Dade Behring	Dade Behring	Roche Boehringer	Dade Behring
Code technique	V7	VB	VQ	UD	HQ
Appareil	Immuno 1	Mira - Mira Plus	ACA SX	Hitachi	Dimension
Précision (reproductibilité) *	5,2 % à 7,4 %		7,4 % à 11 %	1,1 % à 2,7 %	3 % à 7,7 %
Domaine de mesure	0,2 à 20 mg/l	0,5 à 20 mg/l	2 à 20 mg/l	0,5 à 20 mg/l	0,5 à 20 mg/l
Exactitude / FPIA **	$y=0,99x+2/r=0,949/n=221$	/			
Exactitude / EMIT*		/	$y = 0,84 x + 1 / r 0,947$		$y = 0,99 x + 0,06 / r = 0,979/n=82$
Exactitude / HPLC-GC **	/	/	/		/
Interférences liées au prélèvement ***					
Bilirubine	300 mg/l : NS	300 mg/l : NS		600 mg/l : < 10 %	200 mg/l : < 10 %
Hémoglobine	8 g/l : NS	8 g/l : NS	100 mg/l : < 10 %	10 g/l : < 10 %	5 g/l : < 10 %
Triglycérides	10 g/l : NS	7,5 g/l : NS	NP NS	10 g/l : < 10 %	10 g/l : < 10 %
Spécificité/Métabolites*** et structures proches					
Carbamazépine 10-11	50 mg/l : NS	50 mg/l : NS		250 mg/l : 7,4 %	Dosé
Imipramine	/	/		200 mg/l : 5,6 %	
Amitriptyline	40 mg/l : NS	5 mg/l : NS		100 mg/l : 18,6 %	
Nortriptyline	/	/		/	
Désipramine	/	/	NS NS	/	3 mg/l : < 10 %
Spécificité/ Autres antiépileptiques ***					
Acide valproïque	1 g/l : NS	1 g/l : NS	//	NP : < 1 %	500 mg/l : < 10 %
Phénobarbital	500 mg/l : NS	500 mg/l : NS	NP NS	NP : < 1 %	150 mg/l : < 10 %
Phénytoïne	500 mg/l : NS	500 mg/l : NS	NP NS	NP < 1 %	100 mg/l : < 10 %
Nature anticorps	Monoclonal, Souris	Monoclonal, Souris	NP, Mouton	Monoclonal, Souris	Monoclonal, Souris
Reconstitution réactif	Liquide, prêt à l'emploi	Liquide, prêt à l'emploi Remise à T° ambiante 20 minutes	Prêt à l'emploi	À reconstituer - Consignes strictes	Liquide, prêt à l'emploi
Conservation réactif ouvert	30 jours	Péremption	Sans objet	60 jours	72 heures
Nombre de tests / coffret	100 tests	100 tests	50 tests	100 tests	80 tests
Nombre de points de Fréquence de calibration	6 (0 ; 2 ; 4 ; 8 ; 12 ; 20) 14 jours ou nouveau lot	6 (0 ; 2 ; 4 ; 8 ; 12 ; 20) Nouveau lot	5 (2 ; 4 ; 8 ; 12 ; 20)	2 Nouveau lot	5 (0 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20) en double 30 jours ou nouveau lot
Prélèvement préconisé	Sérum ou plasma hépariné	Sérum ou plasma	Sérum ou plasma	Sérum ou plasma (héparine, EDTA)	Sérum ou plasma
Volume spécimen•		3 µl	40 µl	3 µl	3 µl
Date fiche technique	1998	1997	1996	1998	1997

* Fourchettes fonction des concentrations testées

*** Concentration de substance « interférente » et % réaction croisée

** y = méthode testée ; x = Autre méthode

• : Volume de la prise d'essai, volume mort non pris en compte

NS : Non significative cliniquement

NP : Non précisé

CARBAMAZÉPINE

MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES EN PHASE HOMOGÈNE

Tableau II

PRINCIPE	FPIA	FPIA	FPIA
Fournisseur	Roche Boehringer	Abbott	Abbott
Code technique	IZ	IR	IJ
Appareil	Integra	TDX	AxSym
Précision (reproductibilité) *	2,8 % à 3,6 %	2,9 à 6,9 %	4,1 % à 6,9 %
Domaine de mesure	0,12 à 20 mg/l	0,5 à 20 mg/l	0,5 à 20 mg/l
Exactitude / FPIA **	$y=1,061x+0,124/r=0,995/$ n=205		$y=0,98x+0,32/r=0,995/$ n=150
Exactitude / EMIT **		$y=1,031x+0,19/r=0,984/$ n=146	
Exactitude / HPLC-GC **		HPLC I $y=1,026x-0,07/r=0,980/$ n=39	
Interférences liées au prélèvement ***			
Bilirubine	201 mg/l : < 10 %	130 mg/l : < 5 %	150 mg/l : < 10 %
Hémoglobine	7,5 g/l ; < 10 %	8,5 g/l : < 5 %	10 g/l : < 10 %
Triglycérides	21,6 g/l : < 10 %	5,3 g/l : < 5 %	8 g/l : < 10 %
Spécificité / Métabolites *** et structures proches			
Carbamazépine 10-11 époxyde	14,8 mg/l : 21,4 %	3 mg/l : NP	3 mg/l : NP
Imipramine	10 mg/l : 3,2 %	0,5 mg/l : NP	0,5 mg/l : NP
Amitriptyline			
Nortriptyline			
Désipramine			
Spécificité/ Autres antiépileptiques ***			
Acide valproïque	1 g/l : < 0,2 %	NP : < 1 %	
Phénobarbital	400 mg/l : 0 %	NP : < 1 %	
Phénytoïne Y	200 mg/l : 0 %	NP : < 1 %	
Nature anticorps	NP, mouton	NP, mouton	Polyclonal, mouton
Reconstitution réactif	Liquide, prêt à l'emploi	Liquide, prêt à l'emploi	Liquide, prêt à l'emploi
Conservation réactif ouvert	8 semaines	180 jours ou péremption	335 heures d'utilisation
Nombre de tests / coffret	200 tests	100 tests	100 tests
Nombre de points de calibration	6 (0 ; 1,25 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20)	6 (0 ; 2 ; 4 ; 8 ; 12 ; 20)	6 (0 ; 2 ; 4 ; 8 ; 12 ; 20) en double
Fréquence de calibration	8 semaines, ou nouveau lot	Nouveau lot	Nouveau lot
Prélèvement préconisé	Sérum ou plasma (héparine)	Sérum ou plasma (héparine, citrate)	Sérum ou plasma
Volume spécimen •	2 µl	1 µl	44 µl
Date fiche technique	1995	1999	1998

* Fourchettes fonction des concentrations testées

*** Concentration de substance « interférente » et % réaction croisée

** y = méthode testée ; x = Autre méthode

• : Volume de la prise d'essai, volume mort non pris en compte

NS : Non significative cliniquement

NP : Non précisé

CARBAMAZÉPINE

MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES EN PHASE HOMOGÈNE

Tableau III

PRINCIPE	NÉPHÉLOMÉTRIE	NÉPHÉLOMÉTRIE	TURBIDIMÉTRIE
Fournisseur	Beckman Couper	Beckman Couper	Beckman Couper
Code technique	GK	GK	HK
Appareil	Image	Array	CX 7
Précision (reproductibilité) *	2,6 % à 6 %	7,2 % à 7,8 %	4,9 % à 7,1 %
Domaine de mesure	2 à 20 mg/l	2 à 20 mg/l	2 à 20 mg/l
Exactitude / FPIA **	$y = 0,982 x + 0,17 / r = 0,992 / n=111$	$y = 1,08 x - 1,21 / r = 0,95 / n=92$	$y = 1,063 x - 0,04 / r = 0,984 n=98$
Exactitude / EMIT **			
Exactitude / HPLC-GC **			
Interférences liées au prélèvement ***			
Bilirubine	300 mg/l : NS		300 mg/l : NS
Hémoglobine	5 mg/l : NS		S g/l ; NS
Triglycérides	6,7 g/l : NS		+++ NS
Spécificité / Métabolites *** et structures proches			
Carbamazépine 10-11 époxyde	10 mg/l : NS	> 7,4 mg/l : > 30 %	7 mg/l NS
Imipramine	1 mg/l : NS	> 0,5 mg/l : > 30 %	0,75 mg/l : NS
Amitriptyline	1 mg/l : NS	> 0,5 mg/l : > 30 %	0,5 mg/l : NS
Nortriptyline	1 mg/l : NS	> 0,5 mg/l : > 30 %	0,5 mg/l : NS
Désipramine	0,5 mg/l : NS	> 0,5 mg/l : > 30 %	0,9 mg/l : NS
Spécificité / Autres antiépileptiques ***			
Acide valproïque	400 mg/l : NS	> 400 mg/l : > 30 %	400 mg/l : NS
Phénobarbital	120 mg/l : NS	> 100 mg/l : > 30 %	120 mg/l : NS
Phénytoïne	100 mg/l : NS	> 100 mg/l : > 30 %	100 mg/l : NS
Nature anticorps	Polyclonal, souris	NP, chèvre	Monoclonal, Souriks
Reconstitution réactif	Liquide, prêt à l'emploi	Liquide, prêt à l'emploi	Liquide, prêt à l'emploi
Conservation réactif ouvert	14 jours avec bouchon anti-évaporation	30 jours	42 jours
Nombre de tests / coffret	150 tests	100 tests	200 tests
Nombre de points de calibration	Étalonnage usine - calage de la courbe sur 1 point	Étalonnage usine - calage de la courbe sur 1 point	6
Fréquence de calibration	14 jours, ou nouveau lot	Nouveau lot	14 jours ou nouveau lot
Prélèvement préconisé	Sérum ou plasma	Sérum	Sérum ou plasma hépariné
Volume spécimen •	0,33 µl	20 µl	3 µl
Date fiche technique	1997	1996	1997

* Fourchettes fonction des concentrations testées

*** Concentration de substance « interférente » et % réaction croisée

** y = méthode testée ; x = Autre méthode

• : Volume de la prise d'essai, volume mort non pris en compte

NS : Non significative cliniquement

NP : Non précis

Tableau IV

CARBAMAZÉPINE

MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES EN PHASE HÉTÉROGÈNE

PRINCIPE	FIA	CHIMILUMINESCENCE
Fournisseur	Dade Behring	Chiron
Code technique	DA	SI
Appareil	Opus	ACS 180
Précision (reproductibilité) *	4,4 % à 7,7 %	5,6 % à 6,7 %
Domaine de mesure	1 à 20 mg/l	0,25 à 18 mg/l
Exactitude / FPIA **	$y = 1 x + 0,08 / r = 0,96 / n=99$	$y = 0,93 x + 0,27 / r = 0,98 / n=200$
Exactitude / EMIT **		
Exactitude / HPLC-GC **		
Interférences liées au prélèvement		
Bilirubine	Interfère positivement	200 mg/l : < 5 %
Hémoglobine	10 g/l : NS	5 g/l : < 5 %
Triglycérides	8 g/l : NS	10 g/l : < 5 %
Spécificité / Métabolites *** et structures proches		
Carbamazépine 10-11 époxyde		100 mg/l : 7,3 %
Imipramine	NP : 9,8 %	1 mg/l
Amitriptyline	NP : 8,3 %	2 mg/l
Nortriptyline	NP : 9 %	2 mg/l
Désipramine	NP : 9,3 %	8 mg/l
Spécificité/Autres antiépileptiques***		
Acide valproïque	NP : < 1 %	1 mg/l : NS
Phénobarbital	NP : < 1 %	150 mg/l : NS
Phénytoïne	NP : < 1 %	100 mg/l : NS
Nature anticorps	Monoclonal, Souris	Monoclonal, Souris
Reconstitution réactif	Prêt à l'emploi, remise à température ambiante 30	Prêt à l'emploi
Conservation réactif ouvert	Date péremption	40 heures à température ambiante
Nombre de tests / coffret	50 ou 100 tests	50 ou 300 tests
Nombre de points de calibration	6 (0 ; 2 ; 4 ; 8 ; 12 ; 20)	Calibration usine
Fréquence de calibration	nouveau lot	28 jours (en 2 points) ou nouveau lot
Prélèvement préconisé	Sérum ou plasma (héparine, EDTA)	Sérum ou plasma (héparine, EDTA)
Volume spécimen •	10 µl	15 µl
Date fiche technique	1996	1997

* Fourchettes fonction des concentrations testées

• : Volume de la prise d'essai, volume mort non pris en compte

*** Concentration de substance « interférente » et % réaction croisée

NS : Non significative cliniquement

** y = méthode testée ; x = Autre méthode

NP : Non précisé

I. GÉNÉRALITÉS

I.1- Structure

Le phénobarbital ou phényléthylmalonyl urée est un dérivé de l'acide barbiturique. C'est actuellement le seul barbiturique disponible en France, tous les autres ayant été progressivement retirés du marché.

I.2- Propriétés pharmacologiques

Le phénobarbital est un médicament doué de propriétés anticonvulsivantes, sédatives, et hypnotiques.

I.3- Mode d'action

Dans la crise épileptique on observe une dépolarisation prolongée et extensive d'un groupe de neurones par libération excessive de neurotransmetteurs excitateurs. Le phénobarbital s'oppose à la crise épileptique en renforçant l'action des neurotransmetteurs inhibiteurs (acide gamma-aminobutyrique essentiellement) par ouverture de canaux chlore.

I.4- Indications cliniques

Le phénobarbital est essentiellement prescrit pour ses propriétés anticonvulsivantes dans le traitement des épilepsies : épilepsies de type Grand mal et crises focalisées. Les crises de petit mal et psychomotrices ne répondent pas à ce médicament et peuvent même être aggravées.

Dans le traitement des insomnies ou des anxiétés on préfère aujourd'hui se passer des barbituriques (dont les effets secondaires sont redoutés) au profit des benzodiazépines.

I.5- Voies d'administration - Posologies

Le phénobarbital (Aparoxal® - Gardéнал® - Alepsal®) est présenté sous forme de comprimés à 10, 50 et 100 mg. Il existe des préparations injectables à 40 et 200 mg réservées à l'usage hospitalier.

La posologie orale chez l'adulte est de 2 à 3 mg/kg/jour en une seule prise, au coucher.

I.6- Caractéristiques pharmacocinétiques

C'est un médicament d'action et d'élimination lentes. Environ 80 % du phénobarbital, administré par voie orale, sont absorbés par le tube digestif ; le pic plasmatique est atteint en 8 heures chez l'adulte et 4 heures chez l'enfant.

Le phénobarbital circulant dans le sang est fixé pour 50 % sur les protéines plasmatiques.

Le phénobarbital diffuse dans tout l'organisme, notamment dans le cerveau en raison de sa liposolubilité. Il traverse la barrière placentaire et passe dans le lait maternel. Son volume de distribution est de 0,6 litre/kg. Le phénobarbital est métabolisé par le foie. Une hydroxylation conduit au parahydroxyphénobarbital, métabolite inactif, qui est ensuite glucuro ou sulfo conjugué. Le phénobarbital est éliminé par la voie rénale soit sous forme inchangée (30 % de la dose ingérée) soit sous forme métabolisée (20 % de la dose ingérée). L'élimination rénale de la forme inchangée s'accroît lorsque les urines sont alcalines.

Le phénobarbital possède un effet inducteur très important sur les enzymes des microsomes hépatiques. Il est capable d'accélérer le métabolisme des médicaments dégradés par ce biais, y compris le sien.

La demi-vie du phénobarbital s'étage entre 50 et 140 heures chez l'adulte, 40 et 70 heures chez l'enfant. Elle diminue lorsque le traitement est maintenu pendant de longues périodes.

I.7- Intérêt du dosage sanguin

La zone thérapeutique se situe entre 15 et 40 mg/l. Les signes de surdosage apparaissent à partir de 50 mg/l. Le dosage sanguin du phénobarbital est utile au décours d'un traitement antiépileptique dans les circonstances suivantes :

- à la mise en route du traitement pour ajuster la posologie à chaque individu ;
- en présence d'une épilepsie rebelle au traitement afin de déterminer si le patient prend correctement le médicament ou s'il est nécessaire de changer de classe d'antiépileptique ;
- lorsqu'une pathologie intercurrente apparaît en cours de traitement pour réajuster les posologies : insuffisance hépatique et insuffisance rénale conduisent à une augmentation des taux sanguins à contrer par une diminution de posologie ;
- lorsqu'il est nécessaire d'associer plusieurs antiépileptiques (polythérapie) ;
- lorsque des signes d'intoxication latente (troubles intellectuels) ou aiguë surviennent.

I.8- Surdosage

Les intoxications se caractérisent par un coma calme, hypotonique, hypothermique avec dépression respiratoire (si vomissement risque d'inhalation bronchique) et rhabdomyolyse. Actuellement il y a peu de tentatives de suicide aux barbituriques mais celles qu'on rencontre sont souvent le fait d'épileptiques traités par le phénobarbital.

■ II. CONDITIONS DE PRÉLÈVEMENT ET DE CONSERVATION DES SPÉCIMENS

II. 1- Milieux

Le dosage de phénobarbital peut être effectué sur sérum ou sur plasma hépariné.

Pour faciliter le suivi thérapeutique des jeunes enfants la salive a été préconisée, mais chez l'enfant de moins de 8 ans les concentrations sanguines et salivaires de phénobarbital se sont avérées mal corrélées.

II.2- A quel moment prélever ?

Pour une surveillance thérapeutique il faut prélever lorsque l'état d'équilibre pharmacocinétique est atteint. On considère que cet état d'équilibre est atteint lorsque 5 demi-vies se sont écoulées. Pour le phénobarbital ce délai se situe 15 à 30 jours après le début du traitement.

Pour une suspicion de surdosage ou d'intoxication il faut prélever au moment où les signes cliniques se manifestent.

II.3- Conservation des échantillons

8 heures à température ambiante ; 7 jours entre 2 et 8°C ; plusieurs semaines à - 20°C.

■ III. MÉTHODES DE DOSAGES

III.1- Méthodes chromatographiques

Ces méthodes sont actuellement largement supplantées par les méthodes d'immunoanalyse mais restent utilisables. La chromatographie en phase gazeuse, la chromatographie liquide haute pression avec détection UV permettent de doser plusieurs antiépileptiques à la fois, permettent la mise en évidence et le dosage des métabolites dans les urines. Pour l'HPLC une extraction préalable est le plus souvent nécessaire.

Avantages et inconvénients de ces techniques chromatographiques :

- Avantages : spécificité, faible coût en réactifs.
- Inconvénients : méthodes longues, exigent un personnel qualifié, praticabilité médiocre.

III.2- Méthodes d'immunoanalyse

Le phénobarbital est un haptène, non immunogène. Il doit être couplé à un « carrier » avant d'être injecté à l'animal pour la fabrication des anticorps anti-phénobarbital.

Les anticorps sont soit monoclonaux, soit polyclonaux.

Toutes les méthodes d'immunoanalyse de dosage du phénobarbital reposent sur la compétition pour un nombre limité de sites anticorps entre les molécules de phénobarbital présentes dans l'échantillon et les molécules de phénobarbital marqué (conjugué). Elles diffèrent par :

- l'existence ou non d'une étape de séparation de phase :
 - Phase homogène : toutes les étapes de la réaction se déroulent simultanément dans le milieu réactionnel : CEDIA, EMIT, FPIA, TURBIDIMÉTRIE...
 - Phase hétérogène : avec une étape de séparation des molécules libres et des molécules liées aux anticorps.
- La nature du marqueur, donc le signal mesuré :
 - Marqueur enzymatique - Mesure d'absorbance : EMIT, CEDIA.
 - Marqueur fluorescent - Mesure lumière polarisée ou fluorescence : FPIA, FIA.
 - Marqueur particule - Mesure turbidimétrique ou mesure néphélométrique.

III.2.1- Méthodes en phase homogène

a) Avec marqueurs enzymatiques, lecture d'absorbante

- CEDIA (Cloned Enzyme Donor Immuno Assay) utilisable sur systèmes ouverts en particulier les Hitachi (Boehringer). Il s'agit d'une technique en phase homogène utilisant une enzyme la bêta galactosidase qui se présente sous forme de fragments inactifs (Enzyme Acceptor - EA) pouvant être recombinés spontanément avec un peptide inactif (Enzyme Donor - ED) pour former une enzyme active. Il y a compétition mettant en jeu le phénobarbital marqué et le fragment ED ; plus il y a de phénobarbital dans l'échantillon, plus la quantité de conjugué disponible sera grande pour former avec EA l'enzyme active ; l'intensité est donc proportionnelle à la concentration de phénobarbital à doser.
- EMIT (réactif Dade Behring) utilisé sur Cobas Mira, sur Hitachi, sur ACA. Compétition entre phénobarbital du spécimen à doser et du phénobarbital marqué à la G6PD vis-à-vis d'anticorps anti-phénobarbital. On mesure la variation d'absorbante à 340 nm lors de la réduction du NAD en NADH, H⁺ par activité de la G6PD sur un substrat. Plus le phénobarbital est en quantité importante dans l'échantillon à doser, moins le phénobarbital marqué se lie à l'anticorps, plus la G6PD agit sur le substrat, plus la variation d'absorbante mesurée est grande. Donc, l'intensité du signal est proportionnelle à la concentration de phénobarbital à doser.

Les méthodes CEDIA et EMIT peuvent s'adapter sur des automates de biochimie « ouverts » .

b) Avec marqueurs fluorescents

- FPIA utilisé sur TDX ou sur AXSYM (réactifs Abbott) et sur Integra (Roche) : compétition entre le phénobarbital à doser du spécimen et du phénobarbital marqué à la fluoresceïne vis-à-vis d'anticorps anti-phénobarbital. On mesure le taux de polarisation. Plus le phénobarbital est en quantité importante dans le spécimen, plus la dépolarisation sera forte et le taux de polarisation faible. Le signal est donc inversement proportionnel à la concentration en phénobarbital.

c) Précipitation en milieu liquide, lecture néphélométrique

- Principe utilisé sur néphélomètre Array et Image (réactifs Beckman) : compétition entre le phénobarbital du spécimen à doser et du phénobarbital marqué par l'apoferritine (Array) ou des particules (Image) vis-à-vis d'anticorps anti-phénobarbital. Le conjugué lié à l'anticorps forme des complexes Immuns insolubles augmentant la quantité de lumière dispersée que l'on mesure. Plus le phénobarbital est en quantité importante dans le spécimen à doser, moins le conjugué se lie à l'anticorps, moins la lumière est dispersée. Le signal mesuré est la vitesse d'agrégation qui est inversement proportionnelle à la concentration de phénobarbital à doser.

d) Précipitation en milieu liquide, lecture turbidimétrique

- IMMUNO 1 Bayer : compétition entre le phénobarbital et le phénobarbital Ficoll vis-à-vis d'anticorps couplés à des microparticules de latex. Il y a agglutination entre le conjugué phénobarbital Ficoll et l'anticorps couplé aux particules de latex et augmentation

de la turbidité. La présence de phénobarbital diminue la formation d'agglutinats et donc de la turbidité.

- **DIMENSION Dade Behring** : la méthode utilise un conjugué particule de latex - phénobarbital et un anticorps monoclonal spécifique du phénobarbital. Le phénobarbital présent dans l'échantillon entre en compétition avec les particules vis-à-vis de l'anticorps, entraînant une diminution de la vitesse d'agrégation qui est ainsi inversement proportionnelle à la concentration du phénobarbital dans l'échantillon.
- **CX Beckman** : un conjugué particule-phénobarbital entre en compétition avec le phénobarbital libre de l'échantillon au niveau des sites de fixation de l'anticorps. La liaison du phénobarbital libre sur l'anticorps provoque une diminution de la formation des complexes immuns insolubles. La lumière diffusée résultante est ainsi inversement proportionnelle à la concentration en phénobarbital de l'échantillon.

III.2.2- Méthodes en phase hétérogène

a) Lecture en fluorescence

- Immunoanalyse utilisant des films multicouches. Utilisé sur l'Opus (Dade Behring) compétition entre le phénobarbital du spécimen à doser déposé sur une plaque multicouche migrant vers la couche réactionnelle (les protéines de l'échantillon sont arrêtées au niveau d'une couche filtre) et du phénobarbital marqué à la phosphatase alcaline vis-à-vis d'anticorps anti-phénobarbital. La PAL agit sur un substrat, 4MUP et le transforme en 4MU molécule fluorescente. On mesure l'intensité de fluorescence émise. Plus la quantité de phénobarbital dans l'échantillon est importante, moins le phénobarbital marqué reste dans la couche analytique moins la fluorescence émise est importante. Donc, l'intensité de fluorescence émise est inversement proportionnelle à la concentration de phénobarbital dans le spécimen.

b) Lecture en luminescence

- Utilisé sur l'ACS 180 (Chiron). Le phénobarbital contenu dans le spécimen à doser entre en compétition avec du phénobarbital marqué à l'ester d'acridinium pour une quantité limitée d'anticorps anti-phénobarbital couplé de façon covalente à des particules paramagnétiques (phase solide). Il existe une relation inverse entre la quantité de phénobarbital présente dans l'échantillon du patient et le nombre d'unités relatives de lumière (RLU) mesuré par le système.

III.2.3- Avantages et inconvénients de ces techniques d'immunoanalyse

- **Avantages** : toutes sont automatisables ; toutes sont sensibles : la limite de détection la plus basse revient à l'EMIT (0,6mg/l) ; bonne précision ; bonnes répétabilité et reproductibilité. Toutes sont rapides ; toutes sont d'une grande simplicité d'utilisation.
- **Inconvénients** : réactifs de coût élevé. Systèmes fermés : FPIA sur TDX, films multicouches sur Opus... Interférences liées à la bilirubine et réactions croisées avec les autres médicaments antiépileptiques.

III.3- Méthodes par électrophorèse capillaire

Encore du domaine de la recherche ces méthodes commencent à être publiées. Elles permettent la mesure simultanée de plusieurs antiépileptiques : phénobarbital, phénytoïne, carbamazépine. Les premiers résultats semblent bien corrélés à la FPIA.

■ IV. CRITÈRES DE CHOIX D'UNE TECHNIQUE

Les méthodes d'immunoanalyse par leur automatisation, leur simplicité et leur rapidité, sont les plus employées par les laboratoires. De plus, chez les épileptiques sous polythérapie anticonvulsive, plusieurs autres antiépileptiques peuvent être dosés par ces méthodes (phénytoïne, acide valproïque, carbamazépine...). Parmi elles la FPIA et l'EMIT sont les méthodes les plus utilisées.

Données de l'Association de Contrôle de Qualité ProBioQual : octobre 1998

FPIA	50,9 %
EMIT	30,5 %
CEDIA	4,2 %
OPUS	5,4 %
NEPHELO	4,2 %
Autres	4,8 %

Les méthodes chromatographiques : elles seules permettent l'analyse des métabolites

■ V. TECHNIQUES DE RÉFÉRENCE

L'HPLC est la technique de comparaison pour étudier de nouvelles méthodes. Il n'existe pas de techniques de référence ou recommandées actuellement.

■ VI. VALEURS VISUELLES

Zone thérapeutique à l'état d'équilibre : 15 - 40 mg/l

Signes d'intoxication latente : 40 - 60 mg/l

Signes d'intoxication aiguë : > 60 mg/l

On peut aussi exprimer le rapport : Taux (mg/l) / Dose (mg/kg) de phénobarbital, qui est normalement de 6 chez l'enfant, 8 chez l'adulte.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- ANDANSON M., BUREAU C., DERHAROUTUNIAN C., DEVYS C., SANTOLARIA N. Suivi thérapeutique des dosages sanguins des antiépileptiques, des digitaliques et de la théophylline : modalités pratiques et interprétation des résultats. Lyon Pharmaceutique, 1997, 48, 29-41
- 2- BENOIT S.E., EHLE A.L., GREENWOOD R.S., MESSENHEIMER J.A., MILES M.V., TENNISON M.B., THORN M.D. Evaluation of the Ames seralyzer for the determination of carbamazepine, phenobarbital and phenytoin concentrations in saliva. Ther. Drug Monit., 1990, 12, n°5, 501-510
- 3- CARON G.P., GALLAGHER T.K., LEPPIK I.E., OLES K.S., PARKER D.R., PENRY J.K., SHEEHAN M.L. Phenytoin and phenobarbital concentrations in serum : a comparison of ames seralyzer with GLC and Emit. Ther. Drug Monit., 1989, 11, n°1, 73-78
- 4- KATAOKA Y., MAKINO K., OISHI R. Capillary electrophoresis for therapeutic drug monitoring of antiepileptic. Electrophoresis, 1998, n° 83, 2856-2860
- 5- MOORE F.M.L., SIMPSON D. Cost-effective assays for use in monitoring carbamazépine, phenobarbital and phenytoin in serum. Clin. Chem., 1989, 35, n°8, 1782-1784
- 6- PAIBIR S.G., SOINE W.H. High-performance liquid chromatographic analysis of phenobarbital and phenobarbital metabolites in human urine. J. Chromatog. B. Biomed. Appl., 1997, 691, n°1, 111-117
- 7- VAN DER WEIDE J. LUITING H.J., VEEFKIND A.H. Evaluation of the cloned enzyme donor immunoassay for measurement of phenytoin -and phenobarbital in serum. Ther. Drug Monit., 1993, 15, n°4, 344-348

PHÉNOBARBITAL

MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES EN PHASE HOMOGÈNE

PRINCIPE	EMIT	EMIT	CEDIA II
Fournisseur	Dade Behring	Dade Behring	Roche Boehringer
Code technique	VB	VQ	UD
Appareil	Mira - Mira S...	ACA	Hitachi
Répétabilité *		1,2 % à 2,7 %	1,7 % à 2,5 %
Reproductibilité *		1,5 % à 2,8 %	3,5 % à 5,5 %
Domaine de mesure	0,6 à 80 mg/l	5 à 80 mg/l	1,2 à 80 mg/l
Exactitude / Autre méthode **		CG / y = 0,96 x - 0,3 r = 0,994	
Exactitude / Autre méthode **		CG/MS / y = 0,91 x + 1,4 r = 0,977	
Interférences liées au prélèvement ***			
Bilirubine		170 µmol < 10 %	660 mg/l < 10 %
Hémoglobine		5 g/l < 10 %	10 g/l < 10 %
Triglycérides		30 g/l < 10 %	10 g/l < 10 %
Spécificité / Métabolites ***			
p hydroxyphénobarbital			0 %
Spécificité / Autres antiépileptiques ***			
Phénytoïne		100 mg/l 25 %	0,9 %
Carbamazépine		130 mg/l 10 %	0 %
Acide valproïque		500 mg/l 10 %	0,7 %
Nature anticorps	Monoclonal, souris	?, Mouton	?, Souris
Reconstitution réactif	Liquide, prêt à l'emploi	Prêt à l'emploi	À reconstituer, consignes strictes
Conservation réactif ouvert	?	Sans objet	60 jours (froid + obscurité)
Nombre de tests / coffret	100 tests / coffret	50 sachets / boîte	96 tests / coffret
Nombre de points de calibration	6 (0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 ; 80)	5 (5 ; 10 ; 20 ; 40 ; 80)	2 (?, 80)
Prélèvement préconisé	Sérum ou plasma	Sérum ou plasma	Sérum ou plasma (EDTA - héparine)
Volume spécimen •	3 µl	40 µl	4 µl
Date fiche technique	1997	1996	1996

* Fourchettes fonction des concentrations testées

** y = méthode testée ; x = Autre méthode

*** Concentration de substance « interférente » et % réaction croisée

• : Volume de la prise d'essai, volume mort non pris en compte

PHÉNOBARBITAL

MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES EN PHASE HOMOGÈNE

PRINCIPE	FPIA	FPIA	FPIA
Fournisseur	Abbott	Abbott	Roche Boehringer
Code technique	IJ	IJ	
Appareil	TDX	AxSym	Integra
Répétabilité *	1,4 % à 1,7 %	2,2 % à 3,7 %	0,7 % à 1,7 %
Reproductibilité *	2,4 % à 2,8 %	2,9 % à 4,4 %	2,2 % à 3,9 %
Domaine de mesure	1,1 à 80 mg/l	1,1 à 80 mg/l	0,6 à 60 mg/l
Exactitude / Autre méthode **	HPLC / y = 1,024 x - 0,33 r = 0,983	FPIA / y = 1,02 x - 0,69 r = 0,995	FPIA / y = 1,036 x - 1,23 r = 0,095
Exactitude / Autre méthode **	HPLC / y = 1,020 x - 0,73 r = 0,986		
Interférences liées au prélèvement ***			
Bilirubine	150 mg < 10 %	150 mg < 10 %	384 mg/l < 10 %
Hémoglobine	5 g/l < 5 %	10 g/l < 10 %	10 g/l < 10 %
Triglycérides	12 g/l < 5 %	25 g/l < 10 %	32 g/l < 10 %
Spécificité / Métabolites ***			
p hydroxyphénobarbital	22 mg/l > 12 %	22 mg/l > 12 %	200 mg/l 10 %
Spécificité / Autres antiépileptiques ***			
Phénytoïne	< 1 %	< 1 %	1 g/l 0 %
Carbamazépine	< 1 %	< 1 %	1 g/l 0 %
Acide valproïque	< 1 %	< 1 %	1 g/l 0,1 %
Nature anticorps	?, Mouton	Polyclonal, mouton	Monoclonal, souris
Reconstitution réactif	Liquide, prêt à l'emploi	Liquide, prêt à l'emploi	Liquide, prêt à l'emploi
Conservation réactif ouvert	180 jours ou péremption	336 heures d'utilisation sur AxSym	8 semaines, ou péremption
Nombre de tests / coffret	100 tests / coffret	100 tests / coffret	200 tests / cassette
Nombre de points de calibration	6 (0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 ; 80)	6 (0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 ; 80)	6 (0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 ; 60)
Fréquence de calibration	Lot nouveau	Lot nouveau	8 semaines, ou nouveau lot
Prélèvement préconisé	Sérum ou plasma	Sérum ou plasma	Sérum ou plasma (non hémolysé)
Volume spécimen •	50 µl	44 µl	2 µl
Date fiche technique	1998	1998	1995

* Fourchettes fonction des concentrations testées

** y = méthode testée ; x = Autre méthode

*** Concentration de substance « interférente » et % réaction croisée

• : Volume de la prise d'essai, volume mort non pris en compte

PHÉNOBARBITAL

MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES EN PHASE HOMOGÈNE

PRINCIPE	TURBIDIMÉTRIE	TURBIDIMÉTRIE	TURBIDIMÉTRIE	NÉPHÉLOMÉTRIE	NÉPHÉLOMÉTRIE
Fournisseur	Beckman Couper	Dade Behring	Bayer	Beckman	Beckman Couper
Code technique	HK	HQ	87	GK	GK
Appareil	CX 7	Dimension	Immuno 1	Image	Array
Répétabilité *	1,4 % à 1,9 %	1,9 % à 2 %	2 % à 2,8 %	2,4 % à 5,2 %	1,24 % à 2,57 %
Reproductibilité *	2,6 % à 3,9 %	3,1 % à 4,7 %	2,8 % à 4,4 %	3,6 % à 8,8 %	3,47 % à 4,69 %
Domaine de mesure	5 à 80 mg/l	1 à 80 mg/l	0,5 à 80 mg/l	5 à 80 mg/l	5 à 60 mg/l
Exactitude / FPIA **	$y = 1,023 x - 1,16$ $r = 0,995$	$y = 0,98 x - 1,41$ $r = 0,985$	$y = 1,04 x + 0,4$ $r = 0,996$	$y = 0,998 x - 1,18$ $r = 0,996$	$y = 1,06 x - 0,01$ $r = 0,994$
Exactitude / EMIT ***		$y = 1,04 x - 2,32$ $r = 0,985$	$y = 0,96 x + 1,6$ $r = 0,990$		
Interférences liées au prélèvement ***					
Bilirubine	300 mg/l < 8 %	200 mg/l < 10 %	149 mg/l NS	300 mg/l NS	?
Hémoglobine	5 g/l < 8 %	5 g/l < 10 %	5 g/l NS	5 g/l NS	Interférence
Triglycérides	++++ < 8 %	10 g/l < 10 %	12,6 g/l NS	6,7 g/l NS	Interférence
Spécificité) Métabolites p hydroxyphénobarbital	100 mg/l < 8 %	1 g/l < 10 %	Concentration thérapeutique NS	?	?
Spécificité) Autres antiépileptiques ***					
Phénytoïne	25 mg/l < 8 %	100 mg/l < 10 %	Concentration thérapeutique NS	100 mg/l NS	> 75 mg/l 20 %
Carbamazépine	75 mg/l < 8 %	500 mg/l < 10 %	Concentration thérapeutique NS	25 mg/l NS	> 25 mg/l 20 %
Acide valproïque	200 mg/ml < 8 %	500 mg/l < 10 %	Concentration thérapeutique NS	100 mg/l NS	> 400 mg/l 20 %
Nature anticorps	Monoclonal, souris	Monoclonal, souris	Monoclonal, souris	Monoclonal, souris	?, chèvre
Reconstitution réactif	Liquide, prêt à l'emploi	Liquide, prêt à l'emploi	Prêt à l'emploi mais homogénéisé	Liquide, prêt à l'emploi	Liquide, prêt à l'emploi
Conservation réactif ouvert	42 jours, ou péremption	72 heures ; puits entrés dans machine 30 jours : puits scellés	28 jours	14 jours avec bouchon antiévaporation	30 jours avec bouchon antiévaporation
Nombre de tests / coffret	100 tests / cartouche	20 / flex	100 tests / coffret (cassette)	150 tests / cartouche	
Nombre de points de Fréquence de calibration	6 14 jours	5 (0 ; 10 ; 20 ; 40 ; 80) en 30 jours ou nouveau lot	6 (0 ; S ; 10 ; 20 ; 40 ; 40) 60 jours	2 (?), courbe usine 14 jours	2 (?), courbe usine Nouveau lot
Prélèvement préconisé	Sérum ou plasma	Sérum ou plasma	Sérum	Sérum ou plasma	Sérum (plasma proscrit)
Volume spécimen •	3 µl	4 µl		0,67 µl	0,67 µl
Date fiche technique	1997	1997	1995	1997	1996

* Fourchettes fonction des concentrations testées

** y = méthode testée ; x = Autre méthode

NS : Non significative cliniquement

*** Concentration de substance « interférente » et % réaction croisée

• : Volume de la prise d'essai, volume mort non pris en compte

PHÉNOBARBITAL

MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES EN PHASE HÉTÉROGÈNE

PRINCIPE	FIA	CHIMILUMINESCENCE
Fournisseur	Dade Behring	Chiron
Code technique	DA	SI
Appareil	Opus	ACS 180
Répétabilité *		3,3 % à 4,9 %
Reproductibilité *		5,8 % à 6,8 %
Domaine de mesure	1,5 à 80 mg/l	0,15 à 80 mg/l
Exactitude / FPIA **	$y = 0,99 x + 2,7$ $r = 0,98$	$y = 1,05 x - 0,40$ $r = 0,98$
Exactitude / EMIT **		
Interférences liées au prélèvement***		
Bilirubine	Interfère positivement	200 mg/l < 5 %
Hémoglobine	10 g/l NS	5 g/l < 5 %
Triglycérides	6,6 g/l NS	10 g/l < 5 %
Spécificité / Métabolites ***		
p hydroxyphénobarbital	9,3 %	20 mg/13,1 %
Spécificité / Autres antiépileptiques***		
Phénytoïne	< 1 %	100 mg/l < 1 %
Carbamazépine	< 1 %	120 mg/l < 1 %
Acide valproïque	< 4,1 %	50 mg/l < 1 %
Nature anticorps	Monoclonal, souris	Monoclonal, souris
Reconstitution réactif	Prêt à l'emploi, remise à température ambiante	Prêt à l'emploi, mélanger la phase solide
Conservation réactif ouvert	Sans objet	40 heures cumulées à température ambiante
Nombre de tests / coffret	50 et 100 tests / boîte	50 ou 300 tests / boîte
Nombre de points de calibration	6 (0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 ; 80)	2 (bas et élevé) + courbe maîtresse usine
Fréquence de calibration	8 semaines	28 jours
Prélèvement préconisé	Sérum ou plasma (ETDA, héparine) Non ictérique	Sérum (pas de gel séparateur) ou plasma (EDTA, héparine)
Volume spécimen •	10 µl	10 µl
Date fiche technique	1996	1996

* Fourchettes fonction des concentrations testées

** y = méthode testée ; x = Autre méthode

*** Concentration de substance « interférente » et % réaction croisée

NS : Non significative cliniquement

• : Volume de la prise d'essai, volume mort non pris en compte

I. GÉNÉRALITÉS

I.1- Structure

La phénytoïne est un dérivé de l'hydantoïne : la 5,5-diphénylhydantoïne, plus précisément la 5,5-diphényl-2,4-imidazolidinedione.

I.2- Propriétés pharmacologiques

Les propriétés anticonvulsivantes de la phénytoïne en font un excellent antiépileptique d'autant plus que contrairement au phénobarbital elle n'a pas d'effet sédatif. Elle possède également un pouvoir antiarythmique mis à profit dans le traitement de l'hyperexcitabilité cardiaque.

I.3- Mode d'action

Dans la crise épileptique on observe une dépolarisation prolongée et extensive d'un groupe de neurones par libération excessive de neurotransmetteurs excitateurs. La phénytoïne s'oppose à la crise épileptique en renforçant l'action des neurotransmetteurs inhibiteurs (acide gamma-aminobutyrique essentiellement).

I.4- Indications cliniques

La phénytoïne est utilisée dans le traitement préventif des crises d'épilepsie : crises focales et crises motrices. Associée au diazépam elle permet de maîtriser les crises tonico-cloniques du grand mal épileptique.

I.5- Voies d'administration - Posologies

La phénytoïne (Di-hydan®) est présentée en comprimés à 100 mg. La posologie chez l'adulte est de 2 à 6 mg/kg/jour en une ou deux prises. Il existe une préparation injectable réservée à l'usage hospitalier pour le traitement du grand mal. A noter que pour cette indication une prodrogue de la phénytoïne est depuis peu commercialisée, il s'agit d'une phénytoïne phosphorylée (Fosphénytoïne, Dilantin®) très vite transformée par l'organisme en phénytoïne. L'intérêt de cette prodrogue est sa meilleure solubilité aqueuse qui autorise la voie intraveineuse et intramusculaire, et une administration trois fois plus rapide en IV que la phénytoïne injectable.

I.6- Caractéristiques pharmacocinétiques

80 % à 100 % de la phénytoïne, administrée par voie orale, sont absorbés par le tube digestif. Le pic plasmatique est atteint entre 4 et 8 heures après la prise. La phénytoïne circulant dans le sang est fixée pour 90 % sur les protéines plasmatiques. Seule la forme libre est pharmacologiquement active. La phénytoïne diffuse dans tout l'organisme, dans le L.C.R., le tissu nerveux, le placenta, et le lait. Son volume de distribution est de 0,5 litre/kg.

La phénytoïne est métabolisée par le foie. Une hydroxylation conduit à la 5 (4-hydroxyphényl) 5 phénylhydantoïne (HPPH), métabolite inactif, qui ensuite est glucuroconjugué et éliminé dans les urines. Ce métabolisme est saturable, une petite augmentation de dose ingérée peut entraîner une forte augmentation de concentration sanguine. On note une variabilité interindividuelle importante de ce métabolisme.

Dans les urines on retrouve essentiellement le dérivé hydroxylé et glucuroconjugué de la phénytoïne et moins de 5 % de phénytoïne inchangée.

La phénytoïne possède des propriétés inductrices vis-à-vis des enzymes des microsomes hépatiques c'est à dire qu'elle est capable d'accélérer le métabolisme des médicaments dégradés par un mécanisme oxydatif, y compris le sien.

La demi-vie de la phénytoïne est comprise entre 12 et 40 heures. Elle diminue dans le temps si le traitement est donné sur des périodes longues.

I.7- Intérêt du dosage sanguin

La phénytoïne est l'antiépileptique le plus difficile à manier car le rapport entre la dose administrée et la concentration obtenue dans l'organisme est variable, voire même parfois imprévisible.

La zone thérapeutique se situe entre 5 et 12 mg/l chez l'adulte, 10 et 20 mg/l chez l'enfant. Les signes de surdosage apparaissent à partir de 20-25 mg/l.

Le dosage sanguin de la phénytoïne est utile au décours d'un traitement antiépileptique dans les circonstances suivantes :

- à la mise en route du traitement pour adapter progressivement la posologie ;
- en présence d'une épilepsie rebelle au traitement afin de déterminer si le patient prend correctement le médicament ou s'il est nécessaire de changer de classe d'antiépileptique ;
- lorsqu'en cours de traitement survient une insuffisance hépatique ou une insuffisance rénale pour prévenir les risques de surdosage ;
- lorsqu'il est nécessaire pour être efficace d'associer d'autres antiépileptiques ;
- lorsque des signes d'intoxication latente (nausées, vertiges, confusion, érythème gingival) ou aiguë apparaissent ;
- lors de tout changement de posologie.

I.8- Surdosage

Les intoxications se manifestent par un coma calme, hypotonique, hyporéflexique avec dépression respiratoire et myosis.

■ II. CONDITIONS DE PRELEVEMENT ET DE CONSERVATION DES SPÉCIMENS

II.1- Milieux

Le dosage de phénytoïne peut être effectué sur sérum ou sur plasma (hépariné). La salive a été préconisée chez les enfants en raison de son recueil aisé. Pour la phénytoïne les concentrations salivaires sont bien corrélées aux concentrations sanguines.

Les cheveux peuvent être utilisés dans le cadre médico-légal ou pour surveiller la bonne observance du traitement au long cours.

II.2- À quel moment prélever ?

Comme pour toute surveillance thérapeutique il faut prélever à l'état d'équilibre. L'état d'équilibre pharmacocinétique est atteint lorsque 5 demi-vies se sont écoulées. Pour la phénytoïne ce délai se situe 7 à 8 jours après le début du traitement, ou du changement de posologie. Pour une suspicion de surdosage ou d'intoxication il faut prélever au moment où les signes cliniques se manifestent.

II.3- Conservation des échantillons

24 heures à température ambiante ; 7 jours entre 2 et 8 °C ; plusieurs semaines à - 20°C.

■ III. MÉTHODES DE DOSAGES

III.1- Méthodes chromatographiques

Ces méthodes sont actuellement largement supplantées par les méthodes d'immunoanalyse mais restent utilisables. La chromatographie en phase gazeuse, la chromatographie liquide haute pression avec détection UV permettent de doser plusieurs antiépileptiques à la fois, permettent la mise en évidence et le dosage des métabolites dans les urines. Pour l'HPLC une extraction préalable est le plus souvent nécessaire.

Avantages et inconvénients de ces techniques chromatographiques :

- Avantages : spécificité, faible coût en réactifs
- Inconvénients : méthodes longues, exigent un personnel qualifié, praticabilité médiocre

III.2- Méthodes d'immunoanalyse

La phénytoïne est un haptène, non immunogène. Elle doit être couplée à un « carrier » avant d'être injectée à l'animal pour la fabrication des anticorps anti-phénytoïne. Les anticorps sont soit monoclonaux, soit polyclonaux.

Toutes les méthodes d'immunoanalyse de dosage de phénytoïne reposent sur la compétition pour un nombre limité de sites anticorps entre les molécules de phénytoïne présentes dans l'échantillon et les molécules de phénytoïne marquée (conjugué).

Elles diffèrent par :

- l'existence ou non d'une étape de séparation de phase :
 - Phase homogène : toutes les étapes de la réaction se déroulent simultanément dans le milieu réactionnel : CEDIA, EMIT, FPIA, TURBIDIMETRIE...,
 - Phase hétérogène : avec une étape de séparation des molécules libres et des molécules liées aux anticorps,
- La nature du marqueur, donc le signal mesuré :
 - Marqueur enzymatique - Mesure d'absorbance : EMIT, CEDIA,
 - Marqueur fluorescent - Mesure lumière polarisée ou fluorescence : FPIA, FIA,
 - Marqueur particule - Mesure turbidimétrique ou mesure néphélométrique.

III.2.1 - Méthodes en phase homogène

a) Avec marqueurs enzymatiques, lecture d'absorbance

- CEDIA (Cloned Enzyme Donor Immuno Assay) utilisable sur systèmes ouverts en particulier les Hitachi (Boehringer) Il s'agit d'une technique en phase homogène utilisant une enzyme la bêta galactosidase qui se présente sous forme de fragments inactifs (Enzyme Acceptor - EA) pouvant être recombinés spontanément avec un peptide inactif (Enzyme Donor - ED) pour former une enzyme active. Il y a compétition mettant en jeu la phénytoïne marquée et le fragment ED ; plus il y a de phénytoïne dans l'échantillon, plus la quantité de conjugué disponible sera grande pour former avec EA l'enzyme active ; l'intensité finale est proportionnelle à la concentration de phénytoïne à doser.
- EMIT (réactif Dade Behring) utilisé sur Cobas Mira, sur Hitachi, sur ACA. Compétition entre phénytoïne du spécimen à doser et phénytoïne marquée à la G6PD vis-à-vis d'anticorps anti-phénytoïne. On mesure la variation d'absorbance à 340 nm lors de la réduction du NAD en NADH, H⁺ par activité de la G6PD sur un substrat. Plus la phénytoïne est en quantité importante dans l'échantillon à doser, moins la phénytoïne marquée se lie à l'anticorps, plus la G6PD agit sur le substrat, plus la variation d'absorbance mesurée est grande. Donc, l'intensité du signal est proportionnelle à la concentration de phénytoïne à doser.

Les méthodes CEDIA et EMIT peuvent s'adapter sur des automates de biochimie « ouverts » .

b) Avec marqueurs fluorescents

- FPIA utilisé sur TDX ou sur AXSYM (réactifs Abbott) et sur Integra (Roche) : compétition entre la phénytoïne à doser du spécimen et la phénytoïne marquée à la fluoresceïne vis-à-vis d'anticorps anti-phénytoïne. On mesure le taux de polarisation. La polarisation de

la lumière émise par la molécule fluorescente dépend de sa liberté de rotation. Une petite molécule, capable de rotation rapide, dépolarise fortement la lumière. Une molécule fluorescente associée à une protéine (anticorps) dépolarise peu la lumière. Plus la phénytoïne est en quantité importante dans le spécimen, plus la dépolarisation sera forte et le taux de polarisation faible. Le signal est donc inversement proportionnel à la concentration en phénytoïne.

c) Précipitation en milieu liquide, lecture néphélométrique

- Principe utilisé sur néphélomètre Array et Image (réactifs Beckman) : compétition entre la phénytoïne du spécimen à doser et de la phénytoïne marquée à l'apoferritine (Array) ou des particules (Image) vis-à-vis d'anticorps anti-phénytoïne. Le conjugué lorsqu'il se lie à l'anticorps forme des complexes Immuns insolubles augmentant la dispersion de la lumière, que l'on mesure. Plus la phénytoïne est en quantité importante dans le spécimen à doser, moins le conjugué se lie à l'anticorps, moins la lumière est dispersée. Le signal mesuré est la vitesse d'agrégation qui est inversement proportionnelle à la concentration de phénytoïne à doser.

d) Précipitation en milieu liquide, lecture turbidimétrique

- IMMUNO 1 Bayer : compétition entre la phénytoïne et la phénytoïne Ficoll vis-à-vis d'anticorps couplés à des microparticules de latex. Il y a agglutination entre le conjugué phénytoïne Fico11 et l'anticorps couplé aux particules de latex et augmentation de la turbidité. La présence de phénytoïne diminue la formation d'agglutinats et donc de la turbidité.
- DIMENSION Dade Behring : la méthode utilise un conjugué particule de latex - phénytoïne et un anticorps monoclonal spécifique de la phénytoïne. La phénytoïne présente dans l'échantillon entre en compétition avec les particules vis-à-vis de l'anticorps, entraînant une diminution de la vitesse d'agrégation qui est ainsi inversement proportionnelle à la concentration de phénytoïne dans l'échantillon.
- CX Beckman : un conjugué particule-phénytoïne entre en compétition avec la phénytoïne libre de l'échantillon au niveau des sites de fixation de l'anticorps. La liaison de la phénytoïne libre sur l'anticorps provoque une diminution de la formation des complexes immuns insolubles. La lumière diffusée résultante est ainsi inversement proportionnelle à la concentration en phénytoïne de l'échantillon.

III.2.2- Méthodes en phase hétérogène

a) Lecture en fluorescence

- Immunoanalyse utilisant des films multicouches. Utilisé sur l'Opus (Dade Behring) compétition entre la phénytoïne du spécimen à doser déposé sur une plaque multicouche migrant vers la couche réactionnelle (les protéines de l'échantillon sont arrêtées au niveau d'une couche filtre) et la phénytoïne marquée à la phosphatase alcaline. La PAL agit sur un substrat, 4MUP et le transforme en 4MU molécule fluorescente. On mesure l'intensité de fluorescence émise. Plus la quantité de phénytoïne dans l'échantillon est importante, moins la phénytoïne marquée par PAL reste dans la couche analytique, moins la fluorescence

émise est importante. Donc, l'intensité de fluorescence émise est inversement proportionnelle à la concentration de phénytoïne dans le spécimen.

b) Lecture en luminescence

- Utilisé sur l'ACS 180 (Chiron). La phénytoïne contenue dans le spécimen à doser entre en compétition avec de la phénytoïne marquée à l'ester d'acridinium pour une quantité limitée d'anticorps anti-phénytoïne couplé de façon covalente à des particules paramagnétiques (phase solide). Il existe une relation inverse entre la quantité de phénytoïne présente dans l'échantillon du patient et le nombre d'unités relatives de lumière (RLU) mesuré par le système.

c) Lecture colorimétrique

- Utilisé sur VITROS (Ortho) : immunoanalyse utilisant les films multicouches. Les anticorps anti-phénytoïne sont immobilisés sous la couche d'étalement ; le conjugué phénytoïne peroxydase est positionné au sein de la couche d'étalement. Au moment du dépôt de l'échantillon il y a migration, compétition, et fixation sur anticorps, de la phénytoïne et du conjugué marqué. Le conjugué marqué, non fixé par anticorps, est éliminé par lavage. Le conjugué fixé est révélé par l'intermédiaire de la peroxydase après ajout out d'un substrat développant en sa présence une réaction colorée. La coloration obtenue est inversement proportionnelle à la concentration en phénytoïne de l'échantillon.

III.2.3- Avantages et inconvénients de ces techniques d'immunoanalyse

- Avantages : toutes sont automatisables ; toutes sont sensibles : la limite de détection la plus basse revient à la turbidimétrie sur Immuno 1 : 0,2 mg/l. Bonne précision : bonnes répétabilité et reproductibilité. Toutes sont rapides, toutes sont d'une grande simplicité d'utilisation.
- Inconvénients : réactifs de coût élevé. Systèmes fermés : FPIA sur TDX, films multicouches sur Opus. Interférences liées à la bilirubine.

III.3- Méthodes par électrophorèse capillaire

Encore du domaine de la recherche ces méthodes commencent à être publiées. Elles permettent la mesure simultanée de plusieurs antiépileptiques : phénobarbital, phénytoïne, carbamazépine. Les premiers résultats semblent bien corrélés à la FPIA.

III.4- Cas particulier du dosage de la phénytoïne libre

La phénytoïne libre, non fixée aux protéines plasmatiques, est la forme pharmacologiquement active. Il peut être utile de mesurer la phénytoïne libre lorsque la réponse clinique d'un patient ne concorde pas avec la concentration totale de phénytoïne ou lorsqu'on pense que la liaison protéique du patient est anormale. Après une étape préalable de séparation de la fraction libre et de la fraction liée aux protéines (par exemple par ultrafiltration sur filtre type Amicon), le dosage pourra être fait en FPIA sur TDX. On utilisera le même réactif que pour la phénytoïne totale mais avec des calibrants particuliers (compris entre 0 et 4mg/l), et des

contrôles particuliers. Récemment un auteur a publié une adaptation des réactifs FPIA AxSym pour ce dosage.

■ IV. CRITÈRES DE CHOIX D'UNE TECHNIQUE

Les méthodes d'immunoanalyse par leur automatisation, leur simplicité et leur rapidité, sont les plus employées par les laboratoires. De plus, chez les épileptiques sous polythérapie anticonvulsive, plusieurs autres antiépileptiques peuvent être dosés par ces méthodes (phénytoïne, acide valproïque, carbamazépine...).

La FPIA et l'ÉMIT sont les méthodes les plus utilisées. Les méthodes chromatographiques seules permettent l'analyse des métabolites.

■ V. TECHNIQUE DE RÉFÉRENCE

L'HPLC est la technique de comparaison pour étudier de nouvelles méthodes. Il n'existe pas de techniques de référence ou recommandées actuellement

■ VI. VALEURS USUELLES

Zone thérapeutique à l'état d'équilibre : 10 - 20 mg/l, Signes d'intoxication latente : 25 mg/l.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- ANDANSON M., BUREAU C., DERHAROUTUNIAN C., DEVYS C., SANTOLARIA N. Suivi thérapeutique des dosages sanguins des antiépileptiques, des digitaliques et de la théophylline : modalités pratiques et interprétation des résultats. Lyon Pharmaceutique, 1997, 48, 29-41
- 2- CARON G.P., GALLAGHER T.K., LEPPIK I.E., OLES K.S., PARKER D.R., PENRY J.K., SHEEHAN M.L. Phénytoïn and phenobarbital concentrations in serum a comparison of ames seralyzer with GLC and Emit. Ther. Drug Monit., 1989, 11, n° 1, 73-78
- 3- GORODISCHER R., BURTIN P., VERJEE Z., HWANG P., KOREN G. is saliva suitable for therapeutic monitoring of anticonvulsivants in children : an evaluation in the routine clinical setting. Ther. Drug Monit., 1997, 19, n° 6, 637-642
- 4- JARZABEK J.L., KAMPA I.S. Adaptation of total phenytoïn reagent pack for measuring free phenytoïn levels with the Abbott AxSym immunoassay analyser. Ther. Drug Monit., 1999, 21, n°1, 134-136

- 5- KATAOKA Y., MAKINO K., OISHI R. Capillary electrophoresis for therapeutic drug monitoring of antiepileptic. *Electrophoresis*, 1998, n°83, 2856-2860
- 6- MOORE F.M.L., SIMPSON D. Cost-effective assays for use in monitoring carbamazépine, phenobarbital and phenytoin in serum. *Clin. Chem.*, 1989, 35, n°8, 1782-1784
- 7- O' CONNELL M.T., RATNATAJ N., ELYAS A.A., DOHENY M.H., DARSOT S., PATSALOS P.N. A comparison of the Opus and TDX analysers for antiepileptic drug monitoring. *Ther. Drug Monit.*, 1995, 17, n°5, 549-555
- 8- VAN-DER-WEIDE J., LUITING H.J., VEEFKIND A.H. Evaluation of the cloned enzyme donor immunoassay for measurement of phenytoin and phenobarbital in serum. *Ther. Drug Monit.*, 1993, 15, n°4, 344-348

PHÉNYTOÏNE

MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES EN PHASE HOMOGÈNE

PRINCIPE	EMIT	EMIT	CEDIA II
Fournisseur	Dade Behring	Dade Behring	Roche Boehringer
Code technique	VB	VQ	UD
Appareil	Mira-Mira S...	ACA	Hitachi
Répétabilité*		1,2 % à 2 %	1,3 % à 3,2 %
Reproductibilité*		1,5 % à 2 %	2,3 % à 5,1 %
Domaine de mesure	0,5 à 40 mg/l	2,5 à 30 mg/l	0,6 à 40 m g /l
Exactitude / Autre méthode**		CG y = 0,93 x + 1,1 r = 0,922	
Exactitude / Autre méthode**		CG/MS y = 0,93 x + 1 r = 0,986	
Interférences liées au prélèvement***		Pas d'interférence pour :	
Bilirubine		380 µmol/l	660 mg/l < 10 %
Hémoglobine		5 g/l	10 g /l < 10 %
Triglycérides		30 g/l	10 g /l < 10 %
Spécificité I Métabolites***			
4 hydroxyphényl 5 phénylhydantoïne (=HPPH)		25 mg/l < 10 %	1,8 %
Spécificité/ Autres antiépileptiques***			
Phénobarbital		150 mg/l < 10 %	0 %
Carbamazépine		120 mg/l < 10 %	0,2 %
Acide valproïque		500 mg/l < 10 %	0 %
Nature anticorps	Monoclonal, souris	Monoclonal, mouton	?, souris
Reconstitution réactif	Liquide prêt à l'emploi	Prêt à l'emploi	À reconstituer, consignes strictes
Conservation réactif ouvert		Sans objet	60 jours (froid + obscurité)
Nombre de tests/coffret	100 tests/coffret	50 sachets/boîte	96 tests/coffret
Nombre de points de calibration	6 (0 ; 2,5 ; 10 ; 20 ; 40)	5 (2,5 ; 10 ; 20 ; 30)	2 (? , 40)
Fréquence de calibration		3 mois, ou lot nouveau	5 jours
Prélèvement préconisé	Sérum ou plasma	Sérum ou plasma	Sérum ou p plasma (EDTA - héparine)
Volume spécimen •	3 µl	40 µl	4 µl
Date fiche technique	1997	1996	1996

* Fourchettes fonction des concentrations testées

** y = méthode testée ; x = Autre méthode

*** Concentration de substance « interférente » et % réaction croisée

• : Volume de la prise d'essai, volume mort non pris en compte

PHÉNYTOÏNE

MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES EN PHASE HOMOGÈNE

PRINCIPE	TURBIDIMETRIE	TURBIDIMÉTRIE	TURBIDIMÉTRIE	NÉPHÉLOMÉTRIE	NÉPHÉLOMÉTRIE
Fournisseur	Beckman Couper	Dade Behring	Bayer	Beckman	Beckman Couper
Code technique	HK	H Q	87	GK	GK
Appareil	CX 7	Dimension	Immuno 1	Immage	Array
Répétabilité*	2,2 % à 2,9 %	1,9 % à 3,1 %	1,1 % à 2,2 %	1,7 % à 2,4 %	2,78 % à 3,46 %
Reproductibilité*	2,8 % à 4 %	3,6 % à 7,1 %	1,9 % à 2,7 %	2,4 % à 3,3 %	3,05 % à 4,38 %
Domaine de mesure	2,5 à 40 mg/l	0,5 à 40 mg/l	0,2 à 40 mg/l	2,5 % à 40 mg/l	2,5 % à 40 mg/l
Exactitude / Autre	FPIA $y = 1,028 x - 0,24$ $r = 0,996$	FPIA $y = 0,98 x - 2,14$ $r = 0,989$	FPIA $y = 0,86 x - 0,4$ $r = 0,996$	FPIA $y = 1,05 x - 0,75$ $r = 0,996$	FPIA $y = 1,01 x - 1,29$ $r = 0,997$
Exactitude / Autre		EMIT $y = 1,03 x - 0,58$ $r = 0,991$	EMIT $y = 0,89 x + 0,6$ $r = 0,989$		
Interférences liées au prélèvement***					
Bilirubine	300 mg/l < 8 %	200 mg/l < 10 %	149 mg/l NS	300 mg/l NS	?
Hémoglobine	5 g/l < 8 %	5 g/l < 10 %	5 g/l NS	5 g/l NS	Interférence
Triglycérides	++++ < 8 %	27 g/l < 10 %	12 g/l NS	6,7 g/l NS	Interférence
Spécificité/ Métabolites***					
4 hydroxyphényl 5 phénylhvdantoïne	< 8 %	30 mg/l < 10 %	25 mg/l NS	32 mg/l NS	> 50 mg/l 20 %
Spécificité / Autres antiépileptiques***					
Phénobarbital	< 8 %	150 mg/l < 10 %	120 mg/l NS	120 mg/l NS	> 100 mg/l 20 %
Carbamazépine	< 8 %	120 mg/l < 10 %		25 mg/l NS	> 25 mg/l %
Acide valproïque	< 8 %	500 mg/l < 10 %		400 mg/l NS	> 400 mg/l %
Nature anticorps	Monoclonal, souris	Monoclonal, souris	Monoclonal, souris	Monoclonal, souris	?, chèvre
Reconstitution réactif	Liquide, prêt à l'emploi	Liquide, prêt à l'emploi	Liquide, prêt à l'emploi Mais homogénéiser avant de placer sur l'appareil	Liquide, prêt à l'emploi	Liquide, prêt à l'emploi
Conservation réactif ouvert	42 jours ou péremption	72 heures ; puits entrés dans machine		14 jours avec bouchon antiévaporation	30 jours avec bouchon antiévaporation
Nombre de tests/coffret	100 tests / cartouche	20 / flex	100 tests I coffret (cassette)	150 tests / cartouche	
Nombre de points de Fréquence de calibration	6 14 jours	5 (0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40) en 3 mois ou nouveau lot	6 (0 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40) 60 jours	? 14 jours	2 (?) ; courbe usine Nouveau lot
Prélèvement préconise	Sérum ou plasma (EDTA, héparine)	Sérum ou plasma	Sérum	Sérum ou plasma (EDTA - héparine)	Sérum (plasma proscrit)
Volume spécimen •	3 µl	4 µl		0,22 µl	?
Date fiche technique	1997	1997	1995	1997	1996

* Fourchettes fonction des concentrations testées

** y = méthode testée ; x = Autre méthode

*** Concentration de substance « interférente » et % réaction croisée

• : Volume de la prise d'essai, volume mort non pris en compte

PHÉNYTOÏNE

MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES EN PHASE HOMOGÈNE

PRINCIPE	FPIA	FPIA	FPIA
Fournisseur	Abbott	Abbott	Roche Boehringer
Code technique	IJ	IJ	IZ
Appareil	TDX	AxSym	Integra
Répétabilité*	1,5 % à 1,9 %	2 % à 2,5 %	2,1 % à 2,3 %
Reproductibilité*	2,6 % à 3,6 %	3,3 % à 3,6 %	1,5 % à 3 %
Domaine de mesure	0,5 à 40 mg/l	0,5 à 40 mg/l	0,6 à 40 mg/l
Exactitude / Autre méthode**	HPLC $y = 1,009 x + 0,85$ $r = 0,992$	FPIA $y = 1,03 x + 0,15$ $r = 0,996$	FPIA $y = 1,068 x - 1,59$ $r = 0,992$
Exactitude / Autre méthode**	EMIT $y = 0,968 x + 0,35$ $r = 0,980$		
Interférences liées au prélèvement***			
Bilirubine	130 mg/l < 5 %	150 mg/l < 5 %	290 mg/l < 10 %
Hémoglobine	8,6 g/l < 5 %	10 g/l < 5 %	10 g/l < 10 %
Triglycérides	S g/l < 5 %	9 g/l < 5 %	27 g/l < 10 %
Spécificité / Métabolites***			
4 hydroxyphényl 5 phénylhydantoïne (=HPPH)	100 mg/l 5,3 %	S mg/l < 3 %	220 mg/l 2,5 %
Spécificité) Autres antiépileptiques***			
Phénobarbital	< 1 %		400 mg/l 0,1 %
Carbamazépine	< 1 %		140 mg/l < 0,1 %
Acide valproïque	< 1 %		
Nature anticorps	?, mouton	Polyclonal, mouton	Monoclonal, souris
Reconstitution réactif	Liquide, prêt à l'emploi	Liquide prêt à l'emploi	Liquide prêt à l'emploi i
Conservation réactif ouvert	180 jours ou péremption	336 heures d'utilisation sur AsSYm	16 semaines, ou péremption
Nombre de tests / coffret	100 tests/coffret	100 tests/coffret	200 tests/cassette
Nombre de points de calibration	6 (0 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40)	6 (0 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40)	6 (0 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40)
Fréquence de calibration	Lot nouveau	Lot nouveau	16 semaines, ou nouveau lot
Prélèvement préconisé	Sérum ou plasma	Sérum ou plasma	Sérum ou plasma, non hémolysé
Volume spécimen •	50 µl	44 µl	2 µl
Date fiche technique	1997	1998	1995

* Fourchettes fonction des concentrations testées

** y = méthode testée ; x = Autre méthode

*** Concentration de substance « interférente » et % réaction croisée

• : Volume de la prise d'essai, volume mort non pris en compte

PHÉNYTOÏNE

MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES EN PHASE HÉTÉROGÈNE

PRINCIPE	FIA	CHIMILUMINESCENCE	IMMUNO-ENZYMOLOGIE
Fournisseur	Dade Behring	Chiron	Ortho
Code technique	DA	SI	3K
Appareil	Opus	ACS 180	VITROS
Répétabilité*	4,9 % à 8,6 %	4,2 % à 5,2 %	
Reproductibilité*	5,2 % à 6,0 %	6,1 % à 8,2 %	4,2% à 5 %
Domaine de mesure	0,56 à 40mg/l	0,5 a 40 mg/l	3 a 40 mg/l
Exactitude / Autre méthode**	FPIA $y = 0,90 x - 1,70$ $r = 0,97$	FPIA $y = 1,009 x - 0,78$ $r = 0,98$	HPLC $y = 0,99 x + 0,13$ $r = 0,995$
Exactitude / Autre méthode*			EMIT $y = 1,02 x - 0,46$ $r = 0,988$
Interférences liées au prélèvement***			
Bilirubine	Interfère positivement	200 mg/l < 5 %	200 mg/l < 10 %
Hémoglobine	10 g/l NS	5 g/l < 5 %	Interfère
Triglycérides	8 g/l NS	10 g/l < 5 %	10g/l < 10%
Spécificité / Métabolites***			
4 hydroxyphényl 5 phénylhydantoïne (=HPPH)	6 4 %	100 mg/l < 1 %	200 mg/l < 10 %
Spécificité / Autres antiépileptiques***			
Phénobarbital	< 1 %	150 m g / l < 1 %	250 mg/l < 10 %
Carbamazépine	< 2 %	120 m g / l < 1 %	120mg/l < 10%
Acide valproïque	< 1 %	500 m g / l < 1 %	2 g/l < 10%
Nature anticorps	Monoclonal, souris	Monoclonal, souris	Monoclonal, souris
Reconstitution réactif	Prêt à l'emploi, remise à température ambiante	Prêt à l'emploi, mélanger la phase solide	Prêt à l'emploi, remise à température ambiante
Conservation réactif ouvert	Sans objet	40 heures cumulées à température ambiante	Une semaines sur l'appareil
Nombre de tests/coffret	50 ou 100 tests / boîte	50 ou 300 tests / boîte	?
Nombre de points de calibration	6 (0 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40)	2 (bas élevé) + courbe maîtresse	
Fréquence de calibration	8 semaines	28 jours	Changement de lot
Prélèvement préconisé	Sérum ou plasma non ictérique	Sérum (pas de gel séparateur) ou plasma	Sérum ou plasma (héparine, citrate) non
Volume spécimen •	10 µl	EDTA héparine) 10 µl	hémolysé 11 µl
Date fiche technique	1996	1996	1996

* Fourchettes fonction des concentrations testées

** y = méthode testée ; x = Autre méthode

*** Concentration de substance « interférente » et % réaction croisée

• : Volume de la prise d'essai, volume mort non pris en compte

INTÉRÊT DES DOSAGES SANGUINS DES PSYCHOTROPES

J. GREFFE

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

I. INTRODUCTION

L'utilisation des dosages plasmatiques des médicaments, afin d'en déterminer la concentration efficace avec un minimum d'effets secondaires est ancienne ; ainsi les antipaludéens de synthèse ont été dosés dès les années 40.

En ce qui concerne la surveillance des traitements par les médicaments psychotropes, ce sont les concentrations plasmatiques des antidépresseurs et du lithium qui furent d'abord mesurées, les premières publications datant des années 60-70.

Ce type d'études a été rendu possible grâce à l'évolution des technologies tant dans le domaine de la chimie analytique que celui de l'immunologie, domaines auxquels appartiennent les méthodologies utilisables pour doser les médicaments.

Ces dosages ont permis de rationaliser l'acte thérapeutique et de médicaliser la relation médecin malade.

Les traitements des maladies psychiatriques par les médicaments psychotropes appellent quelques commentaires préliminaires qui préciseront leurs particularités :

- **Lipophilie des molécules.**

Les psychotropes sont en général des substances fortement lipophiles, ayant une grande affinité pour leurs sites d'action dans le système nerveux central. De ce fait, des concentrations plasmatiques souvent très basses (de l'ordre du centième au dixième de $\mu\text{g/ml}$), seront suffisantes pour produire une activité clinique. Il n'y a pas systématiquement une corrélation entre les concentrations circulantes et les effets cliniques.

Chez certains malades, des concentrations plasmatiques très basses (voire même non détectables) de neuroleptiques, administrés sous forme retard par voie intramusculaire, à des posologies très inférieures aux posologies usuelles, produisent un effet clinique. Celui-ci n'est mis en évidence que lors de la rechute qui ne manque pas de se produire environ deux à trois mois après l'arrêt du traitement qui semblait inutile car prescrit à des posologies presque « homéopathiques ».

- **Métabolisme.**

Ces molécules de psychotropes sont souvent transformées dans l'organisme, avec **une grande variabilité individuelle**, en de nombreux métabolites (par exemple dans l'urine on retrouve 35 métabolites majeurs, parmi les 100 que certains auteurs ont mis en évidence, pour la chlorpromazine, Largactil® et 15 pour l'imipramine, Tofranil®).

- **L'activité des métabolites peut être :**

- Soit de même nature et d'intensité identique ou différente de la molécule mère :

- L'hydroxy-halopéridol (métabolite de l'halopéridol, Haldol®) a une activité neuroleptique plus faible que la molécule mère (et peut se retransformer en halopéridol par oxydation).
- La nortriptyline (antidépresseur, métabolite déméthylé de l'amitriptyline, Laroxyl Élavil®), est plus actif que la molécule mère.
- L'époxyde 10-11 de la carbamazépine, Tégrétol® que la molécule mère .
est un métabolite presque aussi actif
- De nombreuses molécules de benzodiazépines conduisent au nordiazépam, qui est également une benzodiazépine.
- Soit de nature pharmacologique différente de la molécule mère, tout en restant dans le même domaine d'activité
 - La clomipramine, Anafranil®, est puissamment inhibitrice du recaptage de la sérotonine tandis que son premier métabolite déméthylé, la desméthylclomipramine est, elle, un puissant inhibiteur du recaptage de la noradrénaline. L'activité antidépressive peut donc être différente si la clomipramine est plus ou moins rapidement déméthylée, d'où l'intérêt du dosage de chacun de ces différents métabolites.
- Soit de nature pharmacologique différente de la molécule mère, dans un autre domaine d'activité
 - La loxapine, Loxapac®, neuroleptique de la famille des dibenzo-oxazépines, est déméthylée en partie (environ 10 %) sous forme d'amoxapine à activité antidépressive, molécule commercialisée sous le nom de Défanyl®.
- Soit nulle, le plus souvent :
 - La maprotiline (Ludiomil®) est métabolisée en desméthylmaprotiline sans effet thérapeutique, ainsi les métaboliseurs intensifs seront de mauvais répondeurs à la maprotiline aux posologies classiques.
 - C'est le cas de tous les métabolites glucuronoconjugués.
- Soit toxique, exceptionnellement.

Les effets des traitements seront donc conditionnés par l'aptitude plus ou moins grande des patients à métaboliser les médicaments. Ce qui montre bien l'intérêt de la pharmacogénétique lors des traitements par les psychotropes, cette spécialité fait l'objet d'une monographie dans ce même ouvrage.

- Associations médicamenteuses fréquentes.

À côté des nombreux métabolites produits par chaque molécule, on observe souvent plusieurs médicaments associés entre eux. Il n'est pas rare de voir des malades à qui l'on a prescrit 4 à 6 médicaments psychotropes avec parfois deux molécules de la même classe pharmacologique (et parfois du même groupe chimique, ce qui exclu certaines méthodologies de dosages utilisant des anticorps).

- Posologies variables du fait des sensibilités et des susceptibilités individuelles.

En psychiatrie, contrairement à ce qui se pratique par exemple en cancérologie et en antibiothérapie, les posologies sont très variables d'un malade à l'autre, du fait des suscepti-

bilités particulières, mais aussi du fait d'effets thérapeutiques différents selon la zone des posologies administrées parmi celles qui sont couramment utilisées.

En effet, certaines molécules d'activité sédatrice à une certaine posologie, seront excitantes à des posologies plus faibles. C'est le cas de certains barbituriques ou des neuroleptiques à action bipolaire (action désinhibitrice à faibles doses et antiproductive à de plus fortes doses). Des posologies mal adaptées produiront des effets contraires à ceux escomptés.

- Transport des psychotropes dans l'organisme.

Les psychotropes (substances souvent basiques) circulent dans le sang en étant plus ou moins liés aux protéines plasmatiques : principalement l'albumine, l' α 1-glycoprotéine acide et les lipoprotéines.

Or, la concentration en albumine circulante est dépendante de l'état hépatique et nutritionnel des individus, et l' α 1-glycoprotéine acide (dont il existe diverses formes génétiquement déterminées), augmente rapidement en cas d'infection, inflammation et sous l'influence de certains médicaments, dont les barbituriques (3). Ainsi, les variations physiopathologiques des concentrations de ces protéines plasmatiques occasionnent une grande variabilité de cette liaison des médicaments, non seulement d'un individu à l'autre, mais aussi chez un même sujet d'un moment à un autre.

Mais quand les variations des concentrations des protéines plasmatiques sont faibles, la proportion de la forme liée de la plupart des médicaments est relativement constante et le doublement de la concentration totale s'accompagne du doublement de la concentration libre à l'équilibre. La mesure de la concentration plasmatique totale apporte la même information que la détermination de la fraction libre.

La liaison des médicaments à ces protéines plasmatiques a une influence sur la pharmacocinétique de ces composés (absorption, distribution, métabolisme et élimination rénale) et, par conséquent, sur leurs effets pharmacologiques et cliniques.

Dans les années 1980, on effectuait fréquemment la détermination des formes libres des médicaments, dites aussi formes biodisponibles pour l'organisme (59).

Les méthodologies utilisaient soit la dialyse à l'équilibre, soit l'ultrafiltration pour séparer les formes libres, de concentrations souvent très basses. De ce fait, le dosage avec les techniques de l'époque était peu précis. Il y avait parfois une fixation d'une partie de cette forme libre sur les membranes de dialyse ou d'ultrafiltration.

Ces dosages de formes libres, délicats à réaliser et d'interprétation difficile qui avaient comme caractéristique commune leur coût élevé, ne sont actuellement pratiquement jamais effectués en routine.

Aux sites d'action des médicaments, il est fort probable que la liaison des molécules aux protéines plasmatiques soit rompue et que peu à peu l'équilibre soit déplacé vers la fixation sur les récepteurs spécifiques. Les concentrations des formes libres des médicaments ne modélisent que rarement leur biodisponibilité au site d'action.

- L'observance du traitement difficile à obtenir.

Globalement 40 % des patients recevant des psychotropes ont une mauvaise observance du traitement (soit volontaire ou soit due à une diminution des capacités de la mémoire).

Les dosages, en permettant d'évaluer cette observance, changent la relation existant entre le médecin et le malade. L'acte thérapeutique est plus rationnel, plus médicalisé et moins autoritaire (5).

Lors des expertises cliniques faites pour obtenir les Autorisations de Mises sur le Marché (AMM) d'une nouvelle molécule, les dosages des concentrations circulantes sont maintenant obligatoires chez tout sujet inclus dans une étude. Ils permettent d'attribuer les effets thérapeutiques ou secondaires à la molécule et non pas à un effet placebo fréquent en psychiatrie qui est dû à l'environnement d'une expertise (évaluation à l'aide d'échelles d'auto-évaluation, écoute et prise en considération de ce que dit le patient, bilans biologiques). Les études contrôlées de nouvelles molécules contre placebo ou contre une substance de référence, ne permettraient pas toujours, avant la réalisation de ces dosages, de différencier les effets dus à la molécule de ceux liés à l'effet protocole.

L'intérêt des dosages des psychotropes en toxicologie ne sera pas traité, nous ne retiendrons que leur utilisation dans la surveillance thérapeutique.

Mais comme pour la toxicologie, les résultats doivent être rendus rapidement aux cliniciens, afin qu'ils puissent ajuster au plus vite les traitements.

En dehors des dosages concernant des protocoles de recherche clinique ou fondamentale, les résultats doivent être transmis au clinicien le jour du prélèvement sanguin, des délais plus longs réduisant tout leur intérêt.

■ II. LES MÉTHODOLOGIES UTILISÉES POUR LES DOSAGES DES PSYCHOTROPES

Les principales méthodologies utilisables pour les dosages de psychotropes sont :

- la chromatographie en phase gazeuse (CPG), avec un détecteur à ionisation de flamme, à capture d'électrons ou à azote.
- la CPG couplée à la spectrométrie de masse, qui permet d'identifier la substance dosée lors de chaque dosage et ainsi d'éliminer les interférences.
- la chromatographie liquide à haute performance (CLHP ou HPLC) avec détection spectrophotométrique dans l'ultra violet (UV) avec le plus souvent maintenant une détermination des spectres d'absorption sur les appareils munis d'une barrette de diodes, on peut aussi utiliser la détection fluorimétrique, la détection électrochimique ou même la détection par spectrométrie de masse.
- le dosage radioimmunologique (RIA, Radio Immuno Assay), est moins précis que les dosages chromatographiques mais plus sensible.
- les dosages immunoenzymatiques principalement par polarisation de fluorescence ou par ÉMIT (Enzyme Multiplied Immuno Test), sont simples à mettre en œuvre et utilisables dans tous les laboratoires sur des appareils multiparamétriques.
- Une méthodologie très intéressante sur le plan de l'activité pharmacologique et sur celui de la biodisponibilité (mais hélas très coûteuse et rarement effectuée en routine) est la méthode au radio récepteur (RRA, Radio-Receptor Assay) introduite par CREESE et

SNYDER en 1977 (38, 55) est considérée comme une technique de référence principalement pour les dosages de neuroleptiques, mais peut être applicable à d'autres psychotropes dans la mesure où l'on peut préparer facilement des extraits contenant leurs récepteurs.

On mesure la capacité du neuroleptique et de ses métabolites actifs à déplacer un ligand radioactif comme le [³H] spiropéridol ou le [³H] halopéridol, fixé sur des récepteurs extraits de cerveaux d'animaux (en général le rat). Cette méthodologie mesure pour chaque neuroleptique une activité due à la molécule mère et à ses métabolites actifs, en tenant compte de leur biodisponibilité, qui dépend de l'équilibre existant entre les formes libres et liées.

Cette activité est souvent exprimée en équivalents chlorpromazine ou halopéridol.

Les concentrations mesurées sont parfois beaucoup plus élevées que celles obtenues avec les autres méthodologies, car tous les métabolites actifs sont pris en compte.

Par ce procédé, on peut évaluer une activité neuroleptique globale, chez un patient recevant plusieurs neuroleptiques.

Enfin il faut noter que les métabolites plasmatiques qui sont glucuronoconjugués (métabolites sans activité pharmacologique, prêts à être éliminés par le rein) ne sont pas détectés par toutes ces méthodologies. Étant hydrosolubles, ils ne sont pas extraits lors des méthodes de purification et dans le cas de techniques directes utilisant un procédé immunologique de détection, ils ne seront pas dosés.

Avec le résultat du dosage, le laboratoire doit fournir la fourchette de valeurs thérapeutiques qui correspond à sa méthodologie car cette zone de concentrations varie légèrement selon la technique de dosage utilisée.

■ III. DOSAGE DES ANTIDÉPRESSEURS

(2, 5, 6, 9, 11, 31, 42, 46, 49, 54, 62, 63, 64, 67)

Actuellement de nombreux médicaments antidépresseurs efficaces peuvent être prescrits pour le traitement des dépressions. Malgré l'importance des moyens thérapeutiques, qui répond à une diversité biochimique des dépressions, des échecs thérapeutiques sont encore observés dans environ 30 % des cas traités (3). Certains de ces échecs peuvent être dus à des concentrations plasmatiques des antidépresseurs inadéquates.

L'utilisation pratique de ces dosages, bien que quelques fois controversée (DALERY (14), dans un article de synthèse sur les antidépresseurs tricycliques, n'évoque pas les dosages), n'est pas sans intérêt comme le prouve notre expérience et celles d'autres équipes qui effectuent ces dosages en routine.

Le dosage des inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO), dont l'activité clinique n'a aucune relation avec les concentrations circulantes, n'est jamais pratiqué. On peut cependant mesurer l'inhibition de la monoamine oxydase plaquettaire qui conduit à une efficacité maximale si elle est d'au moins 90 %. Ces dosages difficiles à mettre en œuvre sont du domaine de la recherche (9).

En ce qui concerne les autres antidépresseurs, principalement les tricycliques, de nombreux articles mentionnent des valeurs globales égales à la somme des concentrations de la molécule mère et de celles des métabolites déméthylés, que le dosage soit effectué par une méthode immunologique donnant une seule valeur ou par une technique mesurant la concentration de chaque molécule.

Il y a une importante variabilité interindividuelle dans les proportions existant entre la molécule mère et les métabolites sans que l'on ait pu mettre en évidence une relation claire, entre ces différences métaboliques et la clinique. Des études dans ce but ont été réalisées, et seront décrites plus loin. En effet, les amines tertiaires se transforment principalement par déméthylation, en amines secondaires qui sont actives

- l'imipramine en désipramine,
- l'amitriptyline en nortriptyline.

Les amines secondaires donnent lieu à la formation de dérivés hydroxylés, et secondairement à celle d'amines primaires qui sont, elles aussi, actives.

Les métabolites hydroxylés devraient être pris en compte dans le calcul des concentrations circulantes mais les dosages en sont délicats car les conditions d'extraction peuvent être différentes de celles de la molécule mère.

Certains auteurs ont proposé des rapports optimaux molécule mère/métabolites déméthylés et hydroxylés permettant de prédire une efficacité clinique, et ce, dès les deux premières semaines de traitement.

De nombreuses études, ayant pour but de prédire une efficacité du traitement par la clomipramine (Anafranil®) en fonction de la proportion de ses différents métabolites (principalement déméthylés), ont été publiées. La plus récente est celle de NOGUCHI et coll. (36) qui prend en compte la proportion des métabolites déméthylés et hydroxylés. Mais les conclusions des auteurs reposent sur des calculs statistiques compliqués, qui bien que significatifs, sont difficilement applicables en routine.

Il serait cependant intéressant de reprendre cette étude sur des patients d'origine européenne, qui métabolisent probablement les médicaments d'une manière différente de celle des sujets japonais.

III.1- Caractéristiques pharmacologiques des antidépresseurs

III.1.1- Les variabilités interindividuelles

Le dosage des concentrations plasmatiques est intéressant pour les antidépresseurs en raison de l'existence d'une grande variabilité interindividuelle. Celles-ci varient très largement d'un sujet et à l'autre pour une posologie orale identique du médicament.

On peut donner comme exemple le cas de la nortriptyline.

Pour la nortriptyline, la variabilité est de l'ordre de 1 à 30, aussi le concept de posologie moyenne apparaît-il erroné.

- Influence des facteurs ethniques :

Pour une même posologie les Japonais et les sujets de race noire ont une concentration plasmatique de nortriptyline plus élevée que les blancs (tableau I).

Tableau I : Variations de la pharmacocinétique de la nortriptyline en fonction du facteur ethnique (26)

Nortriptyline	Japonais	Américains
	n =10	n = 10
Cmax (ng/ml)	39,3 \pm 5,7	32,0 \pm 3,0
Pic de concentration Tmax (h)	6,1 \pm 1,7	6,2 \pm 3,4
Demi-vie (h)	17,6 \pm 6,3	15,3 \pm 6,6
Aire sous la courbe (ng/h/ml)	1 150 \pm 316	730 \pm 445*
Posologie (mg)	50	50

*p<0,05

• Influence de l'âge

L'élimination de nombreux médicaments est diminuée chez les personnes âgées, le rein étant moins fonctionnel. A posologie égale, les concentrations des antidépresseurs seront plus élevées chez les sujets âgés que chez les jeunes chez qui la demi-vie est plus longue et la biodisponibilité meilleure (70). Ceci est démontré dans le tableau II.

Tableau II : Influence de l'âge sur les concentrations plasmatiques après administration de nortriptyline (1 mg/kg/j) (64)

	Groupes d'âges (ans)					
	18-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70
Nb de patients	10	16	16	28	23	23
Conc. Plasm.	60 \pm 24	68 \pm 27	61 \pm 19	66 \pm 29	78 \pm 41	111 \pm 58

Concentration plasmatique moyenne de nortriptyline \pm un écart type (ng/ml)

III.1.2- Corrélation entre les concentrations plasmatiques et les effets cliniques et les effets secondaires

De nombreux travaux ont essayé de démontrer l'existence, pour certains antidépresseurs tricycliques, d'une corrélation entre leur concentration plasmatique et leur efficacité sur le plan clinique.

L'efficacité clinique augmente avec les concentrations jusqu'à un plateau, puis deux cas peuvent se présenter si les concentrations continuent à croître :

- l'efficacité clinique reste au plateau avec l'apparition d'effets indésirables ;
- l'efficacité clinique décroît avec l'apparition de ces effets indésirables.

Les deux types de courbes observées montrant l'effet clinique en fonction des concentrations plasmatiques sont présentées dans les figures 1 et 2.

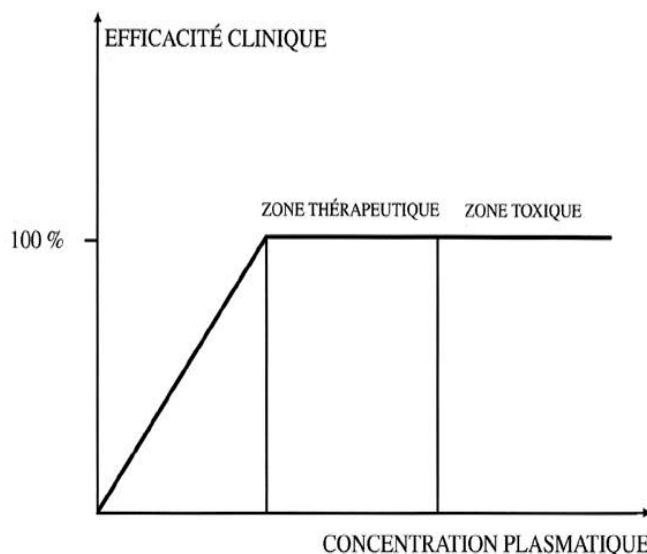


Figure 1 : Relation linéaire entre les concentrations plasmatiques d'un médicament et l'efficacité clinique (66).

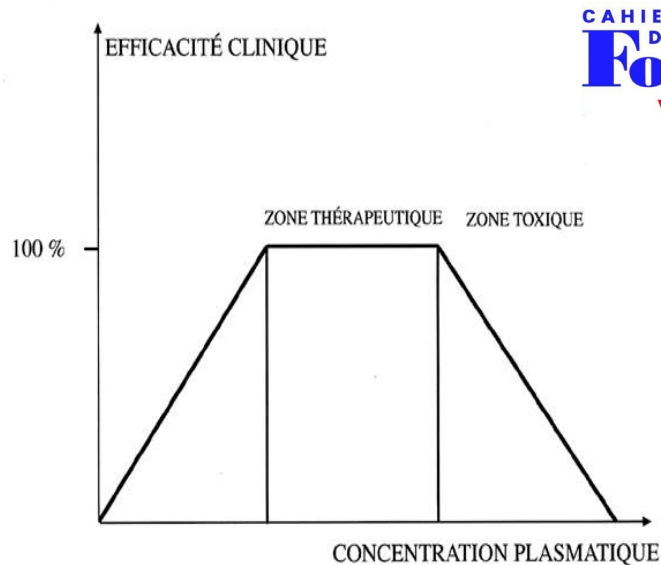


Figure 2 : Relation curvilinéaire entre les concentrations plasmatiques d'un médicament et l'efficacité clinique (66).

Le tableau III récapitule les conclusions de travaux concernant le comportement d'un certain nombre d'antidépresseurs suivant l'un ou l'autre de ces deux modèles.

III.1.3- Concentrations plasmatiques thérapeutiques des antidépresseurs

On parvient ainsi à définir une zone d'efficacité thérapeutique des concentrations plasmatiques, qui correspond à une plus grande probabilité d'obtenir une amélioration clinique satisfaisante avec des effets secondaires limités. Les tableaux IV et V indiquent les intervalles thérapeutiques, les bornes sont parfois très différentes d'un auteur à l'autre, nous

**Tableau III : Rapports entre les concentrations plasmatiques
et la réponse thérapeutique concernant les principaux antidépresseurs tricycliques (52)**

Antidépresseur	Nombre d'études	Rapports entre concentrations plasmatiques et effet clinique		Type de rapport	
		NON	OUI	LIN.	CURV.
Imipramine	20	8	12	11	1
Désipramine	14	8	6	4	2
Amitriptyline	36	21	15	5	10
Nortriptyline	22	10	12	1	11
Clomipramine	16	8	8	4	4
Doxépine	5	1	4	3	1
Protriptyline	2	0	2	1	1
TOTAL	115	56	59	29	30

LIN. = linéaire
CURV. = curvilinéaire

**Tableau IV : Concentrations plasmatiques recommandées
pour quelques antidépresseurs tricycliques
selon des revues de la littérature parues entre 1984
et 1988 d'après Baumann, 1990 (2),
complété d'après Charlier et coll., 1999 (11),
et d'autres auteurs (7, 10, 41, 44, 48, 58, 61)**

Médicament	Principes actifs	Valeurs souhaitables	Références	
Amitriptyline (AT) Laroxyl© Élavil®	AT + NT	80 - 200	10	
		150 - 300	48	
	AT, NT	80 - 250	9, 41	
		120 - 250	11, 61	
Nortriptyline (NT)	NT	60 - 220, 50 - 150	7	
Clomipramine (CMI) Anafranil®	CMI + DCMI	50 - 150	7, 9, 10, 41, 44, 48, 58	
		> 160	10	
	CMI, DCMI	125 - 300	9	
Imipramine (IMI) Tofranil®	CMI	100 - 200, 150 - 300	7	
		50 - 150	11, 61	
		IMI + DMI	150 - 200	41
		150 - 250	9	
		> 200 - 240	10	
	> 200	5 8		
IMI, DMI	> 150 - 300	48		
	> 244	44		
Désipramine (DMI) Pertofran®®	DMI	50 - 250, 20 - 100	7	
		> 125	10	
		20 - 100	7	
		125 - 300	9, 41, 48	
		108 - 158	44	
75 - 250	61			

DCMI = desméthylclomipramine

Tableau V : Concentrations plasmatiques des autres antidépresseurs dans les conditions du « steady-state » (plateau) observées à la suite d'un traitement aux doses indiquées, d'après Baumann, 1990 (2) complété par d'autres auteurs pour les antidépresseurs récents

Médicament	Doses	Délai	Concentrations mesurées ng/ml		Concentrations suggérées ng/ml	Réf.
			VAL. EXTR.	MOYENNE		
Amoxapine Défanyl®			A + 8-OHA		200 - 600	9, 42
Citalopram Séropram®	5, 25, 50 mg	24	5 - 190	80	25 - 110 25 - 110	2 11
Dosulépine Prothiaden®					50 - 150	11, 61
Doxépine Quitaxon®	225	12	53 - 175 D + DD	95	150 - 250 150 - 250	24 42 9
Fluoxétine Prozac®					150 - 500	11, 61
Fluvoxamine Floxyfral®					100 - 800 50 - 250	9 11, 61
Maprotiline Ludimil®	125 mg	14	34 - 225	128	75 - 150	16
	150 mg	10 - 15	95 - 278	220		37
	100 mg	24		79		35
	100 - 150 mg env. 180 mg	12 12 - 16	0 - 500 83 - 375	266 248		53 23 9, 42 11, 61
Miansérine Athymil®	60 mg	12	10 - 170	50	< 70	34
					10 - 60	31
					20-70	11, 61
Paroxétine Déroxat®					10 - 75	11,61
Sertraline Zoloft®					50 - 150	11, 61
Trazadone Pragmarel®	150 - 600 mg	12	240 - 4900	1880	< 1500	57
	10 mg/kg	14	138 - 2297		800 - 1600 500 - 2500	27 9 11, 61
Trimipramine Surmontil®	75 mg	?	11 - 29	47		56
	150 mg	?	28 - 194	141		56
	200 mg	10	T s.d. = 67 DT s.d. = 51	277 169		13
Venlafaxine Effexor®				100		11

DÉLAI = entre la dernière prise et le prélèvement de sang

T = trimipramine, DT = desméthyltrimipramine, s.d. = écart type, D = doxépine, DD = desméthyldoxépine ;

A = amoxapine, 8-OHA = 8-hydroxyamoxapine.

n'avons pas voulu trancher. Les antidépresseurs commercialisés depuis de nombreuses années ont été très étudiés et l'on peut fournir une fourchette de concentrations thérapeutiques ; ce n'est pas le cas pour les molécules apparues récemment.

La nortriptyline n'est plus commercialisée en France car elle n'était pas rentable financièrement pour les Laboratoires SQUIBB ; l'association nortriptyline + fluphénazine (Motival®) vient d'être retirée du marché français en 1999 ; mais cet antidépresseur tricyclique reste commercialisé dans de nombreux pays.

Le tableau VI montre l'action d'un antidépresseur en fonction des concentrations plasmatiques.

Tableau VI : Présentation schématique de l'action d'un antidépresseur tricyclique à l'exemple de l'amitriptyline en fonction des concentrations plasmatiques d'amitriptyline + nortriptyline, mais valable aussi pour les autres tricycliques (2)

Amitriptyline + Nortriptyline ng/ml	
1 000	Risques accrus de problèmes respiratoires, d'atteinte du système cardiovasculaire, de crises épileptiques, de coma et de mort.
450	Risques accrus de délire médicamenteux, de toxicité cognitive et comportementale, de modification de l'ECG.
250	Risques de modification de l'ECG.
150	Efficacité optimale.
50	Efficacité réduite.
0	Inefficacité.

III.2- Intérêt des dosages (6, 28)

La gravité et la durée des dépressions imposent un traitement d'efficacité rapide et constante.

La mesure des concentrations plasmatiques des antidépresseurs conduit à l'obtention d'une efficacité thérapeutique optimale sans attendre le délai d'action, qui reste voisin de 10 à 21 jours, pour ajuster les posologies.

Le tableau III montrant, que dans presque une étude sur deux, les auteurs n'ont pas retrouvé de relation entre les concentrations plasmatiques d'antidépresseurs tricycliques et l'effet clinique, on pourrait donc douter de l'intérêt de ces dosages en routine. On peut cependant penser, comme le disent les auteurs de cette revue générale (52), que lors de ces études en défaveur du dosage, il n'a été mesuré que les concentrations en molécule mère sans celles des métabolites actifs et que la prévention des effets toxiques n'a pas été prise en compte.

III.2.1 Détermination d'une posologie efficace individuelle

La prescription de la posologie de l'antidépresseur ne doit plus être empirique mais objective, déterminée par les valeurs des concentrations plasmatiques qui doivent s'inscrire dans la fourchette thérapeutique caractérisant l'antidépresseur considéré.

Dans le cas où le traitement antidépresseur est d'abord administré par voie injectable en perfusions IV ou en injections IM et qu'il a montré une efficacité, après deux ou trois semaines, on prend le relais avec des formes orales de l'antidépresseur. On ajuste alors la posologie de la forme orale pour obtenir les concentrations plasmatiques observées lors du traitement par voie injectable. Lorsque l'on n'effectuait pas de dosages on se contentait d'administrer par voie orale une posologie égale au double de celle qui s'était avérée efficace par voie injectable, ce qui était souvent insuffisant.

Certains auteurs ont établi des corrélations entre les concentrations obtenues après une prise unique et la posologie permettant d'obtenir des concentrations au plateau comprises dans la fourchette thérapeutique (22, tableaux VII et VIII).

Tableau VII : Posologie efficace de doxépine pour obtenir une concentration plasmatique au plateau de 125 ng/ml (doxépine + desméthyldoxépine, 22)

Concentration plasmatique obtenue 16 heures après la prise d'une dose test de 75 mg de doxépine	Posologie de doxépine
ng/ml	mg/j
3 - 15	325 (300 - 350)
16 - 28	275 (250 - 300)
29 - 40	225 (200 - 250)
41 - 53	175 (150 - 200)
54 - 66	125 (100 - 150)
67 - 78	75 (50 - 100)

Tableau VIII : Posologie efficace d'imipramine pour obtenir une concentration plasmatique au plateau de 150 ng/ml (imipramine + desméthylimipramine, 22)

Concentration plasmatique obtenue 16 heures après la prise d'une dose test de 75 mg d'imipramine	Posologie d'imipramine
ng/ml	mg/j
3-12	300 (275 - 325)
13-22	250 (225 - 275)
23-31	200 (175 - 225)
32-40	150 (125 - 175)
41-50	100 (75 - 125)
51-59	50 (25 - 75)

L'addition à un antidépresseur tricyclique d'autres psychotropes en particulier d'un inhibiteur de la recapture de la sérotonine entraîne des modifications de son métabolisme et apparition d'une inefficacité ou d'effets secondaires. Seul le dosage permet de rester dans la zone thérapeutique en ajustant les posologies, car l'intensité de l'interaction est variable d'un patient à l'autre (tableau IX).

Tableau IX : Interactions entre antidépresseurs tricycliques et différents psychotropes (15)

Molécules	Mécanisme de l'interaction	Effets sur les concentrations plasmatiques des antidépresseurs tricycliques
Fluvoxamine Floxyfral®	Inhibition de l'enzyme responsable de la biotransformation ou Compétition au niveau du site de biotransformation	AUGMENTATION
Fluoxétine Prozac®		
Valpromide Dépamide®		
Disulfiram Espéral®		
Neuroleptiques phénothiaziniques		
Carbamazépine Tégrétol® Phénobarbital	Induction de l'enzyme responsable de la biotransformation	DIMINUTION

III.2.2- Détection précoce d'une inefficacité thérapeutique

Une inefficacité thérapeutique peut être liée à une concentration plasmatique insuffisante ou trop élevée. Par la modification de la posologie, les concentrations plasmatiques de l'antidépresseur et de ses métabolites actifs peuvent être amenées dans la zone thérapeutique.

Cependant une inefficacité du traitement peut être constatée alors que les concentrations plasmatiques de l'antidépresseur se situent dans la zone thérapeutique. Pour ces patients « non-répondeurs », le dosage autorise de manière précoce (environ 6 semaines avec des concentrations dans la zone thérapeutique) (9), le changement de la molécule initialement prescrite.

III.2.3- Contrôle des effets secondaires

Les effets secondaires sont habituellement d'autant plus importants que les concentrations plasmatiques sont élevées, alors que l'efficacité thérapeutique est atteinte pour une zone de concentrations et n'augmente pas lorsque l'on dépasse cette zone.

Les dosages permettent de prescrire la posologie minimale efficace.

Cet intérêt des dosages est réel chez les sujets âgés, souvent très sensibles aux psychotropes, en raison notamment d'une altération de la fonction d'élimination rénale. On peut éviter ainsi certains états confusionnels liés à une concentration plasmatique excessive de tricycliques.

III.2.4- Contrôle et amélioration de l'observance du traitement

Les dosages des concentrations plasmatiques permettent d'apprécier l'observance du traitement. En moyenne 50 % des patients traités par les antidépresseurs interrompent leur traitement à un moment ou à un autre (9).

Pour les antidépresseurs à longue demi-vie, comme l'amitriptyline, les concentrations plasmatiques à l'état d'équilibre sont sensiblement identiques pour une même posologie en trois prises quotidiennes ou en une unique prise vespérale.

La diminution du nombre de prises permet une meilleure acceptation du traitement par le patient, d'où une meilleure observance.

En effet le pourcentage de patients qui ne suivent pas fidèlement leur traitement diminue avec le nombre de prises journalières (5) :

- pour 4 prises journalières, 70 % des patients suivent mal leur traitement,
- pour 3, 60 %,
- pour 2, 20 %,
- pour 1, 7 %.



III.2.5- Surveillance du traitement

Le traitement d'une dépression est souvent un traitement au long cours.

Les rechutes peuvent être liées à une diminution des concentrations plasmatiques de l'antidépresseur due :

- à une mauvaise observance,
- à une modification de la pharmacocinétique de l'antidépresseur entraînée par des thérapeutiques associées prescrites en cours de traitement ou par une modification de l'état du malade qui modifie son aptitude à métaboliser le médicament.

Cependant, la notion de concentration plasmatique efficace ne doit intervenir que d'une manière complémentaire dans l'acte thérapeutique, la clinique devant rester prépondérante.

Ceci est bien démontré dans l'étude réalisée par l'équipe de VOLMAT de Besançon (65) avec la clomipramine (Anafranil®) .

Cette étude porte sur 40 patients (16 hommes, 24 femmes, âgés de 21 à 77 ans, moyenne 43 ans) dont 37 finiront l'étude et qui présentaient :

- soit une dépression endogène : mélancolie unipolaire ou bipolaire, mélancolie d'involution, n= 16, moyenne d'âge 50 ans.
- soit une dépression exogène : dépression névrotique ou réactionnelle, n = 24, moyenne d'âge 39 ans.

L'intensité de leur état dépressif était quantifié grâce à l'échelle de dépression de Hamilton (plus le score obtenu lors de l'évaluation est élevé plus la dépression est intense).

Après 6 jours de traitement par 75 mg/j de clomipramine, les posologies étaient ajustées en fonction de l'état clinique et maintenues pendant 28 jours à 75 mg/j pour 19 patients, 150 mg/j pour 16 patients et 225 mg/j pour 5 patients.

Au 28^e jour, chez les 19 patients avec 75 mg de clomipramine on observait les concentrations suivantes :

- clomipramine de 13,3 à 147 ng/ml soit de 1 à 10.
- desméthylclomipramine de 13 à 332 ng/ml soit de 1 à 30.

Les auteurs ont mis en évidence, au 28^e jour, une relation linéaire négative entre les concentrations plasmatiques de clomipramine, de desméthylclomipramine et la somme des deux, et l'effet clinique coté à l'aide de l'échelle de Hamilton. Ces concentrations plasmatiques étaient plus élevées chez les mauvais répondeurs. La moyenne (± 1 écart type) des concentrations obtenues chez les 37 patients ayant terminé l'étude étaient :

- clomipramine : 121 \pm 94 ng/ml
- desméthylclomipramine : 159 \pm 100 ng/ml
- la somme des deux : 280 \pm 186 ng/ml

Cette étude montre bien la variabilité existant entre les posologies efficaces et entre les concentrations plasmatiques obtenues avec une même posologie.

III.3- Conduite à tenir pour doser les antidépresseurs (9, 66)

Le premier dosage ne doit pas être fait avant le dixième jour, au minimum, après le début du traitement. Avant ce délai, l'état d'équilibre des concentrations plasmatiques n'est pas atteint. Ce délai varie d'un antidépresseur à l'autre en fonction de la demi-vie du médicament, qui elle varie selon l'antidépresseur de 3 à 30 heures.

La fréquence de ces dosages, lors des traitements qui ne posent pas de problèmes particuliers, est faible. Les dosages sont habituellement réalisés lors de l'instauration du traitement, entre 10 et 15 jours de traitement, puis entre 4 à 6 semaines et enfin tous les 3 à 6 mois ou bien lors d'une rechute ou de l'apparition d'effets secondaires.

III.3.1- Conditions de prélèvement et conservation des échantillons

L'heure optimale pour effectuer le prélèvement de sang pour la détermination des concentrations au plateau est :

- entre 10 et 14 heures après la dernière prise, en cas de prise journalière unique, donc prélèvement le matin vers 8 à 10 heures pour une prise au coucher ;
- entre 4 à 6 heures après la dernière prise, en cas de dose journalière fractionnée, prélèvement avant la prise du matin ou de l'après-midi.

Les échantillons de sang en vue d'un dosage d'antidépresseur doivent être centrifugés dans les 4 heures après le prélèvement. Dans le sérum séparé des globules rouges les antidépresseurs sont stables 5 jours à température ambiante, 4 semaines à 4°C et un an congelés à -20°C.

III.3.2- Utilisation pratique des dosages

Lorsque la thérapeutique est efficace :

- on doit rechercher la dose minimale efficace pour limiter les effets indésirables,
- puis garder cette valeur en référence pour le patient.

Lorsqu'elle est inefficace :

- si la concentration est nulle ou très faible, on doit vérifier l'observance et, si elle est correcte, augmenter la posologie ;
- si la concentration est dans la zone thérapeutique, ce peut être un cas de résistance à la molécule et on doit changer d'antidépresseur (seulement après six semaines de traitement, temps nécessaire à l'obtention d'un effet thérapeutique) ;
- si la concentration est trop élevée, on doit diminuer la posologie.

On doit pratiquer un dosage :

- lors d'un test de prédiction de la posologie ;
- lors d'une inefficacité thérapeutique ou d'une rechute de la dépression sous traitement ;
- lors de l'apparition d'effets secondaires marqués pouvant suggérer un surdosage, par exemple, la survenue d'une crise comitiale ;
- lors du changement de la voie d'administration, par exemple, lorsque l'on passe de la forme injectable à la forme orale, de façon à obtenir les mêmes concentrations qui étaient actives par voie injectable ;
- lors de l'ajustement des traitements chez les sujets âgés ou chez les patients présentant une pathologie associée telle une insuffisance cardiaque, rénale ou hépatique ;
- lors de la survenue d'une maladie intercurrente, de la prescription de médicaments associés en cours de traitement, lorsque l'on suspecte un changement d'environnement susceptible d'interférer avec la biodisponibilité du médicament ou avec l'observance du traitement ;
- lors de prescription de doses très élevées par rapport aux posologies habituelles, afin de garantir la sécurité du patient ;
- enfin, après arrêt du traitement, si l'on observe une rechute on peut d'emblée prescrire la même posologie efficace, dans la mesure où les paramètres pharmacocinétiques sont identiques et puis ajuster la posologie de manière à obtenir les concentrations plasmatiques qui étaient auparavant efficaces.

III.4- Conséquences du dosage des antidépresseurs (7)

Le nombre d'antidépresseurs différents prescrits par malade a diminué car les posologies ajustées permettent une meilleure activité.

On observe une diminution des dépressions résistantes aux thérapeutiques, ce qui entraîne une diminution des prescriptions d'électrochocs, pratiqués lorsque les antidépresseurs sont inefficaces.

■ IV. DOSAGE DES NEUROLEPTIQUES (17, 25,55)

L'emploi des neuroleptiques a longtemps été empirique, tant en ce qui concerne les doses, la répartition des prises, que la conduite à tenir devant les effets secondaires. Les dosages sont complexes du fait du grand nombre de métabolites (la grande majorité étant actifs),

sauf dans le cas de l'halopéridol qui est peu métabolisé. Ces dosages montrent une grande variabilité interindividuelle des concentrations plasmatiques, surtout lors d'une administration par voie orale. Chez un même sujet on peut observer lors de traitements de longue durée une auto-induction enzymatique au niveau hépatique et intestinal qui explique une baisse des concentrations au cours du temps pour une même posologie.

Cependant les études pharmacocinétiques ont permis de mieux cerner les conditions d'utilisation de ces médicaments en précisant la demi-vie et les volumes de distribution de chacun d'entre eux.

Mais c'est toujours l'évaluation des résultats cliniques qui guide le traitement.

Bien que les effets endocriniens, neurovégétatifs, anticholinergiques et le pouvoir épiléptogène des neuroleptiques soient dose dépendant, le syndrome malin des neuroleptiques et les agranulocytoses observées avec la clozapine (Léponex®) peuvent se produire quelles que soient les posologies et les concentrations plasmatiques.

IV.1- Dosage des neuroleptiques administrés sous forme orale

De nombreuses études ont été effectuées pour étudier les corrélations qui existent entre les concentrations plasmatiques des neuroleptiques et leur efficacité clinique dans le traitement des schizophrénies.

Des fourchettes thérapeutiques ont été proposées :

- chlorpromazine (Largactil®)	: 30 à 100 ng/ml,
- clozapine (Léponex®)	: 300 à 600 ng/ml,
- flupentixol (Fluanxol®)	: 2 à 5 ng/ml,
- fluphénazine (Moditen®)	: 5 à 20 ng/ml,
- halopéridol (Haldol®)	: 5 à 25 ng/ml,
- loxapine (Loxapac®)	: 5 à 30 ng/ml,
- penfluridol (Semap®)	: 2 à 50 ng/ml,
- perphénazine (Trilifan®)	: 5 à 30 ng/ml,
- pipotiazine (Piportil®)	: 30 à 40 ng/ml,
- sulpiride (Dogmatil®)	: > 500 ng/ml,
- thioridazine (Melleril®)	: 250 à 1250 ng/ml,
- trifluopérazine (Terfluzine®)	: 4 à 40 ng/ml,
- zuclopenthixol (Clopixol®)	: 5 à 30 ng/ml.

Signalons que les conditions dans lesquelles les prélèvements ont été effectués sont malheureusement rarement précisées.

La perphénazine n'est actuellement commercialisée que sous forme à action prolongée (Trilifan® Retard) .

Les effets secondaires semblent corrélés avec des concentrations élevées (51).

IV.1.1 - Exemple de la clozapine

Dans le cas de traitement par la clozapine les dosages de la molécule-mère et de son principal métabolite déméthylé, la norclozapine, sont utiles pour ajuster les posologies élevées que nécessitent certains patients. Les prélèvements pour réaliser ces dosages peuvent être effectués en même temps que ceux utilisés pour la surveillance hématologique, obligatoire pour ce médicament qui entraîne une proportion non négligeable d'agranulocytoses.

La fourchette de concentration thérapeutique n'est pas encore bien précisée malgré une utilisation (discontinue, il est vrai, du fait des agranulocytoses entraînées par la clozapine) depuis plus de 25 ans. La concentration de 350 ng/ml de plasma pour la clozapine semble être la borne basse au-dessus de laquelle l'activité clinique est bonne (64 % de réponse) (45).

Les dosages de clozapine permettent donc d'augmenter la posologie jusqu'à cette concentration (50). HASEGAWA et coll. (21) obtiennent pour des concentrations plasmatiques de clozapine de l'ordre de 350 ng/ml, une concentration en norclozapine de l'ordre de 200 ng/ml.

Bien que l'on suppose que ce métabolite soit le responsable de la survenue de l'agranulocytose, l'auteur ne met pas en évidence de différence significative de concentration en norclozapine entre les patients atteints d'agranulocytose par rapport à ceux qui n'en présentent pas.

Le pouvoir épiléptogène commence à apparaître avec la clozapine pour des concentrations plasmatiques comprises dans la fourchette 600 à 1 000 ng/ml.

IV.1.2- Exemple de l'halopéridol

Lors de l'utilisation de l'halopéridol à de très fortes posologies pour le traitement d'épisodes psychotiques aigus, il n'y a pas de corrélation entre les effets cliniques, les effets secondaires et les concentrations plasmatiques d'halopéridol, qui elles sont corrélées à la posologie (47) (tableau X).

Tableau X : Représentation parallèle de l'évolution des posologies (posologies moyennes), des concentrations plasmatiques d'halopéridol (concentrations moyennes \pm écart type) et de la symptomatologie psychotique (score BPRS moyen \pm écart type)

Jours	J0	J7	J14	J21
Nombre de patients	15	13	12	11
Posologie moyenne d'halopéridol (mg/24h)	0	255	130	80
Concentration plasmatique d'halopéridol ng/ml	0	188 \pm 32	91 \pm 14	55 \pm 15
Cotation BPRS	67 \pm 3	49 \pm 3	45 \pm 2	41 \pm 3

BPRS = Brief Psychiatric Rating Scale, échelle globale d'appréciation d'un état psychiatrique, au cours des différentes phases du traitement des épisodes psychotiques aigus (47). Les concentrations plasmatiques d'halopéridol varient comme la dose administrée dans un rapport de 1 à 3 au cours des trois semaines de traitement.

Cette absence de corrélation entre les effets cliniques et les concentrations circulantes est probablement due au fait que lorsque les récepteurs sont saturés de neuroleptiques, grâce à des posologies élevées en début de traitement, des concentrations plasmatiques plus faibles suffisent à entretenir cette saturation. Ceci est à rapprocher de la constatation, chez certains patients, de l'activité de faibles doses de neuroleptiques retard (un cinquième de la posologie habituelle). Si ces traitements à faible dose, que l'on suppose inutiles, sont arrêtés les patients rechutent.

IV.2- Dosages des neuroleptiques administrés sous forme à action prolongée

C'est surtout pour la surveillance des traitements avec les neuroleptiques à action prolongée, utilisés par voie injectable, que les dosages peuvent être utiles.

La mise sur le marché des neuroleptiques à action prolongée au cours des années 60 permet de réduire la fréquence des rechutes au long cours, ainsi que la durée d'hospitalisation des psychotiques traités.

Ces médicaments sont obtenus par estérification de la molécule-mère du neuroleptique (généralement de structure phénothiazinique) par une molécule d'acide gras à longue chaîne carbonée, puis dissous dans des huiles végétales permettant l'utilisation par voie parentérale, intramusculaire. Citons à titre d'exemple

- En solution dans l'huile de sésame : Modécate® (décanoate), Moditen® Retard (éнанthate), Haldol Décanoas® (décanoate), Piportil® L4 (palmitate), Trilifan® Retard (éнанthate) .

- En solution dans l'huile de coco fractionnée (mélange de triglycérides d'acides gras saturés à courte chaîne principalement en C8, acide caprylique, et C 10 acide caprique) Clopixol® Action prolongée (décanoate), Fluanxol® LP (décanoate).

En général, les concentrations sont situées entre 0,5 et 10 ng/ml, ce qui montre bien que ce sont celles obtenues aux sites d'action qui sont actives et non pas les concentrations plasmatiques. On a pu observer des effets cliniques avec des concentrations situées en dessous du seuil de détection des techniques de dosages.

Ces formes retard par voie injectable constituent le traitement d'entretien après que l'on ait obtenu une sédation de l'épisode psychiatrique aigu avec les formes injectables classiques et/ou les formes orales à des posologies beaucoup plus élevées entraînant des concentrations plasmatiques plus élevées qu'avec les formes retard.

Pour illustrer ceci, on peut citer les concentrations obtenues avec la pipotiazine (Piportil®) dans différentes situations (IM = intramusculaire, Cmax = pic de concentration plasmatique)

• avec la forme conventionnelle :

+ 30 mg de pipotiazine, en prise unique, orale (18) :

- concentration maximale 1 heure après la prise : 41, 8 ± 19,9 ng/ml

- concentration 24 heures après la prise : 2,2 + 1,2 ng/ml

+ 30 mg de pipotiazine par jour en traitement chronique, oral (18)

- concentration 1,5 heures après la prise : $32 \pm 13,5$ ng/ml

• avec la forme retard :

+ 100 mg de palmitate de pipotiazine, en injection unique, IM (18) :

- pendant les trois premiers jours concentrations basses ou nulles,

- C_{\max} entre 7 et 9 j ours : $1,70 \pm 0,90$ ng/ml

+ 100 mg de palmitate de pipotiazine, tous les mois, en injection IM (4) :

- C_{\max} au 10^e jour : $2,40 \pm 0,55$ g/ml

- C résiduelle au 28^e jour : $0,39 \pm 0,18$ à $1,30 \pm 0,35$ ng/ml

La figure 3 montre les variations des concentrations plasmatiques obtenues au cours du temps lors d'un traitement comprenant des injections mensuelles de palmitate de pipotiazine.

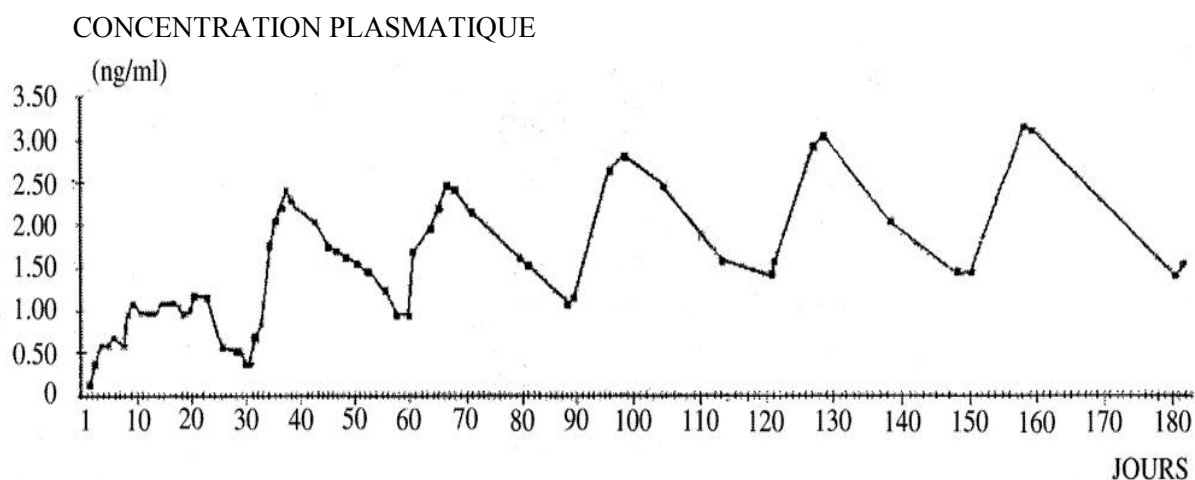


Figure 3 : Variations moyennes des concentrations plasmatiques de la pipotiazine après injection intramusculaire de palmitate de pipotiazine toutes les 4 semaines chez les schizophrènes (12).

Avec le décanoate d'halopéridol (Haldol Décanoas®) en injection IM mensuelle de 100 mg, la concentration plasmatique moyenne est de 5 ng/ml qui est à rapprocher des concentrations de 5 à 25 ng/ml obtenues avec la forme orale (29).

Il existe des cas extrêmes où l'on tombe rapidement en 3 à 8 jours à des concentrations très basses. Ces phénomènes se produisent chez des psychopathes gravement atteints, qui libèrent et métabolisent rapidement le médicament à partir du point d'injection, ce qui explique que les troubles psychotiques réapparaissent.

Dans le cas d'échappements à la thérapeutique par les neuroleptiques à action prolongée, les dosages des concentrations plasmatiques permettent de les expliquer par une consommation rapide du médicament au point d'injection. On peut alors rapprocher les injections et/ou augmenter les posologies. Les effets secondaires ne sont pas liés aux concentrations circulantes mais plus à une susceptibilité des patients.

Le tableau XI donne les paramètres pharmacocinétiques des neuroleptiques à action prolongée (55).

Tableau XI : Paramètres pharmacocinétiques des neuroleptiques à action prolongée (55)

Neuroleptiques à action prolongée	Demi-vie de libération Jours Administration Aiguë / Chronique	Temps d'apparition du pic plasmatique Jours	Fluctuation C_{max}/C_{min} Intervalle entre 2 injections	
Flupentixol (décanoate) Fluanxol®	3 - 8 / 17	7	2 à 3 2 à 4 semaines	
Fluphénazine (décanoate) Modécate®	7 - 10 / 12 - 16	0,5 à 2	7,5 à 100 3 à 4 semaines	
Fluphénazine (éнанthate) Moditen Retard®	3 - 4 / 7 - 8	2 à 3	5 à 10 2 à 3 semaines	
Halopéridol (décanoate) Haldol Décanoas©	3 - 9 / 18 - 30	Aiguë 1 à 2	Chronique 7	2 à 3 3 à 4 semaines
Perphénazine (éнанthate) Trilifan Retard®	? / 3 - 5	2 à 5	5,8 à 6 2 à 4 semaines	
Pipotiazine (palmitate) Pipartil L ₄ ®	Inconnue	5 à 11	2,5 à 5 3 à 4 semaines	
Zuclopentixol (décanoate) Clopixol®	19	4 à 7	2,8 à 3 4 semaines	

Le penfluridol (Semap®) utilisé par voie orale est administré une fois par semaine car sa demi-vie est de 130 heures, le pic plasmatique étant obtenu en 24 heures.

Les dosages des concentrations plasmatiques neuroleptiques sont donc réservés à des cas particuliers comme la prévention des effets secondaires dose dépendants et les situations où la pharmacocinétique peut être modifiée.

■ V. DOSAGE DES BENZODIAZÉPINES (39, 40,43)

Il n'y a pas de corrélation entre les concentrations circulantes des benzodiazépines et les effets cliniques ; les métabolites sont nombreux et souvent actifs. Les mesures des concentrations plasmatiques présentent donc peu d'intérêt, exception faite :

- lors de certains travaux de recherche afin d'apprécier l'imprégnation des sujets ;
- pour le diazépam et le clonazépam utilisés en tant qu'anticonvulsivants ;
- et bien sûr lors des intoxications. Mais même dans ce cas, il n'y a pas de corrélation entre les concentrations circulantes et les manifestations de toxicité.

Malgré cette absence de corrélation entre les concentrations et les effets cliniques, certains auteurs ont indiqué des relations entre les concentrations plasmatiques au plateau et les effets pharmacologiques et toxiques de quelques benzodiazépines (39, 40) :

- Avec le diazépam (Valium®) :
 - des concentrations de 150 à 250 ng/ml auront une activité anticonvulsivante, mais dans certains cas cette activité demandera des concentrations comprises entre 600 et 1 200 ng/ml;

- à partir de 300 ng/ml, on observera une somnolence, une sédation et une diminution des performances ;
- entre 300 et 500 ng/ml, le traitement sera actif sur l'anxiété ;
- à partir de 500 ng/ml, les effets secondaires d'ordre neurologique apparaîtront et seront très nets à partir de 800 ng/ml ;
- entre 900 et 1 000 ng/ml, on observera des effets secondaires de type vertige, ataxie, troubles de la mémoire et perturbation de l'activité motrice ;
- au-dessus de 2 500 ng/ml, les crises convulsives réapparaissent ou augmentent.

Il faut noter que la multiplicité des facteurs susceptibles de modifier la pharmacocinétique des benzodiazépines explique qu'une dose de 10 mg/j de diazépam peut entraîner des concentrations plasmatiques allant de 270 à 1 380 ng/ml (43).

- Avec le flunitrazépam (Rohypnol®, Narcozep®), entre 6 et 8 ng/ml on aura un effet inducteur du sommeil et à partir de 18 à 20 ng/ml apparaîtront des troubles de la mémoire.
- Avec le clonazépam (Rivotril®), les concentrations anticonvulsivantes seront comprises entre 20 et 70 ng/ml, les effets secondaires débiteront dès 60 ng/ml, seront maximum à partir de 100 ng/ml et au-dessus de 180 ng/ml les crises réapparaîtront.

■ VI DOSAGE DES ANTIÉPILEPTIQUES (1, 8, 20, 30, 32, 39, 60)

Les antiépileptiques ou anticonvulsivants sont utilisés pour prévenir les crises dans les divers types d'épilepsies. 80 % des patients sont stabilisés par une monothérapie.

- Une quinzaine de molécules sont disponibles, selon les principales indications, les plus utilisées sont :
 - dans les épilepsies généralisées primaires : le phénobarbital (Gardéнал®, Alepsal®) et l'acide valproïque (Dépakine®) ; et en cas d'échec : l'éthosuximide (Zarontin®) ou la lamotrigine (Lamictal®).
 - dans les épilepsies partielles : la carbamazépine (Tégréтол®), la diphénylhydantoïne (Di-Hydan®), la gabapentine (Neurontin®) et en cas d'échec de la monothérapie on peut adjoindre à une autre molécule : le topiramate (Epitomax®), le vigabatrin (Sabril®) et la tiagabine (Gabitril®).

Parmi les benzodiazépines : le clobazam (Urbanyl®) peut être utilisé en complément d'un autre traitement, le diazépam (Valium®) pour la prévention des crises fébriles, le clonazépam (Rivotril®) dans les formes sévères d'épilepsies myocloniques.

- Utilisation dans la prévention des rechutes de la psychose maniaco-dépressive.

Certains médicaments anticonvulsivants sont indiqués aussi pour prévenir les rechutes des psychoses maniaco-dépressives. En France seule la carbamazépine a obtenu l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) dans cette indication, l'acide valproïque est sur le point de l'obtenir, Le valpromide (Dépamide®) qui se métabolise en acide valproïque est proposé dans cette indication sans que de réels essais cliniques aient été effectués (68). Certains des anticonvulsivants mis sur marché en France au cours des dix dernières années ont été utilisés avec succès chez des patients atteints de psychose maniaco-dépressive résistante aux

traitements classiques, ce sont la gabapentine, la lamotrigine et le topiramate (19), mais leurs conditions d'emploi restent à valider.

Une série de monographies portant sur chacun des antiépileptiques à été publiée par BOUËR et coll. En 1998 (8).

VI.1- Concentrations thérapeutiques des antiépileptiques

La justification du dosage plasmatique des antiépileptiques repose sur l'assez bonne corrélation entre les concentrations plasmatiques et les concentrations cérébrales d'un antiépileptique et sur le fait que la plupart des patients sont stabilisés si ces concentrations plasmatiques sont comprises dans un certain intervalle déterminé statistiquement, dit intervalle thérapeutique.

Les concentrations plasmatiques associées à des effets indésirables sont souvent proches de cet intervalle thérapeutique, l'index thérapeutique est donc réduit pour la plupart des antiépileptiques (phénobarbital, primidone, phénytoïne, carbamazépine), il est élevé pour l'acide valproïque, l'éthosuximide et les benzodiazépines.

Les concentrations thérapeutiques sont indiquées dans le tableau XII.

Tableau XII : Concentrations thérapeutiques des médicaments antiépileptiques les plus fréquemment proposées (8, 20, 39, 60, 68)

MÉDICAMENT	Concentrations thérapeutiques
Phénobarbital Gardéal®	10-30 µg/ml
Phénytoïne Di-Hydan®	10-20 µg/ml
Carbamazépine Tégrétol®	6-12 µg/ml
Acide valproïque Dépakine®	50-100 µg/ml
Valpromide Dépamide®	*
Ethosuximide Zarontin®	40-100 µg/ml
Primidone Mysoline®	5-12 µg/ml
Diazépam Valium®	200-600 ng/ml

Clonazépam Rivotril®	20-70 ng/ml
Clobazam Urbanyl®	**
Lamotrigine Lamictal®	1-4 µg/ml
Topiramate Épitomax®	non disponible
Felbanate Taloxa®	50-100 µg/ml
Vigabatrin Sabril®	inutile
Tiagabine Gabitril®	non disponible
Gabapentine Neurontin®	2-20 µg/ml

* Le valpromide se transforme en partie en acide valproïque dont on peut doser les concentrations plasmatiques lors des traitements. On ne mesure pas les concentrations de valpromide car l'index thérapeutique est élevé.

** Le clobazam est dosé par certains laboratoires qui fournissent leur propre zone de concentrations thérapeutiques.

Il faut noter que le métabolisme de la phénytoïne est saturable, un accroissement minime de la posologie, alors que les concentrations plasmatiques se trouvent dans la zone de valeurs thérapeutiques, entraînera une augmentation brutale de ces concentrations.

Le métabolite 10-11 époxy de la carbamazépine, qui est actif, n'est pas toujours mesuré par les méthodes immunoenzymatiques.

La borne haute de la zone de concentrations thérapeutiques pour l'acide valproïque est proposée par certains auteurs à 150 ng/ml, concentration à partir de laquelle débutent les phénomènes de toxicité.

La primidone ou 2-désoxyphénobarbital se transforme en phénobarbital dans la proportion de 15 à 25 %, dont il est important de mesurer conjointement les concentrations lors des traitements .

Le diazépam, comme cela a été dit précédemment, a une action anticonvulsivante pour des concentrations plasmatiques comprises entre 150 et 250 ng/ml. Dans certains cas il est nécessaire d'obtenir des concentrations plus élevées de l'ordre de 600 à 1 200 ng/ml. Ces traitements ne devront pas être poursuivis sur de longues périodes car les effets secondaires gênants apparaissent.

Le phénobarbital et la phénytoïne sont de puissants inducteurs enzymatiques qui vont augmenter le métabolisme des médicaments avec lesquels ils ont été associés.

Lorsque la carbamazépine et l'acide valproïque sont utilisés en alternative au traitement par le lithium, dans le traitement préventif des rechutes de la psychose maniaco-dépressive, les concentrations plasmatiques thérapeutiques sont les mêmes que celles qui sont efficaces lors des traitements anticonvulsivants.

VI.2- Conduite à tenir pour doser les anticonvulsivants

Les prélèvements en vue de doser les concentrations plasmatiques d'antiépileptiques se feront le matin 12 heures après la dernière prise afin de doser les concentrations résiduelles.

Lors de la mise en route d'un traitement anticonvulsivant on prescrira une dose faible adaptée au poids du patient, on observera trois éventualités :

- les crises ont disparu et le traitement est bien supporté : le dosage des concentrations plasmatiques est inutile ;
- le traitement est bien supporté mais les crises persistent :
 - les concentrations plasmatiques sont inférieures à l'intervalle thérapeutique, on ajuste ces concentrations en augmentant la posologie de l'antiépileptique ;
 - les concentrations plasmatiques sont dans l'intervalle thérapeutique, on peut alors changer d'antiépileptique, et en cas d'échec des monothérapies on peut passer en bithérapie et exceptionnellement en polythérapie ;
- quel que soit son effet sur les crises le traitement est mal toléré :
 - les concentrations plasmatiques sont supérieures à l'intervalle thérapeutique, on baisse la posologie de l'antiépileptique ;

- les concentrations plasmatiques sont dans l'intervalle thérapeutique, il faut alors changer d'antiépileptique.

Lorsque le traitement a été adapté, si le clinicien est certain de la bonne observance du traitement et que le patient reste sans crises et sans effets indésirables, en particulier s'il est en monothérapie, les dosages sont inutiles.

Ce sont les éléments cliniques qui font contrôler la concentration plasmatique des médicaments antiépileptiques et modifier éventuellement le traitement. Si cette concentration est hors des limites statistiquement établies, mais sans que le patient en souffre, elle ne doit pas avoir d'influence sur la décision thérapeutique. Il est donc inutile de la mesurer (30).

■ VII. CONCLUSION

Dans la surveillance des traitements par les médicaments psychotropes, les dosages de concentrations circulantes :

- doivent être systématiquement réalisés, dans le cas des traitements par les sels de lithium (traité dans le cahier de formation n° 9) et par un certain nombre d'anticonvulsivants, car les effets cliniques ne sont pas apparents, ces traitements ayant une visée préventive ;
- sont très utiles dans le cas des traitements par les antidépresseurs, lorsque les traitements sont inefficaces ou entraînent des manifestations de toxicité ;
- sont parfois utiles dans le cas des traitements par neuroleptiques lors de l'apparition d'effets secondaires et lors de l'utilisation de neuroleptiques à action prolongée, lorsqu'ils semblent ne pas être actifs pendant toute la durée séparant deux injections ;
- ne sont jamais effectués en routine dans les traitements par les benzodiazépines (sauf pour le clonazépam utilisé en tant qu'anticonvulsivant).

Cependant lors d'expérimentations cliniques ou de travaux de recherche, on peut être amené à effectuer systématiquement des dosages des médicaments appartenant à toutes les classes de psychotropes.

Dans les indications précédemment citées, les dosages de médicaments psychotropes permettent donc d'avoir une posologie adaptée à chaque sujet avec des effets secondaires réduits, une meilleure observance du traitement et une médicalisation de maladies qui étaient auparavant considérées à la fois par les patients et les médecins comme en marge de la Médecine.

Ainsi, il en résulte une efficacité accrue des traitements et une meilleure qualité de vie des patients, donc une diminution importante des coûts financiers, familiaux et socioprofessionnels engendrés par les affections relevant de ces thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- BARRE J. Intérêt du dosage des antiépileptiques. Rev. Fr. Lab., 1990, n° 202, 75-83
- 2- BAUMANN P. Apports et limites des dosages plasmatiques d'antidépresseurs. Neuro-Psy, 1990, 5, 155-164
- 3- BAUMANN P., EAP C.B. Genetics, biochemistry, physiological functions and pharmacology of alphas-acid glycoprotein. Académie Suisse des Sciences Naturelles, 1989, 13, 32-34
- 4- BLANC M., GIRARD M., GRANIER F., ESCANDE M., COTONAT J. Pharmacocinétique de l'ester palmitique de pipotiazine; après administration intramusculaire chez des malades schizophrènes. Thérapie, 1986, 41, 27-30
- 5- BONIN B., VANDEL S., VANDEL B., SANDOZ M., BIZOUARD P., VOLMAT R. Antidépresseurs et concentrations plasmatiques. Ann. Psychiatry, 1991, 6, 193-200
- 6- BONIN B., VANDEL S., VANDEL B., SANDOZ M., JOANNE C., ALLERS G., VOLMAT R. Intérêt de l'étude des concentrations plasmatiques des antidépresseurs. Bilan de 10 années de pratique. Comptes Rendus du Congrès de Psychiatrie et de Neurologie, Luxembourg, 1984, 504-512
- 7- BONIN B., VANDEL S., VANDEL B., VOLMAT R. Bilan critique de l'intérêt et des limites des dosages plasmatiques des imipraminiques pour la surveillance thérapeutique. Thérapie, 1986, 41, 115-118
- 8- BOUËR R., SAIVIN S., HOUIN G. Adaptation de la posologie des antiépileptiques. Rev. Fr. Lab., 1998, n°304 : 63-68
- 9- BOURIN M., JOLLIET P. Adaptation de la posologie des antidépresseurs. Rev. Fr. Lab., 1998, n°304 : 59-62
- 10- BREYER-PFAFF U., GAERTNER H.J. Antidepressiva : Pharmakologie, therapeutischer Einsatz und Klinik der Depression. Wissenschaftl. Verlagsgesell, Stuttgart, 1987
- 11- CHARLIER G., ANSSEAU M., PINTO E., ANDRIEN F., PLOMTEUX G. Le contrôle thérapeutique des médicaments antidépresseurs. Ann. Biol. Clin., 1999, 57, 463-468
- 12- COTONAT J., GAYRAL L.F. Etude de la pharmacocinétique de l'ester palmitique de pipotiazine appliquée à la conduite du traitement neuroleptique au long cours des psychoses schizophréniques. Psychologie Médicale, 1989, 21, 113-121
- 13- COURNOYER G., DE MONTIGNY C., QUELLETTE J., LANGLOIS R., ÉLIE R., CAILLE G., LE MORVAN P. A comparative double-blind controlled study of trimipramine and amitriptyline in major depression : lack of correlation with 5-hydroxytryptamine reuptake blockade. J. Clin. Psychopharmacol., 1987, 7, 385-393
- 14- DALERY J. Antidépresseurs tricycliques. Principes et règles d'utilisation. Rev. Prat. (Paris), 1992, 42, 2220-2222
- 15- FRANCOIS T., BONIN B., VANDEL S., SECHTER D., BIZOUARD P. Intérêt des dosages plasmatiques des psychotropes. Rev. Prat. (Paris), 1994, 44, 2336-2340

- 16- GAERTNER H.J., GOLFINOPOULOS G., BREYER-PFAFF U. Response to maprotiline treatment in depressive patients. Relationship to urinary MHPG excretion and plasma drug level. *Pharmacopsychiatry*, 1982, 15, 170-174
- 17- GAILLOT J. Métabolisme, pharmacocinétique et surveillance des niveaux plasmatiques des neuroleptiques. In Séminaire de psychiatrie biologique, Hôpital Sainte-Anne. Cuhe H., Gérard A., Lôo H., Zarifian E. eds. Éditions Médicales Fournier Frères, Gennevilliers, 1983, tome 3, 115-139
- 18- GIRARD M., GRANIER F., SCHMITT L., COTONAT J., ESCANDE M., BLANC M. Premiers résultats d'une étude pharmacocinétique de la pipotiazine et de son ester palmitique (Piportil® L4) dans une population de schizophrènes. *Encéphale*, 1984, 10, 171176
- 19- GOLDEN R.N. Mania, psychoses and new treatments. American Psychiatric Association 152nd annual meeting, Washington (DC, USA), 1999
- 20- HAAS H.L., BOURGEOIS B.F.D. Anticonvulsivants (antiépileptiques). In *Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques*. Schorderet M. ed. Éditions Frison-Roche, Paris, 1998, 435-444
- 21- HASEGAWA M., COLA P.A., MELTZER H.Y. Plasma clozapine and desmethylclozapine levels in clozapine-induced agranulocytoses. *Neuropsychopharmacology*, 1994, 11, 45-47
- 22- HRDINA P.D., BAKISH D., SWENSON S., LAPIERRE Y.D. Prediction of steadystate plasma levels of doxepin and imipramine from single dose levels in depressed out patients. *J. Psychiatr. Neurosci.*, 1991, 16, 25-29
- 23- HRDINA P.D., LAPIERRE Y.D. Plasma levels of maprotiline and zimelidine and their relationship to clinical response in depressed patients. *Ther. Drug Monit.*, 1986, 8, 400-406
- 24- HRDINA P.D., LAPIERRE Y.D., HORN E., BAKISH D., BROWNE M. Antidepressant plasma levels and clinical response in depressed patients treated with oxaprotiline and doxepin. *Psychopharmacology*, 1988, 3, 205-214
- 25- JOLLIET P., BOURIN M. Adaptation de la posologie des neuroleptiques. *Rev. Fr. Lab.*, 1998, n° 304 : 85-89
- 26- KISHIMOTO A., HOLLISTER L.E. Nortriptyline kinetics in japanese and americans. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 1984, 4, 171-172
- 27- KLEIN H.E., MUELLER N. Trazodone in endogenous depressed patients : a negative report and a critical evaluation of the pertaining literature. *Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 1985, 9, 173-186
- 28- LEMOINE P., MOUTTE P., MATHIEU P., GREFFE J. Corrélation entre l'effet clinique et les taux sanguins d'un antidépresseur tricyclique : la nortriptyline. Résultats préliminaires. Congrès de psychiatrie et de neurologie de langue française. Angers, 1979, 873-884
- 29- LEVRON J.C., ROPERT R. Pharmacocinétique clinique du décanoate d'halopéridol. Comparaison avec celles des autres neuroleptiques d'action prolongée. *Encéphale*, 1987, 13, 83-87

- 30- LOISEAU P. Indications du contrôle des concentrations plasmatiques. in Les médicaments antiépileptiques chez l'enfant. Pons G., Dulac O., Ben-Ari Y. eds, Springer-Verlag, Paris, 1994
- 31- MAÎTRE L. Antidépresseurs. In Pharmacologie. Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Schorderet Med. Editions Frison-Roche, Paris, 1998, 373-387
- 32- MAUGUIÈRE F. Les épilepsies de l'enfant et de l'adulte. Cours à l'Université Lyon I, 1999
- 33- MELLSTRÖM B., BERTILSSON L., TRÄSKMAN L., ROLLINS D., ASBERG M., SJÖQVIST F. Intraindividual similarity in the metabolism of amitriptyline and chlorimipramine in depressed patients. *Pharmacology*, 1979, 19, 282-287
- 34- MONTGOMERY S., MCAULEY R., MONTGOMERY D.B. Relationship between mianserin plasma levels and antidepressant effect in a double-blind trial comparing a single night-time and divided daily dose regimens. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1978, 5 (suppl. 1), 71S-76S
- 35- MÜELLER-OERLINGHAUSEN B., FAEHNDRICH E. The relationship between pharmacokinetic data and the clinical response in patients treated with maprotiline or clomipramine by intravenous infusion. *Pharmacopsychiatry*, 1985, 18, 100-101
- 36- NOGUCHI T., SHIMODA K., TAKAHASHI S. Clinical significance of plasma levels of clomipramine, its hydroxylated and desmethylated metabolites : prediction of clinical outcome in mood disorders using discriminant analysis of therapeutic drug monitoring data. *J. Affect. Dis.*, 1993, 29, 267-279
- 37- NORMAN T.R., BURROWS G.D., MAGUIRE K.P., MCINTYRE I.M., SCOGGINS B.A. Maprotiline in affective illness. *J. Affect. Disord.*, 1983, 5, 147-154
- 38- ODOU P., VAIVA G., LUYCKX M., BRUNET C., DÎNE T., GRESSIER B., CAZIN M., CAZIN J.C. Neuroleptic monitoring relation between antipsychotic efficiency and radioreceptor assay of serum haloperidol. *Eur. J. Pharmacol.*, 1996, 50, 357-363
- 39- OLIVE G. Métabolisme, pharmacocinétique et surveillance des niveaux plasmatiques des psychotropes : benzodiazépines et anti-épileptiques. In Séminaire de psychiatrie biologique, Hôpital Sainte-Anne. Cuhe H., Gérard A., Lôo H., Zarifian E. eds. Éditions Médicales Fournier Frères, Gennevilliers, 1984, tome 4, 51-78
- 40- OLIVE G., REY E. Pharmacocinétique comparée des benzodiazépines. *Nouv. Presse Méd.*, 1982, 40, 2957-2964
- 41- ORSULAK P.J. Therapeutic monitoring of antidepressant drugs : current methodology and applications. *J. Clin. Psychiatry*, 1986, 47, 39-50
- 42- ORSULAK P.J. Therapeutic monitoring of antidepressant drugs : guidelines updated and applications. *Ther. Drug Monit.*, 1989, 11, 497-507
- 43- PERAULT M.C., VANDEL B. Le suivi thérapeutique des benzodiazépines. *Neuro Psy*, 1990, 5, 165-169
- 44- PERRY P.J., PFOHL B.M., HOLSTAD S.G. The relationship between antidepressant response and tricyclic antidepressant plasma concentrations. A retrospective analysis of the literature using logistic regression analysis. *Clin. Pharmacokinet.*, 1987, 13, 381-392

- 45- PERRY P.J., MILLER D.D., ARNDT S.V., CADORET R.J. Clozapine and norclozapine plasma concentrations and clinical response of treatment refractory schizophrenic patients. *Am. J. Psychiat.*, 1991, 148, 231-235
- 46- PERRY P.J., PFOHL B.M., HOLSTAD S.G. The relationship between antidepressant response and tricyclic antidepressant plasma concentrations. A retrospective analysis of the literature using logistic regression analysis. *Clin. Pharmacokinet.*, 1987, 13, 381-392
- 47- PETIT P., BLAYAC J.P., CASTELNAU D., BILLET J, PUECH R., POUGET R. Utilisation de très fortes posologies d'halopéridol dans le traitement des épisodes psychotiques aigus. Analyse clinique et pharmacocinétique à propos de quinze cas. *Encéphale*, 1987, 13, 127-130
- 48- PRESKORN S.H., DOREY R.C., JERKOVICH G.S. Therapeutic drug monitoring of tricyclic antidepressants. *Clin. Chem.*, 1988, 34, 822-828
- 49- PRESKORN S.H., FAST G.A. Therapeutic drug monitoring for antidepressants : efficacy, safety, and cost effectiveness. *J. Clin. Psychiatry*, 1991, 52 (suppl. 6), 22-23
- 50- PRÉTERRE P., JOUEN F. La mesure du taux plasmatique de la clozapine améliore-t-elle la qualité des soins apportés aux schizophrènes ? *Information psychiatrique*, 1994, n°10, 1-6
- 51- PUPESCHI G., AGENET C., BARGES-BERTOCCHIO M.H. Méthodologie clinique du suivi thérapeutique de l'halopéridol. *Psychologie Médicale*, 1991, 23, 1515-1519
- 52- REIS DE OLIVEIRA I., DO PRADO-LIMA P.A.S. L'apport des dosages plasmatiques des antidépresseurs tricycliques au traitement des dépressions. *Ann. Psychiatry*, 1989, 4, 253-259
- 53- ROUILLON F., SIOUFI A., SERRURIER D., MIZON J.P., PLAQUET R., RICHARD J.B., RICHE C., BOURIN M., KERGUERIS M.F., BESANCON G., VENISSE J.L., GOVIN Y., THOBIE Y., BERNBARD H., GUIBERT S., BOUQUET S. Étude des concentrations sanguines de maprotiline chez des patients déprimés. *Encéphale*, 1988, 14, 229-305
- 54- SCOGGINS B.A., MAGUIRE K.P., NORMAN T.R., BURROWS G.D. Measurement of tricyclic antidepressants. Part 2. Applications of methodology. *Clin. Chem.*, 1980, 26, 805-815
- 55- SENON J.L. Pharmacocinétique des neuroleptiques. *Encéphale*, 1990, 16, 99-109
- 56- SIMPSON G.M., PI E.H., GROSS L., BARON D., NOVEMBER M. Plasma levels and therapeutic response with trimipramine treatment of endogenous depression. *J. Clin. Psychiatry*, 1988, 49, 113-116
- 57- SPAR J.E. Plasma trazodone concentrations in elderly depressed inpatients : cardiac effects and short-term efficacy. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 1987, 7, 406-409
- 58- TASK FORCE. Tricyclic antidepressants - blood levels measurements and clinical outcome : an APA Task Force Report. Task Force on the use of laboratory tests in Psychiatry. *Am. J. Psychiatry*, 1985, 142, 155-162
- 59- TINGUELY D., KOEB L., PEREY M., BAUMAN P. Détermination de la fraction libre d'amitriptyline et de nortriptyline dans le plasma. *Psychologie Médicale*, 1980, 12, 2459-2464

- 60- THOMAS P., BROGLIN D. Dosage plasmatiques des antiépileptiques. Éditions Sanofi Winthrop, Gentilly, 1995
- 61- LIGES D.R.A. Therapeutic and toxic drug concentration. TIAFT Bul., 1996, 26, 34
- 62- VAILLEAU J.L., MARTIN L., VERRY A. Le dosage plasmatique des antidépresseurs tricycliques : conditions d'utilisation et réalisation pratique. Rev. Fr. Psychiatrie, 1988, 6, 15-20
- 63- VANDEL B., ALLERS G. Facteurs de variations pharmacocinétiques des antidépresseurs. Confrontations psychiatriques, 1989 : 165-173
- 64- VANDEL B., VANDEL S. Facteurs pharmacocinétiques et résistance aux traitements antidépresseurs. Encéphale, 1986, 12, 217-222
- 65- VANDEL B., VANDEL S., JOUNET J.M., ALLERS G., VOLMAT R. Clomipramine et desméthylclomipramine. Relation entre les concentrations plasmatiques et l'effet clinique. Encéphale, 1981, 7, 601-608
- 66- VANDEL S. Le dosage des antidépresseurs tricycliques. Surveillance et guide de la thérapeutique. Soins psychiatrie, 1988, n° 88, 27-34
- 67- VIALA A. Antidépresseurs : taux plasmatiques - valeurs et limites. Conséquences sur le schéma thérapeutique. Actualités Psychiatriques, 1982, n° 4 : 65-85
- 68- Dictionnaire VIDAL, OVP Editeur, Paris, 1999

INTÉRÊT ET APPLICATIONS DE LA PHARMACOGÉNÉTIQUE EN BIOLOGIE CLINIQUE

Ph. BOUCHER, J. GREFFE, J.J. VALLON †

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

I. INTRODUCTION

I.1- Historique

La Pharmacogénétique est née en 1932 ; elle a donc aujourd'hui 68 ans. À l'époque, un chercheur nommé Snyder décrivait une différence génétiquement déterminée dans le métabolisme de la phénylthiourée. Dans les années 50 trois découvertes viennent renforcer ce nouveau concept : la découverte d'un polymorphisme dans le métabolisme de la primaquine lié à une déficience en glucose-6-phosphate dehydrogénase (G6PD), le métabolisme multimodal de l'isoniazide (INH) et la présence dans le plasma d'une cholinestérase atypique à l'origine d'un effet prolongé du traitement par la succinylcholine. En 1957, Motulsky (36) montra que certains effets secondaires des médicaments pouvaient être expliqués par des variations enzymatiques génétiquement déterminées. Le terme de Pharmacogénétique est créé par Vogel en 1959 (48) avec pour définition « l'étude et le rôle de la génétique dans le métabolisme des médicaments ». En 1962 le premier article faisant la revue du sujet est publié par Kalow (24). Ce fut la découverte du polymorphisme d'un anti-hypertenseur : la débrisoquine, qui ouvrit le champ des investigations actuelles (32).

I.2- Qu'est ce que la Pharmacogénétique ?

La pharmacogénétique est la recherche et l'étude des mutations sur les enzymes qui transforment les médicaments. Une faible différence au niveau d'un gène peut influencer l'efficacité de l'enzyme, modifiant ainsi le traitement dans le sens de l'inefficacité ou au contraire de la toxicité. On comprend donc aisément que la possibilité d'avoir des variations importantes dans l'activité phénotypique de ces enzymes au sein de la population générale peut avoir des implications thérapeutiques majeures dans la façon de gérer les traitements et dans la façon d'améliorer la qualité de vie des patients.

Ces 10 dernières années ont été particulièrement importantes dans la connaissance des polymorphismes génétiques associés aux enzymes qui transforment les médicaments. Le nombre de molécules concernées par la pharmacogénétique a considérablement augmenté. L'identification des gènes codant pour les enzymes de transformation de ces médicaments, leur clonage et la mise en évidence des mutations à l'origine du polymorphisme génétique ont permis le développement et l'utilisation pour le clinicien de méthodes de diagnostic et d'identification rapides et fiables des différents allèles par biologie moléculaire (Tableau I). D'autres polymorphismes sont connus comme ayant un impact sur le métabolisme et la toxicologie de nombreuses classes de médicaments utilisées en thérapeutique, mais les mutations à l'origine de ces polymorphismes restent à identifier.

L'objectif de cette revue est de faire le point sur l'intérêt de l'étude des polymorphismes d'une part pour le clinicien dans le cadre de l'efficacité et de la prévention de la toxicité des

Tableau I : Les principaux polymorphismes enzymatiques identifiables par PCR

Enzymes	Substrats	Références
Dihydropyrimidine déhydrogénase (DPD)	5-Fluoro-uracile	42, 50
Thiopurine méthyltransférase (TPMT)	Azathioprine, 6-Mercaptopurine 6-Thioguanine	25, 38
N-Acétyltransférase 2 (NAT2)	Amonafide	2, 20, 43
Aldéhyde déhydrogénase (ALDH 1)	Cyclophosphamide Ifosfamide	18
CYP2C19	Antidépresseurs tricycliques, phénytoïne, warfarine, proguanile, téniposide	12
CYP2D6	Neuroleptiques, antidépresseurs tricycliques, antiarythmiques et β bloquants	5, 6

traitements médicamenteux et d'autre part pour le biologiste dans le cadre de l'identification des différents allèles.

■ II. ASPECTS PRATIQUES ; INTÉRÊTS

II.1- Connaître la susceptibilité individuelle d'un patient à une thérapeutique

Dans la plupart des cas les thérapeutiques sont utilisées sans que l'on connaisse la susceptibilité individuelle du patient vis à vis des drogues. La Pharmacogénétique permet, avant d'instaurer la thérapeutique, de déterminer le génotype du patient (métaboliseur lent, normal, rapide, ultrarapide). Les mutations peuvent être mises en évidence par des techniques de Biologie Moléculaire simples et peu coûteuses. Ces techniques sont réalisées à partir de sang total prélevé sur anticoagulant (EDTA en général). Le volume de sang prélevé nécessaire est en général de quelques ml, mais il peut-être très faible (quelques μ l). Le prélèvement se conserve et voyage facilement congelé ou non. L'ADN est ensuite extrait à partir des leucocytes et les techniques de biologie moléculaire sont réalisées à partir de cet ADN.

Pratiquement toutes les classes médicamenteuses et en particulier les médicaments toxiques ou à effets différés sont concernés par la Pharmacogénétique. Le génotype peut-être demandé chaque fois que la thérapeutique choisie est un substrat pour une enzyme qui présente un polymorphisme connu. En pratique, le génotype sera recommandé lorsque le médicament est toxique ou face à l'inefficacité d'un traitement. L'analyse du génotype peut-être combinée avec le suivi des concentrations plasmatiques du médicament. La combinaison des deux tests peut-être utilisée pour ajuster la posologie ou au contraire choisir une thérapeutique alternative qui ne soit pas un substrat pour une enzyme qui présente un polymorphisme génétique.

Dans certain cas il peut-être intéressant de connaître le polymorphisme génétique de plusieurs cytochromes simultanément. La plupart des médicaments psychotropes sont transformés par le CYP2D6 et le CYP2C19. Il est donc important dans ce cas de connaître le génotype métaboliseur des deux cytochromes. Parfois les activités pharmacologiques de la molécule mère et du métabolite sont différentes. C'est le cas par exemple de la clomipramine qui est transformé par le CYP2D6 et le CYP2C19. La clomipramine est un puissant inhibiteur de la recapture de la serotonine tandis que son métabolite déméthylé, la desméthylclomipramine est un puissant inhibiteur de la recapture de la noradrenaline. L'activité antidépressive peut donc être différente selon si la clomipramine est plus ou moins rapidement déméthylée.

II.2- Maîtriser les coûts

Enfin, indépendamment de l'apport de ce type de tests en termes de confort vis à vis du malade et du médecin, son coût est bien inférieur au surcoût considérable engendré par une hospitalisation prolongée en service de médecine ou dans un service d'urgence après échec thérapeutique ou intoxication.

La iatrogénie est l'ensemble des manifestations cliniques indésirables consécutives soit à des prises de médicaments soit à une conduite thérapeutique inadaptée. Plus de 30 % de ces manifestations sont directement liées à des imprudences thérapeutiques (Pr P.Queneau, rapport de l'Association pédagogique nationale pour l'enseignement de la thérapeutique (APNET) remis en avril 1998 au secrétaire d'État chargé de la Santé). Le surcoût humain de la iatrogénie correspond à des chiffres compris entre 5 et 10 % des journées d'hospitalisation et à 25 % des admissions dans les services d'urgence, soit plusieurs dizaines de milliard de francs (Bulletin de l'Académie nationale de médecine, 1992). Or un pourcentage élevé de ces cas serait « théoriquement » évitable et l'on estime qu'une économie de 15 milliards de francs pourrait être ainsi réalisée. La pharmacogénétique va dans le sens de la maîtrise des dépenses de santé en limitant, par la connaissance du génotype métaboliseur, les échecs thérapeutiques et les intoxications médicamenteuses. Elle s'intègre parfaitement dans la démarche de qualité de soin visant à réduire les surcoûts liés à l'hospitalisation prolongée par iatrogénie.

■ III. POLYMORPHISMES GÉNÉTIQUES DES CYTOCHROMES P450

III.1- Données générales

Les médicaments et les xénobiotiques sont éliminés après conversion métabolique en deux étapes mettant en jeu deux types de réactions : les réactions de phase I et les réactions de phase II. Une trentaine de familles de cytochromes P450 sont responsables de la première étape d'oxydation (phase I). Ces cytochromes sont présents chez tous les organismes vivants : les animaux, les plantes, les levures et les bactéries. Les cytochromes sont des mono-oxygénases c'est-à-dire des systèmes multienzymatiques capables de transporter des électrons jusqu'à l'oxygène moléculaire. Un des ces deux oxygènes activés sera fixé sur le composé à oxyder. Le composé ainsi oxydé sera plus soluble dans l'eau et donc plus

facilement éliminé par les urines. Parallèlement aux réactions de phase I, les réactions de phase II sont capables d'ajouter un groupement sulfate ou glucuronate à un médicament, toujours dans le but de faciliter son élimination de l'organisme. Ce sont en général les enzymes de phase I qui agissent en premier. Parfois le métabolisme commence par une conjugaison. Dans certain cas on observe une compétition entre les deux voies.

La plupart des médicaments utilisés en clinique sont métabolisés par des cytochromes P450 (Tableau II). Parmi les 30 familles de cytochromes actuellement décrites comme impliquées dans le métabolisme de ligands endogènes ou de xénobiotiques, 3 à 4 seulement sont quantitativement et qualitativement plus importantes : les CYP3A, CYP2C, CYP2D, et le CYP2E1. Le CYP3A4 métabolise à lui seul environ 60 % des médicaments actuellement sur le marché.

Un polymorphisme génétique a été décrit sur le CYP2C, le CYP2D et le CYP2E 1, mais également récemment sur le CYP3A (40).

Tableau II : Les principaux P450 et leurs substrats

Cytochromes P450	Substrats
CYP1A1	Polycycliques aromatiques
CYP1A2	Afltoxine, caféine
CYP2A6	Nitrosamines
CYP2B6	Cyclophosphamides, ifosfamides
CYP2C8	Acide tienilique, tolbutamide
CYP2C9	Warfarine, tamoxifen, ibuprofen; dicoumarol, acide acétylsalicylique, indométhacine, acide tienilique, tétrahydrocannabinol, tolbutamide
CYP2C19	Citalopram, cycloguanyl, diazéparn, hexobarbital, imipramine, oméprazol, prapanol, phénytoïne, warfarine, proguanile, téniposide, clomipramine
CYP2D6	Halopéridol, imipramine, minalcipram, IMAO, mianserine, venlafaxine, maprotiline, fluoxétine, désipramine, nortriptyline, citalopram, clozapine, clomipramine, amitriptyline, thioridazine, triflupéridol, paroxétine, perphénazine, fluphénazine, rispéridone, thioridazine. Antihypertenseurs, antiarythmiques, propranolol, timolol, bufuralol, métoprolol. Codéine, debrisoquine, spartéine, ébastine, encainide, flécainide, phenformine, propafénone
CYP2E1	éthanol, chlorzoxazone, benzène, nitrozamines, paracétamol, halothane, enflurane
CYP3A3	Aflatoxine
CYP3A4	Alfentanil, amiodarone, cocaïne, corticoïdes, digitoxine, dihydroergotamine, diltiazem, érythromycine, éthylmorphine, lovastatine, caféine, diltiazem, paclitaxel, cyclosporine, taxol, tamoxifene, Cycophosphamides, ifosfamides, téniposide, étoiposide, toremifene, vinblastine, vincristine, navelbine, doxorubicine, vindésine, FK506, macrolides, carbamazépine, docetaxel

III.2- Le Cytochrome P4502D6

L'exemple de variabilité pharmacocénétique le mieux connu actuellement est celui du cytochrome P4502D6 (CYP2D6) (15). Ce polymorphisme a été mis en évidence par l'utilisation de la débrisoquine. En réponse à des doses usuelles, certains patients répondaient par des chutes de tension importantes alors que pour d'autres patients le médicament restait inefficace (22). D'un point de vue pharmacocinétique, dans la population européenne, le métabolisme de la débrisoquine est de type multimodal (22) avec des métaboliseurs normaux (EM : extensive metabolizer), des métaboliseurs lents (PM : poor metabolizer) qui présentent des concentrations plasmatiques élevées, une demi-vie d'élimination longue et des effets secondaires importants et des métaboliseurs Ultra-Rapides (UEM : ultra extensive metabolizer) (1) qui présentent des concentrations plasmatiques très basses et une inefficacité de la thérapeutique.

Le CYP2D6 fait partie des 4 familles de CYP les plus importantes quantitativement et tous les médicaments métabolisés par ce cytochrome vont présenter une distribution pharmacocinétique identique à celle de la débrisoquine.

Le CYP2D6 transforme au moins 30 agents thérapeutiques avec essentiellement : les neuroleptiques et les antidépresseurs tricycliques et d'une façon plus modeste les antiarythmiques et les bêtabloquants (Tableau II).

Le CYP2D6 est localisé au niveau du chromosome 22. Il est hautement polymorphique chez l'Homme. Environ 50 mutations ont été décrites. Leurs transmissions s'effectuent sur un mode autosomique récessif. Ces mutations peuvent être de deux types : 1/ le CYP2D6 peut être entièrement délété ou contenir 1 ou 2 différences, chacune affectant particulièrement l'efficacité de l'enzyme, 2/ le CYP2D6 peut être dupliqué, il existe alors au moins deux copies du gène. La répartition des différents génotypes est variable suivant l'ethnie. Elle varie de 1 % à 51 % suivant l'allèle muté. Dans la population européenne et nord américaine la répartition moyenne est de 11 % de métaboliseurs lents, 2 à 3 % de métaboliseurs rapides et environ 85 à 90 % de métaboliseurs normaux.

Les quatre principales mutations sont les mutations A, B, D et L. Les mutations A, B et D sont associées à un phénotype métaboliseur lent. La mutation D correspond à une délétion totale du gène et une absence totale d'activité. Les mutations A et B sont des mutations ponctuelles au niveau des exons 5 et 3 respectivement. La mutation L correspond à une duplication du gène et à un phénotype rapide. Ces quatre mutations peuvent être mises en évidence par PCR-Polymerase Chain Reaction (3, 5, 6, 11). Elles représentent à elles seules 95-98 % des mutations sur le CYP2D6.

Les phénotypes d'antidépresseurs tricycliques PM ou UEM sont tous les deux préjudiciables pour les patients. Pour des doses usuelles, les patients PM ont des taux sériques multipliés par 4 à 5 (31) augmentant du même coup les effets secondaires : bouche sèche, hypotension, sédation, cardiotoxicité. Etant donné l'aspect en « cloche » de la courbe effet/dose de ces médicaments, cette augmentation des effets secondaires est également associée à une inefficacité thérapeutique. Chez ces patients il est donc nécessaire de diminuer la dose. De la même façon, l'administration d'antidépresseurs tricycliques chez des patients UEM, se traduit par une inefficacité thérapeutique. Cette fois, des doses plus importantes sont nécessaires. Cette variabilité entre individus complique la démarche thérapeutique du clinicien qui souhaite évidemment un maximum d'efficacité dans un mini-

mun de temps. Ceci est particulièrement vrai pour les médicaments de la classe des neuroleptiques ou des antidépresseurs pour lesquelles l'efficacité thérapeutique en temps normal se manifeste toujours après un délai de plusieurs jours. La connaissance du génotype métaboliseur va donc permettre d'adapter la posologie au patient dans le but d'obtenir une efficacité thérapeutique optimum. Cette connaissance du génotype métaboliseur n'est pas négligeable dans la mesure où au moins 1 patient sur 10 va être exposé à un risque d'échec thérapeutique simplement à cause d'une posologie mal adaptée.

III.3- Le Cytochrome P4502C19

Un polymorphisme génétique dans le métabolisme de l'agent anticonvulsivant la méphénytoïne, mais également dans le métabolisme de psychotropes ou de molécules classiquement utilisées en chimiothérapie anticancéreuse comme le Téniposide a été attribué à la présence d'allèles mutés sur le gène qui code pour le CYP2C19 (12). Ce polymorphisme est très variable suivant les ethnies avec 2-5 % de métaboliseurs lents dans la population caucasienne et 13-23 % dans la population orientale (12). Deux allèles sauvages (CYP2C19*1A et CYP2C19*1B) et 7 allèles mutés responsables du phénotype métaboliseur lent, ont été isolés. Le principal allèle (CYP2C19*2A) est une substitution G/A dans l'exon 5 (8). Cet allèle représente 75-80 % des allèles CYP2C19*2 dans la population Caucasienne et 100 % dans la population Orientale. Un variant, l'allèle CYP2C19*2B, est plus rarement rencontré et uniquement dans la population Caucasienne. Un deuxième allèle muté (CYP2C19*3) est présent à raison de 13-31 % de la population Orientale et 1,5 % chez les Caucasiens (8). Il présente une mutation G636A dans l'exon 4 avec formation d'un codon stop. Les deux allèles CYP2C19*2 et CYP2C19*3 représentent à eux seuls la majorité (80-85 %) des mutations rencontrées sur le gène dans les populations Caucasiennes et Asiatiques. Ils sont facilement identifiables par PCR (12). Les autres allèles sont plus faiblement représentés. Les mutations peuvent être localisées soit dans le codon initial (CYP2C19*4) soit dans différents exons sur le gène (CYP2C19*5 à *8). Ces mutations modifient le plus souvent la structure tertiaire de la protéine. L'activité catalytique méphénytoïne hydroxylase est alors considérablement diminuée (activité résiduelle < 2 %) par rapport à l'activité catalytique de la protéine sauvage.

III.4- Le Cytochrome P4503A4

La famille CYP3A est la famille de cytochromes probablement la plus abondante au niveau du tissu hépatique humain. Dans certains modèles *in vitro* elle représente plus de 60 % des cytochromes P450 (17). Elle est constituée essentiellement de deux isoformes CYP3A4 et CYP3A5 chez l'adulte et d'une isoforme supplémentaire CYP3A7 dans le foie fœtal. CYP3A5 est présent chez seulement 10-20 % de la population sans que l'on connaisse d'explication évidente à ce polymorphisme apparent (29). Le CYP3A4, seul ou le plus souvent en association avec un ou plusieurs autres cytochromes, transforme de nombreux médicaments essentiels en thérapeutique. Cette biotransformation conduit le plus souvent à la formation de dérivés ayant un pouvoir cytotoxique plus faible et donc à une diminution du pouvoir thérapeutique anticancéreux de la molécule mère.

Le premier polymorphisme génétique sur le CYP3A4 a été démontré récemment chez l'homme (40). Des foies humains ont été phénotypés pour l'activité midazolam hydroxy-

lase, un marqueur de l'activité du CYP3A4. Les niveaux d'activité ont montré des variations très importantes suggérant la présence d'un polymorphisme génétique. Les techniques de PCR et le séquençage du gène ont permis l'identification et la localisation de la mutation. Cette mutation perturbe la liaison des facteurs de transcription avec la région promotrice de gène modifiant ainsi son expression et sa régulation.

Cette première mise en évidence d'un polymorphisme génétique sur le CYP3A4 est très importante. Beaucoup de molécules utilisées en thérapeutique sont métabolisées par ce cytochrome et la connaissance des différents allèles mutés aura un impact clinique et biologique majeur sur la façon de gérer les traitements. Reste à déterminer la présence d'autres mutations éventuelles et surtout leurs fréquences dans les différentes populations.

■ IV. POLYMORPHISME GÉNÉTIQUE DE LA DIHYDROPYRIMIDINE DÉHYDROGÉNASE

La dihydropyrimidine déhydrogénase (DPD, EC 1.3.1.2.) est l'enzyme limitante du métabolisme des bases pyrimidiques, elle est également responsable du métabolisme d'un médicament largement utilisé en oncologie : le 5 Fluorouracile (SFU). Le SFU est un antimétabolite introduit en oncologie il y a environ 30 ans. Il est utilisé dans le traitement de nombreux types de cancers, particulièrement dans le cancer du poumon, du sein, de l'ovaire, du côlon et des voies digestives. Le rôle important de la DPD dans la chimiothérapie avec le SFU a été démontré chez des patients présentant une déficience pratiquement totale de l'enzyme (9). Des doses usuelles de SFU exposent ces patients à une toxicité hématologique (neutropénie, thrombopénie) et neurologique très importante, parfois mortelle. La première observation décrivant le rôle de la DPD dans le métabolisme du SFU a été publiée en 1985 (46). Ce travail a montré que la sévère toxicité de la SFU résultait d'un ralentissement dans le métabolisme du médicament avec une demi-vie du SFU jusqu'à 10 fois plus longue chez les patients déficients en DPD par rapport aux témoins (9, 14). Diasio et al. (9) ont mesuré l'activité DPD dans les cellules mononucléées d'un patient qui avait auparavant développé une neurotoxicité sévère après un traitement par le SFU. Les auteurs rapportent une complète déficience de l'activité DPD chez ce patient. Par ailleurs, certains autres membres de la famille présentaient une déficience partielle suggérant pour la première fois une transmission sur un mode autosomique récessif de cette déficience (9). Les patients classés comme profondément déficitaires étaient homozygotes, les autres étaient hétérozygotes (19).

La plupart des patients qui présentent une toxicité vis à vis du SFU sont hétérozygotes, l'activité DPD, bien qu'inférieure aux valeurs habituellement rencontrées, est détectable. La répartition des patients dans la population caucasienne réalisée à partir de la mesure de l'activité catalytique de l'enzyme dans les cellules mononucléées, montre que les hétérozygotes représentent environ 3 %-4 % de la population.

Les bases moléculaires du déficit en DPD ont été identifiées et ont montré la présence d'une substitution G/A en position 2894. Cette substitution peut être rapidement mise en évidence par PCR avant d'initier la thérapeutique par le SFU (50). Une autre mutation à l'origine d'un phénotype métaboliseur lent a été récemment isolée (13). Elle est constituée

d'une mutation au niveau du codon 974 (acide aspartique/valine). La présence de cette mutation peut-être détectée par PCR (42). Son incidence dans la population est probablement très faible (42).

■ V. POLYMORPHISME GÉNÉTIQUE DE LA THIOPURINE S MÉTHYLTRANSFÉRASE

La thiopurine S-méthyltransférase (TPMT., EC 2.1.1.67) est une enzyme cytosolique qui catalyse la S-méthylation de composés aromatiques et hétérocycliques soufrés tels que la 6-mercaptopurine, la thiopurine et l'azathioprine. La TPMT présente un polymorphisme génétique très marqué (51). 89 % de la population caucasienne a une activité catalytique normale, environ 11 % une activité catalytique diminuée et 0,3 % une TPMT totale inactive (33). Les populations orientales font cependant exception à la règle avec une distribution de type gaussien et absence de sous groupe à activité TPMT faible ou nul (23). Cette enzyme et son polymorphisme ont fait l'objet d'une activité de recherche intense étant donné le rôle critique joué par la TPMT dans le métabolisme de la mercaptopurine, de l'azathioprine et de la 6-thioguanine et le risque potentiellement accru de toxicité médullaire et d'aplasie chez les patients à activité TPMT déficiente traités par des doses usuelles de ces médicaments (28, 33, 44).

L'azathioprine (AZA) est un immunosuppresseur majeur qui, *in vivo*, est métabolisé en 6-mercaptopurine (39). La 6-mercaptopurine (MP) et la 6-thioguanine (TG) sont utilisées dans le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) chez l'enfant et chez l'adulte. Ces prodrogues n'ont pas d'activités intrinsèques elles nécessitent d'être métabolisées en thiopurines nucléotides (TGN) pour exercer leur activité cytotoxique. Le principal mécanisme à l'origine de leur toxicité médullaire est habituellement considéré comme l'incorporation des 6-thioguanines ribo et désoxyribo-nucléotides dans l'ARN et l'ADN génomique (10, 47). Les études cliniques chez le transplanté traité par l'AZA (44) ou chez des enfants qui présentaient une leucémie aiguë lymphoblastique et qui étaient traités par la MP ont montré une corrélation inverse entre l'activité TPMT érythrocytaire et la concentration érythrocytaire en TGN avec, pour l'activité TPMT la plus faible, la toxicité la plus élevée, probablement parce que plus de MP ou d'AZA est disponible pour être transformé en TGN (28; 30, 33).

L'AZA, la MP et la TG sont métabolisées par trois voies métaboliques concurrentes. La voie principale de transformation est celle de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT, EC 2.4.2.8) qui métabolise AZA, MP et TG en 6-thioguanines nucléotides cytotoxiques. AZA, MP et TG sont également transformées par la TPMT en produits inactifs. La xanthine oxydase (XO, EC 1.1.3.22) transforme également AZA, MP et TG en produits inactifs (41, 52). La xanthine oxydase étant absente du tissu hématopoïétique humain (52), si la TPMT est peu active ou inactive, l'essentiel de la transformation sera effectué par la voie de l'HGPRT augmentant ainsi le risque de toxicité médullaire et d'aplasie.

La TPMT a été clonée (21, 27). Le gène qui code pour l'enzyme active est constitué de 10 exons et a été localisé sur le chromosome 6p22.3 (45). Huit variants alléliques ont été iden-

tifiés (38, 45). Tous sont associés à une diminution de l'activité catalytique de la TPMT et à un risque accru de myélotoxicité. Parmi ces huit variants alléliques, quatre (TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B, TPMT*3C) représentent à eux seuls 75-80 % des mutations (25, 37). Le premier allèle décrit, l'allèle TPMT*2 est présent chez environ 0.3 % de la population caucasienne. Ce type de mutation, malgré sa fréquence faible, est le plus souvent associé à des aplasies gravissimes le plus souvent mortelles (25, 33). Les autres allèles, plus fréquents (environ 11 % de la population caucasienne), sont associés à des aplasies plus modérées mais qui nécessitent le plus souvent l'arrêt du traitement. Ces allèles sont en fait une combinaison de deux mutations en position 460 (G460-A) et 719 (A719-G). La présence de l'une, l'autre, ou les deux mutations est donc à l'origine de 3 allèles distincts TPMT*3A (G460/A et A719/G), TPMT*3B (G460/A), TPMT*3C (A719/G) (40, 42). Des techniques de PCR ont été mises au point pour la recherche et la mise en évidence, en routine, à partir d'une simple prise de sang, des mutations TPMT*2 et TPMT*3 au niveau de l'ADN génomique (26). Enfin quatre derniers variants (TPMT*3D, TPMT*4, TPMT*5, TPMT*6) ont été isolés récemment par séquençage (37, 38).

Etant donné l'impact clinique de la présence de ces allèles même à l'état hétérozygote il est nécessaire en pratique de rechercher le maximum de mutations. La mesure de l'activité catalytique de la TPMT dans les globules rouges était jusqu'à présent la méthode standard de détermination de l'activité phénotypique de la TPMT. Cette technique encore largement utilisée présente l'avantage de tester directement l'activité phénotypique de l'enzyme. Par contre ce test étant effectué à partir des globules rouges il n'est pas envisageable chez des patients polytransfusés comme c'est souvent le cas en transplantation. La PCR présente l'avantage de connaître le génotype métaboliseur du patient avant d'initier la thérapeutique. Cependant tous les allèles ne sont pas pour l'instant directement et rapidement identifiables par PCR. Il est difficile de faire un choix, dans le cas particulier de la TPMT, entre la détermination phénotypique à partir des globules rouges ou génotypique à partir d'ADN génomique. La réponse la mieux adaptée sera probablement l'approche génotypique avec la connaissance des différentes mutations et le développement des techniques de biologie moléculaire adaptées à l'identification rapide des mutations génomiques.

■ VI. POLYMORPHISME GÉNÉTIQUE DE LA N-ACÉTYLTRANSFÉRASE 2

La N-Acétyletransférase 2 (NAT 2) fait partie des premiers polymorphismes génétiques décrits dans le domaine des enzymes transformant les médicaments (49). Ce polymorphisme est responsable d'une variabilité importante dans les processus d'acétylation de nombreux médicaments dont le plus étudié est l'agent antituberculeux Isoniazide (INH). Un déficit en NAT 2 est trouvé dans plus de 50 % de la population caucasienne. Les individus sont alors classés en métaboliseurs lents, rapides ou occasionnellement métaboliseurs intermédiaires. Arbitrairement les individus étaient alors classés en homozygote pour le type sauvage, homozygote pour le type muté et hétérozygotes. Ce polymorphisme est également responsable de la toxicité de molécules utilisées en chimiothérapie anticancéreuse. L'amonafide est un agent intercalant utilisé dans les cancers du sein et de la pros-

tate qui forme un dérivé actif, le N-acétyl amonafide, dans une réaction catalysée par NAT2. Les récents progrès effectués dans la recherche de mutations sur le gène NAT2 ont permis l'isolement de 8 allèles distincts dans les populations caucasienne et asiatique. Ils peuvent tous être responsable d'un polymorphisme pour le métabolisme de l'amonafide. Deux d'entre eux sont responsables du phénotype métaboliseur rapide, les autres sont responsables du phénotype métaboliseur lent (16). Ces allèles résultent de la combinaison de 6 mutations ponctuelles en positions 282, 341, 481, 590, 803, 857. Tous ces allèles peuvent être diagnostiqués par PCR (2, 20, 43).

■ VII. CONCLUSIONS

Le principal problème en Pharmacologie est de prévoir la réponse au traitement en terme de toxicité et d'efficacité thérapeutique. Ce problème est particulièrement aigu lorsque les agents utilisés sont à fenêtre thérapeutique étroite ou particulièrement toxiques. L'optimisation de la prescription par la pharmacogénétique présente donc un intérêt majeur en terme de pharmacovigilance et de toxicologie préventive. La pharmacogénétique concerne aujourd'hui de plus en plus de molécules et de plus en plus de mutations sont isolées. Le but étant, in fine, de connaître la carte génétique du patient avant d'initier la thérapeutique autorisant ainsi une sorte de prescription personnalisée. Ce but n'est pas si éloigné de nous pour deux raisons : (1) le nombre d'enzymes concernés reste limité. On estime en effet qu'environ 6 à 8 cytochromes métabolisent à eux seuls pratiquement la totalité des médicaments ; (2) la diversité et la multiplicité des mutations n'est pas non plus, et loin de là, un problème insoluble. Aujourd'hui l'automatisation des techniques et l'arrivée de nouvelles technologies comme celle des « Biopuces » va autoriser le diagnostic rapide et de masse de plusieurs mutations en même temps. De telles technologies sont déjà disponibles sur le marché et directement appliquées à la pharmacogénétique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- BERTILSON L., ASBERG-WISTEDT A., GUSTAFSON L.L., NORDIN C. Extremely rapid hydroxylation of debrisoquine : a case report with implication for treatment with nortriptyline and other tricyclic antidepressants. *Ther. Drug. Monit.*, 1985, 7 : 478-80
- 2- BLUM M., DEMIERRE A., GRANT D.M., HEIM M., MEYER U.A. Molecular mechanism of slow acetylor of drugs and carcinogens in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88 : 5237-41
- 3- BROLY F., GAEDIGK A., HEIM M., EICHELBAUM M, MORIKE K., and Meyer U. Debrisoquine/sparteine hydroxylation genotype and phénotype : analysis of common mutations and allèles of CYP2D6 in a European population. *DNA Cell. Biol.*, 1991, 10, 545-558
- 4- Bulletin de l'Académie nationale de médecine, 1992, 176, n° 4, 511-529, séance du 14 avril 1992, et n° 5, 651-667, séance du 19 mai 1992

- 5- DAHL M.L., JOHANSSON I., PALMERTZ M.P., INGELMAN-SUNDBERG M., and SJÖQVIST F. Analysis of the CYP2D6 gene in relation to debrisoquine and desipramine hydroxylation in a Swedish population. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1992, 51, 12-17
- 6- DALY A.K., ARMSTRONG M., MONKMAN S.C., IDLE M.E., IDLE J.R. The genetic and metabolic criteria for the assignment of debrisoquine hydroxylation (cytochrome P450 2D6) phenotypes. *Pharmacogenetics*, 1991, 1, 33-41
- 7- DE MORAIS S.M.F., WILKINSON G.R., BLAISDELL J., MEYER U.A., NAKAMURA K., GOLDSTEIN J.A. Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in Japanese. *Mol. Pharmacol.*, 1994, 46 : 594-98
- 8- DE MORAIS S.M.F., WILKINSON G.R., BLAISDELL J., NAKAMURA K., MEYER U.A., GOLDSTEIN J.A. The major defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in human. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269 : 15419-22
- 9- DIASIO R.B., BEAVERS T.L., CARPENTER J.T. Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase: biochemical basis for familial pyrimidemia and severe 5-fluorouracil-induced toxicity. *J. Clin. Invest.*, 1988, 81 : 47-51
- 10- ELION G.B. The purine path to chemotherapy. *Science*, 1989, 244 : 41-6
- 11- GAEDIGK A., BLUM M., GAEDIGK R., EICHELBAUM M., MEYER U.A. Deletion of the entire cytochrome P450 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 1991, 48, 943-950
- 12- GOLDSTEIN J.A., DE MORAIS S.M.F. Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics*. 1994, 4 : 285-99
- 13- GONZALEZ F.J., FERNANDEZ-SALGUERO P. Diagnostic analysis, clinical importance and molecular basis of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Trends Pharmacol. Sci.* 1995, 16 : 325-27
- 14- GONZALEZ F.J., IDLE J.R. Pharmacogenetic phenotyping and genotyping. Present status and future potential. *Clin Pharmacokinet.*, 1994, 26 : 59-70
- 15- GONZALEZ F.J., MEYER U.A. Molecular genetics of the debrisoquine sparteine polymorphism. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 1991, 50 : 233-38
- 16- GRANT D.M. Molecular genetics of N-acetyltransferase. *Pharmacogenetics*, 1993, 3 : 45-50
- 17- GUENGERICH F.P. Mechanism-based inactivation of human liver cytochrome P4503A4 by gestadene. *Chem. Res. Toxicol.*, 1990, 3 : 363-71
- 18- HADIDI A.F.A., COULTER C.E.A., IDLE J.R. Phenotypically deficient urinary elimination of carboxyphosphamide after cyclophosphamide administration to cancer patients. *Cancer Res.*, 1988, 48 : 5167-71
- 19- HARRIS B.E., CARPENTER J.T., DIASIO R.N. Severe 5-fluorouracil toxicity secondary to dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency : a potentially more common pharmacogenetic syndrome. *Cancer*, 1991, 68 : 489-501
- 20- HICKMAN D., SIM E. N-Acetyltransferase polymorphism : comparison of phenotype and genotype in humans. *Biochem. Pharmacol.*, 1991, 42 : 1007-14

- 21- HONCHEL R., AKSOY I.A., SZUMLANSKI C.L., WOOD T.C., OTTERNESS D.M., WIEBEN E.D., WEINSHILBOUM R.M. Human thiopurine methyltransferase molecular cloning and expression of T84 colon carcinoma cell cDNA. *Molec. Pharmacol.*, 1993, 43 : 878-87
- 22- IDLE J.R., SMITH R.L. Polymorphisms of oxidation at carbon centers of drugs and their clinical significance. *Drug. Metab. Rev.*, 1979, 9 : 301-17
- 23- JANG I.J., SHIN S.G., LEE K.H., YIM D.S., LEE M.S., KOO H.H. Erythrocyte thiopurine methyltransferase activity in a Korean population. *Br J. Pharmacol.*, 1996, 42 : 63 8-41
- 24- KALOW W. *Pharmacogenetics. Hereditary and the response to drugs*, 1962, Philadelphia, Saunders
- 25- KRYNETSKI E.Y., SCHUENTZ J.D., GALPIN A.J., PUI C., RELLING M.V., EVANS W.E. A single point mutation leading to loss of catalytic activity in Human thiopurine S-methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1995, 92 : 949-53
- 26- KRYNETSKI E.Y., TAI H.L., YATES C.R., FESSING M.Y., LOENNECHEN T., SCHUETZ J.D., RELLING M.V., EVANS W.E. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase : clinical importance and molecular mechanisms. *Pharmacogenetics*, 1996, 6 : 279-90
- 27- LEE D., SZUMLANSKI C., HOUTMAN J., HONCHEL R., RODAS K., OVERHAUSER J., WIEBEN E.D., WEINSHILBOUM R.M. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics : cloning of human liver cDNA and presence of a processed pseudogene on human chromosome 18q21.1. *Drug. Metab. Dispos.*, 1995, 23 : 398-405
- 28- LENNARD L., LILLEYMAN J.S., VAN LOON J.A., WEINSHILBOUM R.M. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 1990, 336 : 225
- 29- LI A.P., KAMINSKI D.L., RASMUSSEN A. Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4. *Toxicology*, 1995, 104 : 1-8
- 30- LILLEYMAN J. S ., LENNARD L. Mercaptopurine metabolism and risk of relapse in childhood lymphoblastic leukemia. *Lancet*, 1994, 343 : 1188-90
- 31- LINDER M.W, PROUGH R.A., VALIDES R. Pharmacogenetics : a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency. *Clin. Chem.*, 1997, 43, 254-266
- 32- MAHGOUB A., DRING L.G., IDLE J.R., LANCASTER R., SMITH R.L. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet*, 1977, 2 : 584
- 33- McLEOD H.L., LIN J.S., SCOTT E.P., PUI C.H., EVANS W.E. Thiopurine methyltransferase activity in American white subjects and black subjects. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 1994, 55 : 15-20
- 34- McLEOD H.L., MILLER D.R., EVANS W.E. Azathioprine-induced myelosuppression in thiopurine methyltransferase deficient heart transplant recipient. *Lancet*, 1993, 341 : 1151
- 35- McLEOD H.L., RELLING M.V., LIU Q., PUI C.H., EVANS W.E. Polymorphic thiopurine methyltransferase in erythrocytes is indicative of activity in leukemic blasts from children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1995, 85 : 1897-1902

- 36- MOTULSKY A.G. Drug reaction, enzymes and biochemical genetics. *JAMA*, 1957, 165 : 835-7
- 37- OTTERNESS D., SZUMLANSKI C., LENNARD L., KLEMETSDAL B., AARBAKKE J., OK PARK-HAH J., IVEN H., SCHMIEGELOW K., BRANUM E., O'BRIEN J., WEINSHILBOUM R. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics : Gene sequence polymorphisms. *Clin Pharmacol. Ther.*, 1997, 62 : 60-73
- 38- OTTERNESS D.M., SZUMLANSKI C.L., WOOD T.C., WEINSHILBOUM R.M. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics : Kindred with a terminal exon splice junction mutation that results in loss of activity. *J. Clin. Invest.*, 1998, 101 : 1036-44
- 39- PATERSON A.R.P., TIDD D.M. 6-Thiopurines. In : Antineoplastic and immunosuppressive agents II. Ac. Sartorelli and DG. Johns, editors, Springer Verlag New York Inc., New York, 1975 : 384-403
- 40- PLANT N.J., MOORE D., GIBSON G.G. Identification of genetic polymorphisms in the promoter of the human cytochrome P450 3A4 gene. International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations. 20-24 July 1998, Montpellier, France, P135
- 41- REMY C.N. Metabolism of thiopyrimidines and thiopurines : S-methylation and S-adenosylmethionine transmethylase and catabolism in mammalian tissue. *J.Biol. Chem.*, 1963, 238 : 1078-84
- 42- RIDGE S.A., BROWN O., McMURROUGH J., FERNANDEZ-SALGUERO P., EVANS W.E., GONZALEZ F.J., McLEOD H.L. Mutations at codon 974 of the DPYP gene are a rare event. *Br. J. Cancer.*, 1997, 75 : 178-9
- 43- ROTHMAN N., HAVES R.B., BI W., CAPORASO N., BROLY F. Correlation between N-acetyltransferase activity and NAT2 genotype in chinese males. *Pharmacogenetics*, 1993, 3 : 250-55
- 44- SEBBAG L., BOUCHER Ph., BOISSONNAT P., DAVELU P., CHAMPSAUR G., NINET J., DUREAU G., OBADIA J.F., VALLON J.J., DELAYE J. Thiopurine S-methyltransferase gene polymorphism is predictive of azathioprine induced myelosuppression in heart transplant recipients. *Transplantation*, 1999, impress.
- 45- SZUMLANSKI C., OTTERNESS D., HER C., LEE D., BRANDRIFF B., KELSELL D., SPURR N., LENNARD L., WIEBEN E., WEINSHILBOUM R.M. Thiopurine methyl transferase pharmacogenetics : human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol.*, 1996, 15 : 17-30
- 46- TUCHMAN M., STOECKELER J.S., KIANG D.T., O'DEA R.F., RAMNARAIN M.L. Familial pyrimidine and pyrimidinemia associated with severe fluorouracil toxicity. *New Engl. J. Med.*, 1985, 313 : 245-49
- 47- URIBE-LUNA S., QUINTANA-HAU J.D., MALDONADO-RODRIGUEZ R., ESPINOSA-LARA M., BEATTIE K.L., FARQUHAR D., NELSON A.J. Mutagenic consequences of the incorporation of 6-Thioguanine into DNA. *Biochem. Pharmacol.*, 1997, 54 : 419-24
- 48- VOGEL F. Modern problems of human genetics. *Ergeb Inn. Med. Kinderheilek*, 1959, 12 : 52-125

- 49- WEBERT W:W. The acetylor gene and drug response. Oxford University Press, New York, 1987
- 50- WEI X., McLEOD H.L., McMURROUGH J., GONZALEZ F.J., FERNANDEZ-SALGUERO P. Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-Fluorouracil Toxicity. J. Clin. Invest., 1996, 98 : 610-15
- 51- WEINSHILBOUM R.M., SLADEK S.L. Mercaptopurine Pharmacogenetics Monogenic inheritance of erythrocyte thiopurinu methyltransferase activity. A m. J. Hum. Genet., 1980, 32 : 651-62
- 52- WOODSON L.C., WEISHILBOUM R.M. Human kidney thiopurine methyltransferase : purification and biochemical properties. Biochem. Pharmacol., 1983, 32: 819-26

I. INTRODUCTION

La vancomycine est un antibiotique naturel appartenant à la famille des glycopeptides qui comprend des médicaments d'usage exclusivement hospitalier.

Compte tenu de son excellente activité sur les staphylocoques méticillino résistants, l'utilisation de la vancomycine s'est largement développée ces dernières années.

I.1- Structure (11, 14)

La vancomycine est un glycopeptide tricyclique, dichloré, comportant une chaîne heptapeptidique. Son poids moléculaire est élevé, environ 1 450 Da. Elle a été isolée en 1956 d'une culture d'un actinomyces, *Amycolatopsis orientalis* (ex. : *Streptomyces orientalis*) et a été commercialisée en France en 1960.

Le principe actif est le chlorhydrate de vancomycine, produit stable et hydrosoluble ; la solution a un pH 3.5, ce qui exclut l'administration intramusculaire. Cette solution est peu stable, en particulier lorsque le pH devient alcalin et que la température s'élève : le chlorhydrate de vancomycine se transforme alors en un produit de dégradation sans activité antibactérienne appelé CDP-1 (vancomycin crystallin dégradation product).

I.2- Métabolisme et pharmacocinétique

I.2.1- Absorption

La vancomycine n'est pratiquement pas absorbée après administration orale (< 5 %), si la muqueuse digestive est saine. Cette voie sera néanmoins intéressante pour le traitement local des entérocolites pseudomembraneuses à *Clostridium difficile*, secondaires à l'emploi d'antibiotiques à large spectre, et à la décontamination microbienne du tube digestif. Certains auteurs ont rapporté une résorption systémique notable après administration orale chez des patients présentant une colite pseudomembraneuse ou une insuffisance rénale sévère

La vancomycine est administrée uniquement en perfusion IV.

I.2.2- Distribution (1,8,13)

La vancomycine répond à un modèle pharmacocinétique à trois compartiments. Après administration IV, il est possible de discerner une phase de distribution rapide ($t_{1/2} = 7$ à 15 minutes) et deux phases de distribution lente, une phase avec une demi-vie de 30 minutes à 1 heure puis une phase avec une demi-vie de 6 à 8 heures. Il existe néanmoins de grandes variations interindividuelles de la demi-vie notamment chez les enfants et les nouveau-nés.

La demi-vie moyenne de la vancomycine est de 6 heures.

La pharmacocinétique de la vancomycine est linéaire aux doses habituellement utilisées en thérapeutique et la concentration maximale obtenue est fonction de la dose et de la durée d'administration.

La liaison aux protéines plasmatiques est diversement appréciée selon les études. Elle varie entre 30 et 60 %. Elle s'effectue surtout sur l'albumine.

La vancomycine se distribue rapidement dans les tissus mous ce qui permet d'obtenir des concentrations élevées dans le foie, les reins, la rate, le poumon et le tissu cardiaque. Des concentrations thérapeutiques supérieures à 2,5 mg/l sont retrouvées dans les liquides pleuraux, péricardiques, péritonéaux, d'ascites et synoviaux.

Chez les patients présentant des fonctions rénales normales, les concentrations sont plus élevées après administration répétée suggérant qu'une accumulation de vancomycine puisse survenir dans ces liquides au cours d'un traitement prolongé.

Par contre, la diffusion est mauvaise dans les tissus graisseux, le tissu osseux et dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) lorsque les méninges sont saines. La pénétration de la vancomycine dans le LCR est augmentée lorsque les méninges sont inflammatoires mais sujette à de grandes variations individuelles (elle varie de 7 à 20 % si les méninges sont inflammatoires) (14). L'administration par voie intra-rachidienne peut être utilisée lorsque le pronostic vital est en jeu.

Enfin, la diffusion est pratiquement négligeable dans la bile et l'humeur aqueuse (1).

Des concentrations thérapeutiques ont été obtenues dans le liquide de dialyse péritonéale, après injection intraveineuse, mais avec une très grande variabilité interindividuelle pouvant s'expliquer par l'état infectieux et la susceptibilité individuelle.

L2.3- Métabolisme - Élimination (8)

La vancomycine est très faiblement métabolisée au niveau du foie (< 5 % de la dose injectée). L'élimination biliaire se fait en faible quantité et représente environ 50 % du taux sérique. L'élimination de la vancomycine est urinaire sous forme inchangée par filtration glomérulaire pour 80 à 90 % de la dose injectée. Les concentrations dans les urines sont élevées, de 100 à 500 mg/l. Lors de l'administration par voie orale, la concentration dans les selles peut atteindre 4 000 mg/l.

I.2.4- Variations interindividuelles

a) Âge (8)

La clairance de la vancomycine varie de manière importante avec l'âge. Les enfants éliminent la vancomycine deux fois plus vite que les adultes. Chez le sujet âgé, on constate une diminution de la clairance de la vancomycine et de la demi-vie d'élimination.

b) L'obèse (1,8)

Chez l'obèse, la demi-vie d'élimination est plus rapide. La posologie doit être adaptée, notamment en diminuant l'intervalle entre les prises.

c) L'insuffisant rénal (8)

La vancomycine étant éliminée essentiellement par voie rénale, la clairance diminue et la demi-vie s'allonge en cas d'insuffisance rénale. Au stade d'insuffisance rénale terminale, la demi-vie d'élimination peut atteindre des valeurs de 8-9 jours. Les dosages sériques journaliers sont nécessaires pour permettre l'adaptation posologique, soit en diminuant la dose, soit en espaçant les prises.

I.3- Propriétés pharmacologiques et indications



I.3.1- Mécanisme d'action

La vancomycine agit sur les bactéries à Gram positif selon trois mécanismes :

- Blocage de la polymérisation du peptidoglycane de la paroi bactérienne par inhibition de transglycosylation,
- Altération de la perméabilité de la membrane cytoplasmique,
- Inhibition de la synthèse de l'ARN bactérien.

Ce mode d'action à cibles multiples contribue au faible nombre de résistance bactérienne actuelle.

La vancomycine a une action bactéricide, temps dépendant, sauf sur *Staphylococcus haemolyticus*, les Streptocoques et les Entérocoques où l'activité est bactériostatique. Elle n'agit que sur des germes en phase de croissance et est sensible à l'effet inoculum qui peut causer des difficultés pour le traitement des infections à germes présentant des concentrations minimales inhibitrices (CMI) limites.

I.3.2- Activité bactérienne

Le spectre bactérien de la vancomycine est étroit, limité aux germes à Gram positif aérobie et anaérobie.

Les valeurs critiques actuellement retenues par le comité de l'antibiogramme sont pour la vancomycine :

CMI < ou = 4 mg/l : SENSIBLE

CMI de 4 à 16 mg/l : INTERMÉDIAIRE

CMI > 16 mg/l : RÉSISTANT.

Certaines bactéries à Gram positif sont résistantes, en particulier *Nocardia*, *Leuconostoc*, certains *Lactobacilles*, certains Entérocoques (*Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*) et toutes les bactéries à Gram négatif : la vancomycine ne peut pas traverser la paroi externe des bactéries à Gram négatif.

Depuis le début de l'utilisation de la vancomycine, il y a plus de 20 ans, et jusqu'à ces dernières années, le problème de l'étude de son activité en routine était facilité par l'absence de toute souche résistante à la vancomycine. La situation s'est modifiée depuis 1988. Des résistances acquises à la vancomycine apparaissent actuellement et concernent les entérocoques (*Enterococcus faecium* essentiellement, puis *Enterococcus faecalis*) et même de manière exceptionnelle *Staphylococcus aureus* (2, 10). Elles sont de trois types

- Van A = Résistance plasmidique de haut niveau à la vancomycine et la téïcoplanine ;

- Van B = Résistance chromosomique modérée ou de haut niveau à la vancomycine (teïcoplanine sensible) ;
- Van C = Résistance chromosomique de bas niveau à la vancomycine (teïcoplanine sensible).

Le taux de portage asymptomatique d'entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) à partir de coprocultures systématiques a été estimé actuellement à 17 % au sein de la population générale (5). L'origine de cette contamination est alimentaire, l'isolement d'ERV chez les animaux d'élevage et dans les viandes crues est un argument fort en faveur de cette hypothèse (12).

Malgré la faible incidence actuelle dans les hôpitaux français des entérocoques résistants à la vancomycine, une évolution vers une diffusion épidémique des souches constitue un risque majeur de santé publique.

1.3.3- Indications

Réservée à l'usage hospitalier, la vancomycine est le traitement de choix des infections sévères à germes à Gram positif multi-résistants (Staphylocoques et en particulier *Staphylococcus aureus* méti R, Entérocoques et Streptocoques bêtalactamines résistants, Corynébactéries) et le traitement des infections à germes sensibles chez les patients allergiques aux bêtalactamines.

L'utilisation en antibioprophylaxie est possible comme recours en cas d'allergie aux bêtalactamines lorsqu'une action sur les staphylocoques est nécessaire.

La vancomycine est un traitement possible par voie orale, bien que non conseillé actuellement en première intention, de la colite pseudomembraneuse à *Clostridium difficile*.

1.3.4- Contre-indications

Elles concernent essentiellement les sujets aux antécédents d'allergie aux glycopeptides.

1.3.5- Effets secondaires

Les effets secondaires constatés actuellement, néphrotoxicité et ototoxicité, sont nettement moins importants que ceux constatés au début de la commercialisation de la molécule, alors dus aux impuretés contenues dans le produit. L'amélioration des techniques de préparation (HPLC) a permis d'obtenir un degré de pureté de plus de 95 % (14).

a) Une néphrotoxicité

Rapportés dans de nombreux travaux depuis la première utilisation, il semble de plus en plus que les problèmes de néphrotoxicité étaient liés au degré de purification de la molécule.

La néphrotoxicité n'apparaît que chez 5 à 10 % des patients (8) et est toujours réversible. Elle peut être prévenue en surveillant la créatinine et en réalisant une adaptation posologique.

Par contre, l'association de la vancomycine à un aminoside entraîne une augmentation significative de la néphrotoxicité.

b) Une ototoxicité

L'ototoxicité est rare en l'absence de facteurs de risques surajoutés (< 2 %) (1, 8).

c) Autres effets secondaires

Un certain nombre de réactions locales ont été décrites, en rapport avec le pH acide de la solution de vancomycine (douleur au point d'injection, nécrose, veinite, thrombophlébite). Des réactions de type anaphylactoïde (« syndrome de l'homme rouge ») ont été signalées, ainsi que de rares réactions générales (urticaire, fièvres, frisson, éruption cutanée hypotension). Ces manifestations sont devenues plus rares depuis l'utilisation de produits purifiés. Elles sont également constatées lors de l'injection trop rapide de la vancomycine.

I.4- Modalités d'utilisation

La vancomycine s'administre soit en perfusion intraveineuse intermittente, perfusion lente de 45 à 60 minutes, soit de plus en plus, en perfusion continue. La perfusion continue est intéressante compte tenu du fait que la vancomycine est un antibiotique temps dépendant son action bactéricide est plus importante si on augmente le temps de contact de la vancomycine avec les germes sur le site infecté. La posologie dans ce cas est de 30 à 60 mg/ kg/j, après une dose de charge de 15 mg/kg sur une durée de 1 à 2 heures. La dose journalière chez l'adulte à fonction rénale normale est de 2 g par jour, soit 30 mg/kg/j .

L'administration par voie orale est utilisée pour le traitement des colites pseudo-membraneuses à *Clostridium difficile*, bien que le traitement actuel préconise en première intervention l'utilisation du métronidazole, pour éviter de favoriser la sélection de bactéries résistant à la vancomycine.

■ II. CONDITIONS DE PRÉLÈVEMENT ET DE CONSERVATION DES SPÉCIMENS

II.1- Prélèvement

Le prélèvement est réalisé sur tube sec standard. Une faible quantité de sang suffit pour le dosage. La décantation du sérum doit être rapide pour éviter la dégradation de la vancomycine en CDP-1 (vancomycin crystallin degradation product). Le tube peut être conservé quelques heures à 4°C (< 4 h), au-delà, il doit être congelé. Le dosage peut être également réalisé sur plasma EDTA ou hépariné en fonction des techniques. A noter une instabilité de la vancomycine signalée en présence d'héparine (6).

Le dosage peut être réalisé sur d'autres liquides biologiques et sans précaution de prélèvement, si ce n'est celle de la bonne conservation (à 4°C quelques heures, sinon congelé).

II.2- Horaires des prélèvements

Les prélèvements doivent être réalisés une fois l'état d'équilibre atteint, soit au 2^e jour du traitement.

La détermination de la **concentration résiduelle** se fait classiquement à partir d'un prélèvement sanguin réalisé dans la demi-heure qui précède l'administration de la dose suivante.

La détermination du pic se fait habituellement en réalisant un prélèvement sanguin entre **45 et 60 minutes** après la fin de la perfusion. Les heures de prélèvement doivent être scrupuleusement respectées compte tenu de l'importante phase de distribution de la vancomycine : les concentrations diminuent de moitié au cours de la première heure après la fin de la perfusion. Les modalités en cas de perfusion continue sont envisagées plus loin.

■ III. PRINCIPE DES MÉTHODES D'ANALYSES ACTUELLEMENT UTILISÉES

Le dosage de la vancomycine est actuellement facilement et rapidement réalisable. Le problème se complique par l'état préanalytique qui peut être mal maîtrisé (heure de prélèvement par rapport à l'injection, durée d'acheminement du prélèvement au laboratoire) .

Trois types de méthode de dosage sont utilisables pour l'évaluation de la vancomycine.

III.1- Méthodes microbiologiques

Elles reposent sur la comparaison des effets inhibiteurs produits par l'échantillon sur une souche sensible.

III.1.1- Méthode turbidimétrique de référence (1)

Une gamme de vancomycine et l'échantillon à doser sont mis en culture en conditions déterminées et en milieu de culture défini (DIF 60243) avec une souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. Après 3 h 30 de culture à 37°C, la croissance bactérienne est stoppée par passage au bain-marie à 80°C pendant 4 minutes, puis le trouble est mesuré au spectrophotomètre à 530 nm.

III.1.2- Dosage microbiologique rapide en milieu liquide

Une variante a été réalisée en utilisant un entérocoque et une cinétique de croissance mesurée en néphélométrie laser. L'avantage de la méthode microbiologique est de ne pas nécessiter d'appareillage perfectionné. L'inconvénient actuel est un délai de réponse assez long, une sensibilité faible et une possible interférence par la présence d'autres molécules antibiotiques.

III.2- Méthodes HPLC (7, 9)

La technique HPLC a été utilisée au départ par l'industrie pharmaceutique pour purifier la molécule. C'est une excellente technique de dosage. Son avantage est sa grande sensibilité et spécificité. Son inconvénient est le coût de l'équipement et en « temps personnel ».

III.3- Méthodes immunologiques

III.3.1- Méthodes en phase homogène

Ces méthodes immunologiques reposent sur le principe d'une compétition entre le médicament à doser et ce même médicament marqué soit par une enzyme, soit par la fluorescéine, ou fixé sur une particule de latex.

a) Technique avec marqueurs fluorescents

- **FPIA Fluorescence Polarisation Immuno Assay** : techniques adaptées sur TDX-Abbott, Integra-Roche, Réactifs Thera-Track - Éclair - Biotrol.

Il s'agit d'une technique immunologique par liaison compétitive en un temps. La vancomycine présente dans l'échantillon et la vancomycine marquée à la fluorescéine entrent en compétition pour les sites de liaison de molécules d'anticorps. La quantité de vancomycine 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 de vancomycine à doser.

Les avantages sont les suivants : technique robuste, sensible, spécifique ; absence de prétraitement de l'échantillon, excellente reproductibilité, méthode automatisée, rapidité de mise en œuvre, volume d'échantillon faible.

Les inconvénients principaux sont : coût des dosages, interférence chez les insuffisants rénaux du CDP-1, produit de dégradation inactif de la vancomycine pour la technique sur le TDX.

b) Technique avec marqueurs enzymatiques

- **Technique en phase homogène EMIT : Enzym Multiplied Immunoassay Technic.** techniques : Dade-Behring adaptées sur de nombreux automates, ACA-Dade., Immuno-1 Bayer.

Il s'agit d'une technique immunoenzymatique en phase homogène. Le dosage repose sur la compétition entre la vancomycine de l'échantillon et de la vancomycine marquée 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 de la vancomycine varie dans le même sens que l'activité enzymatique et est mesurée par le biais de la variation d'absorbance à 340 nm lors de la réaction NAD/ NADH.

Les *avantages* sont : grande sensibilité, automatisation possible, bonne reproductibilité.

L'*inconvénient* principal est l'instabilité de la courbe de calibration.

c) Technique turbidimétrique par inhibition de particules de latex, sur Dimension RLX

- **Technique PETINIA : Particule Enhanced Turbidimetric Inhibition Immuno Assay**

La vancomycine présente dans l'échantillon entre en compétition avec des particules de latex sur lesquelles sont fixées de la vancomycine et en présence d'un anticorps monoclonal spécifique de la vancomycine, entraînant une diminution de la vitesse d'agrégation,

celle-ci est ainsi inversement proportionnelle à la concentration de vancomycine dans l'échantillon.

III.3.2- Technique en phase hétérogène

Il s'agit actuellement de techniques encore peu utilisées.

a) Techniques avec lecture en fluorescence

• Technique adaptée sur analyseur OPUS (Dade-Behring).

Elle est basée sur le principe de la compétition. Le support de la réaction est un film mince ; celui-ci contient un nombre limité d'anticorps monoclonaux murins, vis à vis desquels la vancomycine contenue dans l'échantillon entre en compétition avec son homologue marqué. Les molécules liées sont séparées de celles libérées par une couche faisant écran aux rayons lumineux. La fluorescence résiduelle obtenue est inversement proportionnelle à la concentration de l'échantillon en vancomycine.

b) Technique avec lecture en Chimiluminescence

• Technique adaptée sur ACS (BAYER)

La vancomycine de l'échantillon entre en compétition avec de la vancomycine marquée à l'ester d'acridinium pour une quantité limitée d'anticorps monoclonal anti-vancomycine couplé de manière covalente à des particules magnétiques.

Les techniques immunologiques FPIA et EMIT sont actuellement celles qui ont la faveur des laboratoires pour leur praticabilité et leur sensibilité.

■ IV. TECHNIQUE DE RÉFÉRENCE

La technique de référence est une technique microbiologique (cf ci-dessus). Elle pourrait être remplacée par la technique HPLC compte tenu de sa haute spécificité et sensibilité.

■ V. CRITÈRES DE CHOIX D'UNE TECHNIQUE

V.1- Popularité des techniques

Les techniques les plus prisées sont la technique en polarisation de fluorescence sur TDX et les techniques EMIT.

Résultats du contrôle de qualité national (sérum M3 et M4)

	Code	Nombre	Popularité %	Sérum M3 Taux bas cv%	Sérum M4 Taux haut cv%
Techniques ÉMIT	VB-VQ	60	23.1	12.7	9.2
Technique en polarisation de fluorescence	IJ	165	63.5	8.8	8.6
Technique immunoenzymologique Lecture fluorescence	DA	22	8.4	8.2	9.3
Chimiluminescence	SI	8	3.1	-	-
Autre	XX	5	1.9	-	-
TOTAL		260	100	9.4	10.1

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 FPIA et ÉMIT.

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 FPIA et EMIT présentent de bonnes sensibilités et spécificités et sont bien corrélées l'une par rapport à l'autre.

Le recrutement du laboratoire sera un élément important pour le choix d'une technique ainsi, un laboratoire réalisant souvent des dosages chez des insuffisants rénaux s'orientera plus facilement vers le dosage de la vancomycine en technique EMIT. En effet, certaines techniques de dosage présente une réaction croisée avec des produits de dégradation de la vancomycine (vancomycin crystallin dégradation products, CDP-1). Le CDP-1 n'a aucune activité antimicrobienne, par contre il interfère dans le dosage de la vancomycine en technique FPIA sur le TDX (environ + 10 %), par rapport aux techniques ÉMIT et HPLC. La technique FPIA sur le TDX surestime donc le taux de vancomycine chez les patients insuffisants rénaux.

■ VI. ZONE THÉRAPEUTIQUE ET TOXIQUE

VI.1- Les zones thérapeutiques standards

Les zones acceptables sont : (6)

Taux résiduel (30 minutes avant la mise en place de la perfusion) : 5 à 10 mg/l

Pic (45 à 60 minutes après la fin de la perfusion) : 20 à 40 mg/l

Des résultats plus élevés peuvent être pratiqués chez les grands brûlés et les patients atteints d'infection grave (4)

Taux résiduel : 10 à 15 mg/l

Pic : 40 à 50 mg/l

Enfin, le taux résiduel peut être personnalisé en fonction du germe isolé : ainsi, pour être actif en permanence sur le germe responsable d'une infection, le taux résiduel doit être d'au moins 4 fois la CMI du germe. Par exemple, si un *Staphylococcus aureus* a une CMI de l'ordre de 2 mg/l, le taux résiduel à atteindre devrait être de 8 mg/l. Chez les patients avec des infections sévères, on peut préconiser jusqu'à 6 à 8 fois la CMI du germe, soit 10 à 15 mg/l au taux résiduel.

VI.2- Toxicité - Effets secondaires

La toxicité se manifeste à partir de 40 mg/l.

VI.3- Perfusion continue

La perfusion continue doit maintenir une concentration entre 20 et 35 mg/l pour un adulte, entre 20 et 25 mg/l pour un enfant. La perfusion continue ne nécessite qu'un seul prélèvement. Les résultats ainsi obtenus sont intermédiaires entre le pic et la vallée des traitements discontinus (3, 15).

Certaines équipes s'interrogent sur la nécessité de réaliser un ou plusieurs dosages de vancomycine pour la surveillance thérapeutique, ainsi que sur le meilleur mode d'administration. L'absence de surveillance, en dehors des patients avec insuffisance rénale, a même été préconisée. Pour trancher le débat, certains ont préconisé de surveiller le traitement à la vancomycine par un seul prélèvement réalisé 2 heures après l'injection du médicament chez les patients ayant une fonction rénale normale. Mais dans tous les cas de figure, une attention particulière doit être portée aux patients présentant une association de plusieurs médicaments, aux patients dialysés, aux patients avec un volume de distribution altéré, en pédiatrie, chez la femme enceinte, en oncologie.

En attendant de nouveaux protocoles validés, et si la perfusion continue n'est pas possible, la surveillance par l'association pic - vallée reste la meilleure solution.

■ VII. CONCLUSION

La vancomycine est un médicament hospitalier incontournable, de même que la surveillance biologique de son utilisation, compte tenu des effets secondaires importants et de la sévérité des infections traitées par cet antibiotique.

Je remercie Monique MANCHON, Denis GRAFMEYER et Florence MARCON pour leur aide à la réalisation de cet article.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- ANONYME. Vancocine (vancomycine). Saint-Cloud, Laboratoire Lilly France, 1990, 1-80
- 2- BOBIN DUBREUX S., REVERDY M.E., VANDENESCH F., ÉTIENNE J. Résistance des Staphylocoques aux glycopeptides - Annales du Contrôle National de qualité, 1998, 13 : 29-37
- 3- BORDERON J.-C., LAUGIER J., CHAMBOUX C., SALIBA E., MATHIEU A. Perfusion continue de vancomycine en période néonatale - Société d'Édition de l'Association d'Enseignement Médical des Hôpitaux de Paris, Paris, 1994, 42 : 525-529
- 4- CONIL J.M., FAVARET H., LAGUERRE J., BROUCHET A., CHABANON G., CAZAL L., BODNAR M., ROUGE D., VIRENQUE C., COSTAGLIOLA M. vancomycine en administration continue chez le grand brûlé. Press Méd, 1994, 34 : 1554-1558
- 5- GUÉRIN F., PERRIER-GROS-CLAUDE J.D., FOISSAUD F., MASSERON T., THIERRY J. Entérocoques résistants à la vancomycine en France. Press méd, 1998, 28 1427-1428
- 6- HAMMETT-STABLER C.A., JOHNS T. Laboratory guidelines for monitoring of antimicrobial drugs. Clin. Chem., 1998, 44 (5) : 1129-1140
- 7- HOSOTSUBO H. Rapid and specific method for the determination of vancomycin in plasma by high performance liquide chromatography on an aminopropyl column. J. Chromatogr., 1989, 487 : 421-427
- 8- KALTENBACH M.L., VISTELLE R. Adaptation de la posologie des antibiotiques, II. Les glycopeptides. Rev. Fr. Lab., 1998, 304 : 47-54
- 9- LI L., MILES M.V., HALL W., CARSON S.W. An improved Micromethod for Vancomycin determination by high performance liquide chromatography. Ther. Drug Monit. 1995 : 366-370
- 10- LUCAS G.M., LECHTZIN N., PURYEAR D.W., YAU L.L., FLEXNER C.W., MOORE R.E. Vancomycin-Resistant and Vancomycin-Susceptible Enterococcal Bacteremia : Comparison of clinical Feature and Outcomes. Clin. Inf. Dis., 1998, 26 : 1127-1133
- 11- MAY TH., CANTON PH. Glycopeptides, E.M.C., Paris, 1993. 8-004-L10 : 1-4
- 12- PERRIER-GROS-CLAUDE J.D., COURRIER P.L., BÉRARD J.M., VIGNOT J.L., MASSERONT T., GARIN D., THIERRY J., GARRABE E. Entérocoques résistants aux glycopeptides dans les viandes. Feuil. Bio., 1998, 224-81-83
- 13- POU L., ROSELL M., LOPEZ R., PASCUAL C. Changes in Vancomycin Pharmacokinetics during treatment. Ther. Drug Monit., 1996, 12 (2) : 149-153
- 14- SAUX P., MARTIN C., PERRIN G. Antibiothérapie en Réanimation et chirurgie. Les glycopeptides. Paris, Arnette Édition, 1992, 195-203
- 15- WYSOCKI M., CALVET B. Dialogue en infectiologie et réanimation, Paris, Éd. Lilly, 1998, La vancomycine en perfusion continue ; 1-8

EGOPRIM
30/32 Rue du Couëdic – 75014 Paris
Janvier 2000
Dépôt légal janvier 2000

ISSN : 1293-2892
ISBN : 2-913633-26-9

CAHIER DE
Formation
Biologie médicale

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.