

UNIVERSITE de LIMOGES
Faculté de Pharmacie

ANNEE 1998



THESE N° 30211

**CALCULS BILIAIRES
MEDICAMENTEUX
ET DIPYRIDAMOLE**



THESE

POUR LE

DIPLOME D'ETAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 26 Janvier 1998

par
Annick GAUTIER
née le 10 Mai 1969 à Harfleur (Seine-Maritime)

EXAMINATEURS de la THESE

- | | |
|---|-----------|
| Monsieur le Professeur C. MÆSCH | PRESIDENT |
| Monsieur le Professeur J. BUXERAUD | JUGE |
| Monsieur le Professeur D. SAUTEREAU | JUGE |
| Monsieur le Docteur B. FERRANDES | JUGE |

**UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE**

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur GHESTEM Axel

ASSESEURS : Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard
Monsieur DREYFUSS Gilles - Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean-Louis BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

BERNARD Michel PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE

BOSGIRAUD Claudine BACTÉRIOLOGIE-VIROLOGIE
PARASITOLOGIE

BROSSARD Claude PHARMACOTECHNIE

BUXERAUD Jacques CHIMIE ORGANIQUE
CHIMIE THÉRAPEUTIQUE

CARDOT Philippe CHIMIE ANALYTIQUE

CHULIA Albert PHARMACOGNOSIE

DELAGE Christiane CHIMIE GÉNÉRALE ET MINÉRALE

GHESTEM Axel BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

HABRIOUX Gérard BIOCHIMIE FONDAMENTALE

LACHATRE Gérard TOXICOLOGIE

MOESCH Christian HYGIÈNE

LOUDART Nicole PHARMACODYNAMIE

**SECRETARE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES
ADMINISTRATIFS**

POMMARET Maryse

A Monsieur Christian MÆSCH
Professeur des Universités en Hygiène Hydrologie et Environnement

Vous avez accepté de diriger notre thèse et vous nous faites l'honneur de présider notre jury.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre profond respect et notre reconnaissance pour l'enseignement que vous nous avez dispensé et le temps que vous avez su nous consacrer.

C'est en rendant hommage à vos qualités humaines et pédagogiques que nous vous demandons de trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Jacques BUXERAUD
Professeur des Universités de Chimie Thérapeutique et
Chimie Organique

Vous nous faites l'honneur de siéger à notre jury
de thèse.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre
profond respect et notre reconnaissance pour
l'enseignement dynamique que vous nous avez
dispensé et vos qualités humaines qui font de
vous un partenaire privilégié dans un cursus
universitaire.

A Monsieur le Professeur Denis SAUTEREAU
Professeur des Universités en Hépatogastro-Entérologie

Vous avez spontanément accepté de participer au jury de notre thèse.

Veillez trouver ici l'expression de nos vifs remerciements et de notre très respectueuse considération.

A Monsieur Bernard FERRANDES
Docteur ès Sciences

Nous vous sommes très reconnaissant d'avoir
accepté de diriger une partie de ce travail et nous
vous remercions pour le concours précieux de
votre expérience et votre rigueur scientifique.

Qu'il nous soit permis ici de vous exprimer notre
profonde gratitude...

A mes parents

qui m'ont offert la possibilité de réaliser mon
ambition,
en les remerciant de la confiance et du soutien
qu'ils ont su m'apporter,
que ce travail soit pour eux la juste récompense
de tous leurs efforts,
avec toute mon affection...

A Eric et à sa famille

A ma famille

A Jeanine R.

que ce travail vous soit dédié...

A Eliane

Que je remercie tout particulièrement pour la qualité de son travail et sa disponibilité de chaque instant.

Trouvez ici le témoignage de ma profonde reconnaissance et de mon affection.

PLAN

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

A - ANATOMIE DES VOIES BILIAIRES ET DU FOIE

I. INTRODUCTION

II. ANATOMIE DESCRIPTIVE

II.1. MORPHOLOGIE EXTERNE

II.2. MOYENS DE FIXITE DU FOIE

III. ANATOMIE FONCTIONNELLE VASCULAIRE.

IV. PEDICULE HEPATIQUE

IV.1. VEINE PORTE

IV.2. ARTERES HEPATIQUES

IV.3. VOIES BILIAIRES EXTRA-HEPATIQUES

IV.4. VOIE BILIAIRE PRINCIPALE

IV.5. VOIE BILIAIRE ACCESSOIRE

IV.6. VASCULARISATION DES VOIES BILIAIRES

V. MOYENS D'EXPLORATION

B - LES CALCULS BILIAIRES

I. LES DIFFERENTS TYPES DE CALCULS

- I.1. LES CALCULS CHOLESTEROLIQUES
- I.2. LES CALCULS PIGMENTAIRES

II. COMPOSITION DE LA BILE

- II.1. LES ELEMENTS MINERAUX
- II.2. LES ELEMENTS ORGANIQUES

C - ETUDE DU DIPYRIDAMOLE

I. INTRODUCTION

II. SYNTHÈSE

III. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

- III.1. CARACTÈRES
- III.2. IDENTIFICATION
- III.3. DOSAGES

IV. PHARMACOCINÉTIQUE

- IV.1. ABSORPTION
- IV.2. DISTRIBUTION
- IV.3. MÉTABOLISATION
- IV.4. EXCRETION

V. PHARMACOLOGIE

- V.1. ACTION SUR LES VAISSEAUX CORONAIRES
- V.2. MODIFICATIONS MÉTABOLIQUES
- V.3. ANTIAGREGANT PLAQUETTAIRE

V.4. AUTRES PROPRIETES

VI. INDICATIONS

VI.1. MALADIES CORONARIENNES

VI.2. COMPLICATIONS THROMBOEMBOLIQUES SUR LES
PROTHESES DE VALVES

VI.3. PREVENTION ET TRAITEMENT DES THROMBOSES
ARTERIELLES

VI.4. AUTRES INDICATIONS

VII. CONTRE-INDICATIONS

VIII. EFFETS SECONDAIRES ET INDESIRABLES

IX. INTERACTIONS MEDICAMENTEUSES

X. PRECAUTIONS D'EMPLOI

XI. POSOLOGIE ET FORMES PHARMACEUTIQUES

XI.1. POSOLOGIE

XI.2. FORMES PHARMACEUTIQUES - SPECIALITES

D - LA LITHIASE BILIAIRE MEDICAMENTEUSE

I. INTRODUCTION

II. PHYSIOPATHOLOGIE, EPIDEMIOLOGIE

II.1. SATURATION DE LA BILE EN CHOLESTEROL

II.2. SATURATION DE LA BILE EN BILIRUBINE LIBRE

II.3. STASE VESICULAIRE

II.4. PRECIPITATION D'UNE SUBSTANCE EN EXCES

DEUXIEME PARTIE : ANALYSE

I. INTRODUCTION

II. PATIENTS

III. MATERIELS ET METHODES

III.1. TEST DE DETECTION RAPIDE DU DIPYRIDAMOLE DANS LES CALCULS

III.2. ETUDE DU DOSSIER CLINIQUE

III.3. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

III.4. SPECTROPHOTOMETRIE INFRAROUGE

III.5. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

IV. RESULTATS

IV.1. TEST DE DETECTION RAPIDE DU DIPYRIDAMOLE

IV.2. ETUDE DU DOSSIER CLINIQUE

IV.3. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

IV.4. SPECTROPHOTOMETRIE INFRAROUGE

IV.5. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

V. DISCUSSION

V.1. POPULATION ETUDIEE

V.2. TECHNIQUE

V.3. EXPLOITATION DES RESULTATS : HYPOTHESE DE LITHOGENESE DES CALCULS MEDICAMENTEUX A DIPYRIDAMOLE

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

En France, près de trois à quatre millions de personnes ont des calculs biliaires et 100 à 200 000 nouveaux cas sont découverts chaque année.

L'importance de cette pathologie, tant sur le plan purement médical que sur le plan socio-économique, justifie la mise en place d'une politique de prévention.

L'existence des lithiases biliaires médicamenteuses n'est plus à démontrer aujourd'hui et nous nous intéresserons plus particulièrement aux lithiases à dipyridamole.

Après avoir revu l'anatomie des voies biliaires et quelques généralités sur les calculs biliaires, nous étudierons les propriétés physico-chimiques et thérapeutiques du dipyridamole puis nous ferons le point sur les différentes lithiases biliaires médicamenteuses connues à ce jour.

Notre travail consistera tout d'abord à mettre en évidence la molécule de dipyridamole dans les calculs par un test rapide de fluorescence sous lumière ultraviolette.

Nos résultats seront ensuite confirmés par chromatographie sur couche mince et par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier. Ces méthodes ne permettant pas de donner une quantification précise nous utiliserons alors une méthode de dosage par chromatographie liquide haute performance. Outre la détermination précise de la teneur en dipyridamole des calculs, l'étude par chromatographie liquide haute performance permettra, après hydrolyse enzymatique par la β -glucuronidase, de préciser la forme libre ou conjuguée du médicament.

PREMIERE PARTIE :
GENERALITES

A - ANATOMIE DES VOIES BILIAIRES ET DU FOIE

I. INTRODUCTION

Le foie, la plus volumineuse des glandes de l'organisme, doué de fonctions métaboliques complexes indispensables à la vie, est situé dans la partie supérieure et droite de la cavité abdominale, dans l'étage sus-mésocolique. Il occupe la presque totalité de l'hypochondre droit, une partie de l'épigastre et de l'hypochondre gauche. En partie sous le rebord costal, c'est un véritable organe thoraco-abdominal.

Viscère plein, le foie a été considéré pendant longtemps comme une masse de parenchyme univoque dont on ne pouvait réséquer une partie sans compromettre sa fonction. Actuellement, l'anatomie fonctionnelle vasculaire hépatique permet la dissociation du foie en territoires distincts, indépendants les uns des autres et pouvant être traités séparément, ce qui est la base de la chirurgie hépatique moderne.

Cette anatomie interne a été précisée grâce à l'étude de la répartition des vaisseaux à l'intérieur du parenchyme à la suite des travaux anatomiques de Couinaud, et, plus récemment grâce à la mise au point de nouvelles techniques d'imageries, (échographie, scanner, résonance magnétique nucléaire) qui, en permettant une étude anatomique in vivo, ont marqué un progrès indiscutable en hépatologie.

II. ANATOMIE DESCRIPTIVE

La forme générale du foie est classiquement comparée à celle de la moitié supérieure d'un ovoïde sectionné suivant son grand axe à grosse extrémité droite, allongé transversalement sous le diaphragme.

Il s'agit d'un viscère relativement plastique qui se moule sur la face inférieure de la coupole diaphragmatique droite et qui surplombe la région pyloro-duodénale et la tête du pancréas.

Il est lisse, de consistance ferme, de coloration rouge-brun, constitué d'un parenchyme friable entouré d'une mince capsule fibreuse, la capsule de Glisson (*tunica fibrosa*).

Il présente une extrême variabilité de volume, dimensions et poids. Son poids de 1400 à 1500 g chez le cadavre est en fait plus élevé, de l'ordre de 2300 à 2500 g, chez le vivant, chez qui il est gorgé de sang.

II.1. MORPHOLOGIE EXTERNE

Il est classique de décrire 3 faces au foie : supérieure, inférieure et postérieure (*figures 1 A et B*).

La face supérieure ou diaphragmatique est convexe dans le sens antéro-postérieur, moulée sur le diaphragme. Large dans sa partie droite, progressivement effilée vers la gauche, elle présente, à l'union de ses deux tiers droits et de son tiers gauche, l'insertion du ligament suspenseur ou falciforme, repli péritonéal sagittal qui relie le foie au diaphragme. Ce ligament sépare le foie en deux lobes droit et gauche.

La face inférieure ou viscérale est oblique en bas, en avant et vers la gauche. Elle est parcourue par trois sillons qui dessinent grossièrement la lettre H :

- ◆ *un sillon transversal* correspondant au hile hépatique (*porta hepatis*), point de pénétration ou d'émergence des éléments du pédicule hépatique ;
- ◆ *un sillon antéro-postérieur droit* correspondant au lit de la vésicule biliaire ;
- ◆ *un sillon antéro-postérieur gauche* (*fossa ligamentum teretis*) qui contient dans sa moitié antérieure le reliquat fibreux de la veine ombilicale gauche ou ligament rond et dans sa moitié postérieure le reliquat fibreux du canal veineux d'Arantius qui, chez le fœtus, fait communiquer la veine ombilicale (retour veineux placentaire) par l'intermédiaire de la branche porte gauche avec la veine cardinale postérieure droite : future veine cave inférieure.

Ces trois sillons divisent la face inférieure du foie en quatre zones distinctes faisant ressortir une ambiguïté de l'anatomie "classique" :

- ◆ *une partie droite* correspondant seulement à une partie de ce qui paraissait être le lobe droit sur la face supérieure,
- ◆ *une partie gauche* correspondant au lobe gauche précédemment décrit,
- ◆ *une partie centrale antérieure*, le lobe carré (*lobus quadratus*), limité par le sillon ombilical à gauche, le lit vésiculaire à droite et le hile en arrière appartenant au lobe droit,
- ◆ *une partie centrale postérieure*, le lobe de Spigel (*lobus caudatus*), qui appartient en fait essentiellement à la face postérieure du foie, entre la veine cave inférieure et le sillon d'Arantius, et qui n'était pas décrite sur la face antérieure.

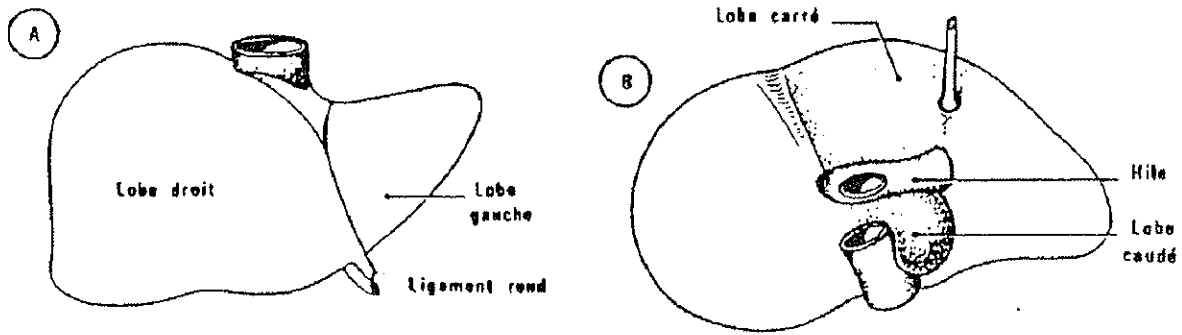


Figure 1 - Morphologie externe du foie

- A** - Face supérieure, montrant les deux lobes droit et gauche séparés par le ligament falciforme et le ligament rond.
- B** - Face inférieure, montrant la division du foie carré (partie du lobe droit) entre le hile, le ligament rond et la fossette vésiculaire. En arrière du hile et à gauche de la veine cave, le lobe de Spiegel du lobe caudé.

La face postérieure, la plus étroite, de forme triangulaire à base droite, est pratiquement verticale et se moule sur la veine cave (mais le foie n'entoure pratiquement jamais complètement la veine cave) et sur la convexité de la colonne vertébrale. Elle est traversée par deux sillons : le sillon vertical droit ou gouttière de la veine cave et le sillon vertical gauche, qui contient le canal d'Arantius.

II.2. MOYENS DE FIXITE DU FOIE

Ce sont :

♦ La veine cave inférieure :

le foie est uni à la veine cave inférieure par de courtes veines sus-hépatiques qui représentent son principal moyen de fixité.

♦ Le ligament phréno-hépathique :

zone d'adhérence très lâche de la face postérieure du foie à la partie verticale du diaphragme.

♦ Les ligaments péritonéaux représentés par :

- le ligament falciforme ou ligament suspenseur, ou triangulaire
- le ligament coronaire.

♦ Le petit épiploon reliant le foie à la petite courbure de l'estomac et au premier duodénum.

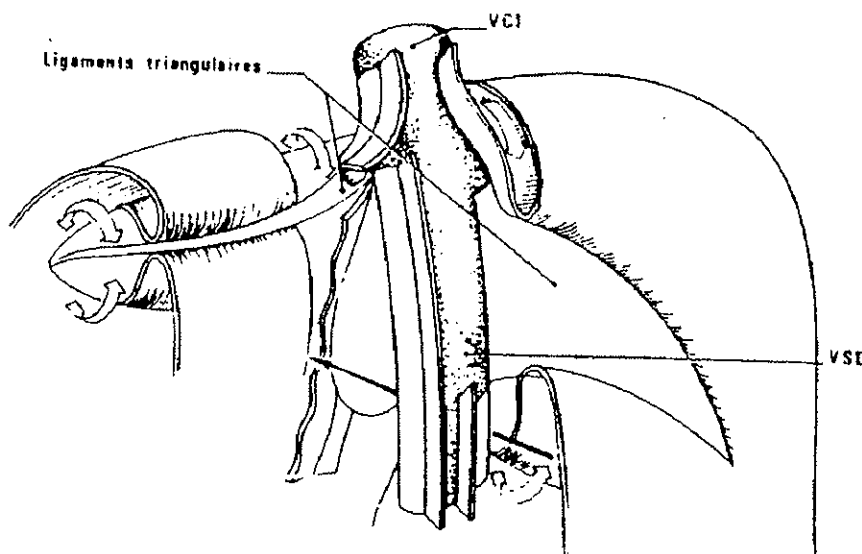


Figure 2 - Les ligaments triangulaires droit et gauche.

Vue postérieure montrant la formation des deux ligaments triangulaires autour de la veine cave inférieure (VCI), par replis du péritoine (en grisé).

VSD : veine surrénale droite.

III. ANATOMIE FONCTIONNELLE VASCULAIRE.

Anatomie "classique" de Couinaud. (figure 3)

A l'anatomie "morphologique" extérieure se substitue actuellement une anatomie "fonctionnelle" fondée sur la vascularisation à l'intérieur du parenchyme. Cette anatomie fonctionnelle, décrite par Couinaud est utilisée couramment en France et devrait s'étendre à la littérature étrangère par sa simplicité et sa facilité à définir les interventions d'exérèse hépatique. Toutefois cette description ne tient pas compte de la position anatomique du foie dans l'organisme.

Les termes "paramédian" et "latéral" correspondent à une description cadavérique du foie, c'est-à-dire, posé à plat sur une table. Il convient mieux de parler d'antérieur et de postérieur.

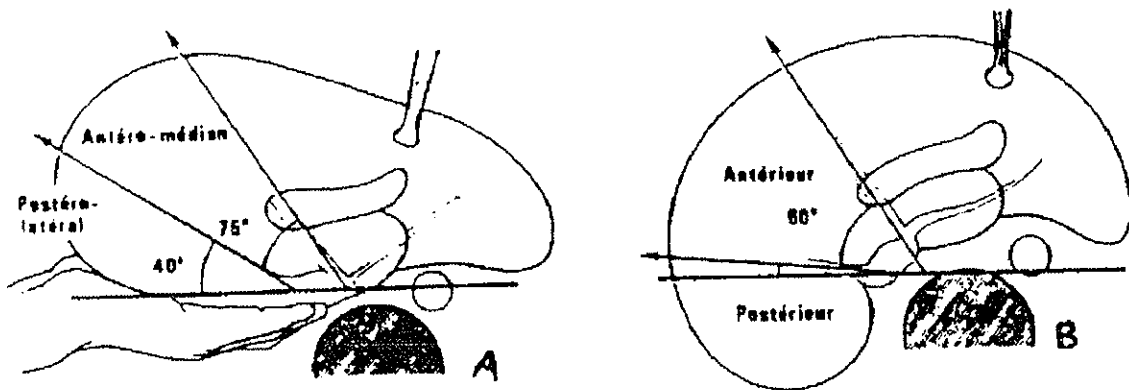


Figure 3 - La description classique de Couinaud correspond à un foie étalé à plat.

La scissure médiane est à 75° de l'horizontale et les deux secteurs du foie droit sont antéro-médian ou paramédian et postéro-latéral (Figure A). En fait, et ceci est bien connu depuis l'utilisation des différents moyens d'exploration morphologique, le foie s'enroule autour du rachis : la scissure droite est à l'horizontale, la scissure médiane est à 60° de l'horizontale. Les deux secteurs sont antérieur et postérieur (Figure B).

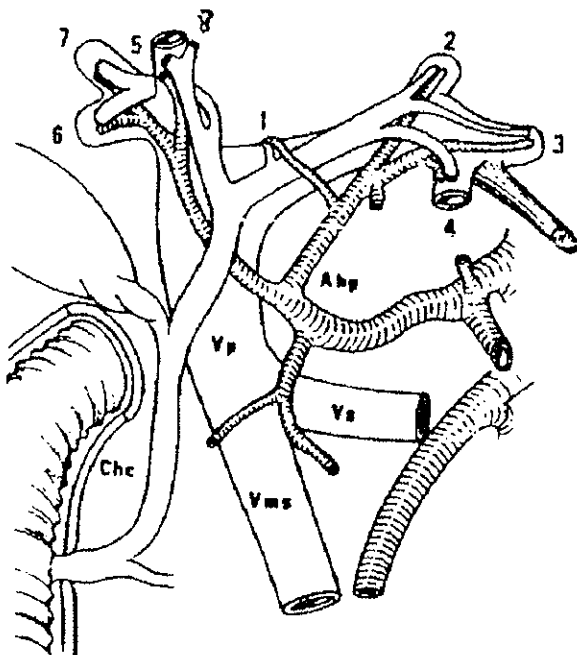
Le foie est un organe porte, c'est-à-dire interposé entre deux circulations veineuses : la circulation porte et la circulation cave par l'intermédiaire des veines sus-hépatiques. L'apport sanguin au foie est partiellement artériel (20%) par l'intermédiaire de l'artère hépatique.

L'ensemble veine porte, artère hépatique et canal biliaire chemine à l'intérieur du parenchyme hépatique dans une émanation fibreuse de la capsule de Glisson. Il constitue les pédicules glissoniens.

IV. PEDICULE HEPATIQUE

Le pédicule sous-hépatique, plus généralement appelé pédicule hépatique, est contenu dans la partie inférieure et droite du petit épiploon. Il regroupe les structures vasculaires qui apportent le sang au foie : la veine porte, la où les artères hépatiques, et les voies biliaires extra-hépatiques.

A ces 3 éléments principaux, il faut ajouter l'existence dans le pédicule hépatique d'éléments "accessoires" qui sont des nerfs et des lymphatiques hépatiques.



- ⇒ La veine porte (VP) est constituée par la réunion de la veine mésentérique supérieure (Vms) et de la veine splénique (VS). Elle se divise en deux branches droite et gauche à la partie haute du pédicule dans le hile.
- ⇒ L'artère hépatique propre (Vhp), (ou artère hépatique moyenne), est formée par la division de l'artère hépatique commune en artère gastro-duodénale et artère hépatique moyenne.
- ⇒ Le canal hépato-cholédoque (Chc), d'abord à la partie droite du pédicule, s'écarte vers la droite de la veine porte pour rejoindre le canal de Wirsung et se jeter, par l'ampoule de Vater, dans le duodénum..

Figure 4- Le pédicule hépatique

IV.1. VEINE PORTE

La veine porte amène au foie le sang veineux de la portion sous diaphragmatique du tube digestif, du pancréas et de la rate. C'est une veine volumineuse de 8 à 10 cm de long et d'un diamètre de 15 à 20 mm.

Ce confluent portal est situé à hauteur de la deuxième lombaire, un peu à droite de la ligne médiane, derrière l'isthme du pancréas.

Au niveau du hile hépatique, la veine porte se divise en deux branches qui pénètrent à l'intérieur du parenchyme hépatique et s'y ramifient :

- ◆ une branche droite courte dont la direction continue celle du tronc principal
- ◆ une branche gauche qui chemine dans le hile avant de pénétrer dans le foie.

Au cours de son trajet, la veine porte reçoit des collatérales :

- ◆ sur sa gauche, la veine coronaire stomachique et la veine pylorique
- ◆ sur sa droite, la veine pancréatico-duodénale supérieure droite et les veines cystiques.

IV.2. ARTERES HEPATIQUES

La vascularisation artérielle hépatique est caractérisée par une extrême variabilité.

Les variations de deux domaines anatomiques différents, mais très liés, sont à l'origine de la distribution artérielle :

- ◆ d'une part, la triple vascularisation du foie primitif
- ◆ d'autre part, les possibles modifications d'origine de la coronaire stomachique, de l'hépatique moyenne (naissant le plus souvent du tronc coeliaque) et de l'artère mésentérique supérieure (naissant le plus souvent isolément).

Ces variations sont très importantes à connaître en raison de leur implication lors de l'étude de tous les examens morphologiques, en particulier d'une artériographie.

IV.3. VOIES BILIAIRES EXTRA-HEPATIQUES

Les deux canaux hépatiques, droit et gauche, forment la voie biliaire principale ou hépatocholédoque. La voie biliaire accessoire, vésicule et canal cystique, est un diverticule de la voie biliaire principale. Leurs anomalies sont très fréquentes.

IV.4. VOIE BILIAIRE PRINCIPALE

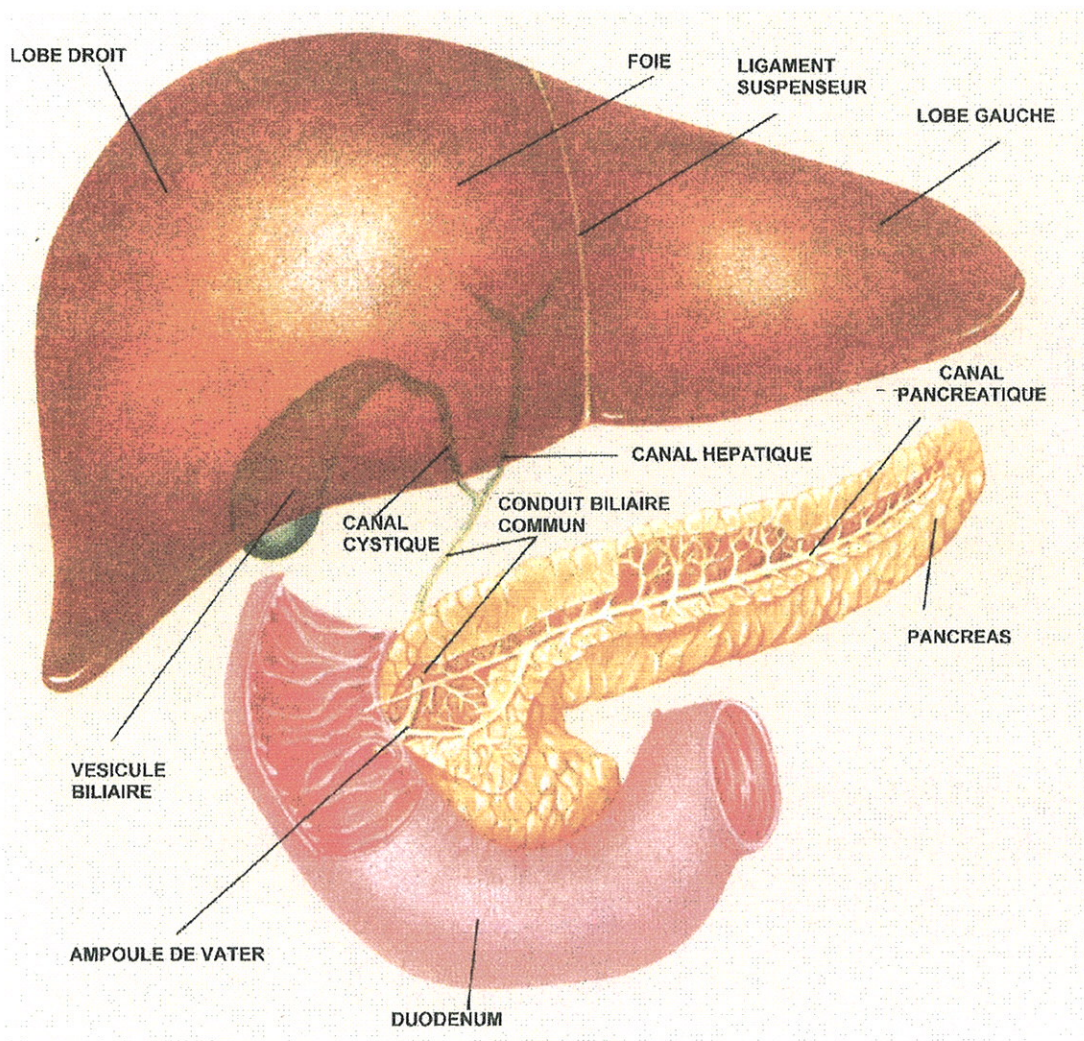


Figure 5 : Voie biliaire principale

IV.4.1. Confluent biliaire supérieur ou convergence biliaire

Toujours extra-parenchymateuse, la réunion des deux canaux biliaires hépatiques droit et gauche se fait dans le hile du foie et définit la convergence biliaire supérieure.

Le canal hépatique gauche est constitué par la réunion des canaux segmentaires 2 et 8 au-dessus du recessus de Rex. Extra-hépatique dans cette région, il se dirige transversalement dans le hile de gauche à droite. Il est assez long : 1,5 à 3,5 cm chez 80 % des sujets.

Le canal hépatique droit est formé par la réunion des deux principaux canaux droits antérieur et postérieur. Ce confluent est en règle au-dessus de la veine porte droite, extra-hépatique. Le canal droit est court et vertical 0,5 à 2,5 cm chez 80 % des sujets. Il se réunit avec le canal gauche.

L'angle que forme la convergence est variable.

La convergence est entourée par la capsule de Glisson, dont l'épaississement au niveau du hile forme la plaque hilare. Cette particularité permet un accès plus facile des voies biliaires lors d'interventions.

IV.4.2. Canal hépatocholédoque.

Le canal hépatique reçoit le canal cystique et devient à partir de cette réunion le canal cholédoque. Cette distinction est très arbitraire car l'abouchement du cystique a lieu à une hauteur variable. Il vaut donc mieux parler de voie biliaire principale dans son ensemble c'est-à-dire : canal hépatocholédoque. La voie biliaire principale est longue de 8 à 10 cm et son calibre est variable de 4 à 10 mm.

L'artère hépatique est à gauche de la voie biliaire et sur le même plan. La bifurcation en branches droites et gauches a lieu en dessous de la convergence biliaire à une hauteur variable. Dans son segment rétro-

pancréatique, la voie biliaire principale est en rapport avec la face postérieure de la tête du pancréas, soit dans une gouttière, soit dans un véritable tunnel. Son trajet est croisé par les arcades pancréatiques postérieures artérielles et veineuses.

IV.4.3. Terminaison de la voie biliaire principale

L'hépatocolédoque traverse plus ou moins obliquement la paroi duodénale. Des variations sont possibles dans la hauteur d'abouchement qui peut se situer sur toute la hauteur du deuxième duodénum : position haute, moyenne ou basse.

Dans son segment terminal, la voie biliaire principale est en rapport avec le canal de Wirsung, qui lui est parallèle, sous-jacent et dans un plan antérieur. Les deux canaux se jettent dans le duodénum au fond de l'ampoule de Vater.

La papille est entourée par une couronne de fibres musculaires lisses, distinctes de celles de la paroi duodénale qui constituent le sphincter d'Oddi.

IV.5. VOIE BILIAIRE ACCESSOIRE

IV.5.1. Vésicule biliaire

Piriforme, longue de 8 à 10 cm, large de 3 à 4 cm, elle se situe à la face intérieure du foie, dans la fossette cystique entre le lobe carré à gauche, le foie droit à droite, le sillon transverse en arrière et le bord antérieur du foie en avant. Le fond est situé à la partie antéro-externe qui répond à l'échancrure cystique du bord antérieur du foie. Le corps, de forme cylindrique, diminuant progressivement de calibre d'avant en arrière, est en rapport avec la face inférieure du foie.

La face inférieure est recouverte de péritoine et repose sur le côlon droit et le duodénum (rapports importants expliquant les fistules cholécysto-digestives). Le collet est situé à la partie la plus profonde de la fossette cystique, là où elle rejoint le hile du foie et est donc en rapport étroit avec le pédicule du foie droit.

IV.5.2. Canal cystique

Il prolonge le collet vésiculaire, forme un angle ouvert en arrière et décrit un trajet oblique en bas à gauche et en arrière pour aller rejoindre la voie biliaire principale.

IV.6. VASCULARISATION DES VOIES BILIAIRES

Les artères de la voie biliaire principale proviennent essentiellement de l'artère pancréatico-duodénale supérieure droite, qui naît de la gastro-duodénale et passe à la face antérieure de la voie biliaire. Elle donne à ce niveau plusieurs artéριοles qui s'anastomosent entre-elles en un riche réseau épicholédocien. Les deux artéριοles principales ont un trajet parallèle, l'une à droite et l'autre à gauche de la voie biliaire principale. Ce réseau est doublé par deux autres réseaux intramuraux, donc, la voie biliaire est richement vascularisée.

La vésicule biliaire reçoit sa vascularisation de l'artère cystique qui se divise au niveau du collet en deux branches superficielles et profondes. Le retour veineux se fait par de nombreuses petites veines qui pénètrent dans le foie.

V. MOYENS D'EXPLORATION

Le développement des moyens d'exploration morphologique a permis la véritable application (avec la chirurgie hépatique) de cette anatomie, rendant le foie quasiment transparent. Le scanner, et encore plus l'échographie, permettent actuellement une étude complète de l'anatomie vasculaire hépatique. L'utilisation en préopératoire de l'échographie, va permettre des interventions chirurgicales à la demande, entièrement fondées sur une étude in vivo de l'anatomie vasculaire propre de chaque malade.

B - LES CALCULS BILIAIRES : GENERALITES

I. LES DIFFERENTS TYPES DE CALCULS

Il existe deux grands types de calculs biliaires :

- ◆ les calculs cholestéroliques
- ◆ les calculs pigmentaires.

Dans les pays occidentaux, environ 70 à 80 % des calculs sont cholestéroliques, purs ou mixtes et à localisation vésiculaire. Les calculs cholestéroliques purs ne comportent que du cholestérol monohydraté, alors que les calculs mixtes contiennent au moins 50 % de cholestérol, associé à des pigments biliaires.

Environ 20 % des calculs sont pigmentaires, composés majoritairement de pigments biliaires et différenciés en calculs pigmentaires bruns et calculs pigmentaires noirs (1) (*tableau 1 et figure 6*).

L'analyse des calculs biliaires par spectrophotométrie infrarouge permet d'en préciser la composition puisqu'une quinzaine de composés différents sont fréquemment retrouvés (2, 3).

Cette méthode d'analyse a également permis la découverte en 1988 d'un nouveau type de pathologie lithiasique biliaire ; les lithiases médicamenteuses liées à la précipitation de médicaments peu solubles, éliminés préférentiellement par voie biliaire (4, 5).

I.1. LES CALCULS CHOLESTEROLIQUES

Leur formation se résume en deux phases, nucléation et croissance. Une hypersécrétion biliaire de cholestérol par l'hépatocyte devrait prédisposer à une nucléation du cholestérol, ce dernier étant pratiquement insoluble dans l'eau (2 mg/L soit 5,17 mmol/L). Cependant, la sursaturation en cholestérol de la bile est une étape nécessaire mais non suffisante pour la formation des calculs. Par exemple, la bile hépatique sursaturée en cholestérol ne contient qu'exceptionnellement des cristaux. La bile possède un système efficace et complexe de solubilisation du cholestérol (6) par formation de micelles et/ou de vésicules en présence de sels biliaires et de lécithines (diagramme triangulaire de Small). Deux circonstances favorisent principalement la formation de ces calculs vésiculaires cholestéroliques : le déséquilibre des sécrétions muqueuses vésiculaires et la stase biliaire. L'hypersécrétion par la muqueuse vésiculaire de mucoprotéines et de facteurs nucléants favorise la nucléation hétérogène du cholestérol qui précipite sous forme de microcristaux. La cristallisation serait aussi facilitée par la diminution de la synthèse des protéines inhibitrices de la nucléation. L'hypotonie vésiculaire, facteur de stase, favorise l'agglomération des microcristaux puis leur croissance, aboutissant à la formation d'un calcul cholestérolique comportant un centre mixte cholestérolo-pigmentaire (*photo 1 et figure 7*).

I.2. LES CALCULS PIGMENTAIRES (1, 7)

Ce sont des calculs biliaires composés principalement de bilirubinate de calcium et de ses dérivés. De par leur aspect et leur étiopathogénie, ils se divisent en 2 groupes : les calculs noirs et les calculs bruns.

- a) **Les calculs pigmentaires bruns** seraient plus fréquents en Orient qu'en Occident, même si actuellement leur fréquence est en baisse, notamment au Japon où en zone rurale, 70 % des calculs biliaires étaient de type pigmentaire brun en 1975. Ils se forment préférentiellement dans les voies biliaires, plutôt intrahépatiques, dans

un contexte de stase et de bile infectée. Ces calculs sont de couleur brun-orangé (*photo 2*), ont une consistance molle et une structure feuilletée en surface, plus lacunaire vers le centre. Ils sont radiotransparents (teneur en calcium < 4 %), et sont constitués principalement de bilirubinate et palmitate de calcium, de mucopolysaccharides, de traces de bilirubine libre et de cholestérol (*figure 8*).

b) **Les calculs pigmentaires noirs** se forment dans la vésicule, dans un contexte de bile stérile et sont communément associés à une hyperhémolyse chronique ou à une cirrhose. Parmi les facteurs lithogènes, l'environnement local vésiculaire et, en particulier, la sécrétion de mucine sont souvent incriminés et favoriseraient leur calcification ; la moitié d'entre eux sont opaques aux rayons X. Ils sont de couleur noire, d'aspect amorphe à vernissé (*photo 3*) et de consistance friable. Leur composante pigmentaire est constituée d'un bilirubinate de calcium à haut degré de polymérisation. Des sels minéraux sont également présents :

- ◆ phosphates de calcium (carbapatite, phosphates amorphes, brushite, whitlockite),
- ◆ carbonates de calcium (calcite, aragonite, vaterite) associés constamment à une matrice glycoprotéique (*tableau 2*).

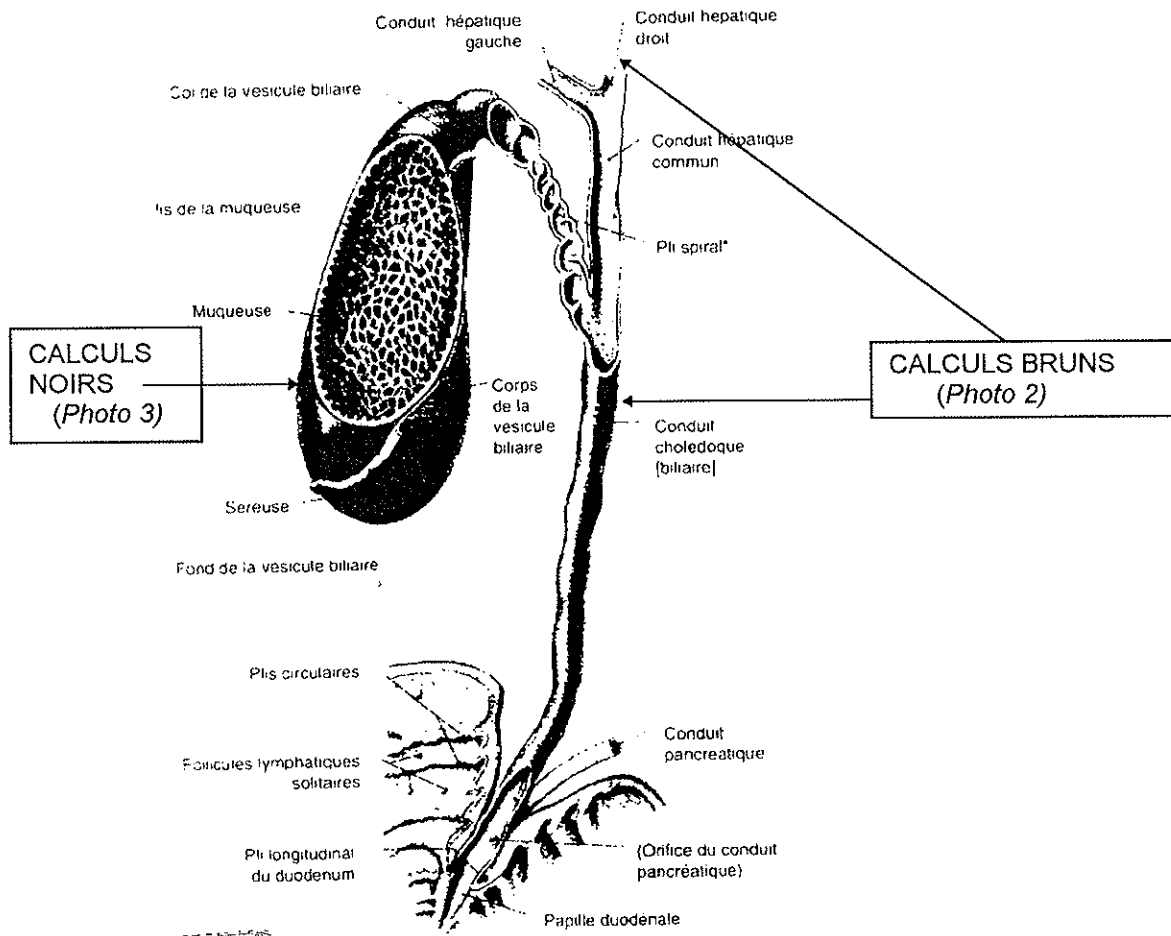


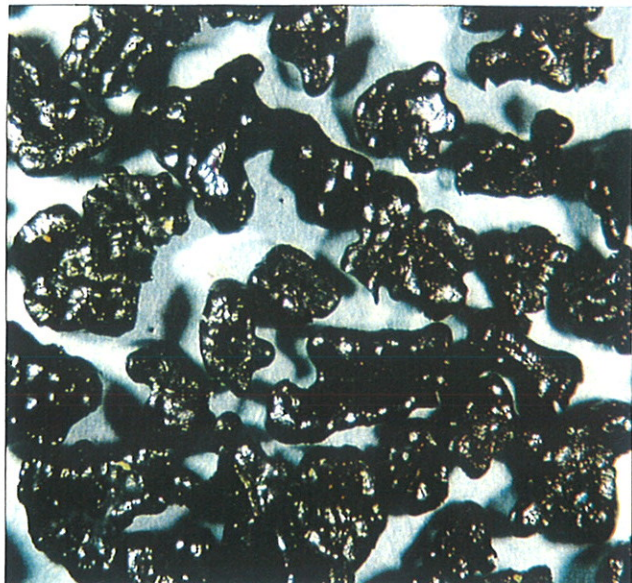
Figure 6 - Lieu de formation des calculs biliaires.

Photo 1 - Calculs cholestéroliques multiples provenant de la vésicule (diamètre 4 à 5 mm).



Photo 2 : Calcul biliaire de type pigmentaire brun, extrait de la voie biliaire principale (diamètre 6 mm).

Photo 3 : Multiples calculs de type pigmentaire noir et d'origine vésiculaire (taille 3 à 4 mm)



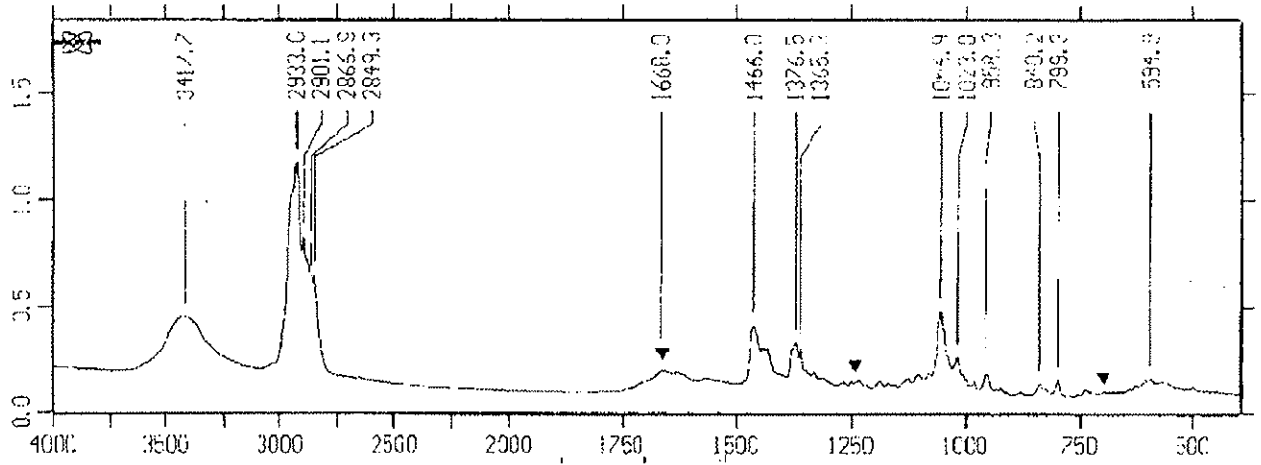


Figure 7 - Spectre infrarouge d'un calcul cholestérolique
cholestérol >> bilirubinate de Ca ▼ > mucoprotéines (traces).

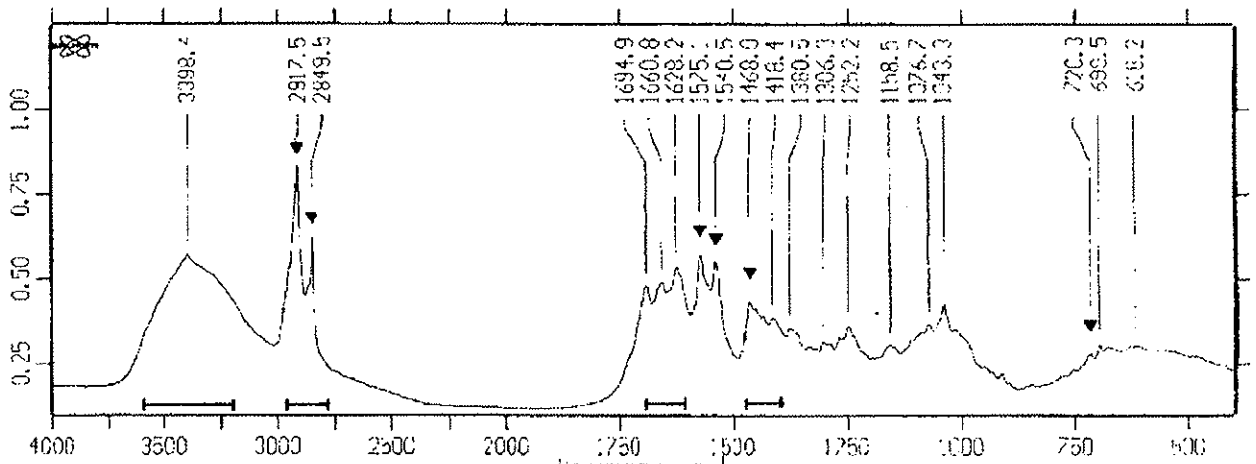


Figure 8 - Spectre infrarouge d'un calcul pigmentaire brun.
bilirubinate neutre de Ca > palmitate de Ca ▼ > mucoprotéines |—|

Tableau 1 : Différences entre les calculs noirs et bruns d'après ERLINGER (1).

	Calculs noirs	Calculs bruns
<i>Couleur</i>	Noire	Brun-orangé
<i>Aspect</i>	Amorphe ou vernissé	Parfois laminé
<i>Consistance</i>	Friable	Molle
<i>Localisation</i>	Vésicule	Voies biliaires
<i>Géographie</i>	Occident-Orient	Orient principalement
<i>Culture de bile</i>	Stérile	Infectée
<i>Constituant principal</i>	Polymère de bilirubine	Bilirubinate de calcium

Tableau 2 : Différence de composition entre les calculs pigmentaires noirs et bruns d'après TROTMANN et OSTROW (7, 8)

Composant	Calcul noir	Calcul brun
Pigment total biliaire	Polymère insoluble 40 %	Bilirubinate de calcium 50 à 60 %
Calcium total	15 %	5 %
Sel de calcium :		
- Carbonates	6 à 13 %	néant
- Phosphates	5 à 9 %	Inf. à 1 %
- Palmitate	1 %	9 à 15 %
Cholestérol non estérifié	2 à 3 %	15 à 23 %
Sels biliaires	2 %	2 %
Résidu non mesuré	24 %	12 %

En conclusion, comme le montre le tableau 2, le bilirubinate de calcium pourrait bien ne pas être le principal composant du calcul. Le spectre infrarouge des calculs n'est pas suffisamment typique pour affirmer que le bilirubinate de calcium est à un taux aussi élevé que dans les calculs bruns (9). Les calculs noirs seraient plutôt composés de polymère de bilirubine et de ses dérivés, liés à des composés complexes, comportant du cuivre ou du fer. Ces composants pourraient donc bien être des complexes métal-bilirubine, par exemple un bilirubinate double de calcium et de cuivre (10).

II. COMPOSITION DE LA BILE

La composition chimique entre bile vésiculaire et bile hépatique diffère considérablement. L'eau et les électrolytes sont absorbés dans la vésicule et la bile vésiculaire est plus concentrée que la bile hépatique.

La bile est à peu près isotonique avec le sérum.

Le pH de la bile vésiculaire (pH = 6,9) est plus faible que celui de la bile hépatique (pH=7,1). Ceci est probablement dû à une sécrétion intravésiculaire d'ions H⁺.

La bile circulant au contact des calculs pigmentaires n'est habituellement pas saturée en cholestérol et peut contenir une proportion élevée de bilirubine IX α , libre ou monoconjuguée (1). Elle comporte également de nombreuses et fines particules de bilirubinate de calcium qui peuvent être identifiées au microscope (11) et qui lui confèrent une consistance épaisse.

II.1. LES ELEMENTS MINERAUX (tableau 3)

1. **Le calcium** : La concentration en calcium ionisé dans la bile est de 0,75 à 1,0 mM. Il semble bien possible que cette concentration soit liée au pH, aux sels biliaires mais aussi aux glycoprotéines par lesquelles les pigments biliaires joueraient aussi un rôle (1).
2. **Le phosphore** : il se trouve dans les phospholipides essentiellement.
3. **Les bicarbonates** : leur taux dans la bile hépatique augmente avec le flux biliaire.
4. **Le fer** : 20 % de sa composition totale est d'origine plasmatique.
5. **Le cuivre** est sous forme non dialysable et la bile possède naturellement un grand pouvoir de captation du cuivre.
6. **Le manganèse** est également sous forme non dialysable.

*Tableau 3 : Composants non organiques de la bile
d'après la référence (13)*

	Bile Hépatique	Bile Vésiculaire
Bicarbonate	30 mmol/L	19 mmol/L
Chlorure	105 mmol/L	66,2 mmol/L
Phosphore	2,9 à 7,2 mmol/L	45 mmol/L
Potassium	4,8 mmol/L	12,8 mmol/L
Sodium	146 mmol/L	209 mmol/L
Calcium	2,6 mmol/L	3,1 à 17,2 mmol/L
Magnésium	0,7 à 1,5 mmol/L	---
Fer	7 à 56 μ mol/L	---
Cuivre	25,3 μ mol/L	87,2 μ mol/L
Manganèse	0,38 μ mol/L	0,20 μ mol/L
	---	5,4 μ mol/L

II.2. LES ELEMENTS ORGANIQUES (tableau 4)

1. **La bilirubine** se retrouve sous forme diglucuronoconjuguée à 70 - 80 % dans la bile vésiculaire et à 90 % dans la bile hépatique. Le reste de la bilirubine est monoconjuguée et de faibles quantités sont conjuguées à du glucose, du xylose ou sous forme sulfoconjuguée. Un pour cent de la bilirubine totale est présente sous forme libre et près des 2/3 apparaît sous la forme d'un agrégat moléculaire formant une solution micellaire. Le bilirubinate de calcium des calculs biliaires pourrait être dû à la libération de bilirubine sous l'action d'une glucuronidase.
2. **Les protéines** : elles sont diverses et viennent du plasma, du foie et de la vésicule biliaire.
3. **Les enzymes** sont nombreuses: déshydrogénases, transférases, phosphatases, glucuronidases,...
4. **Les lipides totaux**, sont sous la forme de lipoprotéines, l'apoprotéine étant de l'albumine. Il y a environ 75 % d'acides biliaires, 20 % de phospholipides et 5 % de cholestérol. Les acides gras principaux sont les acides palmitique, oléique et linoléique.
5. **Le cholestérol** se trouve sous forme libre et seulement 4 % est sous forme estérifiée (sels mixtes de sels de sodium d'acides biliaires).
6. **Les phospholipides** sont retrouvés en très grand nombre, il s'agit à plus de 90 % de lécithines.
7. **Les acides biliaires** sont représentés de 60 à 90 % par l'acide cholique et chénodésoxycholique. Ils sont principalement conjugués avec la glycine (12).
8. **Vitamines** : acide folique, vitamine B12...

Tableau 4 : Composants organiques de la bile d'après la référence (13)

	Bile hépatique	Bile vésiculaire
Azote total	51 à 55 mmol/L	250 mmol/L
Urée	3,93 mmol/L	3,3 à 7,5 mmol/L
Choline	4,7 mmol/L	45 mmol/L
Acide urique	0,26 mmol/L	---
Bilirubine	1,11 mmol/L	4,00 mmol/L
Porphyrines	0,15 mmol/L	---
Protéines totales	1,8 à 7 g/L	18 à 28 g/L
Albumine	361 mg/L	---
α -glycoprotéine	54,7 mg/L	---
α 1-antitrypsine		200 mg/L
α 2-macroglobuline	44,5 mg/L	---
IgA	166 mg/L	---
IgG	98,8 mg/L	---
Hydrates de carbone	0,35 à 0,91 g/L	2,4 g/L
Acide lactique	2,0 mmol/L	3,0 mmol/L
Lipides :		
- Lipides totaux	---	77,3 g/L
- Acides gras libres	---	0,96 mmol/L
- Cholestérol	4,63 mmol/L	10,4 mmol/L
- Phospholipides	3,2 mmol/L	33,3 mmol/L
Acides biliaires :		
- Totaux	25 mmol/L	75,3 mmol/L
- Acide cholique	---	44,8 mmol/L
- Ac. chénodésoxycholique	---	29,3 mmol/L
- Ac. désoxycholique	---	17,1 mmol/L
- Ac. lithocholique	---	4,0 mmol/L

C - ETUDE DU DIPYRIDAMOLE

I. INTRODUCTION

Le DIPYRIDAMOLE

2,2',2'',2''' - ((4,8-Dipipéridinopyrimido (5,4-d) pyrimidine - 2,6 -diyl) dinitrilo) tétraéthanol

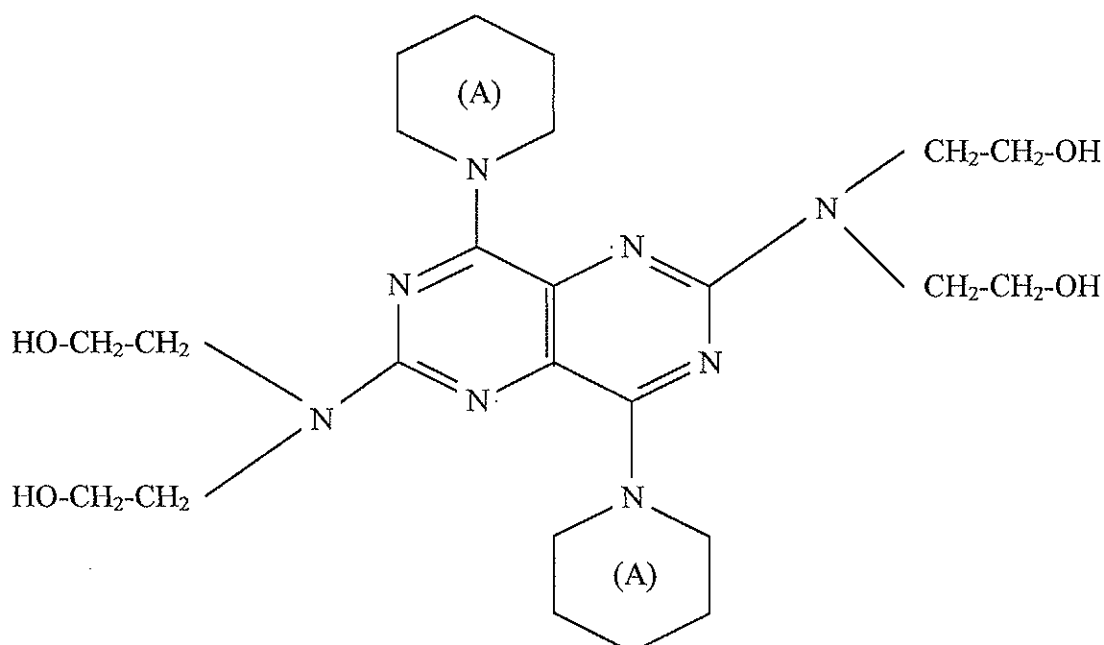
Formule brute : $C_{24}H_{40}N_8O_4$

CAS 58-32-2

pKa = 6,4

Poids moléculaire = 504,6

Formule développée plane



Le dipyriddyamole, composé pyrimidopyrimidique fut, à l'origine, utilisé aux U.S.A. en 1959 comme vasodilatateur coronarien. Aujourd'hui il est utilisé dans l'agrégation plaquettaire, les maladies coronariennes, l'infarctus du myocarde, les maladies neurologiques, ou les troubles de la circulation périphérique....

II. SYNTHESE

La synthèse du dipyridamole est longue et complexe et se fait en six étapes. On utilise des matières premières comme la thiourée, la pipéridine et la diéthanolamine.

A chaque étape, il faut vérifier la pureté des matières premières employées et les conditions opératoires des réactions seront rigoureusement déterminées, ceci pour limiter la formation de produits secondaires (14).

III. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

III.1. CARACTERES

III.1.1. Caractères organoleptiques

Poudre cristalline jaune, peu odorante et de saveur amère.

III.1.2. Solubilité

SOLUBLE	Acides dilués Ethanol Méthanol
PEU SOLUBLE	Eau Chloroforme Ether
TRÈS PEU SOLUBLE	Acétone Acétate d'éthyle Benzène

Sous irradiation en lumière ultraviolette les solutions de dipyridamole dans l'éthanol présentent une fluorescence vert-jaune.

NB : Il faut faire attention car ce test n'est pas spécifique : il existe d'autres substances pouvant donner une fluorescence en présence d'éthanol, telles que :

- acriflavine
- procaïnamide
- quinidine
- penbutolol
- propranolol
- acébutolol
- chlorpromazine

Cette liste n'est cependant pas exhaustive. Lors de la recherche de dipyridamole dans les calculs biliaires, par "*screening*" U.V., il faudra toujours confirmer la nature du médicament par une autre méthode comme la spectrophotométrie infrarouge.

III.2. IDENTIFICATION

III.2.1. Point de fusion

Le point de fusion en tube capillaire mesuré avec un appareil de Totolli est de 167,2°C.

III.2.2. Test de solubilité

Si on dissout 0,1 g de dipyridamole dans 3 ml d'HCl 0,1 N la solution obtenue doit être limpide.

III.2.3. Réactions colorées ou réactions d'halochromie

Avec H_2SO_4 (acide sulfurique) \implies on obtient une coloration jaune.

Avec HNO_3 (acide nitrique) \implies coloration rouge violacée.

III.2.4. Spectre UV/visible

Le spectre dans l'UV présente des maximums d'absorption caractéristiques à (± 3 nm) :

- 283 et 237 nm : solution dans HCl 0,1 N.
- 285 et 230 nm : solution méthanolique acide.
- 295 nm : solution aqueuse alcaline.

Dans le visible on aura une coloration jaune (absorption vers 402-405 nm).

III.2.5. Chromatographie sur couche mince

Plusieurs systèmes de chromatographie sur couche mince ont été utilisés et notamment celui préconisé par G.BEINSENHERZ et ses collaborateurs.

Différentes méthodes ont été résumées dans le tableau suivant :

Technique 1 : G. BEINSENHERZ
et ses collaborateurs (15)

- \Rightarrow Absorbant : Gel de silice G.
- \Rightarrow Solvant de migration : n-butanol/méthyl éthyl cétone (5/2 : v/v)
- \Rightarrow Révélation : lecture directe
- \Rightarrow Résultats : DP $R_f = 0,82$
DP glucuroconjugué $R_f = 0,00$
Métabolites non identifiés à des R_f de 0,31 et 0,50

Technique 2 : ZAC S.B.(16)

- ⇒ Absorbant : Gel de silice fluorescent.
- ⇒ Solvant de migration : n-butanol/méthanol/NH₄OH/H₂O (5/3/1/1 ; v/v)
- ⇒ Révélation : Séchage en obscurité et à température ambiante en U.V. à 356 nm.
- ⇒ Résultats : DP Rf = 0,90
DP monoglucuronocconjugué Rf = 0,67
Spot allongé à 2 cm Rf 0,40

III.2.6. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Le chromatogramme du mélange étalon (indométhacine + dipyridamole) est présenté à la figure 15 page 123.

III.2.6.1. Définition de la chromatographie

La chromatographie est une méthode d'analyse immédiate, qui permet de séparer les constituants d'un mélange, en utilisant les différences entre les constantes d'équilibre de ces corps, lors de leur partage entre une phase mobile dans laquelle ils sont solubles, et une phase fixe ou stationnaire qui exerce sur eux un effet retardateur.

Sous l'influence de ces deux effets antagonistes : effet d'entraînement exercé par la phase mobile et effet de rétention exercé par la phase stationnaire, les constituants du mélange se déplacent à des vitesses différentes et sont séparés.

Le phénomène ou les procédés utilisés varient selon les types de méthodes choisies, mais, elles ont toutes en commun un certain nombre de principes :

- a) Les composés se répartissent dans deux phases non ou très peu miscibles jusqu'à l'établissement d'un équilibre. Cette répartition dépend des propriétés de chacun des composés vis à vis des phases considérées.
- b) Le renouvellement continu de la phase mobile remet en cause cet équilibre et entraîne, par une succession d'autres équilibres, la migration des substances tout au long de la phase stationnaire.
- c) La séparation des différents composés tient au fait que chaque constituant migre avec une vitesse qui lui est propre.

III.2.6.2. Application à la CLHP

La CLHP a un vaste champ d'applications analytiques et permet notamment l'analyse de molécules non volatiles, thermosensibles et de polarité élevée. Elle se caractérise par la grande diversité des phénomènes physiques qu'elle exploite : adsorption, partage, échange d'ions, exclusion et diffusion (5).

Les débuts de la chromatographie en phase liquide remontent à 1958. Elle était peu utilisée jusqu'à ces dernières années à cause de la lenteur des séparations et de l'absence de détecteurs adaptés.

La lenteur des séparations était liée aux faibles vitesses d'élution qui étaient nécessaires en raison de l'efficacité médiocre des colonnes utilisées ($0,001 \text{ cm.s}^{-1}$ à $0,01 \text{ cm.s}^{-1}$).

Actuellement, on opère avec des vitesses linéaires de la phase mobile de l'ordre de $0,1 \text{ cm.s}^{-1}$ à 1 cm.s^{-1} qui sont des vitesses comparables à celle de la chromatographie en phase gazeuse dont elle est complémentaire.

On parlera ainsi de chromatographie "à grande vitesse", "sous haute pression", de "haute performance" ou plutôt de "haute résolution".

Nous nous limiterons à cette forme moderne de la chromatographie en phase liquide et au cas du développement par élution seul utilisé en analyse.

III.2.6.3. Caractéristiques de la CLHP

Ces caractéristiques sont en relation directe avec la nature de la phase mobile qui est liquide et s'opposent à celle d'une phase mobile gazeuse sur trois points :

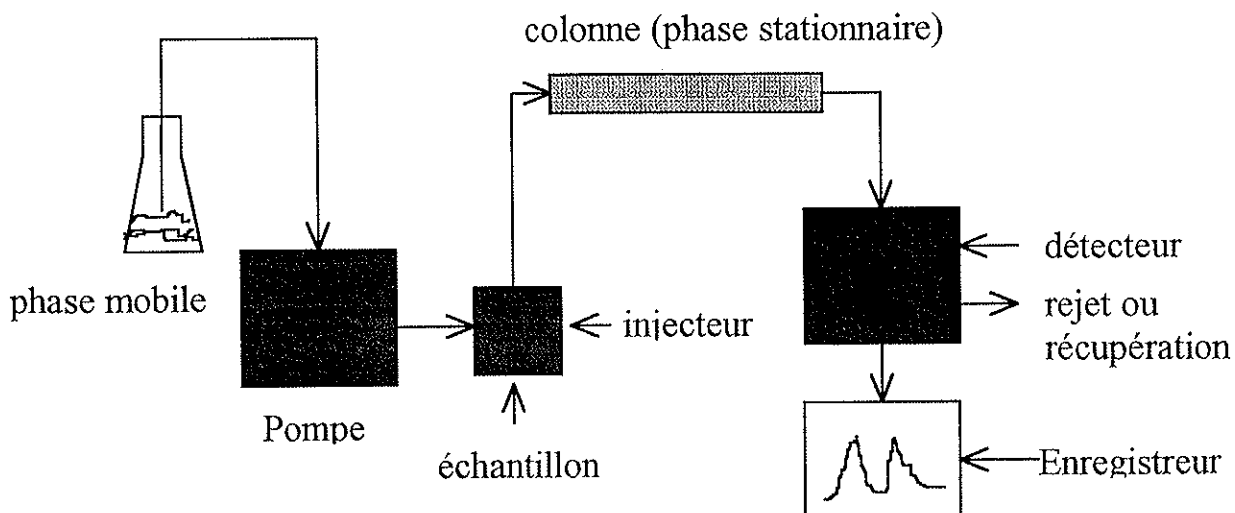
- ◆ la viscosité des liquides est 100 fois supérieure à celle des gaz,
- ◆ les liquides sont incompressibles jusqu'à 600 bars,
- ◆ les coefficients de diffusion des molécules et des liquides sont faibles (de l'ordre de $10^{-9} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ contre $10^{-4} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ dans les gaz).

Ces caractéristiques interviennent :

- ◆ au niveau de l'écoulement de la phase mobile dans la colonne (viscosité, compressibilité)
- ◆ au niveau de la valeur de la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT).

III.2.6.4. Appareillage et schéma

L'appareillage utilisé doit être capable de supporter des pressions élevées imposées par la très fine granulométrie des phases stationnaires. Il est pour cela formé de matériaux en acier inoxydable résistant à la corrosion chimique des phases mobiles liquides.



Dans cet appareillage on trouve :

- ◆ un réservoir de phase mobile dont la contenance est de 1 à 2 litres pour les appareils commerciaux les plus courants,
- ◆ une pompe qui provoque l'écoulement de la phase mobile dans la colonne,
- ◆ un injecteur permettant l'introduction des échantillons et qui peut être un procédé par injection directe ou par boucle,
- ◆ une colonne qui se caractérise par sa géométrie et par la nature de la phase qu'elle contient. Son diamètre varie en fonction du mode de chromatographie :
 - * 1 mm : chromatographie à microdébit (vitesse linéaire constante ; la diminution du diamètre de la colonne réduit la valeur du débit nécessaire).
 - * 4,6 mm : on aura un diamètre qui correspond à celui d'une chromatographie classique.
 - * 8 mm : on aura ici un diamètre qui correspond au domaine de la chromatographie préparative.
- ◆ Une phase stationnaire dont la caractéristique essentielle est sa granulométrie et qui est constituée de fines particules poreuses de silice ou d'alumine de forme irrégulière ou homogène.
- ◆ Une phase mobile qui sera choisie par nombre de contraintes pratiques imposées par son comportement vis à vis des échantillons de la phase stationnaire et de l'appareillage utilisé.
- ◆ Un système de détection et d'enregistrement avec deux possibilités :
 - * soit une détection basée sur une modification par les substances d'une propriété de la phase mobile.

Ce sont des moyens de détection peu spécifiques mais qui s'appliquent à un très grand nombre de composés. Ils font appel à des propriétés physiques générales de la phase mobile, modifiées quantitativement lorsqu'une substance y est dissoute. On pourra avoir une variation de la conductivité, de la constante diélectrique ou de l'indice de réfraction.

* soit une détection basée sur une propriété spécifique des substances.

On utilisera essentiellement la spectrophotométrie UV, car les propriétés de la lumière dans le domaine UV/visible et les réponses de nombreux composés à ces longueurs d'onde ont, depuis longtemps, été considérées comme des outils puissants dans l'identification et surtout l'analyse quantitative des molécules à activité thérapeutique. La spectrophotométrie d'absorption UV/visible requiert l'utilisation de détecteurs donnant une réponse dans l'UV lointain jusqu'au proche infrarouge, une large gamme dynamique, une réponse linéaire, un faible bruit de fond et une stabilité thermique aussi bonne que possible. Récemment les barrettes de photodiodes ont été proposées comme détecteurs spectrophotométriques UV/visible et répondent à ces exigences avec l'avantage supplémentaire de pouvoir acquérir simultanément le spectre dans son intégralité.

Puisque l'acquisition spectrale est un processus "parallèle" à la mesure d'absorbance, un grand nombre de problèmes rencontrés par les analystes, tels que la photodégradation de l'échantillon, la non-linéarité du balayage, des longueurs d'onde et des difficultés à observer des phénomènes éphémères ont été diminuées sinon éliminées.

On pourra également utiliser la spectro-fluorimétrie, la détection électrochimique, et dans certains cas, la polarimétrie ou la mesure de radioactivité.

III.2.6.5. Optimisation des conditions chromatographiques

L'optimisation des conditions chromatographiques est guidée par plusieurs nécessités :

- ◆ il faut une résolution maximum,
- ◆ le temps d'analyse et la perte de charge doivent être les plus faibles possible,
- ◆ il faut faire le bon choix chromatographique.

La résolution

Elle comprend la sélectivité, le facteur de capacité et l'efficacité. Sa valeur doit être supérieure ou égale à 1. Cet objectif peut être atteint en augmentant la sélectivité, le facteur de capacité et le nombre de plateaux. L'importance respective de chacune de ces grandeurs fondamentales sur l'expression de la résolution doit être envisagée.

La sélectivité

Elle doit être supérieure à 1 et elle correspond à l'ensemble des interactions du soluté et de chacune des deux phases.

Le facteur de capacité

Il représente la rétention du composé qui, dans l'analyse considérée est le plus retenu dans la phase stationnaire. La résolution augmente avec sa valeur. Les meilleures conditions d'élution sont réunies quand le facteur de capacité est compris entre 1 et 10.

L'efficacité

Le nombre de plateaux intervient dans l'expression de la résolution. On cherchera à diminuer la HEPT en optimisant les paramètres précédemment évoqués comme :

- ◆ la phase mobile,

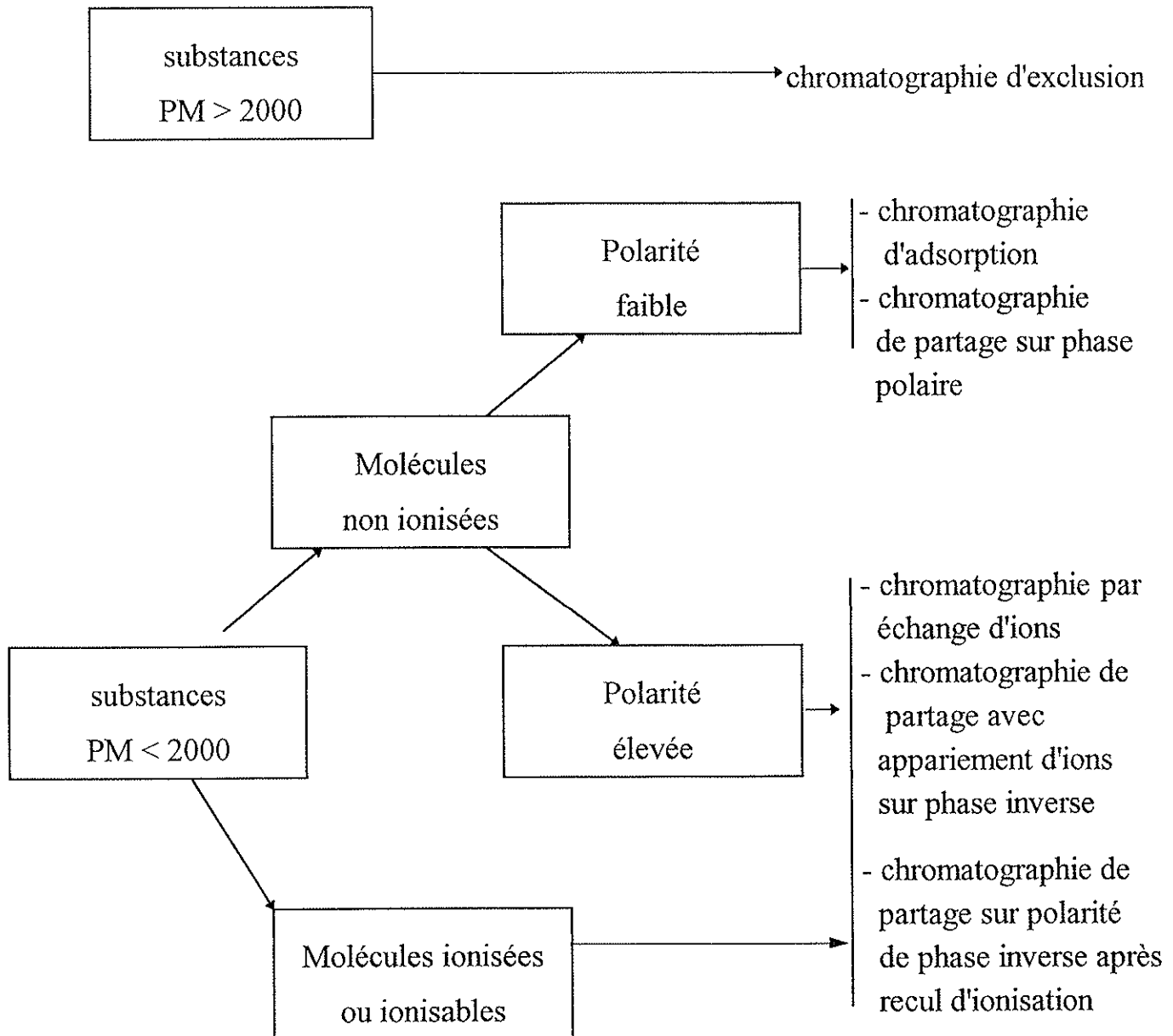
- ◆ le diamètre des particules de la phase stationnaire qui devra être le plus faible possible (3 à 5 μm),
- ◆ la méthode de remplissage de la colonne,
- ◆ les caractéristiques géométriques de la colonne,
- ◆ le niveau et le volume d'injection du soluté.

III.2.6.6. Conclusion

L'optimisation du temps d'analyse et de perte de charge nécessite de maintenir une résolution constante. On montre que, à résolution et à perte de charge constante, le temps d'analyse diminue avec le diamètre des particules de phase stationnaire ce qui explique le développement de la chromatographie liquide haute performance depuis l'apparition sur le marché de phases de 3 μm .

De plus, la connaissance des poids moléculaires, des polarités et des caractères ioniques des solutés, va orienter le choix du procédé chromatographique à mettre en oeuvre pour réaliser leur séparation.

Le tableau qui suit, schématise toutes les situations auxquelles l'analyste peut être confronté.



III.2.7. Spectre infrarouge du dipyridamole

III.2.7.1. Introduction

La spectrophotométrie infrarouge (IR) est une technique d'analyse efficace, simple, rapide et précise. C'est donc la méthode de choix dans l'analyse de routine des calculs.

III.2.7.2. Principe

L'irradiation d'une molécule par un rayonnement électromagnétique du domaine de l'infrarouge entraîne des mouvements de vibration et de rotation des différents atomes de la molécule entre eux. Ainsi, à chaque groupe d'atomes susceptible d'entrer en vibration ou en rotation suivant une fréquence qui lui est propre, correspond une bande d'absorption à une longueur d'onde déterminée d'où, des fréquences de groupe caractéristiques présentées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Fréquences d'absorption caractéristiques de quelques groupes fonctionnels

<i>Groupe</i>	<i>Fonction</i>	<i>Région cm^{-1}</i>	<i>Intensité</i>
C-H	Alcane	2965-2850 ((valence)	forte
	-CH ₃	1450 (ciseau)	moyenne
		1380 (ciseau)	moyenne
	-CH ₂ -	1465	moyenne
	Alcène	3095-3010 (valence)	moyenne
		700-1000 (torsion)	forte
	Alcyne	3300 (approx.)	forte
Aldéhyde		2900-2820	faible
		2775-2700	faible
C-C	Alcane	700-1200 (peu utilisable)	faible
	Alcène ⁽²⁾	1680-1620	variable
	Alcyne ⁽²⁾	2260-2100	variable
C=O	Cétone	1725-1705	forte
	Aldéhyde	1740-1720	forte
	Acide carboxylique	1725-1700	forte
	Ester	1750-1730	forte
	Amide	1700-1630	forte
	Anhydride	1850-1800	forte
C-O	Alcool, ester, Acide carboxylique, éther	3650-1000	forte
-O-H	Alcool		
	monomère	3650-3590	variable et fine
	associé	3400-3200	forte et large
	Acide carboxylique		
	associé	3300-2500	variable et large
-N-H	Amine primaire et amide	3500 (approx.), valence ^(b)	moyenne
	Amine secondaire et amide	3500 valence ^(b)	moyenne
C≡N	Nitrile ^(a)	2260-2240	moyenne
C-X	Fluoro	1400-1000	moyenne
	Chloro	800-600	forte
	Bromo	600-500	forte
	Iodo	500 (approx.)	forte

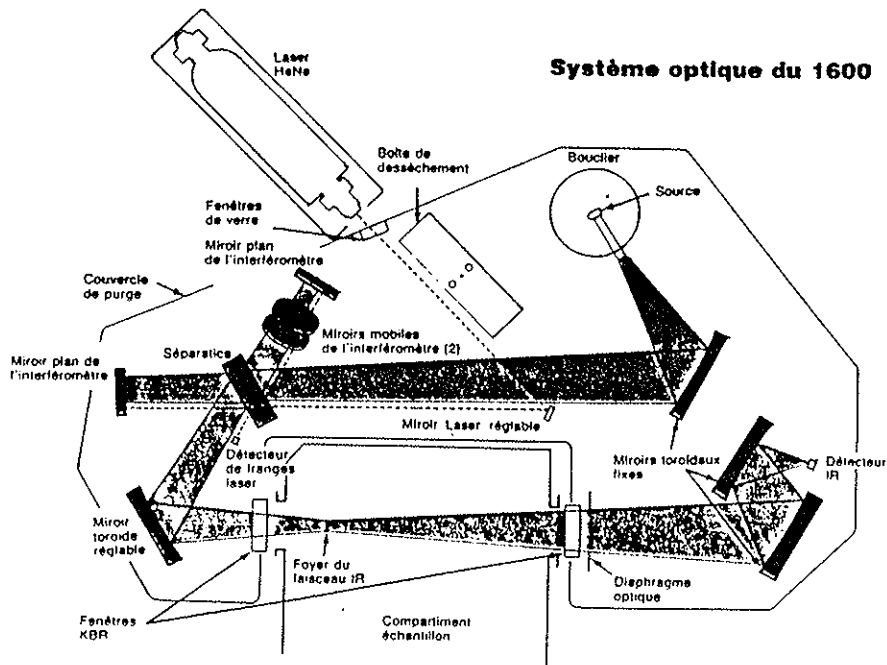
(a) Non conjugué. La conjugaison avec une liaison multiple abaisse la fréquence d'environ 30 cm^{-1}

(b) Valeur abaissée par liaison hydrogène.

III.2.7.3. Appareillage

Exemple de spectrophotomètre IR à transformée de Fourier

Série 1600 PERKIN ELMER



III.2.7.4. Instrumentation

Les spectrophotomètres IR sont constitués de différentes parties.

a) Les sources de rayonnement

Une source infrarouge est constituée par un filament incandescent qui émet toutes les fréquences en accord avec le rayonnement du corps noir. La quantité d'énergie rayonnée à chaque fréquence augmente avec la température de la source. Dans la plus grande partie du domaine

infrarouge l'énergie émise par la source est proportionnelle à la quatrième puissance de la fréquence.

La source la plus utilisée consiste en un mélange conducteur d'oxydes de terres rares contenu dans un tube étroit appelé tube de Nernst. Cette source est chauffée à 8000 K sans système spécial de refroidissement. On peut également utiliser des filaments de carbure de silicium mais aussi de platine, de rhodium ou de tungstène sous vide.

b) Les miroirs

Tous les systèmes de focalisation sont constitués par des miroirs qui doivent posséder une surface réfléchissante revêtue d'un film d'aluminium ou d'un autre métal.

c) Les fentes

Généralement à bords droits et verticaux on les trouve dans certains spectromètres avec un bord légèrement courbe de façon à diminuer les aberrations de l'image.

d) Les réseaux

Autrefois on employait des prismes aujourd'hui remplacés par des réseaux qui diffractent le rayonnement. Ces réseaux présentent plusieurs avantages : meilleure résolution, gamme de fréquences plus étendue, prix de revient moins élevé, au moins pour les basses fréquences.

La concentration du rayonnement réduit les pertes d'énergie provenant de réflexions d'ordres divers et améliore le rapport signal/bruit.

Les rayonnements parasites peuvent être éliminés à l'aide d'un petit spectromètre à prisme ou grâce à des filtres mais il n'existe pas de matériau convenant à toutes les régions du spectre infrarouge.

e) Interféromètres de Michelson

Ils sont utilisés dans l'infrarouge lointain (10 à 200 cm^{-1})

f) Les détecteurs thermiques

Les détecteurs infrarouges courants sont des thermomètres rapides, à faible capacité thermique, dans lesquels un système électrique enregistre les élévations de température dues à l'irradiation par les rayons infrarouges. Ils doivent être sensibles à de très faibles variations de chaleur et revenir à leur état initial dès que le rayonnement est supprimé. On trouvera ainsi très souvent des dispositifs constitués par un récepteur placé sous vide et relié à un thermocouple.

g) Les détecteurs quantiques

L'utilisation de détecteurs photoconducteurs permet d'abaisser le seuil de l'énergie détectable. Il s'agit essentiellement de semi-conducteurs dont les électrons peuvent être excités par les quanta infrarouges, jusqu'aux niveaux de conduction de plus basse énergie. Il en découle une variation de la conductibilité.

h) Spectromètres enregistreurs

Les spectromètres à double faisceau ont été conçus pour éliminer les sources d'erreur provenant de l'absorption par la vapeur d'eau atmosphérique ou le gaz carbonique. On peut aussi réaliser un balayage à l'azote ou placer l'ensemble du spectromètre sous vide.

Dans les spectromètres double faisceau, deux rayons issus de la même source, suivent un trajet différent : l'un traverse l'échantillon, l'autre une cellule vide ou tout autre système de référence. L'enregistreur indique le rapport d'intensité entre les deux rayons.

i) Les échantillons

- Les gaz et les liquides volatils sont contenus dans des cellules à gaz.
- Les liquides sont étudiés dans de petites cellules dont les fenêtres sont à choisir en fonction du type d'échantillon étudié (bromure de potassium pour les solvants organiques apolaires, ...).
- Pour les poudres :
 - * en dessous de 1300 cm^{-1} on peut utiliser du Nujol (paraffine liquide),
 - * au-dessus on utilise un liquide halogéné (hexachlorobutadiène).

On peut également faire un pastillage avec du bromure de potassium qui, une fois comprimé sous vide, devient transparent ou utiliser d'autres techniques d'échantillonnage telle que la réflexion diffuse.

- Certains solides peuvent être comprimés ou fondus pour donner un film transparent.

Enfin solides et liquides peuvent être étudiés en solution pourvu que l'on trouve le solvant qui sera transparent à la longueur d'onde qui nous intéresse.

III.2.7.5. Cas du spectromètre à transformée de Fourier

La faible énergie portée par le rayonnement infrarouge a longtemps été un obstacle à la détermination de spectres sur de petites quantités de substances. En effet, les différences d'intensité lumineuse détectées étaient alors insuffisantes pour obtenir un tracé satisfaisant, d'autant plus que l'utilisation d'un système dispersif et la sélection à l'aide d'un monochromateur entraînaient une perte importante de l'énergie émise par la source. Il en résultait la nécessité de disposer d'au moins un milligramme d'échantillon pour réaliser une détermination convenable.

Depuis quelques années, sont apparus des appareils fondés sur une toute autre approche. Grâce à l'augmentation de l'énergie lumineuse envoyée sur l'échantillon, ils permettent une diminution corrélative de la masse de celui-ci. Le principe en est le suivant : l'envoi d'une lumière infrarouge polychromatique (spectre continu) sur la substance à étudier, entraîne une absorption simultanée aux différents nombres d'ondes. La séparation des différentes radiations et la mesure de l'énergie absorbée pour chacune d'elles est réalisée en utilisant un système de franges d'interférence à deux ondes.

Un bref rappel sur ce phénomène paraît souhaitable.

En lumière monochromatique visible, un tel système est formé de franges brillantes ou obscures selon que la différence de marche entre les deux ondes est ou non, un multiple de la longueur d'onde initiale.

Dans le cas d'une lumière polychromatique visible, les raies brillantes correspondant aux différentes couleurs, sont situées dans des positions différentes selon la valeur de leurs longueurs d'onde. Il se produit donc un phénomène de dispersion. En infrarouge, comme dans le domaine précédent, la mesure de l'intensité lumineuse de chaque frange permet de déterminer un interférogramme.

La transformée de Fourier de l'enregistrement ainsi obtenu, fonction de la différence de marche, permet d'obtenir une courbe dépendant de la fréquence (ou du nombre d'ondes) c'est-à-dire un spectre.

De tels appareils permettent des mesures qualitatives et même quantitatives sur des échantillons de très faible masse, telles que celles contenues dans un effluent à la sortie d'un chromatographe. Ils rendent également possible la mesure de petites variations d'absorption, par exemple, celles obtenues sur un solvant pur et sur une solution dans ce même solvant, même si celui-ci présente une absorbance non négligeable en infrarouge. C'est notamment le cas de l'eau.

III.2.7.6. Enregistrement des spectres IR du dipyridamole

a) Pastillage KBr

Le bromure de potassium anhydre est employé car il n'absorbe pas dans l'I.R. entre 0,23 et 25 μ m.

D'après le Clarke's "Isolation and Identification of Drugs" (17) les six pics principaux du dipyridamole sont relevés à 1526, 1214, 1010, 1076, 1041 et 1251 cm^{-1} .

Le spectre réalisé sur un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier Bruker IFS 48, équipé d'un passeur linéaire d'échantillon

(nombre de spectres = 128, résolution = 4 cm^{-1}) est présenté page suivante : (figure 9 - tableau 6).

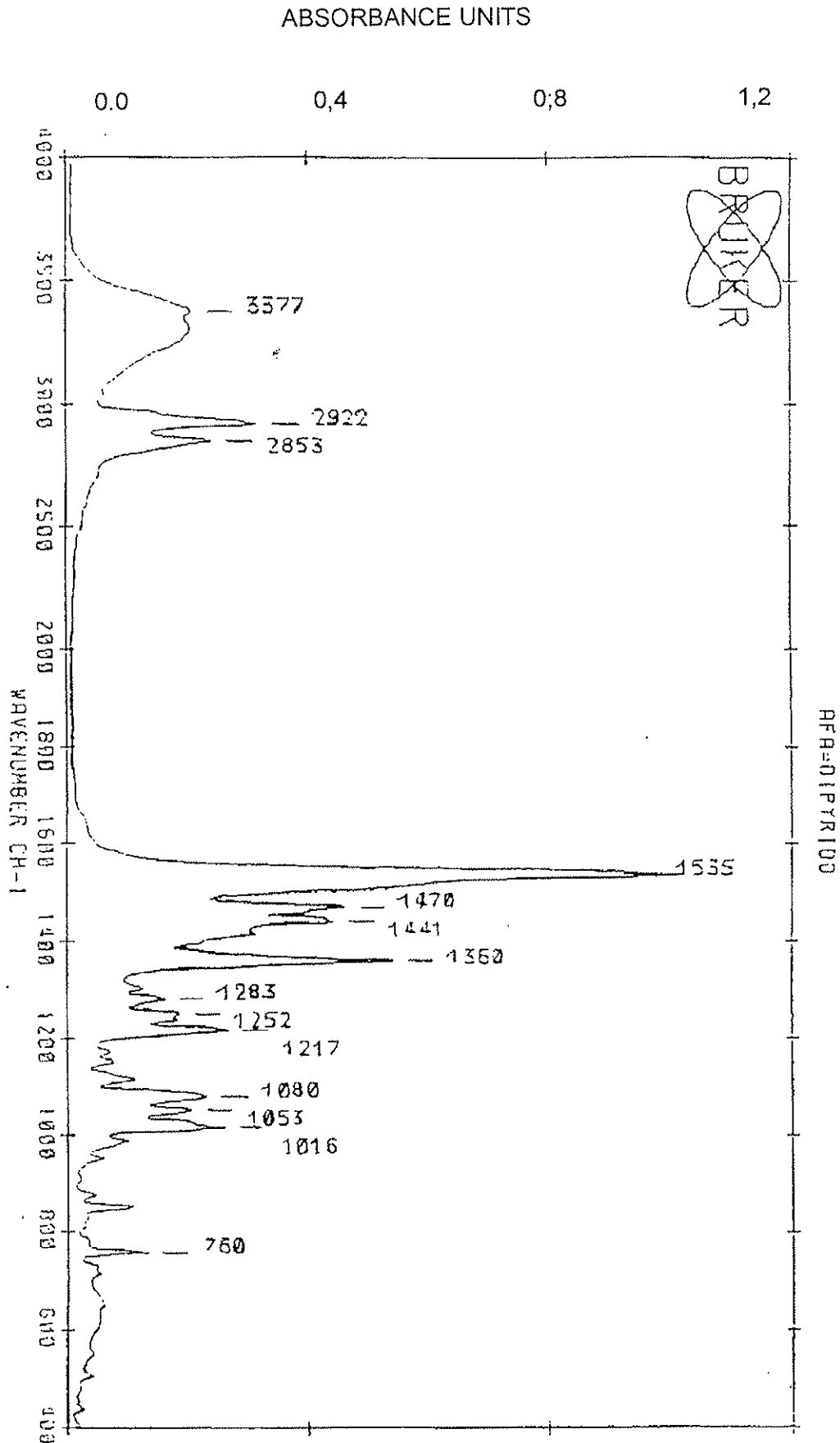


Figure 9 : Spectre infrarouge du dipyrindamole

TABLEAU DE PICS

PEAK TABLE FILE : DIPYRIDO
 ABSORBANCE
 26 PEAKS.
 SENSIVITE: 90

NO	WAVE-NO	REL.INTENSITY	WIDTH CM ⁻¹
1	505.322	3.75	12
2	653.833	5.30	125
3	715.480	4.72	33
4	759.912	12.42	8
5	854.419	10.24	12
6	879.492	3.94	15
7	952.783	5.28	15
8	991.357	9.16	46
9	1016.431	25.19	31
10	1053.076	19.75	29
11	1080.078	22.21	31
12	1116.724	10.51	25
13	1149.512	6.95	29
14	1174.585	6.49	25
15	1217.017	25.73	19
16	1251.733	17.78	56
17	1282.591	15.29	31
18	1303.809	11.96	33
19	1359.741	52.85	21
20	1415.674	30.42	35
21	1440.747	43.50	46
22	1469.678	44.75	19
23	1535.254	100.00	35
24	2852.563	23.20	96
25	2921.997	30.73	52
26	3377.173	19.98	309

R1

FUI OFL=DIPYDIDO
 INFO OR FILE DIPYRIDO.DATA
 ABSORBANCE SPECTRUM FILE
 MEASURED ON IFS 48
 BASELINE CORRECTION DONE
 ZFF=2
 SCN=128 SCL=1 FFP=4002.075195 FLP=397.314453
 GAIN=0
 SNM=MEDICAMENT SFM=PASTILLE-KBR
 RES=4.0 COR=NO VEL=6
 VDS=0.0 VDE=0.0
 AFP=TR BPC=0.9 BPD=1.0 HZ=ML SPZ=NO SVI=NO PIP=128 PTS=1024

Tableau 6 : Pics caractéristiques du dipyridamole

b) Solution chloroformique

A la concentration de 5 % P/V et entre 2,5 et 16 microns, le spectre est le suivant : (18)

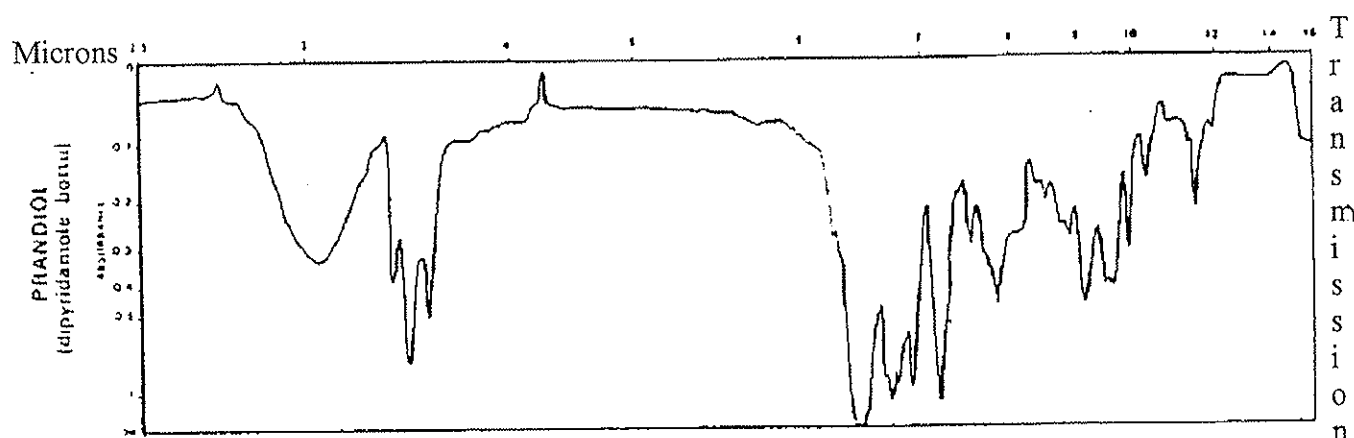


Figure 10 : Spectre du dipyrindamol en solution chloroformique

III.2.7.7. Interprétation du spectre infrarouge du dipyrindamol

L'interprétation est faite à partir des données du tableau 6 et en considérant séparément trois motifs structuraux.

a) Groupe pyrimido (5,4-d) pyrimidine :

Les hétérocycles hexagonaux azotés présentent des bandes d'absorption similaires à celles des hétérocycles carbonés. En effet, lors du remplacement d'un groupe CH du benzène par un atome d'azote, l'effet de masse est réduit et la distribution électronique, facteur essentiel dans la détermination des constantes de forces est pratiquement identique.

Les spectres IR de ces deux catégories de composés présentent donc beaucoup d'analogies et les attributions du système pyrimido-pyrimidine sont semblables à celles du naphthalène.

Les bandes d'absorption sont d'autant moins nombreuses que :

- l'absence d'atomes d'hydrogène sur le système aromatique du dipyridamole interdit les vibrations de valence C-H aromatique,
- le caractère symétrique de la molécule interdit l'activité infrarouge des liaisons cycle-substituant.

Seules subsistent les bandes liées aux vibrations de valence du système polycyclique aromatique à 1535 et 1441 cm^{-1} .

b) Groupe diethylamino-éthanol :

Seules les vibrations liées à la présence de la fonction alcool sont spécifiques, à savoir :

- vibration de valence OH : massif à 3377 cm^{-1} dont la largeur à mi-hauteur (309 cm^{-1}) reflète l'association moléculaire importante existant à l'état cristallin,
- les vibrations de déformation O-H et de valence C-O sont d'attribution moins certaines mais pourraient logiquement être respectivement attribuées aux bandes situées à 1217 et à 1016 cm^{-1} ,
- les bandes liées à la présence des groupes méthylène et C-N sont communes avec le troisième motif structural.

c) Groupe pipéridino :

- l'accroissement de l'ordre de la liaison C-N dû à la conjugaison avec le système aromatique pyrimido-pyrimidine entraîne une augmentation de la fréquence de la vibration de valence C-N qui se situe à 1360 cm^{-1} ,
- dans les systèmes acycliques saturés non tendus, les vibrations de valence des groupes CH_2 ont pratiquement les mêmes fréquences que dans les hydrocarbures saturés acycliques,
- vibration de valence C-H symétrique : 2853 cm^{-1} ,

- vibration de valence C-H asymétrique : 2922 cm^{-1} .

Parmi les modes de vibrations de déformation du groupe CH_2 le plus caractéristique est la vibration de cisaillement à 1470 cm^{-1} .

Les autres modes de vibration du cycle pipéridine varient en fonction de la conformation des groupes méthylène (liaisons axiales ou équatoriales) et ne peuvent donc être attribués sans une étude cristallographique de la molécule.

III.3. DOSAGES

III.3.1. Protométrie en milieu non aqueux

Elle se fait par l'acide perchlorique en présence de violet de méthyle.

- ◆ Peser une partie exactement mesurée de 100 mg = soit "p" et la dissoudre dans 20 ml d'acide acétique pur, cristallisable.
- ◆ Doser la solution obtenue par une solution 0,1 N d'acide perchlorique en présence de violet de cristal comme indicateur coloré, jusqu'à coloration vert foncé.

NB = le point d'équivalence de ce dosage est très difficile à apprécier en raison de la fluorescence du produit (19).

$$T \% = \frac{n \times t \times 25,23 \times 100}{p \times t'}$$

Sachant que :

- T : % de pureté.
- 1 ml d'une solution 0,1 N d'acide perchlorique correspond à 25,23 mg de dipyridamole.

- n = chute de burette d'acide perchlorique en ml.
- p = prise d'essai en mg
- t = titre réel de l'acide perchlorique
- t' = 0,1 N = titre théorique de l'acide perchlorique.

III.3.2. Dosage spectrophotométrique dans l'U.V.

Ce dosage se fait à $283 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$ et par comparaison avec une solution étalon.

Le solvant utilisé est HCl 0,1 N (appareil utilisé : spectromètre Kontron Uvicon 860).

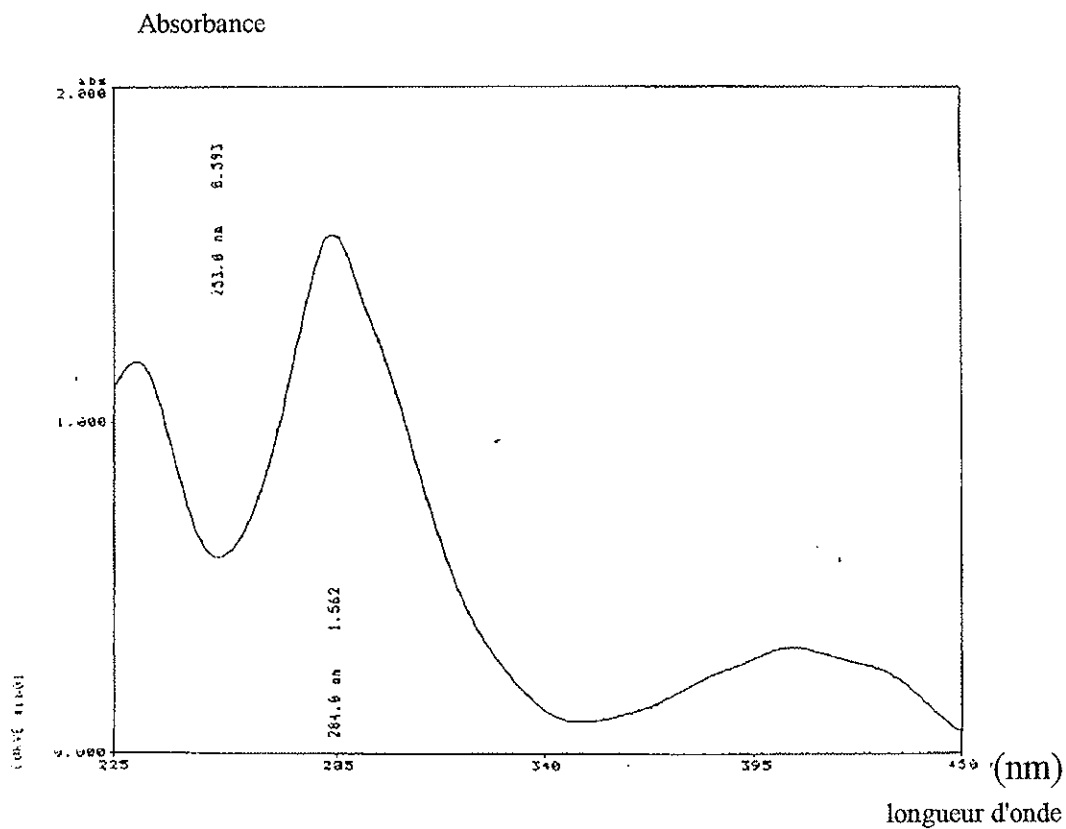
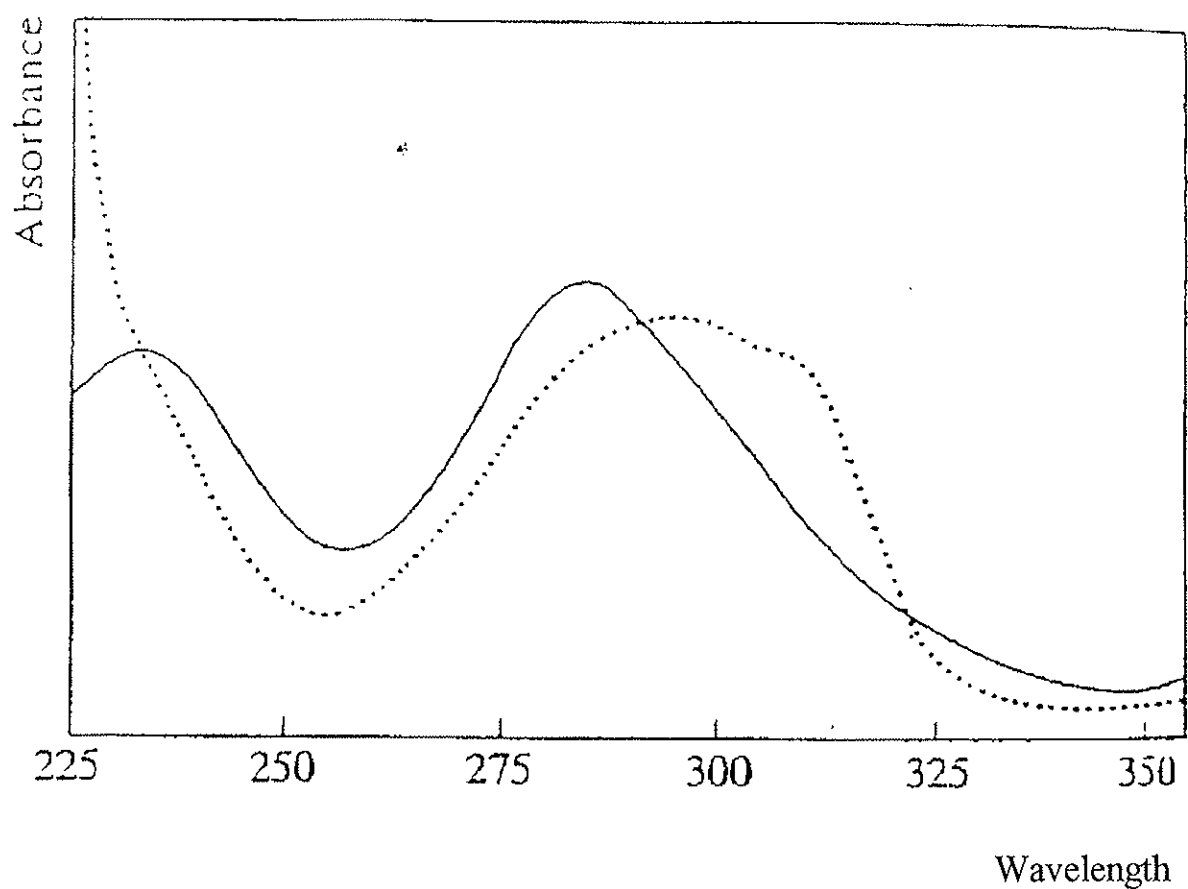


Figure 11 : Spectre du dipyrindamole dans l'U.V.



————— en solution méthanolique acide
pics : 230, 285 nm

..... en solution aqueuse
pic : 195 nm

(15)

Figure 12 : Comparaison entre le spectre du dipyrindamole obtenu en solution méthanolique et celui obtenu en solution aqueuse.

IV. PHARMACOCINETIQUE

IV.1. ABSORPTION

Le dipyridamole est absorbé au niveau proximal de l'intestin grêle et son absorption est rapide. Le pic plasmatique est obtenu entre 30 et 90 minutes après la prise du médicament.

L'ingestion concomitante d'aliments diminue l'absorption digestive de la molécule (19).

IV.2. DISTRIBUTION

La dipyridamole diffuse dans les tissus bien perfusés, mais également au niveau du tissu adipeux. Le dipyridamole est métabolisé au niveau du foie et peut également se retrouver dans le muscle cardiaque, les reins et les surrénales.

Il ne passe pas la barrière méningée.

Le volume de distribution Vd est de 2,5 l/kg.

La liaison protéique est supérieure ou égale à 90 % dans le plasma.

IV.3. METABOLISATION

Le dipyridamole est transformé en dérivé glucuronoconjugué au niveau hépatique.

Tous les dérivés ne sont pas éliminés dans la bile, mais l'élimination pourra être différée par passage dans le cycle entéro-hépatique (passage à peu près équivalent à 16 %).

En effet, le taux de dipyridamole libre dans la veine sus-hépatique est plus bas que celui mesuré dans la veine cubitale, et inversement pour le taux de dérivés glucuronoconjugués.

Dix à vingt minutes après une administration intraveineuse, la concentration du dérivé conjugué augmente au niveau des veines sus-hépatiques.

La bile a une très forte capacité de concentration du dipyridamole et de ses dérivés glucuronoconjugués.

BEISENHERZ a démontré sur les chiens que le dipyridamole monoglucuronoconjugué formé au niveau hépatique pénètre dans l'intestin avec la bile où il est hydrolysé par une β -glucuronidase pour libérer le dipyridamole libre dans l'intestin.

IV.4. EXCRETION

La demi-vie plasmatique après prise orale est très variable selon les auteurs. Elle est en général comprise entre 90 et 150 minutes.

L'élimination étant principalement biliaire, c'est en majorité dans les fèces que l'on retrouve le dipyridamole.

La constante d'élimination est de $0,0283 \text{ min}^{-1}$.

L'excrétion rénale est inférieure à 5 %. Les taux urinaires sont donc très faibles et ne sont pas assez significatifs même en les cumulant pour constituer une méthode de dosage ou d'analyse fiable de la biodisponibilité du dipyridamole.

NB : L'élimination n'est pas diminuée dans les affections hépatiques malgré une biodisponibilité modifiée.

(79,5 % pour les hépatites chroniques et 48,4 % pour les cirrhoses).

V. PHARMACOLOGIE

V.1. ACTION SUR LES VAISSEaux CORONAIRES

V.1.1. Effet vasodilatateur coronarien

Le dipyridamole augmente de manière importante le flux sanguin coronaire et le contenu en oxygène du sinus coronaire. Cette vasodilatation coronaire est due essentiellement à la potentialisation de l'effet de l'adénosine, vasodilatateur coronarien puissant, normalement libérée par le myocarde (19, 20).

Cette action est le reflet à la fois de :

- ◆ l'inhibition de la captation de l'adénosine par les membranes cardiaques avant sa dégradation enzymatique,
- ◆ l'inhibition de l'adénosine-désaminase, enzyme responsable du catabolisme de l'adénosine, tant au niveau sanguin qu'au niveau myocardique,
- ◆ une augmentation du taux d'AMP cyclique par l'inhibition de la phosphodiesterase et activation de l'adénylcyclase.

V.1.2. Action sur la circulation collatérale

Le dipyridamole peut, dans certaines conditions expérimentales accélérer le développement d'un réseau collatéral de suppléance lorsqu'une artère coronarienne est soumise à une constriction progressive.

Par ce processus, il est admis que l'administration de dipyridamole peut constituer un traitement préventif de l'infarctus du myocarde.

V.1.3. Action sur la consommation d'oxygène

La différence de concentration en oxygène entre le sang artériel et le sang veineux diminue sous traitement au dipyridamole.

La coronarodilatation ne s'accompagne donc pas d'une augmentation de la consommation d'oxygène au niveau du myocarde.

V.2. MODIFICATIONS METABOLIQUES

Le dipyridamole s'oppose, au moins partiellement aux effets d'une hypoxie myocardique provoquée, notamment par la chute des taux tissulaires d'ATP.

V.3. ANTIAGREGANT PLAQUETTAIRE

Le dipyridamole inhibe l'adhésion plaquettaire au collagène et au sous-endothélium, ainsi que le "Release" et l'agrégation plaquettaire induite par les agents classiques, à l'exception de l'ADP.

Cette action sur la plaquette semble procéder à la fois :

- ◆ d'une potentialisation de l'effet de l'adénosine (puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire),
- ◆ d'une augmentation du taux circulant de 2, 3-D.P.G. (diphosphoglycérine = antiagrégant plaquettaire),
- ◆ d'une augmentation des taux d'AMP cyclique intra-plaquettaire (médiateur physiologique de la désagrégation plaquettaire),
- ◆ d'une inhibition de la P.G.E.₂ (Prostaglandine E₂).

V.4. AUTRES PROPRIETES

Sur le plan circulatoire, le dipyridamole possède une activité quasi-sélective sur les coronaires.

Il faut atteindre des doses 10 fois supérieures aux doses coronariennes, pour observer, par voie intraveineuse, un effet hypotenseur léger et fugace, lié à une baisse transitoire des résistances périphériques.

Sur les autres territoires, le dipyridamole semble dépourvu d'effets aux doses pharmacologiques expérimentales.

VI. INDICATIONS

VI.1. MALADIES CORONARIENNES

Le dipyridamole est utilisé en traitement d'appoint des maladies coronariennes et il est souvent associé à l'aspirine. On l'utilise contre :

- ◆ les risques de rechute de l'infarctus du myocarde,
- ◆ l'angor.

Cette molécule, capable d'augmenter la circulation coronaire, de préférence aux autres lits vasculaires, est utilisée dans le traitement de l'angine de poitrine (19).

En administration ponctuelle, son action thérapeutique s'avère modeste.

Ce manque d'effet bénéfique pourrait trouver son explication dans les phénomènes de "vol coronaire" qu'induit cette molécule par augmentation du flux coronaire total, aux dépens des zones ischémiées.

VI.2. COMPLICATIONS THROMBOEMBOLIQUES SUR LES PROTHESES DE VALVES

Des études ont montré une baisse de la fréquence des complications thromboemboliques par une prophylaxie à base de dipyridamole.

VI.3. PREVENTION ET TRAITEMENT DES THROMBOSES ARTERIELLES

Des résultats favorables et prometteurs ont été obtenus avec l'aspirine et le dipyridamole dans le traitement d'épisodes ischémiques transitoires dus à des microthrombus situés dans les artères carotidiennes.

VI.4. AUTRES INDICATIONS

- ◆ Les glomérulonéphrites prolifératives.
- ◆ Les greffes rénales ou cardiaques.
- ◆ Les dialyses rénales au cours desquelles le dipyridamole permet d'obtenir une réduction de l'hyperconsommation plaquettaire au niveau de la membrane de dialyse.

VII. CONTRE-INDICATIONS

Aucune contre-indication n'est mentionnée au VIDAL.

VIII. EFFETS SECONDAIRES ET INDESIRABLES

A des posologies élevées, on a pu relever dans certains cas :

- ◆ troubles gastro-intestinaux, sous forme de nausées, vomissements et diarrhées,
- ◆ hypotension,
- ◆ céphalées,
- ◆ rashes cutanés,
- ◆ bouffées de chaleur.

Ces effets liés à la vasodilatation et aux fortes doses surviennent le plus souvent en début de traitement et cèdent lors de sa poursuite. Le fractionnement des prises et l'augmentation progressive de la posologie permettent généralement de les éviter.

Chez certains sujets, par voie injectable et à forte dose, il existe une possibilité de déclenchement de crise angineuse par phénomène de "vol coronarien" (Cléridium* 10 mg/2ml) (Persantine* 10 mg/2ml) (18, 19).

IX. INTERACTIONS MEDICAMENTEUSES

L'association aux anticoagulants (héparines, antivitaminiques K) et à l'aspirine est possible.

Les associations avec la ticlopidine, la pentoxifylline, et les thrombolytiques seront à prendre en compte, car elles augmentent le risque hémorragique.

X. PRECAUTIONS D'EMPLOI

Il faut éviter d'utiliser des spécialités à base de dipyridamole dans la phase initiale de l'infarctus du myocarde, surtout s'il y a collapsus cardio-vasculaire, ou menace de collapsus, ou également une chute tensionnelle. Il conviendra de maîtriser la défaillance circulatoire avant d'utiliser ces spécialités (19).

L'adaptation devra être progressive pour les fortes doses.

Par mesure de prudence, on évitera la prescription pendant la grossesse, le risque n'étant pas connu, et on évitera l'allaitement pendant le traitement.

Les surdosages accidentels font état, à très fortes doses, de troubles gastriques et de céphalées qui disparaissent rapidement.

XI. POSOLOGIE ET FORMES PHARMACEUTIQUES

XI.1. POSOLOGIE (21)

- ◆ Activité antithrombotique = (per os)
 - * de 100 mg 4 fois par jour à 600 mg par jour
(souvent associé à de l'aspirine ou à un autre anticoagulant)
- ◆ Effet vasodilatateur - traitement de l'angor = (per os)
 - * 100 mg 3 fois par jour.
- ◆ Utilisé aussi en intraveineuse lente comme un adjuvant :
 - * du scanner myocardique au thallium 201
 - * du traitement de la maladie coronarienne.

XI.2. FORMES PHARMACEUTIQUES - SPECIALITES

- CLERIDIUM[®] = 10 mg/2ml
Solution injectable pour intraveineuse lente
ou perfusion (MARCOFINA)
- CORONARINE[®] = comprimés à 75 mg (NEGMA)
- PERKOD[®] = comprimés à 75 mg (BIOGALENIQUE)
- PERSANTINE[®] 25 mg = comprimés
(BOEHRINGER INGELHEIN FRANCE)
- PERSANTINE[®] 75 mg = comprimés
- PERSANTINE[®] 10 mg/2 ml = Solution injectable pour intraveineuse lente
ou perfusion
(BOEHRINGER INGELHEIN FRANCE)
- DIPYRIDAMOLE GNR[®] = gélules à 75 mg (GNR-Pharma)

D - LA LITHIASE BILIAIRE MEDICAMENTEUSE (5)

I. INTRODUCTION

La lithiase biliaire médicamenteuse était jusqu'à une date récente considérée comme induite par certains médicaments capables de modifier la composition de la bile pour la rendre lithogène, sans que ces médicaments ne franchissent la barrière hépatocytaire. C'est ainsi que les contraceptifs oraux, le clofibrate, la ciclosporine et le furosémide prédisposeraient à la survenue de lithiases cholestéroliques par saturation de la bile en cholestérol. La dapsoné, sulfone utilisée pour les affections cutanées, entraîne une hémolyse et favoriserait la lithiase pigmentaire brune. Des substances telles que l'octréotide, la progestérone, les anticholinergiques et les morphiniques ont un effet relaxant de la fibre musculaire lisse, elles peuvent induire une stase vésiculaire favorisant la lithogénèse biliaire.

La découverte en 1988 de calculs biliaires composés pour tout ou partie de médicaments ou de leurs métabolites a permis de mettre en évidence un nouveau type d'effet iatrogène biliaire lié à la précipitation d'une substance médicamenteuse en excès. La glafénine, la ceftriaxone et le dipyridamole sont actuellement incriminés. Pour le dipyridamole, anti-agrégant plaquettaire largement prescrit, les études en cours montrent qu'il pourrait s'agir d'un médicament au fort potentiel lithogène biliaire (*photos 4 et 5*) (22, 23).

II. PHYSIOPATHOLOGIE, EPIDEMIOLOGIE

La formation des calculs biliaires nécessite la conjonction de plusieurs facteurs comme la saturation de la bile, la stase vésiculaire et la précipitation de la substance en excès (24). Ces différentes étapes peuvent être favorisées par l'utilisation de certains médicaments.

II.1. SATURATION DE LA BILE EN CHOLESTEROL

II.1.1. Hormones sexuelles ; contraceptifs oraux et oestrogènes

Les études épidémiologiques ont suggéré qu'il devait exister une relation entre les hormones sexuelles et la lithiase biliaire :

- ⇒ entre 40 et 60 ans, la lithiase cholestérolique est 2 fois plus fréquente chez la femme que chez l'homme,
- ⇒ la lithiase biliaire semble plus fréquente chez les multipares que chez les nullipares;
- ⇒ dans certaines tribus d'Indiens d'Amérique du Nord où la lithiase cholestérolique est très fréquente, celle-ci ne se développe qu'après la puberté.

Le pourcentage de femmes prenant "la pilule" chez les cholécystectomisées est significativement plus élevé que chez les femmes hospitalisées pour une autre affection.

Dans la région de Boston on a estimé également que les cholécystectomies étaient bien plus élevées chez les femmes prenant la "pilule" que chez celles qui ne la prennent pas.... La prise multiplie par deux le risque de lithiase (25).

L'étude de la bile avant et pendant ou pendant et après la prise de contraceptifs oraux a montré que celle-ci était significativement plus concentrée en cholestérol après 75 semaines de traitement. Ces modifications apparaissent réversibles en 14 semaines après arrêt de la "pilule" (26).

Cette saturation a également été retrouvée avec les "pilules mini-dosées" (27).

Ces constatations se sont également révélées positives chez les hommes traités par oestrogènes lors d'un cancer de la prostate (28).

A l'opposé, certains considèrent qu'il est peu probable que les contraceptifs oraux et les oestrogènes jouent un rôle important dans l'étiologie de la lithiase cholestérolique (29).

II.1.2. Clofibrate

Le risque de lithiase est environ 2,4 fois plus important chez les patients traités par clofibrate que chez les témoins.

La saturation biliaire serait liée à une augmentation de la sécrétion du cholestérol et à une diminution de celle des acides biliaires.

II.1.3. Ciclosporine

L'obésité, le diabète et de fortes concentrations sériques en ciclosporine ont été trouvés comme facteurs prédisposants à la lithiase biliaire chez 29 transplantés cardiaques étudiés. La ciclosporine étant essentiellement éliminée par la bile, il est probable qu'elle en altère la composition, notamment par diminution de la sécrétion des acides biliaires (30).

II.1.4. Furosémide

Une étude rétrospective faite chez des enfants a montré une plus haute incidence des calculs chez les sujets traités par furosémide (21 %) que dans le groupe contrôle (2 %).

Les deux groupes étant comparables cela suggère que le furosémide, soit seul, soit en association avec la nutrition parentale, prédispose les enfants au développement d'une lithiase biliaire (31).

II.2. SATURATION DE LA BILE EN BILIRUBINE LIBRE

Les maladies hémolytiques chroniques sont reconnues comme facteur favorisant la lithiase pigmentaire. L'augmentation de la sécrétion biliaire de bilirubine peut, à elle seule, expliquer ce phénomène.

La dapsonne (DISULONE[®]), utilisée dans des affections cutanées et vascularites, a pour effet secondaire principal une hémolyse constante, dose dépendante (surtout si dose > 300 mg/j) et majorée chez les sujets présentant un déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Ainsi, par le même mécanisme que pour les anémies hémolytiques, la prise prolongée de dapsonne a été incriminée comme facteur favorisant la lithiase pigmentaire (21).

II.3. STASE VESICULAIRE

Plusieurs médicaments par leur effet relaxant sur la fibre musculaire lisse peuvent induire une stase vésiculaire favorable à la formation d'une lithiase cholestérolique ou pigmentaire en modifiant la motricité vésiculaire ou le tonus du sphincter d'Oddi.

II.3.1. Octréotide

Des doses journalières de 200 à 100 mg pendant un an et demi ont entraîné l'apparition dans 50 % des cas de calculs détectés par échographie. Ces calculs sont probablement cholestéroliques car radiotransparents et parce qu'ils disparaissent sous traitement dissolvant par les acides biliaires (32).

Le traitement par l'octréotide augmenterait de façon significative le volume résiduel moyen post prandial (5) mais son action sur la motricité vésiculaire est discutée.

II.3.2. Progestérone et médroxyprogestérone

Ces médicaments semblent induire à la fois des troubles moteurs vésiculaires (diminution du remplissage et de l'évacuation vésiculaire) ainsi qu'une augmentation de la sécrétion biliaire de cholestérol.

II.3.3. Les anticholinergiques (34)

L'administration d'agonistes cholinergiques exogènes, in vivo comme in vitro, entraîne une contraction vésiculaire. L'atropine diminue la vidange vésiculaire post-prandiale, ainsi que la vidange vésiculaire secondaire à l'administration de cholécystokinine (CCK) exogène. Elle diminue la pression de base du sphincter d'Oddi, la durée, l'amplitude et la fréquence des ondes de contraction.

II.3.4. Morphiniques

Les opiacés induisent une stase vésiculaire par hypertonie du sphincter d'Oddi. L'administration prolongée de morphine chez le cobaye diminue l'évacuation vésiculaire induite par la CCK (35).

II.4. PRECIPITATION D'UNE SUBSTANCE EN EXCES

II.4.1. Ceftriaxone

La ceftriaxone (ROCEPHINE®) est une céphalosporine de troisième génération possédant une haute activité anti-microbienne et une longue demi-vie. Des articles récents ont montré le développement de "sludge" ou de concrétions dans la vésicule de patients traités avec cet antibiotique.

Ces concrétions disparaissent après arrêt du traitement et le terme de "pseudolithiase" a été utilisé pour décrire ces phénomènes. La ceftriaxone est majoritairement excrétée dans les urines mais 40 % du produit est éliminé par la bile sous forme inchangée.

II.4.2. Glafénine

Antalgique pur de la série des fénines, la glafénine est éliminée chez l'homme à 70 % par voie biliaire et à 80 % par voie rénale.

Cette molécule a été incriminée pour la première fois en 1988 pour son rôle lithogène biliaire (4) mais avait déjà été maintes fois mise en cause dans la genèse de lithiases urinaires médicamenteuses (36).

L'analyse d'un calcul chez une patiente de 76 ans traitée pour lombalgies chroniques par glafénine per os à la dose moyenne de 500 mg/j depuis 18 ans, a montré par spectroscopie infrarouge une teneur en métabolites de glafénine répartis dans le calcul de 60 %.

D'autres cas de calculs à glafénine ont été rapportés.

La fraction médicamenteuse était constituée majoritairement d'acide glafénique libre réparti dans l'ensemble des calculs. La nature non conjuguée du médicament, son association constante à un mélange bilirubinate-palmitate de calcium et une bactériologie biliaire positive, faisaient évoquer une étiopathogénie infectieuse (déglucuroconjugaison des métabolites sous l'influence de bêta-glucuronidases bactériennes).

II.4.3. Dipyridamole

Le sujet de notre étude nous permettra de mieux cerner le cas de lithiases médicamenteuses au dipyridamole mais, aujourd'hui, l'analyse de différents calculs montre déjà des teneurs de 15 à 70 % de dipyridamole non conjugué dans des calculs biliaires. L'association du médicament à un mélange bilirubinate-palmitate de calcium permet déjà d'évoquer une étiopathogénie infectieuse identique à celle des lithiases à glafénine.



Photo n°4 : Section d'un calcul biliaire majoritaire à 70 % en dipyridamole (diamètre 13 mm).



*Photo n° 5 : Récidive de calcul biliaire à dipyridamole (47)
(grossissement x 40)*

**DEUXIEME PARTIE :
ANALYSE**

I. INTRODUCTION

La première partie de ce travail a consisté en une présentation :

- ◆ de généralités sur les calculs biliaires,
- ◆ des propriétés physico-chimiques et thérapeutiques du dipyridamole et d'un récapitulatif sur la lithiase biliaire médicamenteuse.

La deuxième partie va être axée sur l'étude des calculs médicamenteux à dipyridamole.

En 1992 deux patients, un homme et une femme, âgés tous deux de 81 ans et traités pour cardiopathie par PERSANTINE 75[®] ont présenté des calculs médicamenteux cholédociens au dipyridamole (37). Ces deux cas pouvant ne pas être isolés, notre étude a consisté en une recherche systématique de ce médicament dans 240 calculs biliaires extraits au CHU de Limoges.

Le protocole a été le suivant :

- ◆ Test rapide de détection du dipyridamole sous lumière U.V. et sélection des calculs présentant une fluorescence.
- ◆ Etude de ces calculs par :
 - ⇒ chromatographie couche mince
 - ⇒ spectrophotométrie infrarouge
 - ⇒ chromatographie liquide haute performance.

Parallèlement à cette partie analytique, une étude du dossier clinique de ces patients a été réalisée dans le but de mieux cerner l'étiologie de cette pathologie iatrogène.

II. PATIENTS

Les 240 calculs testés provenaient de patients qui ont été hospitalisés dans les Services de Chirurgie du CHU Dupuytren. Les 19 calculs qui fluorescaient provenaient de 10 femmes et 9 hommes âgés en moyenne de 78 ans.

III. MATERIELS ET METHODES

III.1. TEST DE DETECTION RAPIDE DU DIPYRIDAMOLE DANS LES CALCULS

III.1.1. Matériel et réactifs :

Stéréomicroscope Wild M3Z (grossissement 6,5 à 40).

Lampe U.V. avec filtre VL-6LC, 254-235 nm, Réf. Prolabo 05 248-021.

Tubes à essai en verre de 15 ml.

Baguette polyéthylène Normadoses Prolabo.

Ethanol absolu pour analyses, Réf. Merck 100983.

Méthanol pour la chromatographie, LiChrosolv, Réf. Merck 106007.

III.1.2. Méthode

Un fragment représentatif du calcul biliaire à analyser est prélevé sous stéréomicroscopie, introduit dans un tube à essai et finement broyé dans un millilitre de mélange méthanol-éthanol à parts égales.

La fluorescence éventuelle de la suspension alcoolique du calcul est alors recherchée par irradiation ultraviolette à 365 nm.

NB : Le test de détection du dipyridamole dans les calculs biliaires, pour rapide qu'il soit, peut ne pas être spécifique (37). Comme nous l'avons signalé dans la première partie de notre travail, l'acriflavine, l'acébutolol, la chlorpromazine, le penbutolol ou le procaïnamide peuvent également fluorescer. Il est donc impératif de confirmer la présence de dipyridamole par les autres techniques analytiques présentées dans l'introduction.

III.2. ETUDE DU DOSSIER CLINIQUE

Le dossier clinique de chaque patient présentant un calcul répondant positivement au test U.V. a été étudié. La synthèse des renseignements recueillis est présentée ci-après :

BET Al.

79 ans

sexe : F

Hospitalisation pour lithiase vésiculaire, douleurs abdominales.

Calcul pigmentaire noir extrait par cholécystectomie.

Traitement à l'admission au CHU

CLERIDIUM[®] 150 mg posologie : 101 durée : 7 ans
+ CAPTEA[®], VASKYL[®], TANAKAN[®], HAVLANE[®]

Biologie

Globules Blancs (GB) 10200/mm³
Taux de prothrombine (TP) 116 %
Créatinine plasmatique (Créat) 94 µmol/L

Antécédents

- ⇒ hypercholestérolémie
- ⇒ hypertension artérielle traitée.

BRO Ra.

93 ans

sexe : F

Hospitalisation pour douleurs abdominales, vomissements et cholécystite.

Calcul pigmentaire noir extrait par cholécystectomie.

Traitement à l'admission au CHU

PRANDIOL[®] 75 mg posologie : 111 durée : ?
 + LANGURAN[®] 20LP, DIGOXINE[®], LIPANTYL 200[®], TIAPRIDAL[®],
 NOOTROPYL[®], FUMAFER[®].

Biologie

GB	15300/mm ³
TP	82 %
Créat	157 µmol/L
Urée	12,3 mmol/L
Bilirubine Totale (BT)	20,6 µmol/L
Bilirubine Directe (BD)	6,3 µmol/L
Phosphatases Alcalines (PAL)	normal
TGO	augmenté
TGP	normal

Antécédents

⇒ hypercholestérolémie

CHE Se.

80 ans

sexe : M

Hospitalisation pour apparition d'un ictère cutanéomuqueux, température à 40° C, douleurs au niveau de l'hypochondre droit.

Calcul jaune-vert extrait par cholécystectomie.

Traitement à l'entrée

PERSANTINE[®] 75 mg posologie : 111 durée : 12 ans
 + CORDARONE[®], DUXIL[®], TADENAN[®], CYCLOTERIAM[®]

Biologie

GB	23100/mm ³
Créat	271 µmol/L
Urée	30,8 mmol/L
BT	36 µmol/L
BD	17,1 µmol/L
PAL	106 UI/L
TGO	81
TGP	140
Amylasémie	86

La biliculture montre *E. coli*, *Streptococcus faecalis* et *Streptococcus hemophilus*

L'hémoculture montre *E. coli*.

Antécédents

- ⇒ troubles du rythme cardiaque depuis 15 ans
- ⇒ insuffisance rénale

COU Ma.

85 ans

sexe : M

Hospitalisation pour hyperthermie, douleurs abdominales et lithiase vésiculaire.

Calcul pigmentaire brun-noir extrait par cholécystectomie.

Traitement à l'admission au CHU

PERSANTINE[®] 75 mg posologie : 111 durée : ?
 + CORDARONE[®], PRAXILENE[®], LASILIX[®], RAMIPLEX[®],
 FONZYLANE[®], MADECASSOL[®], DUXIL[®]; TANAKAN[®], Morphine.

Biologie

GB	24000/mm ³
TP	normal
Créat	128 µmol/L
Urée	19 mmol/L
BT	26,6 µmol/L
BD	5,7 µmol/L
PAL	131 UI/L
TGO	augmenté
TGP	augmenté
Glycémie	augmentée
Acide urique	augmenté

La biliculture est positive : *candida albicans*

L'hémoculture montre *E. coli*.

Antécédents

- ⇒ lithiase vésiculaire depuis 1991
- ⇒ troubles du rythme cardiaque

FOR Je.

78 ans

sexe : M

Hospitalisation pour cholécystite aigüe lithiasique, hyperthermie à 39° C, douleurs abdominales.

Calcul pigmentaire brun-noir extrait par cholécystectomie.

Traitement à l'admission au CHU

PERSANTINE[®] 75 mg posologie : 111 durée : 12 ans
 + TILDIEM[®], PEXID[®], ASPEGIC 250[®], NITRIDERM TTS 10[®],
 PERMIXON[®]

Biologie

GB	16300/mm ³
TP	normal
Créat	103 µmol/L
Urée	9,7 mmol/L
BT	40,2 µmol/L
BD	7,3 µmol/L
PAL	163 UI/L
TGO	normal
TGP	normal

La biliculture montre *E. coli*

Antécédents

- ⇒ hypercholestérolémie
- ⇒ pontage coronarien

JOR Ma.

61 ans

sexe : F

Calcul pigmentaire extrait par cholecystectomie.

Traitement à l'admission au CHU

PERSANTINE[®] 75 mg posologie : 1111 durée : 10 ans
+ SECTRAL 200[®], CERVOXAN 60[®], OESTROGEL[®], DUPHASTON 10[®],
GINKOR FORT[®], PROZAC 20[®].

Biologie

GB	12500/mm3
Urée	3,6 mmol/L
Bilan rénal	normal
Bilan hépatique	normal
Hémoculture	stérile

LEV Me.

75 ans

sexe : F

Hospitalisation pour ictère avec température à 40° C et douleurs abdominales.

Calcul pigmentaire brun-noir extrait par endoscopie de la voie biliaire principale.

Traitement à l'admission au CHU

PERSANTINE[®] 75 mg posologie : 111 puis 222
 + CORDITRINE[®], CORDIUM[®], JUVEPIRINE[®]. durée : 8 ans

Biologie

GB	11300/mm ³
TP	94 %
Bilan rénal	normal
TGO	120
TGP	209
BT	81 µmol/L
BD	58 µmol/L
PAL	255 UI/L
γGT	417
Amylasémie	239

Antécédents

⇒ Infarctus du myocarde

SAV Yv.

63 ans

sexe : F

Hospitalisation pour lithiase vésiculaire accompagnée d'une hyperthermie et de douleurs abdominales.

Calcul pigmentaire noir extrait par cholécystectomie.

Traitement à l'admission au CHU

PERSANTINE[®] 75 mg posologie : 111 durée : 15 ans
 + RISORDAN LP 20[®], TILDIEM 60[®], MÉDIATOR[®], ZYLORIC 100[®],
 AVLOCARDYL[®].

Biologie

GB	6300/mm ³
TP	102 %
TGO	48
TGP	48
Urée	5,5 mmol/L
Bilan rénal	normal
Bilan hépatique	normal

Antécédents

- ⇒ hypercholestérolémie
- ⇒ troubles cardiaques

III.3. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

III.3.1. Matériel et réactifs

Feuilles plastiques pour chromatographie couche mince : Gel de silice 60 F₂₅₄, épaisseur de la couche = 0,2 mm, Réf. Merck 1.05735.0016.

Tubes microcapillaires 2.0 µL, Réf. Merck 1.10290.0001.

Applicateur pour chromatographie couche mince, Réf. Merck 1.10226.0001.

Cuve double bac pour plaques 20 x 20, Réf. Merck CA 225256.

n-Butanol pour la chromatographie LiChrosolv[®], Réf. Merck 101988

Méthanol pour la chromatographie LiChrosolv[®], Réf. Merck 106007

Eau distillée sur appareil Aquatron A₄ D, J. Bibby SA, FRANCE

Ammoniaque à 28% min., d. 0,895, RP NORMAPUR[™] pour analyses, Réf. Prolabo 21 190.292.

Dipyridamole, Sigma, Réf. D9766.

III.3.2. Méthode

Les échantillons sont réalisés à partir d'un broyat de calcul en présence d'un mélange méthanol et éthanol à parts égales.

Le dépôt témoin est constitué de dipyridamole pur en solution dans le même mélange.

Les dépôts sont réalisés à l'aide des tubes microcapillaires et de l'applicateur. La concentration suffisante des dépôts est vérifiée, après séchage sous azote, par l'intensité de la fluorescence en U.V..

Le solvant de migration utilisé est un mélange n-butanol / méthanol / ammoniaque à 28 % / eau (5 / 3 / 1 / 1 ; v / v)

Après saturation de la cuve (deux heures), le développement de la plaque s'effectue sur environ quatre heures et la révélation se fait à température ambiante et sous lumière U.V. à 365 nm.

III.4. SPECTROPHOTOMETRIE INFRAROUGE

III.4.1. Matériel et réactifs

Spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier BRUKER IFS 28 CS couvrant l'intervalle des longueurs d'onde comprises entre 7500 et 370 cm^{-1} , équipé d'un détecteur "deutérium-triglycine-sulfate" DLATGS avec préamplificateur faible bruit et résolution de 0,5 cm^{-1} .

L'appareil est équipé d'un micro ordinateur Compaq 4/50 avec extension à 19 bits du convertisseur analogique/numérique. Le logiciel d'acquisition et de traitement de données est le logiciel IRTF-OPUS/IR₁ qui fonctionne sous OS/2.

Microscope stéréoscopique Wild M3Z.

Nécessaire à pastillage et micropastillage KBr (pastilles de 13 ou 3 mm de diamètre).

Bromure de potassium pour la spectroscopie Uvasol, Réf. Merck 4907.0100.

Pompe à vide, Réf. Prolabo 2179.12.

Dessiccateur chauffant sous vide, Sotelem DR 3002.

Presse hydraulique 16 tonnes Beckmann 1012 A.

III.4.2. Préparation des échantillons

La première étape de l'analyse consiste en une observation minutieuse du calcul à l'aide d'un stéréomicroscope, suivi d'une microdissection. Une description détaillée mentionnant la forme, les dimensions et l'aspect de la surface est alors réalisée.

L'examen de la section permet de préciser la constitution par couches concentriques successives ou par cristallisation radiale, le caractère plus ou moins dense, l'existence ou non d'un noyau différencié. Au terme de cette étude macro et microscopique, différents prélèvements sont effectués aux endroits structurellement caractéristiques.

Après dessiccation, ces échantillons (environ 1 mg) sont broyés finement à l'aide d'un mortier en agate et incorporés de manière homogène à 200 mg de bromure de potassium.

Le bromure de potassium est un solide transparent au rayonnement infrarouge de 4000 à 300 cm^{-1} .

La poudre ainsi obtenue est introduite dans un moule à pastiller, soumise pendant deux minutes à l'action d'une pompe à vide de manière à éliminer l'humidité résiduelle, et simultanément comprimée (pression de 10 tonnes) pour obtenir une pastille fine et transparente.

III.4.3. Conditions d'enregistrement

La pastille est ensuite placée dans le compartiment échantillon de l'appareil et le spectre de 4000 à 400 cm^{-1} est enregistré en 30 secondes (résolution 2 cm^{-1} , nombre de spectres 100).

III.5. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (38-45)

III.5.1. Introduction

L'étude en chromatographie liquide haute performance nécessite d'abord la réalisation d'une gamme d'étalonnage suivie d'un dosage des échantillons ayant subi une extraction.

III.5.2. Réalisation du mélange étalon

Le mélange étalon est réalisé à partir de deux solutions mères :

- ⇒ Dipyridamole à 500 $\mu\text{g/mL}$ dans HCl $5 \cdot 10^{-3}$ M.
- ⇒ Indométhacine à 500 $\mu\text{g/mL}$ dans le méthanol.

Dilutions

- ⇒ La solution de dipyridamole est diluée 25 fois dans HCl $5 \cdot 10^{-3}$ M (solution à 20 $\mu\text{g/mL}$).
- ⇒ La solution d'indométhacine est diluée 7,5 fois dans le méthanol (solution à 6,67 $\mu\text{g/mL}$).

Mélange étalon final

Il est constitué par :

- ⇒ 1 mL de la solution à 20 $\mu\text{g/mL}$ de dipyridamole
- ⇒ 3 mL de la solution à 6,67 $\mu\text{g/mL}$ d'indométhacine.

On injecte 100 μg en CLHP ce qui équivaut à 500 ng de chacun des deux produits.

III.5.3. Réalisation de la gamme d'étalonnage du dipyridamole

- G0** correspond à 0 ng de dipyridamole pur broyé en présence d'une poudre inerte de calcul témoin (20 mg) avec 5 µg d'indométhacine.
- G50** 20 mg de poudre inerte
50 ng de dipyridamole
5 µg d'indométhacine
- G250** 20 mg de poudre inerte
250 ng de dipyridamole
5 µg d'indométhacine
- G500** 20 mg de poudre inerte
500 ng de dipyridamole
5 µg d'indométhacine
- G1000** 20 mg de poudre inerte
1000 ng de dipyridamole
5 µg d'indométhacine
- G2000** 20 mg de poudre inerte
2000 ng de dipyridamole
5 µg d'indométhacine

Se référer aux chromatogrammes G0, G50, G250, G500, G1000, G2000.

III.5.4. Dosage du dipyridamole dans les calculs échantillons

III.5.4.1. Matériel et produits utilisés

1 - Matériel :

- Centrifugeuse : SORVALL RC3 (réfrigérée)
- Injecteur automatique pour CLHP : WISP 700 Satellite (Waters)
- Pompe CLHP : 600E (Waters)

- Détecteur spectrophotométrique à barrette de diodes : 990 Photodiode array detector (Waters)
- Enregistreur : Plotter 990 (Waters)
- Intégrateur : logiciel Photodiode array detector 991 (Waters)/ordinateur NEC APCIV
- Four : Eurosas
- Agitateur : Vortex
- Agitateur magnétique : Bioblock
- Diluteur : Dilutor 401 (Gilson)
- Distributeur automatique pour solvant
- Distributeur : Multipette (Eppendorf)
- Pipettes Eppendorf 150 μ L et 1,0 mL
- Seringues 0,5 et 10 mL pour dilutor Gilson
- Pointes Treff 150 et 1,0 mL
- Combitips Eppendorf 25 μ L
- Tubes col à vis à usage unique
- Tubes coniques en verre Corex
- Pipettes en verre de 5 mL à usage unique
- Bain-marie réglé à 25°C

2 - Produits :

- Dipyridamole : Réf. Sigma D9766, lot 33H00835,
- Etalon Interne : indométhacine, Réf. Sigma I7373, lot 60H0448,
- Acide chlorhydrique prêt à l'emploi 1 N : Fluka Standard Solution, Réf. 84425,
- Acide acétique : Réf. Prolabo 20104298,
- Acétate de sodium : Réf. Merck 6268,
- Hydroxyde de sodium : Réf. Fluka 71690,
- Acétonitrile multisolvant, HPLC grade : SCHARLAU, Réf. AC333,
- Méthanol gradient HPLC grade : SCHARLAU, Réf. Me306,
- Eau MILLI Q : MILLIPORE,
- Azote : AGA,
- Hélium : AGA.

3 - Solutions standards :

Compte tenu de la sensibilité à la lumière des produits analysés, toutes les opérations analytiques (pesées, dilutions etc...) sont réalisées en lumière atténuée.

- Solution mère de dipyridamole à 500 $\mu\text{g/mL}$ dans de l'HCl 5.10^{-3} N.
Peser 12,5 mg de dipyridamole et dissoudre dans 25 mL d'HCl 5.10^{-3} N en fiole jaugée brune.
- Solution fille de dipyridamole à 20 $\mu\text{g/mL}$ dans de l'HCl 5.10^{-3} N.
Solution mère diluée 25 fois à l'aide de l'HCl 5.10^{-3} N (Dilutor 401).
- Solution fille de dipyridamole à 10 $\mu\text{g/mL}$ dans de l'HCl 5.10^{-3} N.
Solution mère diluée 50 fois à l'aide de l'HCl 5.10^{-3} N (Dilutor 401).
- Solution fille de dipyridamole à 1,5 $\mu\text{g/mL}$ dans de l'HCl 5.10^{-3} N.
Solution fille à 10 $\mu\text{g/mL}$ diluée 6,667 fois à l'aide de l'HCl 5.10^{-3} N (Dilutor 401).
- Solution mère de l'étalon interne (indométhacine) à 500 $\mu\text{g/mL}$ dans du méthanol.
Peser 12,5 mg d'indométhacine et dissoudre dans 25 mL de méthanol en fiole jaugée.
- Solution fille de l'étalon interne à 50 $\mu\text{g/mL}$ dans du méthanol.
Solution mère diluée 10 fois à l'aide de méthanol (Dilutor 401).
- Solution fille de l'étalon interne à 6,67 $\mu\text{g/mL}$ dans du méthanol.
Solution fille à 50 $\mu\text{g/mL}$ diluée 7,5 fois à l'aide de méthanol (Dilutor 401).
- Solution témoin de dipyridamole et d'étalon interne (pour le contrôle CLHP)
Mélanger 1 ml de solution de dipyridamole à 20 $\mu\text{g/mL}$ avec 3 mL de solution d'étalon interne à 6,67 $\mu\text{g/mL}$. La solution finale contient 5 ng de dipyridamole et d'étalon interne/ μL . L'injection de 100 μL en CLHP correspond à 500 ng de chacun des produits.

4 - Réactifs :

- Acide chlorhydrique 5.10^{-3} N : diluer 5 mL d'acide chlorhydrique 1 N dans un litre d'eau en fiole jaugée.
- Acétate de sodium 0,02 M : dissoudre 1,6406g dans un litre d'eau.
- Tampon acétate 0,02 M ; pH 5.0 : diluer 1 mL d'acide acétique concentré dans un litre d'acétate de sodium.
- Hydroxyde de sodium 1 N : dissoudre 4 g de NaOH dans 100 mL d'eau .
- Phase mobile :

La phase mobile tampon acétate 0,02 M ; pH 5,0/méthanol, 25/75 (v/v) est préparée automatiquement par la pompe à gradient 600 E (Waters).

III.5.4.2. Méthode : (38-45)

1 - Préparation des échantillons et extraction :

Chaque fragment de calcul est préalablement broyé à l'aide d'un mortier en agate jusqu'à l'obtention d'une poudre fine homogène.

10 à 20 mg de poudre de calcul (pesée exacte notée pour chaque échantillon) sont ensuite pesés et introduits dans un tube col à vis à usage unique contenant 5000 ng d'indométhacine (100 μ L d'une solution à 50 ng/ μ L) puis additionnés de 1 mL de NaOH 0,2 M. Après agitation de quelques secondes au Vortex, on ajoute 5 mL d'éther puis on homogénéise 3 minutes au Vortex.

Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 1600 tours/min à 0-4°C (Centrifugeuse SORVALL RC3). La phase organique surnageante est récupérée avec soin* à l'aide de pipettes en verre à usage unique de 5 ml, placée dans des tubes coniques en verre, et évaporée à sec, au bain marie à 25°C, sous un courant d'azote.

L'extrait sec est repris par 140 μ L de méthanol puis par 60 μ L de tampon acétate 0,02 M pH 5,0, agité au Vortex puis centrifugé 10 minutes à 1600

(*) on évitera en particulier de prélever de la phase inférieure.

tours/min à 0-4°C avant d'être transvasé dans les tubes de l'injecteur automatique pour CLHP. Compte tenu des fortes concentrations de dipyridamole contenues dans certains échantillons, il est parfois nécessaire de diluer l'extrait obtenu de façon à obtenir un signal chromatographique ayant une Densité Optique de l'ordre de 0,5.

50 µL sont injectés en CLHP.

3 - Gamme d'étalonnage :

A partir de la solution mère contenant 500 µg/mL de dipyridamole, des solutions à 10 et 1,5 ng/µL ont été préparées par dilution dans de l'HCl 5.10⁻³ N (voir paragraphe III.5.3.1).

A l'aide de ces solutions étalons, une gamme d'étalonnage est réalisée en surchargeant une série de tubes contenant 5000 ng d'indométhacine par 50, 100, 250, 500, 1000 et 2000 ng de dipyridamole (Tubes G2 à G7).

Le tube témoin G1 (BLANC) ne reçoit aucune surcharge.

Le volume est complété à 250 µL par addition d'HCl 5.10⁻³ N (DILUTOR 401).

TUBES	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
DIPYRIDAMOLE (ng)	0	50	100	250	500	1000	2000
solution 1.5 ng/µL (µL)	-	33	67	167	-	-	-
solution 10 ng/µL (µL)	-	-	-	-	50	100	200
HCl 5.10 ⁻³ N (µL)	250	217	183	83	200	150	50

Les tubes de la gamme d'étalonnage sont alors additionnés de 20 mg de poudre de calcul témoin. Ils sont ensuite traités comme il est expliqué au paragraphe précédent.

4 - Contrôles de qualité :

Pour chaque série de dosages, un ensemble de trois contrôles de qualité est effectué sur des milieux contenant théoriquement 100, 500 et 2000 ng de dipyridamole (prise d'essai = 20 mg).

Ces contrôles de qualité sont réalisés après l'analyse CLHP de chaque série d'analyse d'environ 10 échantillons.

5 - Conditions chromatographiques :

Les conditions chromatographiques sont choisies de façon à avoir une sensibilité optimale compatible avec les dosages à réaliser et un temps d'analyse global de 10 minutes :

- *Colonne* : LICHROSPHER RP-18, 5 μ , 250 X 4 mm ; Merck.
- *Précolonne* : LICHROSPHER RP-18, 5 μ , 4 X 4 mm ; Merck
- *Phase mobile* : tampon acétate 0,02 M ; pH 5,0 / Méthanol, 25/75 (v/v).
- *Débit de la phase mobile* : 1 mL/min.
- *Température* : 30°C.
- *Volume injecté* : 50 μ L

- *Détecteur spectrophotométrique* :

* $\lambda = 290$ nm (en cas d'enregistrement à une seule longueur d'onde),

* 0,5 DO pleine échelle,

Dans ces conditions d'analyse, les temps de rétention du dipyridamole et de l'indométhacine sont respectivement de 6,3 et 4,0 minutes.

III.5.5. Dosage du dipyridamole total (libre et glucuroconjugué) dans les calculs biliaires (46)

III.5.5.1. Matériel et produits utilisés :

1 - Matériel :

- Centrifugeuse : SORVALL RC3 (réfrigérée)
- Injecteur automatique pour CLHP : WISP 700 Satellite (Waters)
- Pompe CLHP : 600E (Waters)
- Détecteur spectrophotométrique à barrette de diodes : 990 Photodiode array detector (Waters)
- Enregistreur : Plotter 990 (Waters)
- Intégrateur : logiciel Photodiode array detector 991 (Waters)/ordinateur NEC APCIV
- Four : Eurosas
- Etuve : UT6060 (Heraeus)
- Agitateur : Vortex
- Agitateur magnétique : Bioblock
- Diluteur : Dilutor 401 (Gilson)
- Distributeur automatique pour solvant
- Distributeur : Multipette (Eppendorf)
- Pipettes Eppendorf 150 µL et 1,0 mL
- Seringues 0,5 et 10 mL pour dilutor Gilson
- Pointes Treff 150 et 1,0 mL
- Combitips Eppendorf 25 µL
- Tubes col à vis à usage unique
- Tubes coniques en verre Corex
- Pipettes en verre de 5 mL à usage unique
- Bain-marie réglé à 25°C

2 - Produits :

- Dipyridamole : Réf. Sigma D9766, lot 33H00835,
- Etalon interne : Indométhacine, Réf Sigma I7373, lot 60H0448,
- β-glucuronidase : Réf. Sigma G0251, lot 117F7256,

- Acide chlorhydrique prêt à l'emploi 1 N : Fluka Standard Solution, Réf. 84425,
- Acide acétique : Réf. Prolabo 20104298,
- Acide citrique : Merck, Art 244,
- Acétate de sodium : Réf. Merck 6268,
- Hydroxyde de sodium : Réf. Fluka 71690,
- Acétonitrile multisolvent, HPLC grade : SCHARLAU, Réf. AC333,
- Méthanol gradient HPLC grade : SCHARLAU, Réf. Me306,
- Eau MILLI Q : MILLIPORE,
- Azote : AGA,
- Hélium : AGA.

3 - Solutions standards :

Compte tenu de la sensibilité à la lumière des produits analysés, toutes les opérations analytiques (pesées, dilutions etc...) sont réalisées en lumière atténuée.

- Solution mère de dipyridamole à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans de l'HCl $5 \cdot 10^{-3}$ N.
Peser 12,5 mg de dipyridamole et dissoudre dans 25 mL d'HCl $5 \cdot 10^{-3}$ N en fiole jaugée brune.
- Solution fille de dipyridamole à 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans de l'HCl $5 \cdot 10^{-3}$ N.
Solution mère diluée 25 fois à l'aide de l'HCl $5 \cdot 10^{-3}$ N (Dilutor 401).
- Solution fille de dipyridamole à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans de l'HCl $5 \cdot 10^{-3}$ N.
Solution mère diluée 50 fois à l'aide de l'HCl $5 \cdot 10^{-3}$ N (Dilutor 401).
- Solution fille de dipyridamole à 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans de l'HCl $5 \cdot 10^{-3}$ N.
Solution fille à 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diluée 6,667 fois à l'aide de l'HCl $5 \cdot 10^{-3}$ N (Dilutor 401).
- Solution mère de l'étalon interne à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du méthanol.
Peser 12,5 mg d'indométhacine et dissoudre dans 25 ml de méthanol en fiole jaugée.
- Solution fille de l'étalon interne à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du méthanol.
Solution mère diluée 10 fois à l'aide de méthanol (Dilutor 401).
- Solution fille de l'étalon interne à 6,67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du méthanol.

Solution fille à 50 µg/ml diluée 7,5 fois à l'aide de méthanol (Dilutor 401).

- Solution témoin de dipyridamole et d'étalon interne (pour le contrôle CLHP).

Mélanger 1 mL de solution de dipyridamole à 20 µg/mL avec 3 mL de solution d'Etalon Interne à 6,67 µg/mL. La solution finale contient 5 ng de dipyridamole et d'étalon interne/µL. L'injection de 100 µL en CLHP correspond à 500 ng de chacun des produits.

4 - Réactifs :

- Solution de β-glucuronidase à 1 mg/mL : dissoudre 10 mg de β-glucuronidase dans 10 mL de tampon citrate 0,1 M, pH 5,0.
- Acide chlorhydrique 5.10⁻³ N : diluer 5 mL d'acide chlorhydrique 1 N dans un litre d'eau en fiole jaugée.
- Acétate de sodium 0,02 M : dissoudre 1,6406g dans un litre d'eau.
- Tampon citrate 0,1 M ; pH 5,0 : dissoudre 2,1014 g d'acide citrique et 800 mg d'hydroxyde de sodium dans 120 mL d'eau.
- Tampon acétate 0,02 M ; pH 5,0 : diluer 1 mL d'acide acétique concentré dans un litre d'acétate de sodium.
- Hydroxyde de sodium 1 N : dissoudre 4 g de NaOH dans 100 mL d'eau .
- Phase mobile :

La phase mobile tampon acétate 0,02 M ; pH 5,0/méthanol, 25/75 (v/v) est préparée automatiquement par la pompe à gradient 600 E (Waters).

III.5.5.2. Méthode :

2 - Préparation des échantillons et extraction :

Chaque calcul est préalablement broyé à l'aide d'un mortier en agate jusqu'à l'obtention d'une poudre fine homogène.

10 à 20 mg de poudre de calcul sont ensuite pesés et introduits dans un tube col à vis à usage unique et additionnés de 1 mL de solution de β -glucuronidase à 1 mg/mL. Le mélange est homogénéisé quelques secondes au Vortex puis mis à l'étuve à 37°C pendant 12 heures.

Les tubes sont ensuite agités au Vortex quelques secondes avant d'être additionnés de 5000 ng d'étalon interne (100 μ L d'une solution à 50 ng/ μ L) et de 1 mL de NaOH 0,2 M, puis à nouveau homogénéisés au Vortex.

Ce mélange est additionné de 5 mL d'éther puis homogénéisé 3 minutes au Vortex.

Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 1600 tours/min à 0-4°C (Centrifugeuse SORVALL RC3). La phase organique surnageante est récupérée avec soin* à l'aide de pipettes en verre à usage unique de 5 mL, placée dans des tubes coniques en verre, et évaporée à sec, à 25°C, sous un courant d'azote.

L'extrait sec est repris par 140 μ L de méthanol puis par 60 μ L de tampon acétate 0,02M ; pH 5,0, agité au Vortex puis centrifugé 10 minutes à 1600 tours/min à 0-4°C avant d'être transvasé dans les tubes de l'injecteur automatique pour CLHP. Compte tenu des fortes concentrations de dipyridamole contenues dans certains échantillons, il est parfois nécessaire de diluer l'extrait obtenu de façon à obtenir un signal chromatographique ayant une densité optique de l'ordre de 0,5.

50 μ L sont injectés en CLHP.

Note : Afin de pouvoir conclure sur les résultats obtenus, il est nécessaire de réaliser en parallèle une deuxième série d'analyse sur une prise d'essai identique de poudre de calcul en mettant 1 mL de tampon citrate 0,1 M à la place du mL de solution de β -glucuronidase à 1 mg/mL. (Dosage du dipyridamole libre).

(*) on évitera en particulier de prélever de la phase inférieure.

3 - Gamme d'étalonnage :

A partir de la solution mère contenant 500 $\mu\text{g/mL}$ de dipyridamole, des solutions à 10 et 1,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ont été préparées par dilution dans de l' $\text{HCl } 5.10^{-3}$ N (voir paragraphe III.5.4.1).

A l'aide de ces solutions étalons, une gamme d'étalonnage est réalisée en surchargeant une série de tubes contenant 5000 ng d'étalon interne par 50, 100, 250, 500, 1000 et 2000 ng de dipyridamole (Tubes G2 à G7).

Le tube témoin G1 (BLANC) ne reçoit aucune surcharge.

Le volume est complété à 250 μL par addition d' $\text{HCl } 5.10^{-3}$ N (DILUTOR 401).

TUBES	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
DIPYRIDAMOLE (ng)	0	50	100	250	500	1000	2000
solution 1,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (μL)	-	33	67	167	-	-	-
solution 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (μL)	-	-	-	-	50	100	200
$\text{HCl } 5.10^{-3}$ N (μL)	250	217	183	83	200	150	50

Les tubes de la gamme d'étalonnage sont alors additionnés de 20 mg de poudre de calcul inerte. Ils sont ensuite traités comme il est expliqué au paragraphe précédent.

4 - Contrôles de qualité :

Pour chaque série de dosages, un ensemble de trois contrôles de qualité est effectué sur des milieux contenant théoriquement 100, 500 et 2000 ng de dipyridamole (prise d'essai = 20 mg).

Ces contrôles de qualité sont réalisés après l'analyse CLHP de chaque série d'analyse d'environ 10 échantillons.

5 - Conditions chromatographiques :

Les conditions chromatographiques sont choisies de façon à avoir une sensibilité optimale compatible avec les dosages à réaliser et un temps d'analyse global de 10 minutes :

- *Colonne* : LICHROSPHER RP-18, 5 μ , 250 X 4 mm ; Merck.
- *Précolonne* : LICHROSPHER RP-18, 5 μ , 4 X 4 mm ; Merck
- *Phase mobile* : tampon acétate 0,02M ; pH 5,0 / méthanol, 25/75 (v/v).
- *Débit de la phase mobile* : 1 ml/min.
- *Température* : 30°C.
- *Volume injecté* : 50 μ L

- *Détecteur spectrophotométrique* :
 - * $\lambda = 290$ nm (en cas d'enregistrement à une seule longueur d'onde),
 - * 0,5 DO pleine échelle,

Dans ces conditions d'analyse, les temps de rétention du dipyridamole et de l'étalon interne sont respectivement de 6,3 et 4,0 minutes.

IV. RESULTATS

IV.1. TEST DE DETECTION U.V. RAPIDE DU DIPYRIDAMOLE

Sur 240 calculs testés, 19 calculs ont présenté une fluorescence sous lumière U.V., soit 8 % (*photo n° 6*).

IV.2. ETUDE DU DOSSIER CLINIQUE

Après étude du dossier clinique, un traitement au dipyridamole a été retrouvé chez au moins 13 patients. Pour les six autres ce traitement médicamenteux au long cours n'était pas précisé.

IV.3. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur 8 échantillons de calculs, choisis par ordre décroissant de fluorescence après test U.V. et présentant le dossier clinique le plus complet.

L'ordre décroissant de fluorescence a été jugé à l'oeil nu et ne peut donc pas être tenu pour scientifiquement exact.

La chromatographie sur couche mince révèle uniquement le dipyridamole libre contenu dans les calculs.

Le rapport frontal ou $R_f = 0,90$ a été le même pour tous sauf 1, pour lequel le doute subsiste.

Le tableau qui suit regroupe les résultats du test U.V. et de la chromatographie sur couche mince.

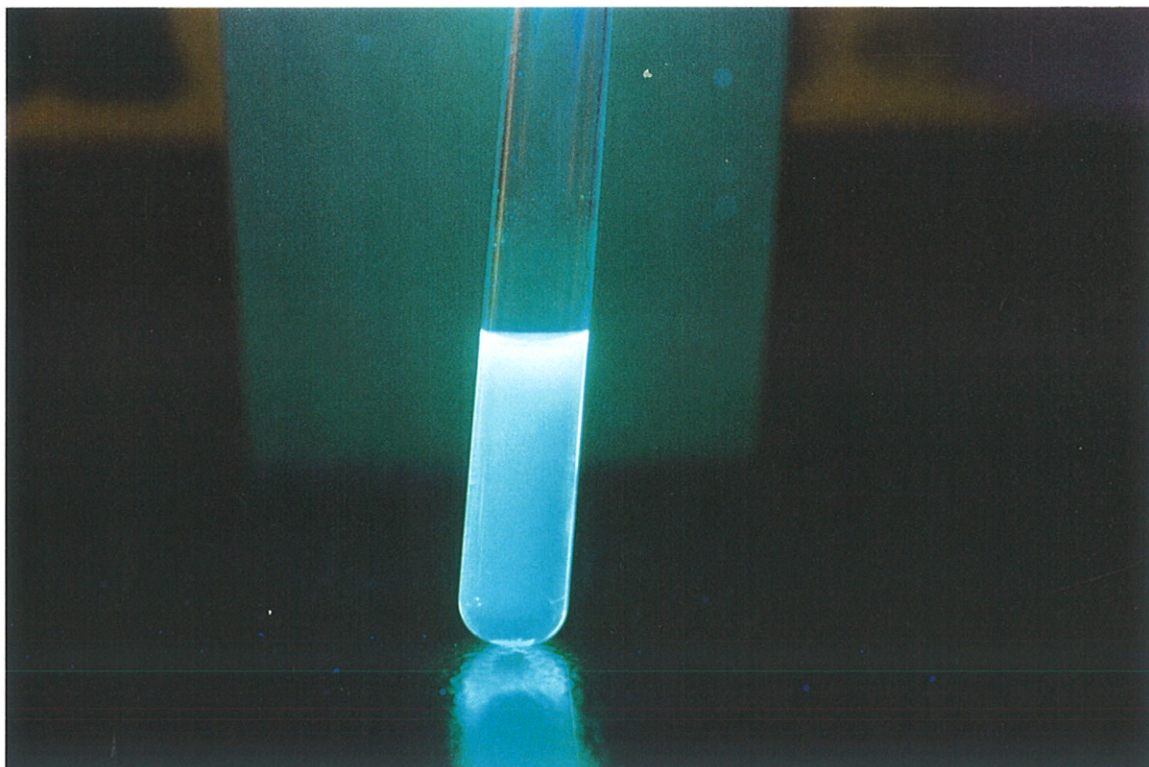
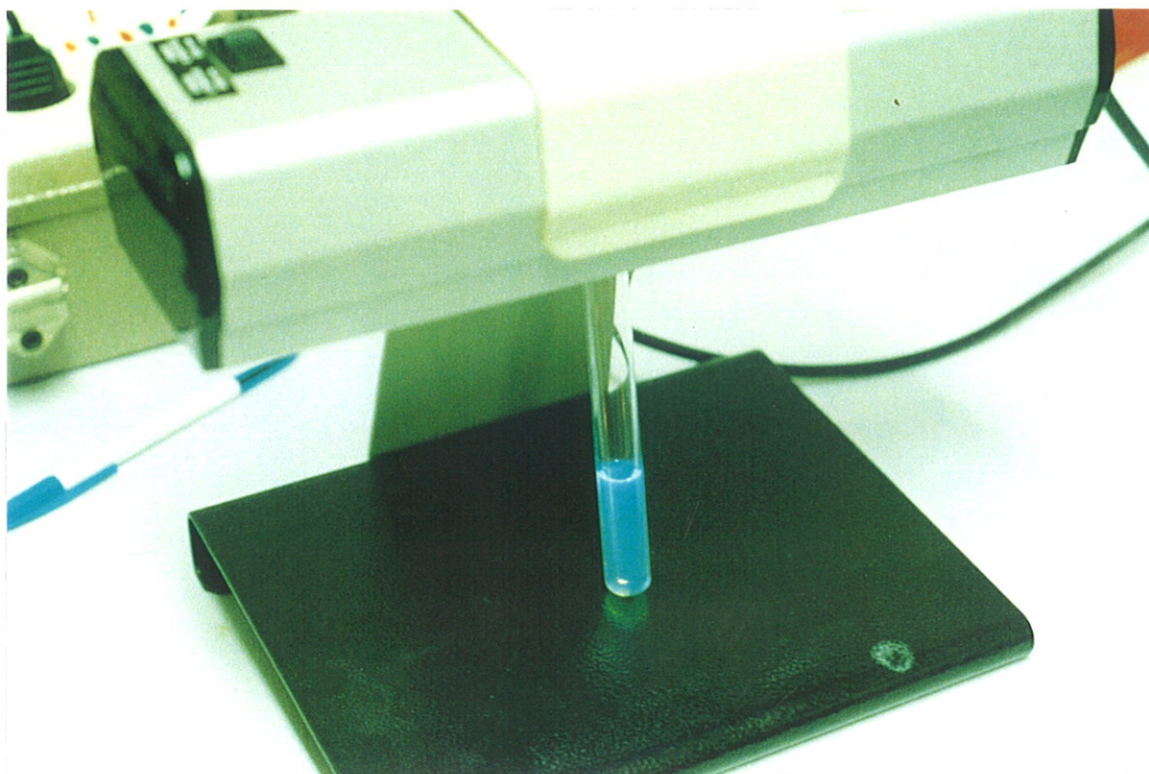


Photo n° 6 : test de fluorescence sous lumière ultraviolette

Nom	Test U.V.	CCM - DP
BET	+ + + +	OUI Rf = 0,90
BRO	+ + +	OUI --
CHE	++ + + +	OUI --
COU	+ + +	OUI --
FOR	+ +	OUI --
JOR	+ + +	OUI --
LEV	+ + + + +	OUI --
SAV	+	? ?

Tableau 7 : Tableau récapitulatif du test U.V. et de la chromatographie sur couche mince.

Le point d'interrogation représente un échantillon qui a migré en donnant un spot différent des autres, plus allongé vers le haut et se divisant pratiquement en deux spots.

IV.4. SPECTROPHOTOMETRIE INFRAROUGE

L'hétérogénéité potentielle des calculs, tant au point de vue structural que constitutionnel, justifie la mise en oeuvre d'un protocole d'étude par zone basé sur une analyse par spectrophotométrie infrarouge.

Lorsque la taille du calcul le permettait, nous avons réalisé une analyse sur chaque couche le constituant.

IV.4.1. Evaluation en pourcentage des différentes couches

C'est par l'observation sous microscope que l'on arrive à bien différencier chacune des couches qui constitue le calcul : celles-ci se distinguent par leur couleur ou leur constitution différente.

Nous pouvons alors faire une estimation visuelle du pourcentage que représente cette couche par rapport au volume global du calcul.

Ces résultats sont rassemblés dans le tableau (8).

IV.4.2. Analyse infrarouge

Quand la manipulation était possible (couche suffisamment épaisse et différenciée pour pouvoir récupérer un échantillon convenable) nous avons effectué une analyse infrarouge sur chacune des couches constituant le calcul.

Les résultats sont regroupés dans le tableau (8).

Des exemples de spectres infrarouge sont donnés ci-après (*figures 13 et 14*) ainsi que leur tableau de pics.

Nom	Couches superficielles	Couches moyennes	Noyau ou partie centrale
BET	95 %		5 %
BRO	10 - 15 %	75 - 85 %	5 - 10 %
CHE	30 - 35 %	60 - 65 %	5 %
COU	15 - 20 %	80 - 85 %	
FOR	60 - 65 %		35 - 40 %
JOR	20 - 30 %	60 - 70 %	10 - 15 %
LEV	20 %	40 %	40 %
SAV	20 %	50 % - 70 %	10 %

Tableau 8 : Evaluation en pourcentage des différentes couches constituant les calculs.


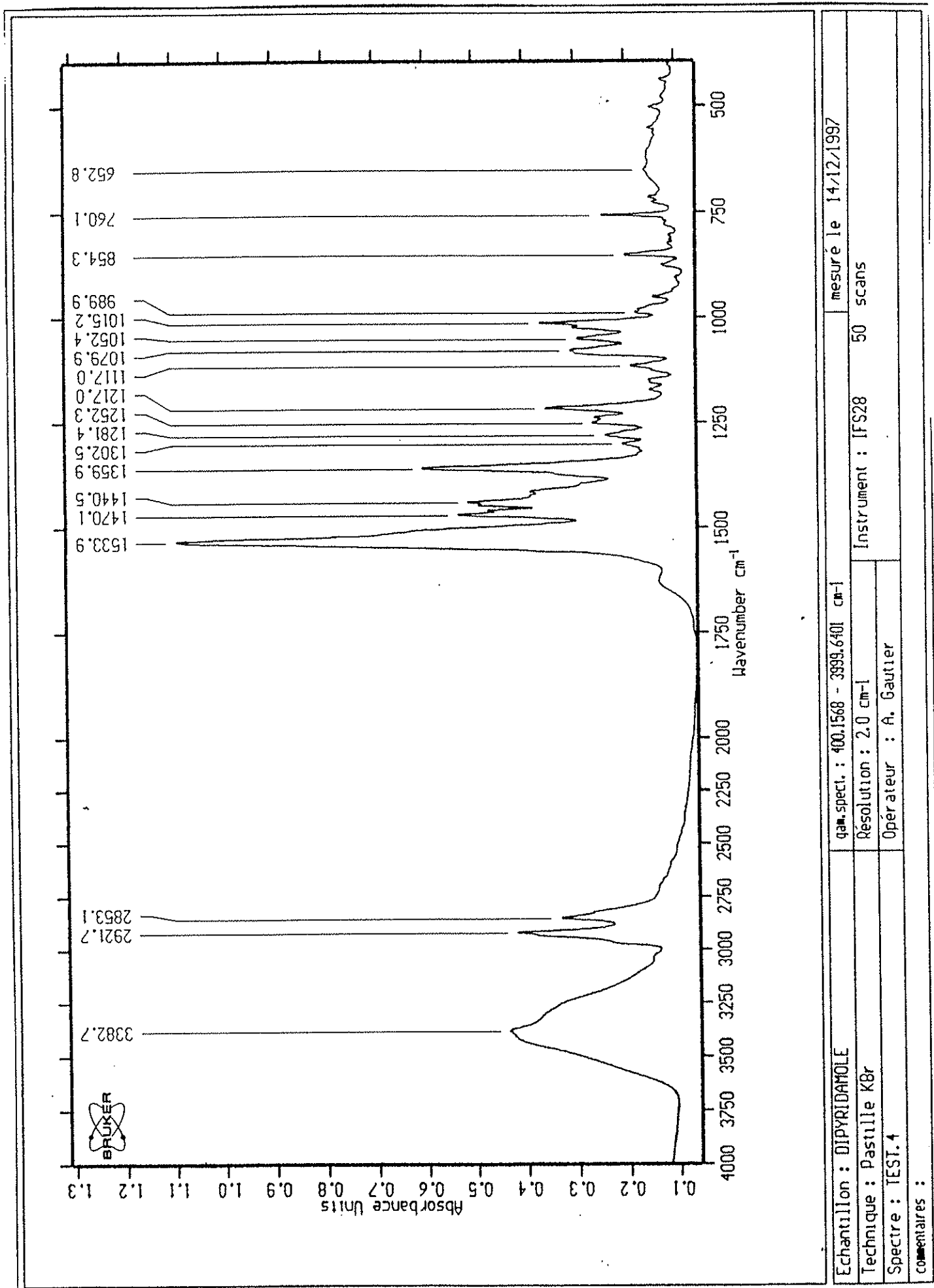
 présence de dipyridamole retrouvée après analyse par spectrophotométrie infrarouge.

Figure 13 : spectre infrarouge du dipyrindamole



mesuré le 14/12/1997

gam. spect. : 400.1568 - 3999.6101 cm⁻¹

Echantillon : DIPYRIDAMOLE

Instrument : IFS28

Résolution : 2.0 cm⁻¹

Technique : Pastille KBr

50 scans

Opérateur : A. Gautier

Spectre : TEST.4

commentaires :

File Name: D:\OPUS\MEAS\TEST.4
 14/12/97, 11:00:08
 Sample Name: DIPYRIDAMOLE
 Operator Name: A. Gautier
 Sample Form: Pastille KBr

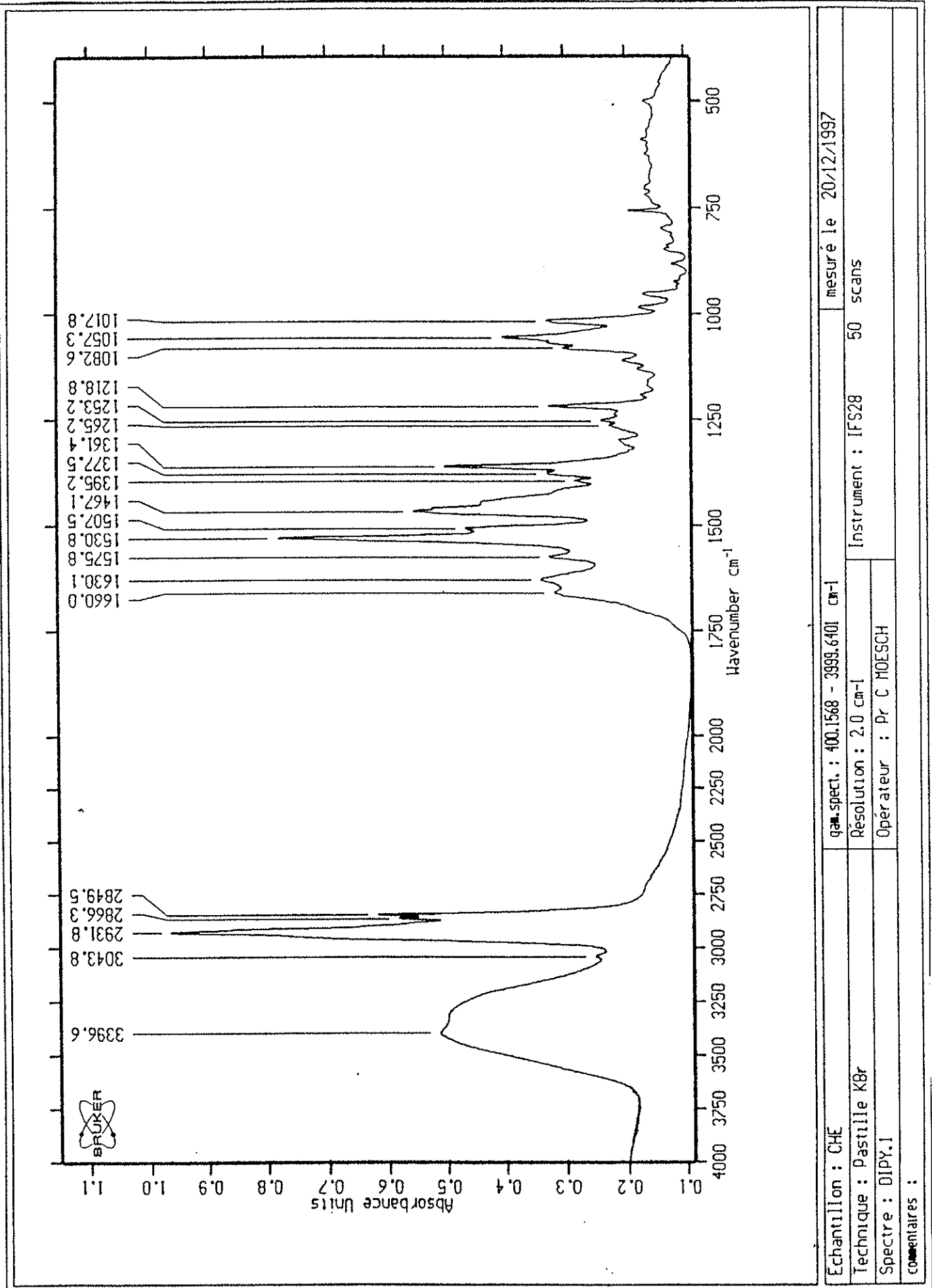
Peak Picking

Method: Standard
 Searched for minima: No
 Number of peaks: 30
 Peaks > [%]: 1
 From: 4000
 to: 400
 Peaks > [abs.]:
 Peaks < [%]:
 Peaks < [abs.]:

Wavenumber	Abs. Intensity	Rel. Intensity	Width
3382.661	0.43	0.34	304.199
2921.683	0.42	0.29	39.860
2853.101	0.33	0.11	30.854
1533.888	1.09	1.03	30.737
1470.086	0.53	0.24	9.270
1459.552	0.47	0.05	4.345
1440.479	0.51	0.16	17.045
1359.865	0.60	0.38	17.700
1302.532	0.20	0.04	10.329
1281.380	0.24	0.07	16.298
1252.311	0.26	0.08	8.075
1238.843	0.26	0.03	6.443
1216.956	0.35	0.21	12.355
1173.700	0.15	0.03	9.548
1149.810	0.15	0.04	12.730
1116.968	0.19	0.08	14.047
1079.941	0.31	0.12	20.492
1052.385	0.29	0.09	12.487
1025.531	0.30	0.02	6.980
1015.236	0.36	0.27	7.837
989.931	0.18	0.04	21.034
953.301	0.14	0.04	8.208
878.577	0.12	0.04	11.007
854.276	0.20	0.11	11.290
760.114	0.25	0.16	6.656
717.753	0.15	0.03	20.388
652.786	0.16	0.05	76.708
554.239	0.15	0.02	8.372
504.908	0.15	0.03	8.677
440.119	0.13	0.02	7.518

Tableau de pics de la figure 13 (Dipyridamole)

Figure 14 : spectre infrarouge de l'échantillon CHE



File Name: D:\OPUS\MEAS\DIPY.1
 20/12/97, 10:19:40
 Sample Name: CHE
 Operator Name: Pr C MOESCH
 Sample Form: Pastille KBr

Peak Picking

Method: Standard
 Searched for minima: No
 Number of peaks: 35
 Peaks > [%]: 1
 From: 4000
 to: 400

Peaks > [abs.]:

Peaks < [%]:

Peaks < [abs.]:

Wavenumber	Abs. Intensity	Rel. Intensity	Width
3396.630	0.51	0.31	352.022
3043.818	0.25	0.01	16.381
2931.823	0.96	0.82	53.222
2866.308	0.58	0.05	9.670
2849.544	0.62	0.12	6.515
1660.040	0.32	0.02	13.951
1630.055	0.34	0.11	21.782
1575.765	0.32	0.05	11.705
1530.764	0.78	0.69	13.830
1507.504	0.46	0.07	9.590
1467.104	0.55	0.30	38.995
1395.246	0.28	0.03	6.712
1377.483	0.33	0.03	11.200
1361.395	0.50	0.25	9.514
1299.710	0.21	0.03	16.896
1265.168	0.23	0.02	13.036
1253.242	0.24	0.04	7.796
1218.791	0.32	0.16	10.711
1193.014	0.17	0.01	7.632
1169.245	0.16	0.01	22.025
1131.495	0.18	0.02	9.336
1111.335	0.20	0.03	11.826
1082.610	0.30	0.03	8.846
1057.313	0.40	0.27	13.001
1017.849	0.33	0.11	13.866
986.530	0.18	0.03	10.845
954.788	0.17	0.05	12.309
883.989	0.12	0.02	9.783
849.774	0.13	0.02	18.227
800.392	0.14	0.02	12.756
758.800	0.19	0.09	5.717
721.699	0.16	0.01	25.980
707.341	0.17	0.02	13.149
592.514	0.17	0.04	11.755
502.406	0.17	0.03	13.464

Tableau de pics de la figure 14 (Echantillon)

IV.5. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

IV.5.1. Chromatogramme et spectres du mélange étalon (indométhacine + dipyridamole)

(Figures 15 - 16 - 17)

IV.5.2. Gamme d'étalonnage du dipyridamole

Voir chromatogrammes G0 à G2000 et tableau récapitulatif de la gamme étalon (*tableau 9*).

IV.5.3. Dosage du dipyridamole dans les calculs échantillons

IV.5.3.1. Dosage sans dilution

Une première série d'essais a été réalisée sur 8 sujets. Les échantillons n'ont pas été dilués et nous avons procédé à une injection de 10 μ L en CLHP.

L'étalon interne n'a pas été retrouvé comme nous l'avons déjà précisé dans la partie "méthode".

Seuls 3 échantillons rentrent dans la gamme : BET, SAV et FOR. Tous les autres échantillons nécessiteront d'être dilués. Deux exemples sont donnés :

⇒ CHE *figure 18*

⇒ COU *figure 19*

IV.5.3.2. Essai dans le plasma

But de l'analyse : retrouver l'indométhacine et le dipyridamole dans le plasma.

Dans les références bibliographiques que nous avons consultées, le dosage du dipyridamole a été réalisé dans le plasma (45).

Nous avons revu ces publications et fait un dosage dans les mêmes conditions chromatographiques.

Conclusion : Nous n'avons toujours pas retrouvé l'indométhacine sur nos chromatogrammes.

IV.5.4. Dosage du dipyridamole dans les échantillons après dilution

- ⇒ CHE dilution : 40
- ⇒ LEV dilution : 40
- ⇒ COU dilution : 4
- ⇒ BRO dilution : 6
- ⇒ JOR dilution : 2,5

50 µl ont été injectés en CLHP.

Les autres échantillons ne sont pas réinjectés car ils contiennent peu de dipyridamole : ce sont BET, FOR et SAV (*voir tableau 10, Dosage du dipyridamole dans les calculs*).

IV.5.5. Dosage du dipyridamole total (libre et glucuronoconjugué) dans les échantillons (46)

Pour cette manipulation on a injecté deux séries de 8 échantillons en parallèle.

50 µL d'échantillon dilué sont injectés

- ⇒ 1 injection est faite sans hydrolyse par la β -glucuronidase
- ⇒ 1 injection est faite avec hydrolyse par la β -glucuronidase

Pour chacun des 8 sujets les chromatogrammes avec et sans glucuronidase sont à la même échelle pour faciliter la comparaison.

Deux calculs échantillons pris en exemple sont présentés : CHE et BET.

Echantillon CHE :

- Figure 20 : Chromatogramme CHE "sans β -glucuronidase"
(on dose le dipyridamole libre)
- Figure 21 : Spectre CHE du dipyridamole libre "sans β -glucuronidase"
- Figure 22: Comparaison entre le spectre CHE du dipyridamole libre et le spectre dipyridamole étalon.
- Figure 23 : Métabolite trouvé pendant l'analyse en HPLC. Ce métabolite apparaît car il doit être structuralement très proche du dipyridamole. Nous ne pouvons dire de quel métabolite il s'agit.
- Figure 24 : Comparaison du spectre du dipyridamole et du métabolite.
- Figure 25 : Chromatogramme CHE "avec β -glucuronidase".
Il n'apparaît aucun changement entre les deux spectres avec ou sans β -glucuronidase. Les spectres du dipyridamole et du métabolite obtenus en présence de β -glucuronidase sont inchangés par rapport à ceux obtenus sans β -glucuronidase

Echantillon BET :

- Figure 26 : Chromatogramme BET : non dilué "sans β -glucuronidase".
- Figure 27 : Chromatogramme BET : non dilué "avec β -glucuronidase".
- Les chromatogrammes montrent ici parfaitement que l'action de la β -glucuronidase a libéré du dipyridamole libre.

En conclusion

Les échantillons BET et SAV présentent de faibles quantités de dipyridamole libre mais contiennent du dipyridamole conjugué.

Pour tous les autres échantillons la quantité de dipyridamole conjugué retrouvée reste très faible (*tableaux 10 et 11*).

Figure 15 : Chromatogramme du mélange étalon (indométhacine + dipyridamole)

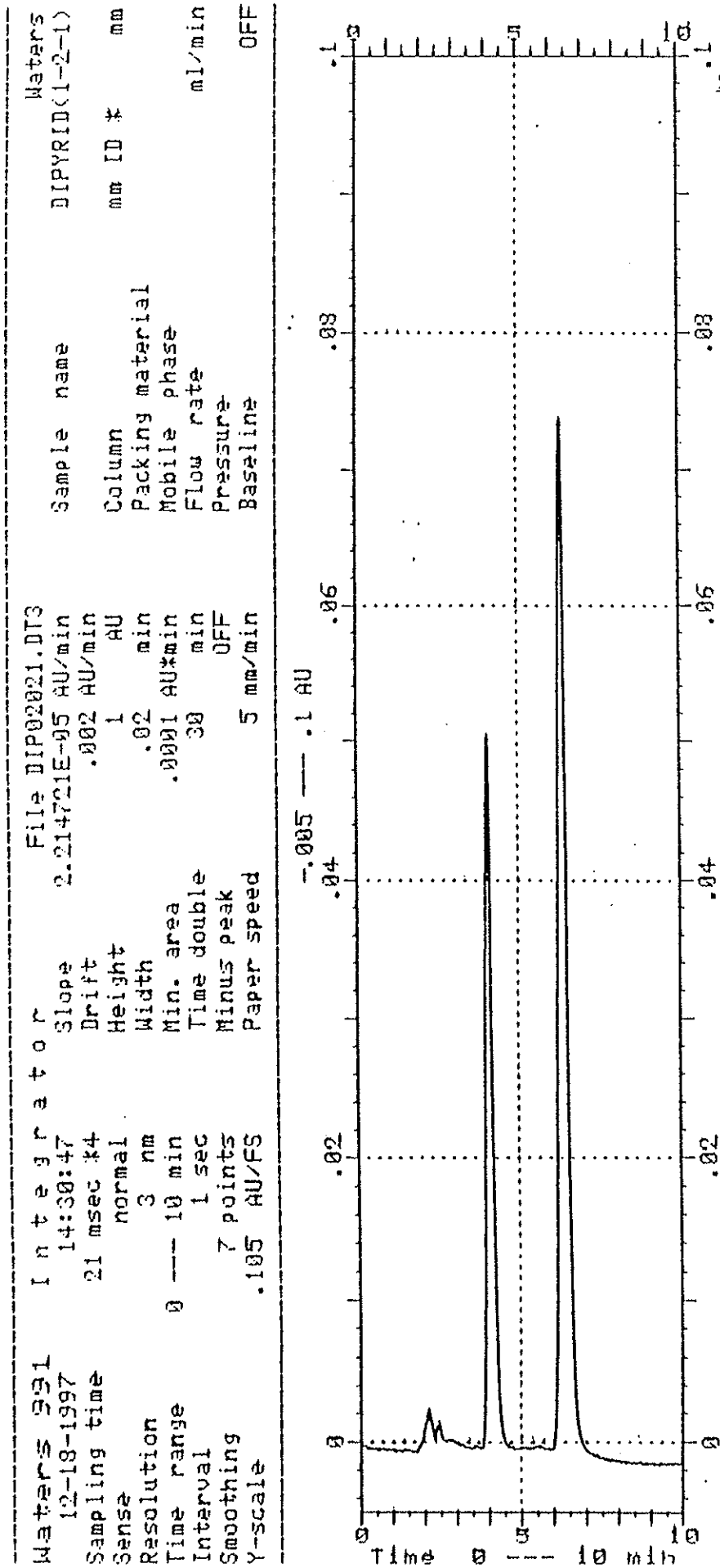


Figure 16 : Chromatogramme du dipyridamole et de l'indométhacine en 3 dimensions et vu de dessus

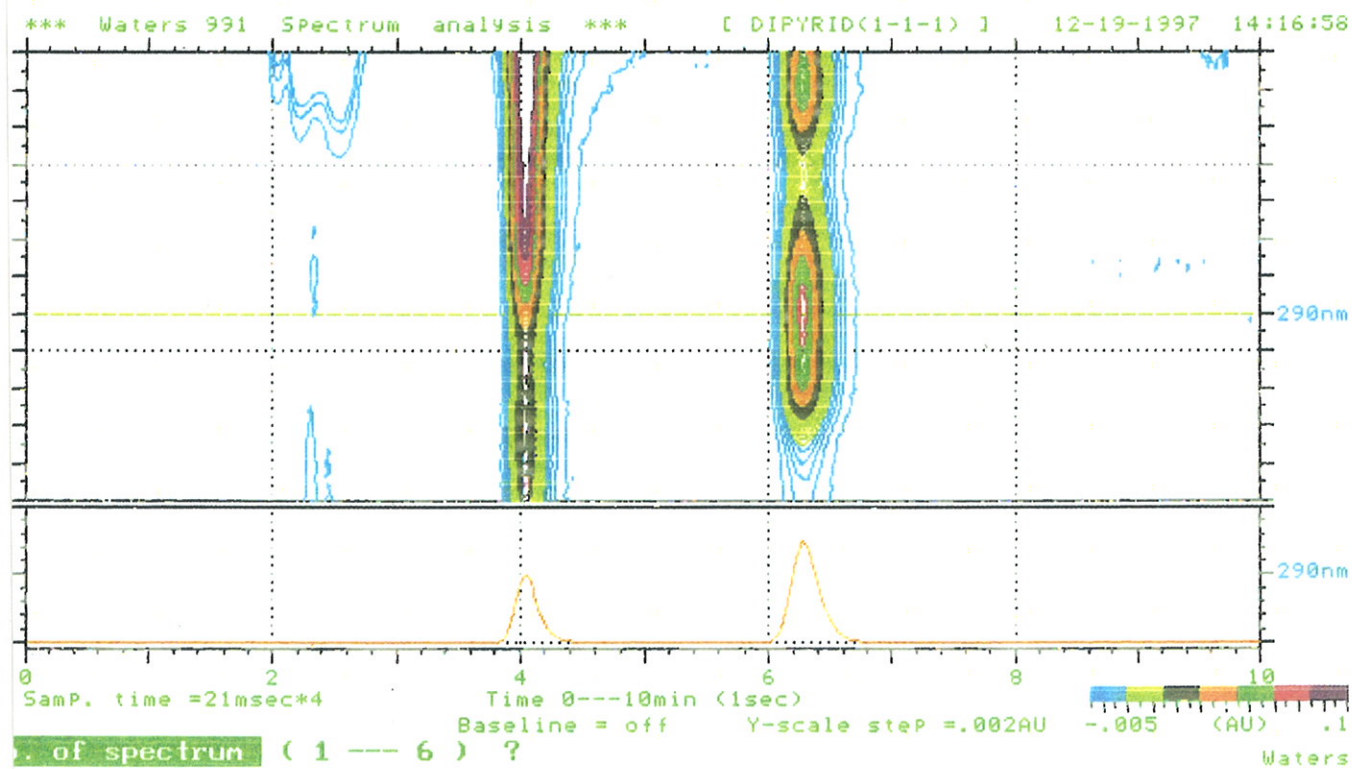
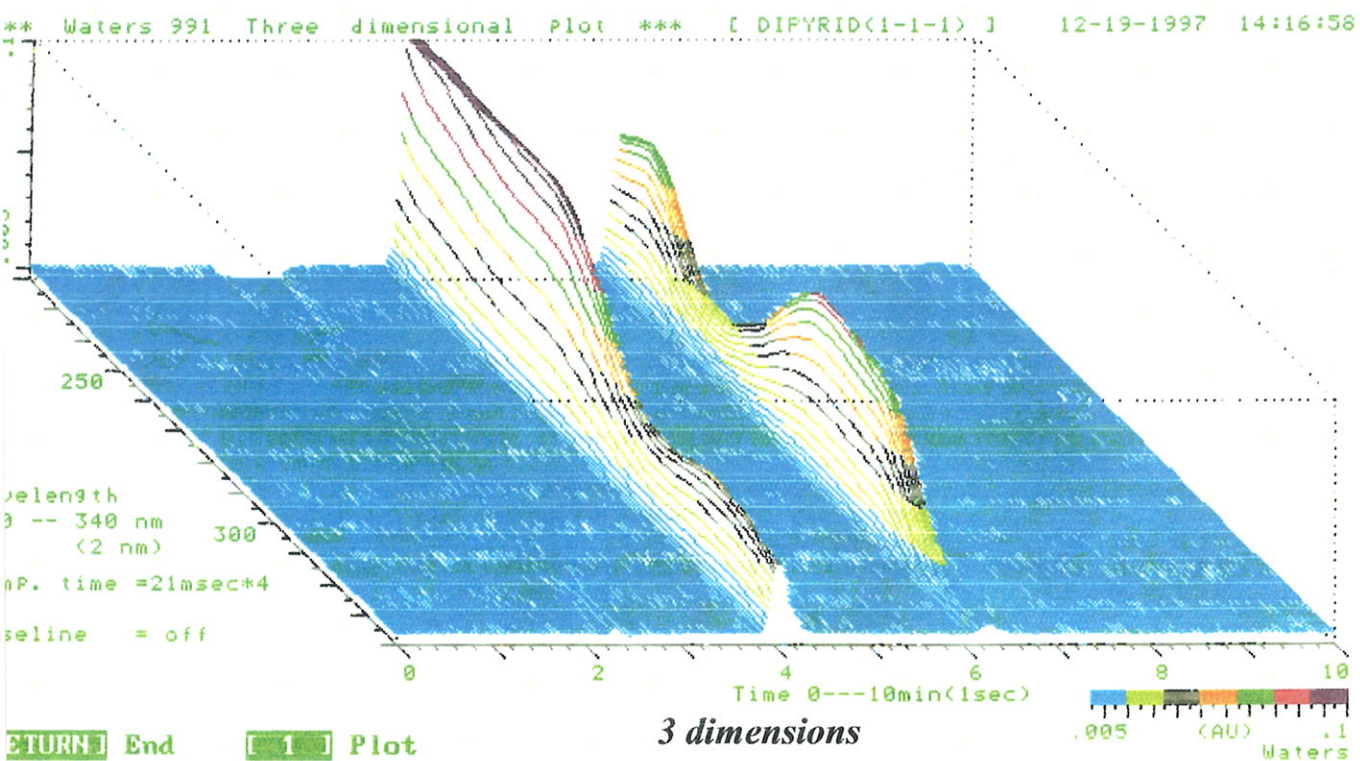
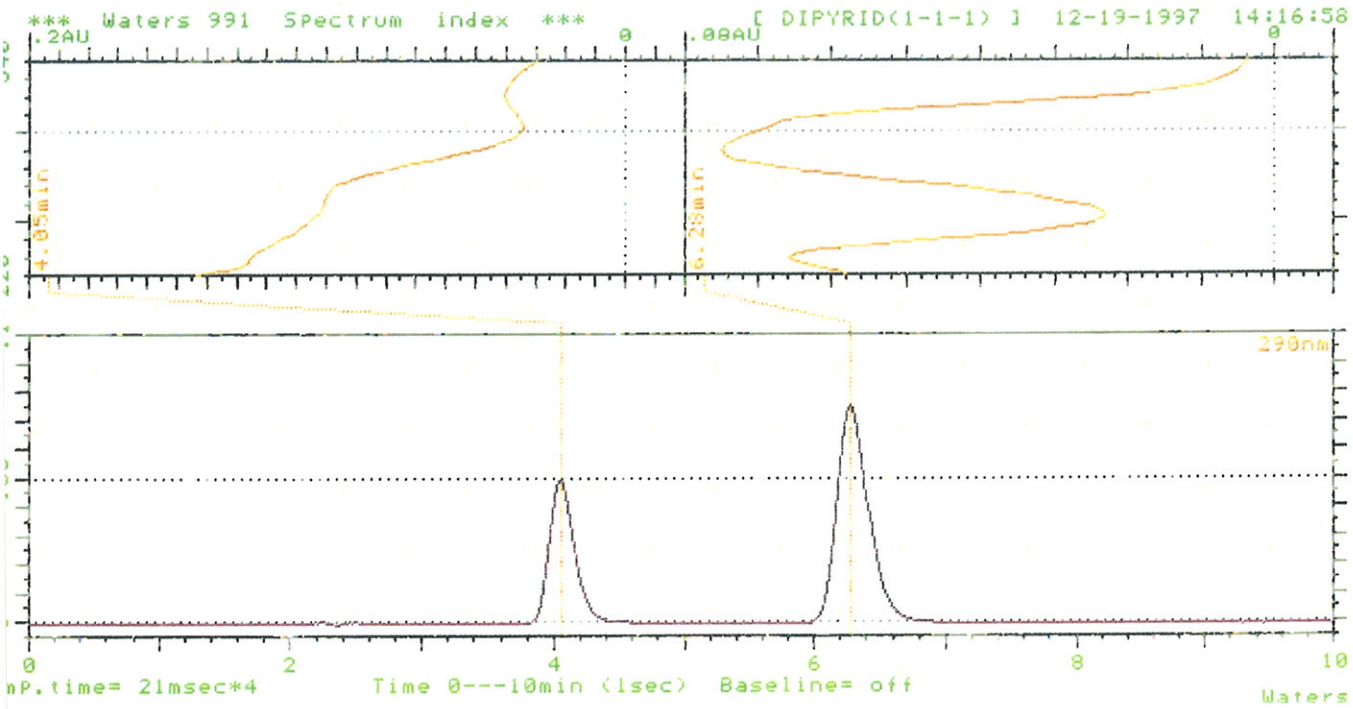
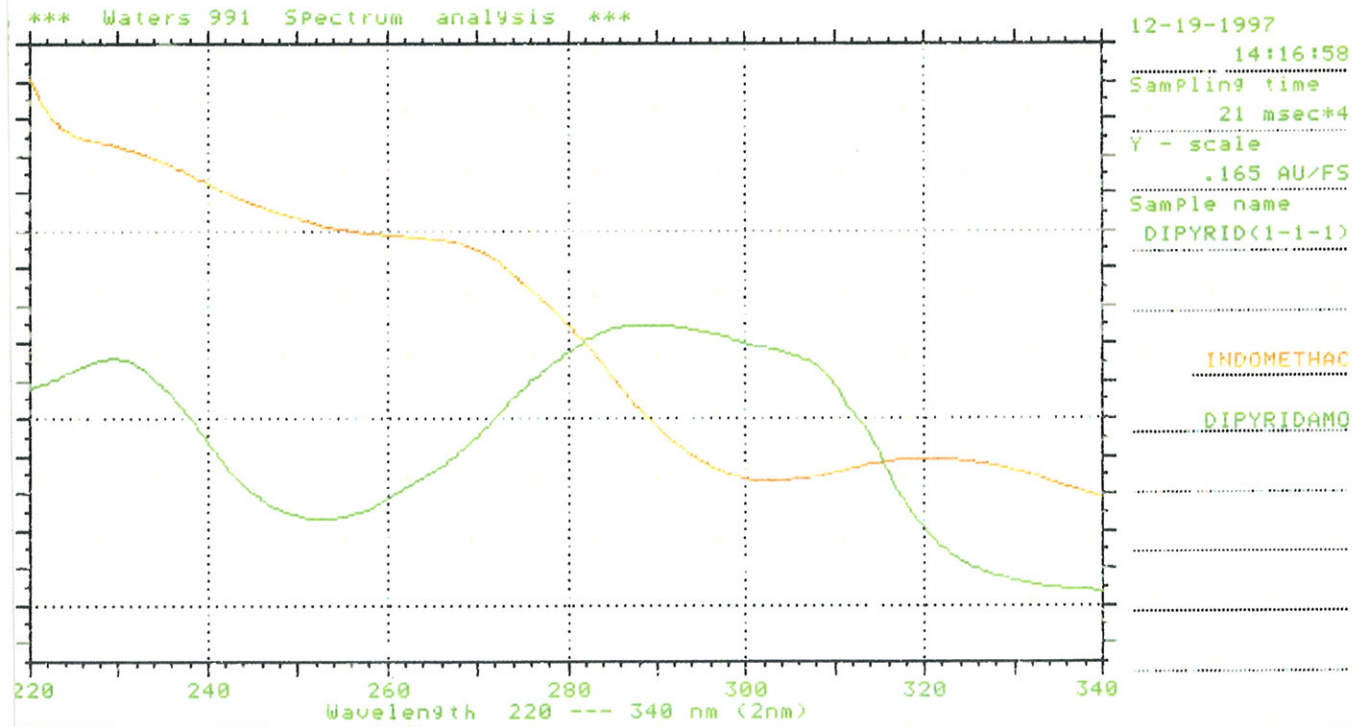


Figure 17 : Spectres du dipyrïdamole et de l'indométhacine



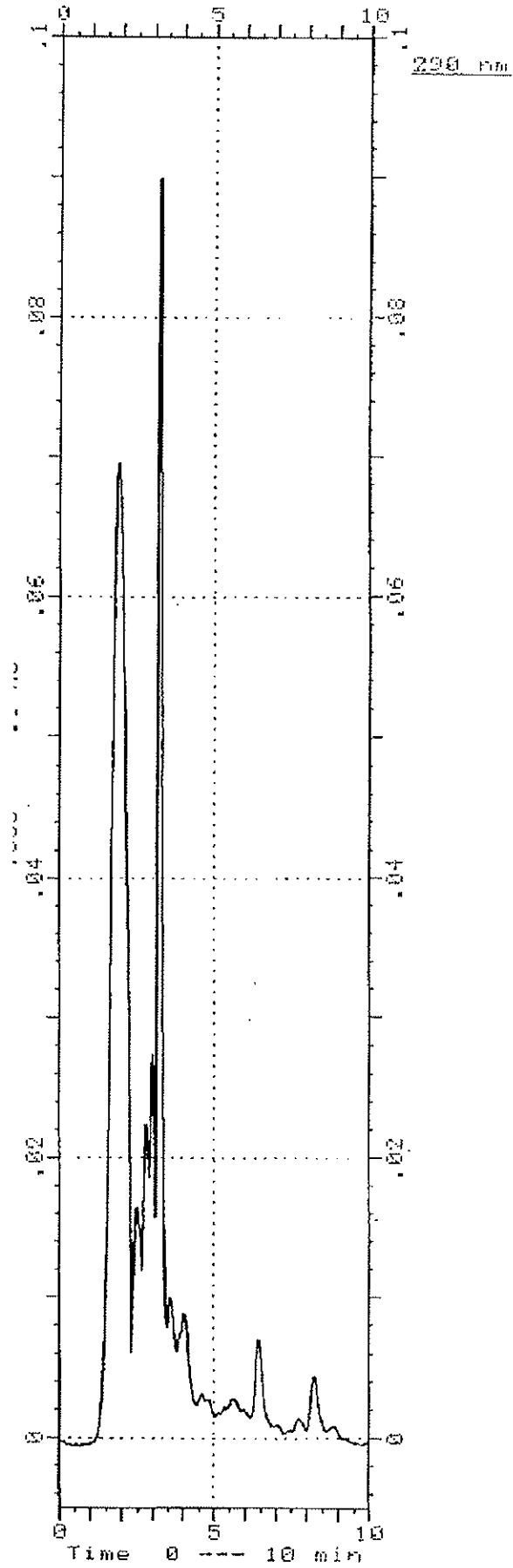
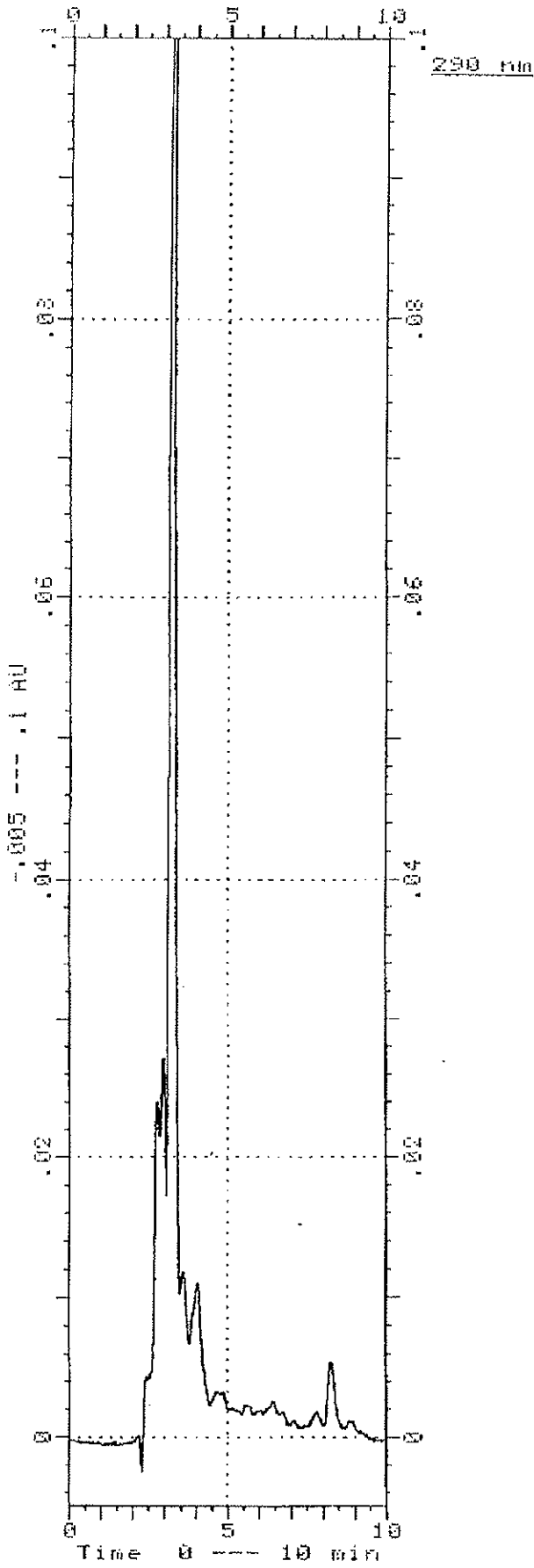
RETURN End [1] Plot



RETURN Next [1] Plot [2] Digital

G0

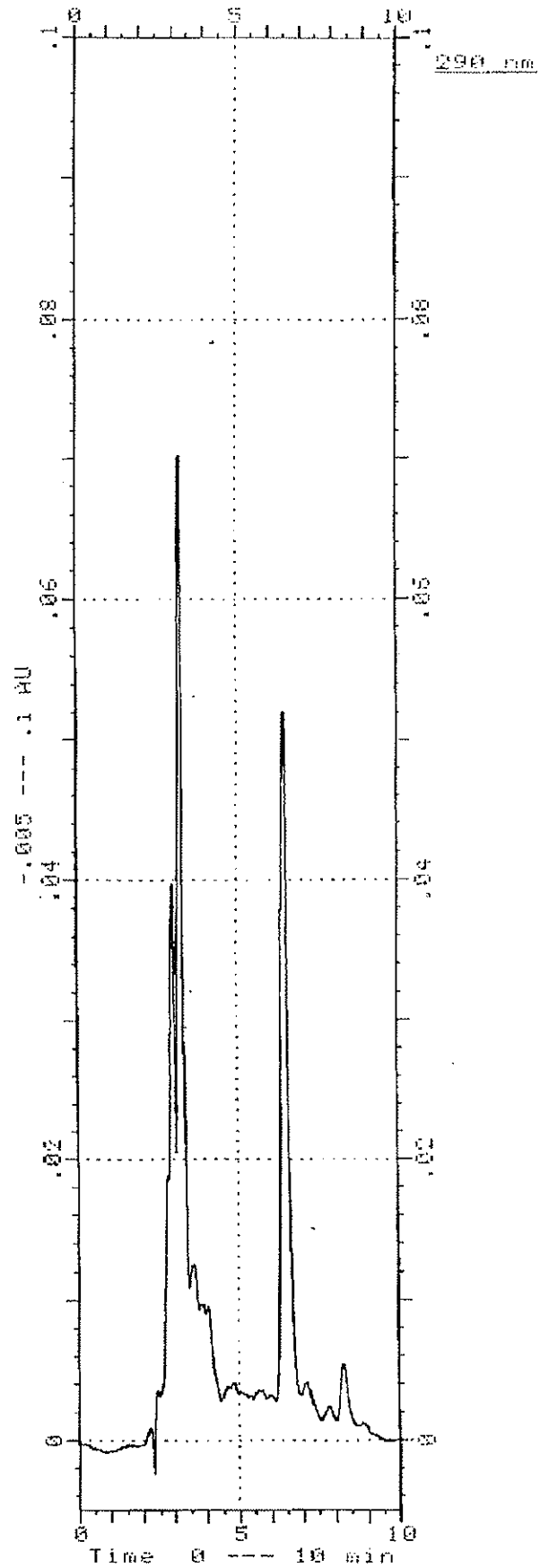
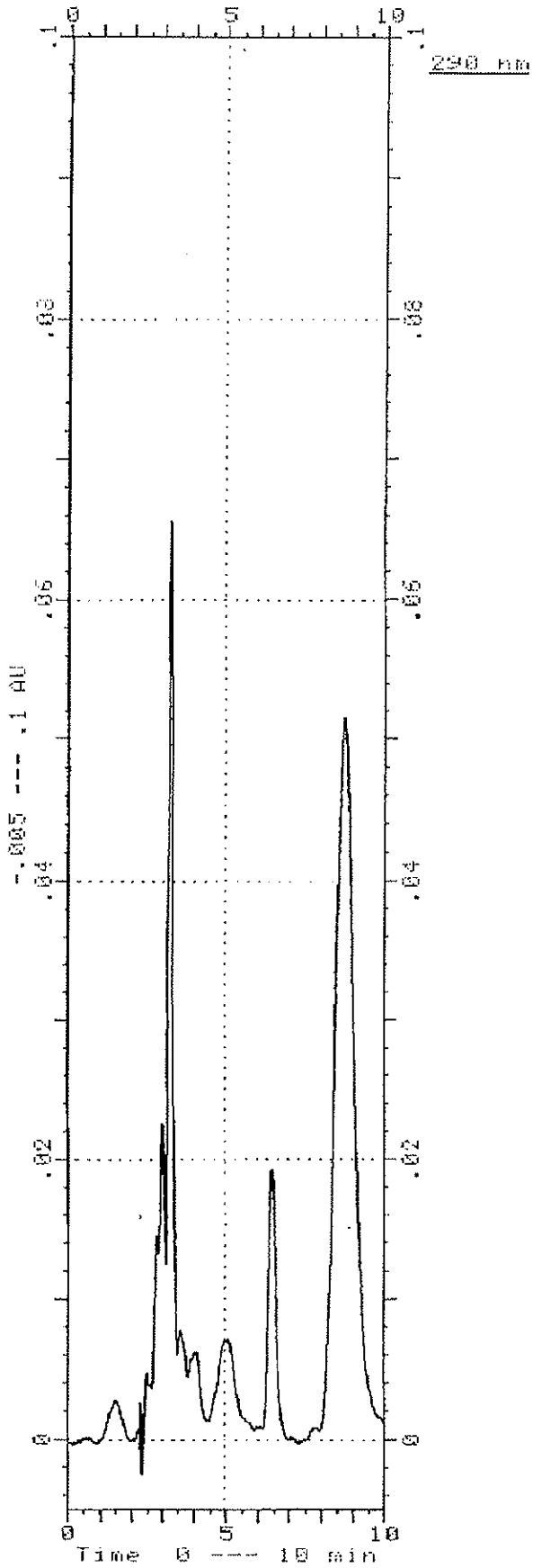
G 50



Gamme d'étalonnage du dipyrïdamole

G 250

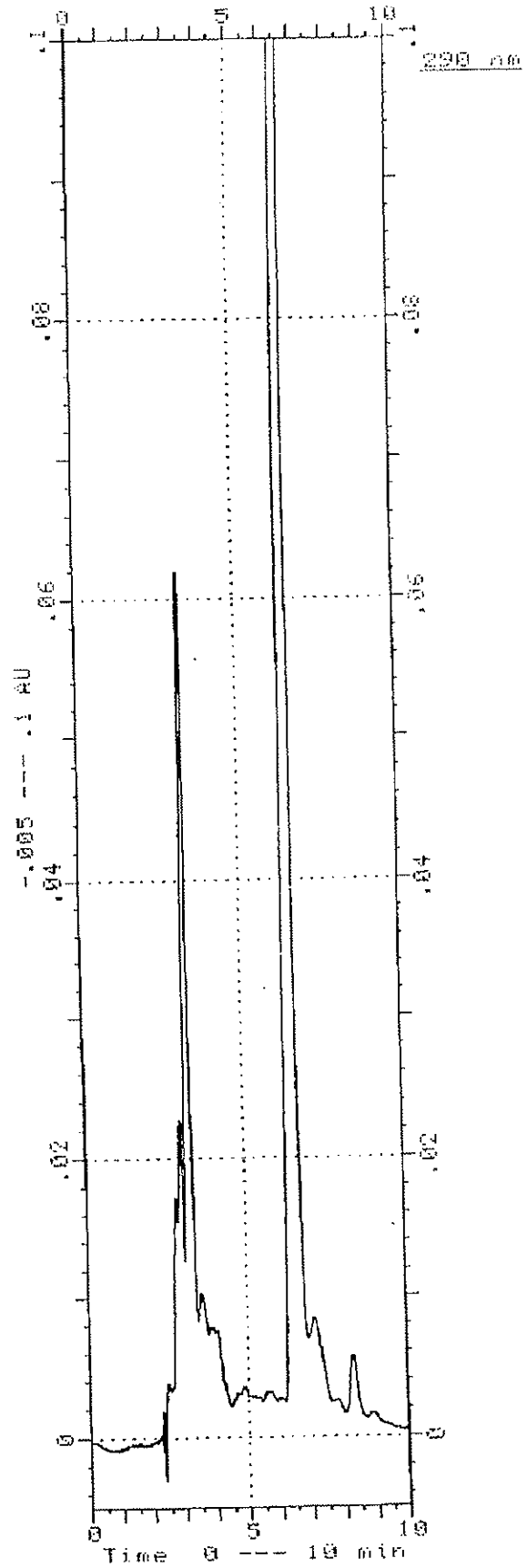
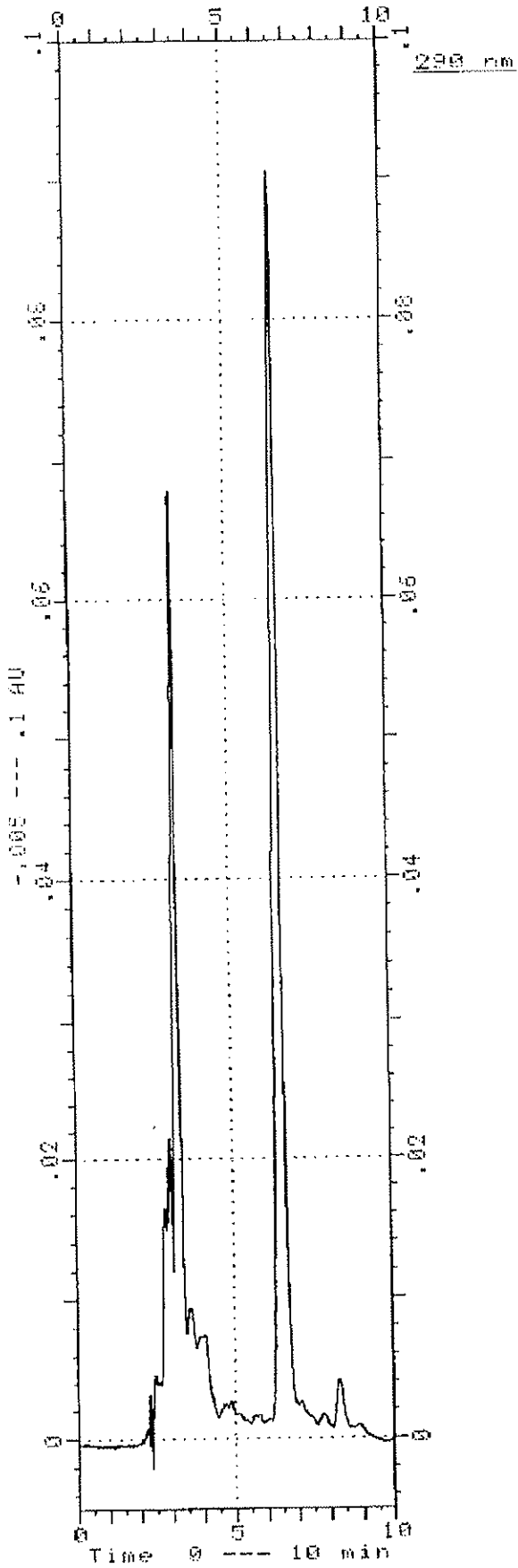
G 500



Gamme d'étalonnage du dipyridamole

G 1000

G 2000



Gamme d'étalonnage du dipyrïdamole

Tableau 9 : Gamme d'étalonnage du dipyridamole et son graphe

DIPYRIDAMOLE 18.12.97

N°	NG DIPYRID	HAUTEUR
1	0.0000	0.0000
2	50.0000	0.0057
3	250.0000	0.0188
4	500.0000	0.0490
5	1000.0000	0.0888
6	2000.0000	0.1724

DIPYRIDAMOLE 18.12.97 : HAUTEUR = a + b * NG DIPYRID
 n obs = 1

a = 0.00110 ± 0.00180 Signification : N.S.
 b = 0.00009 ± 0.00000 Signification : 0.1 %

Coefficient de corrélation (r) : 0.99902
 Ecart-type résiduel (s) : 0.00326
 Rapport de variances (F) : 2040.06924

N°	Y obs	Y calc	Poids	Ecart	E.type	E.réduit
1	0.0000	0.0011	1.0000	-0.0011	0.0033	-0.3376
2	0.0057	0.0054	1.0000	0.0003	0.0033	0.0866
3	0.0188	0.0227	1.0000	-0.0039	0.0033	-1.1920
4	0.0490	0.0443	1.0000	0.0047	0.0033	1.4506
5	0.0888	0.0874	1.0000	0.0014	0.0033	0.4167
6	0.1724	0.1738	1.0000	-0.0014	0.0033	-0.4241

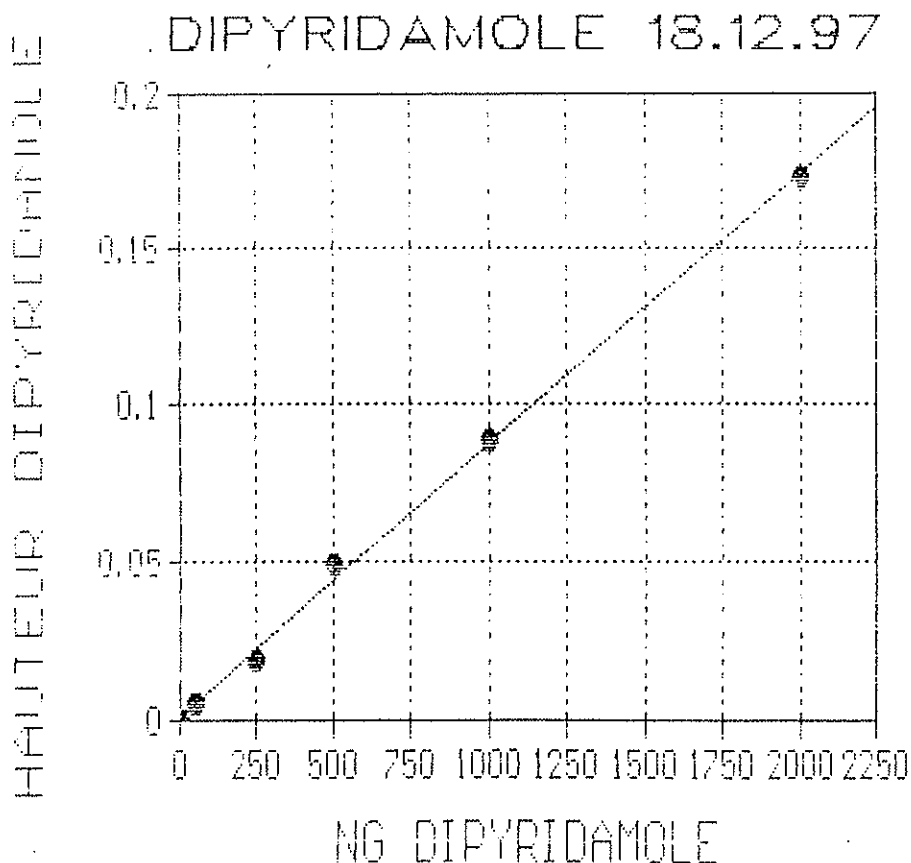


Figure 18 : Chromatogramme de l'échantillon CHE (sans dilution).

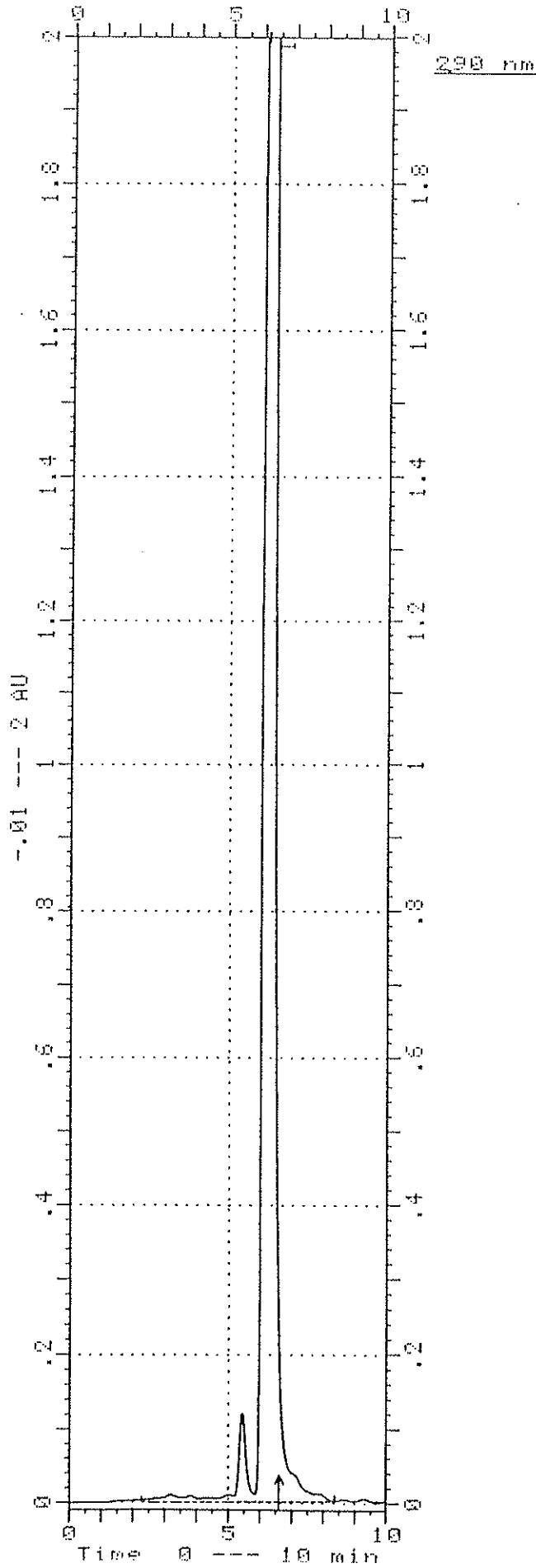


Figure 19 : Chromatogramme de l'échantillon COU (sans dilution).

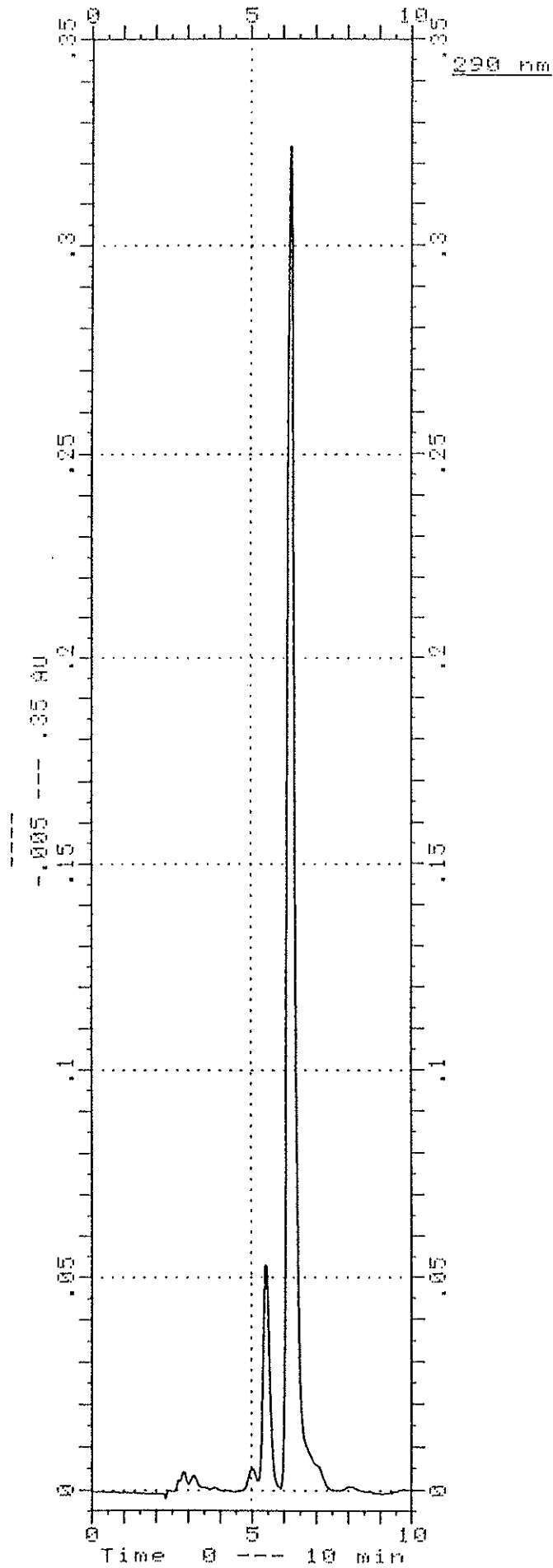


Figure 20 : Chromatogramme de l'échantillon CHE après dilution (sans β -glucuronidase)

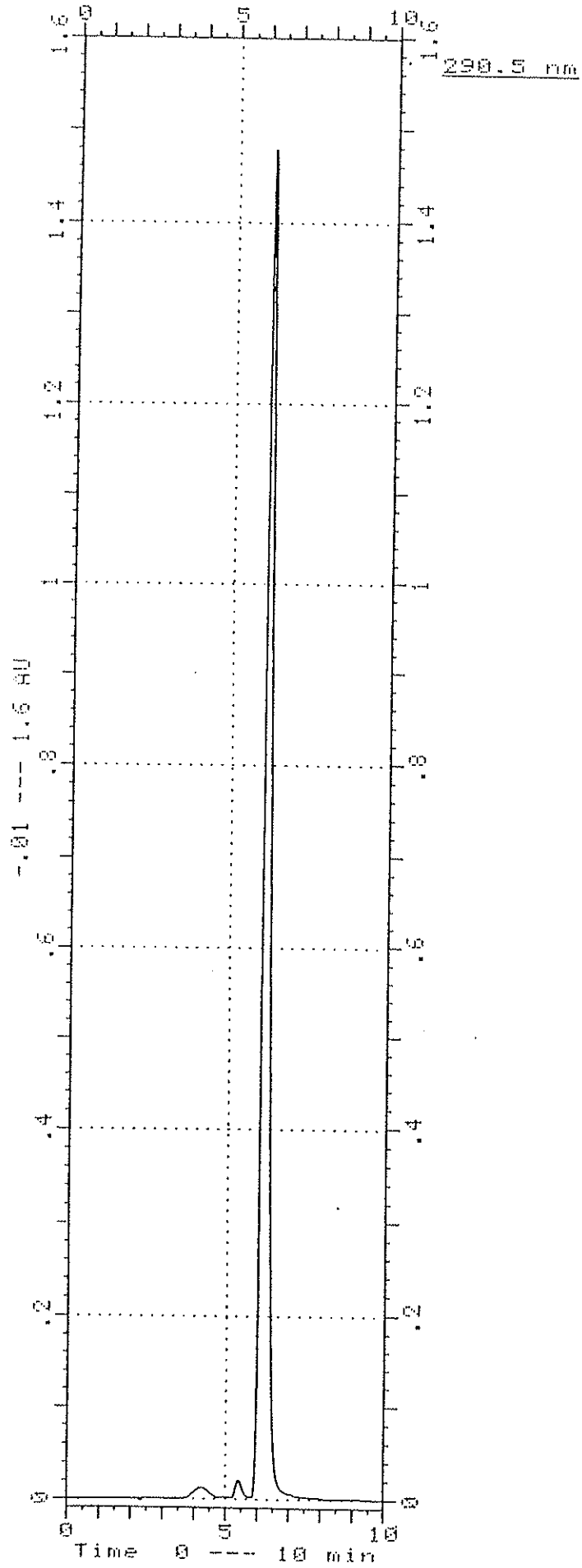


Figure 21 : spectre de l'échantillon CHE (sans β -glucuronidase)

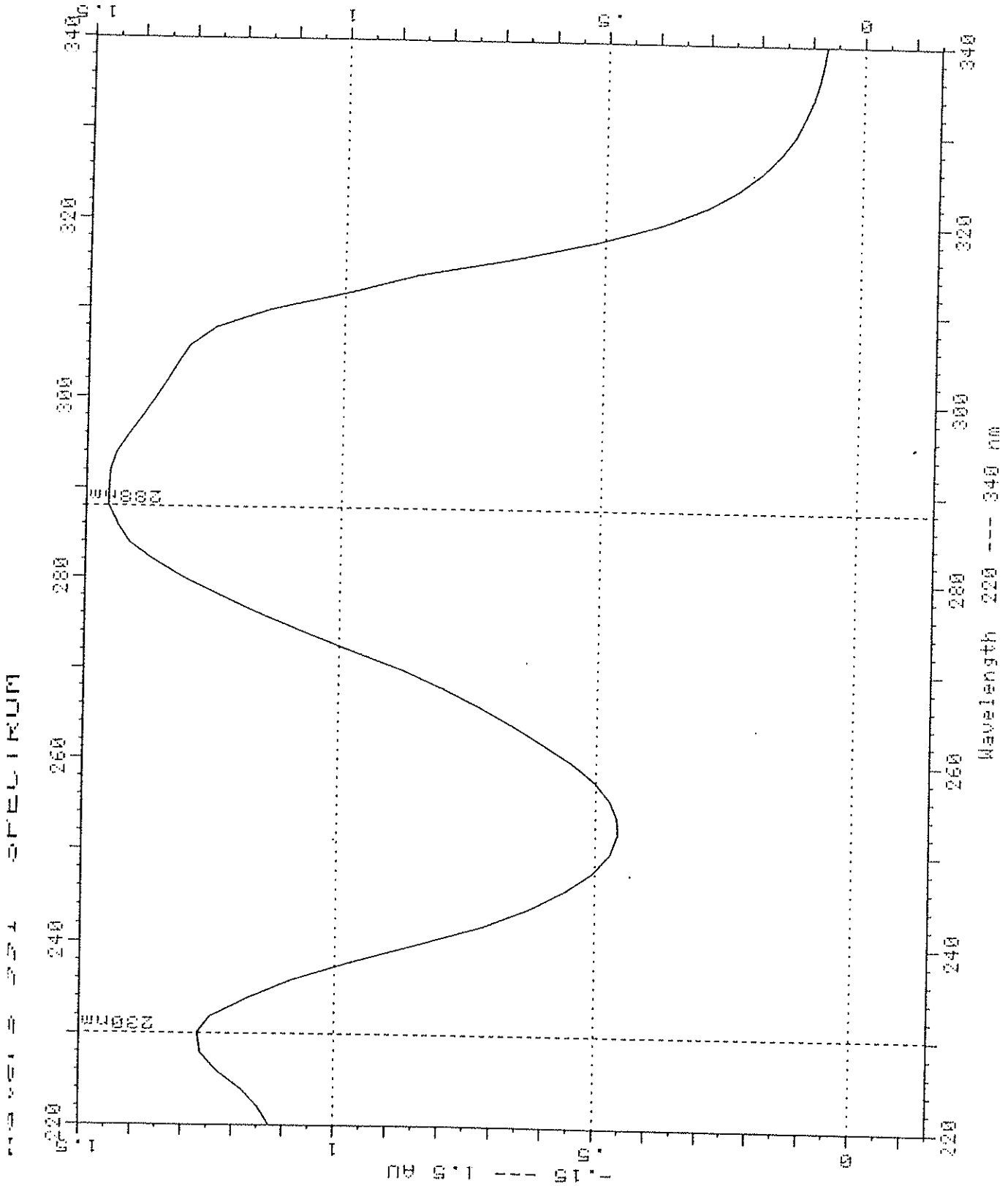


Figure 22 : comparaison entre le spectre CHE (sans β -glucuronidase) et le spectre étalon du dipyridamole

..... dipyridamole
—— étalon

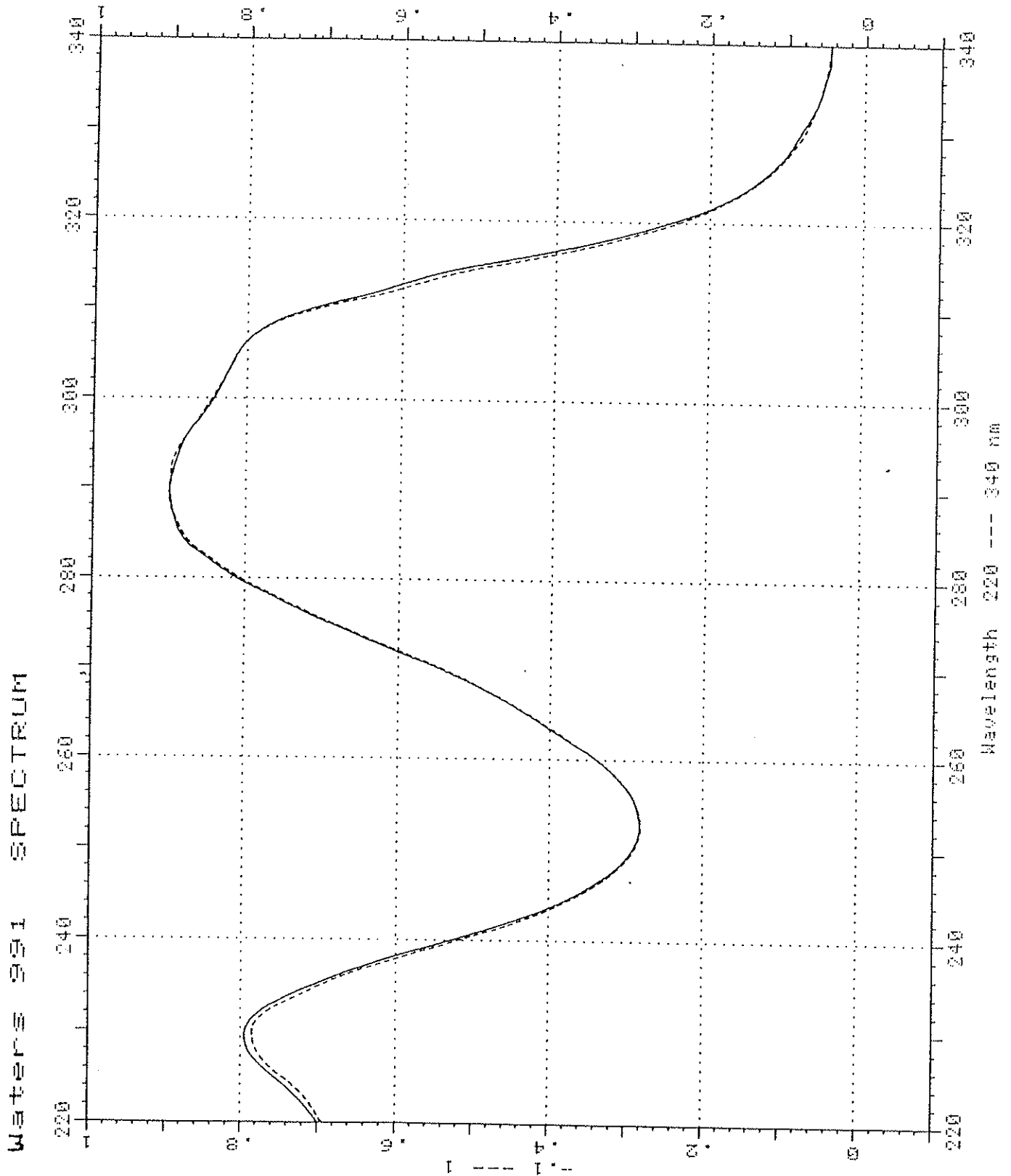


Figure 23 : spectre du métabolite

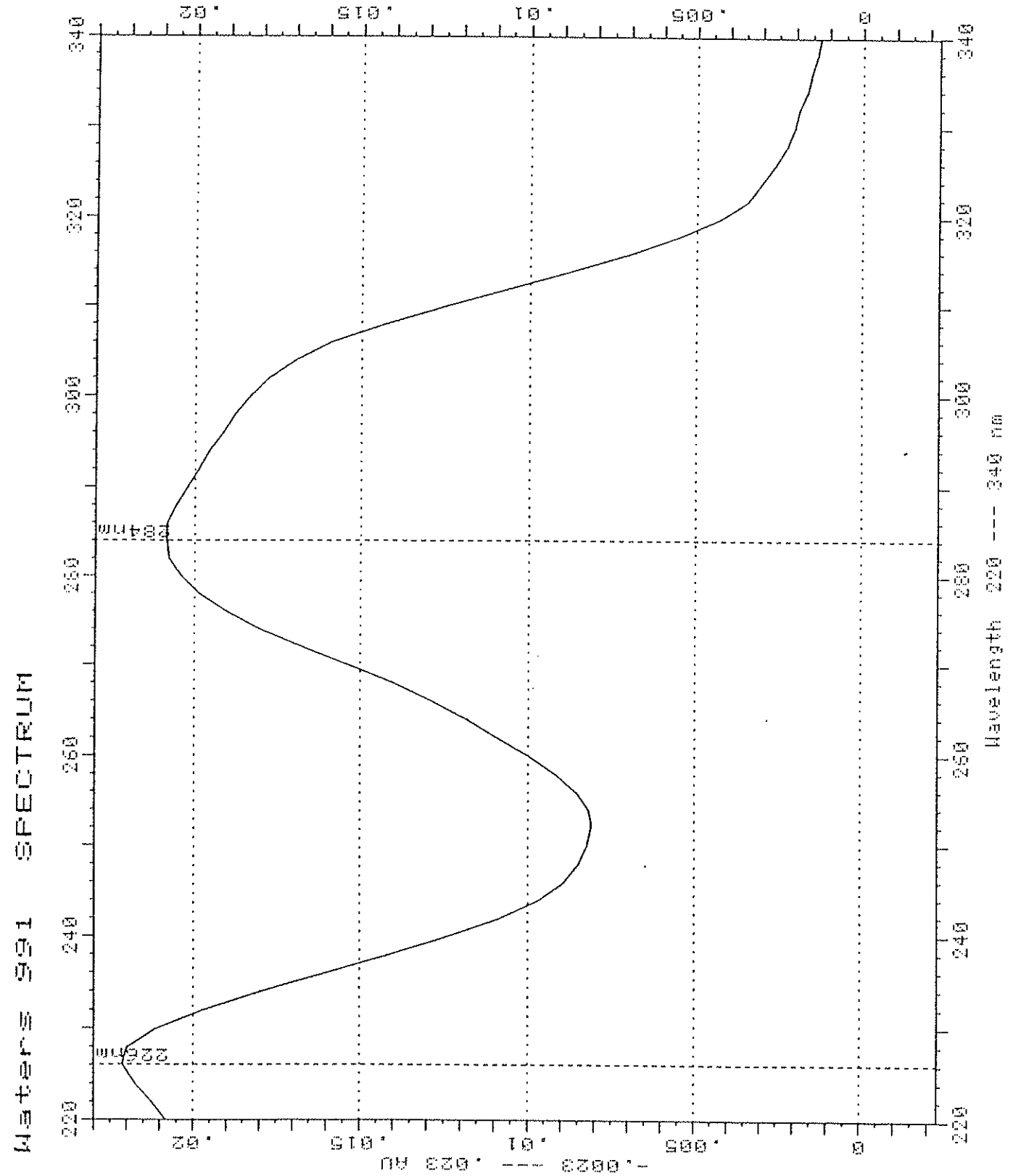


Figure 24 : comparaison entre le spectre du dipyridamole et du métabolite

..... dipyridamole
—— métabolite

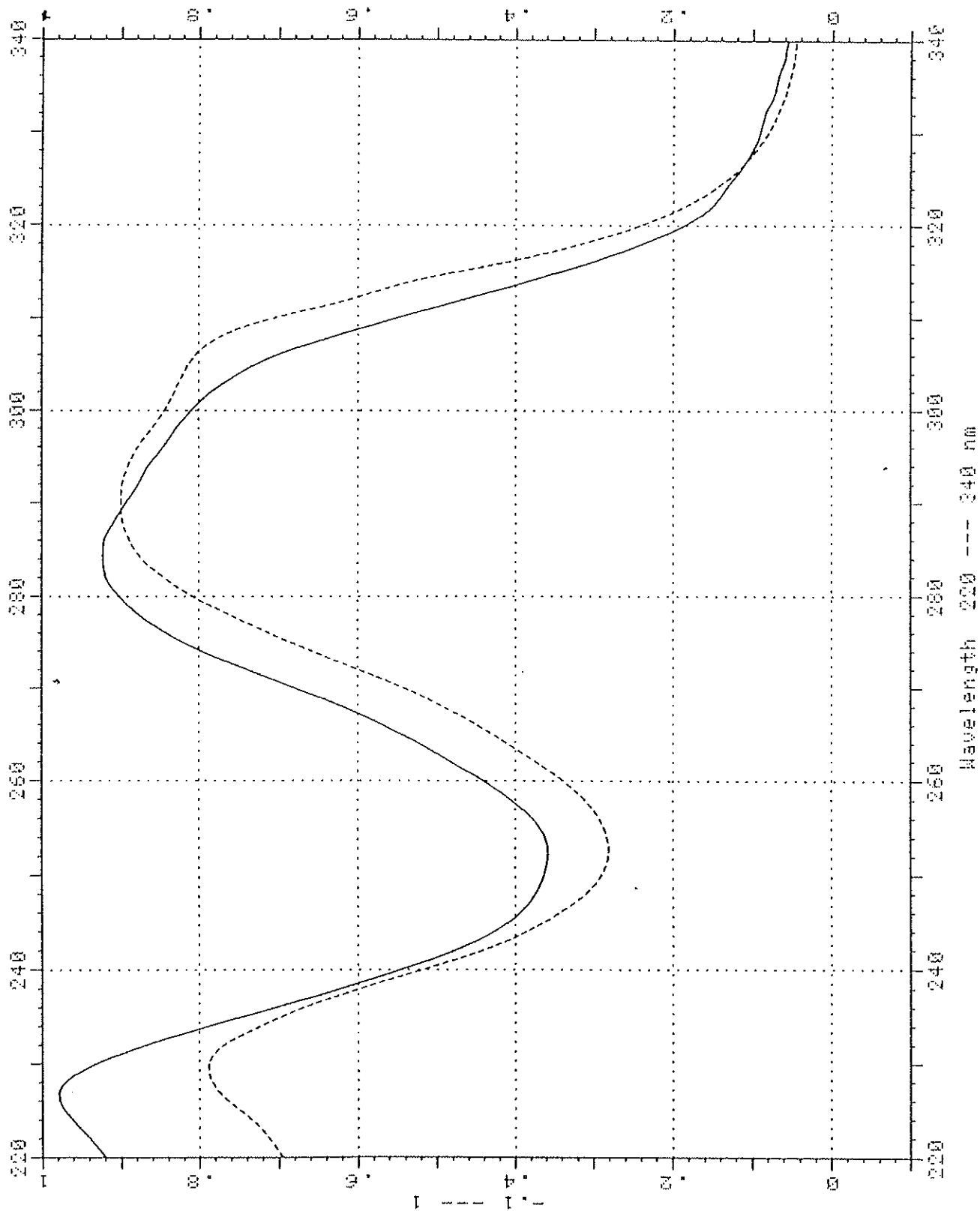


Figure 25 : Chromatogramme de l'échantillon CHE, avec β -glucuronidase (après dilution)

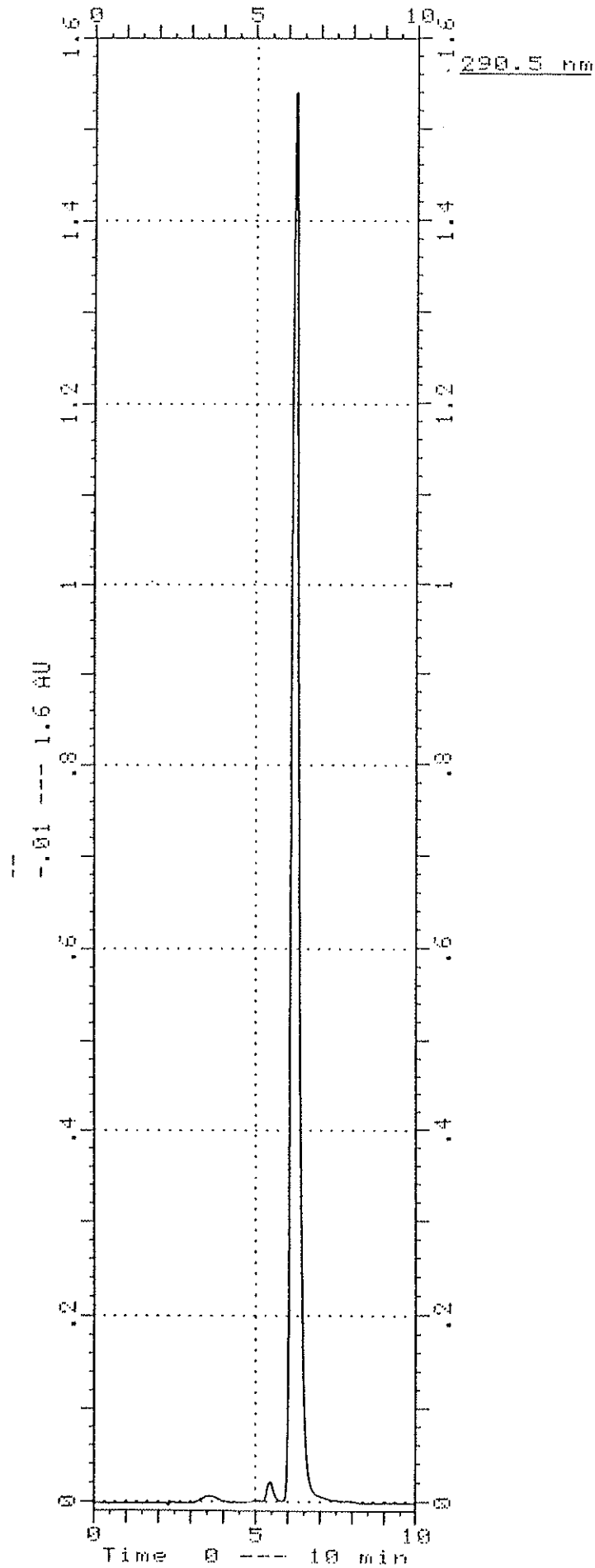


Figure 26 : Chromatogramme de l'échantillon BET sans β -glucuronidase (non dilué).

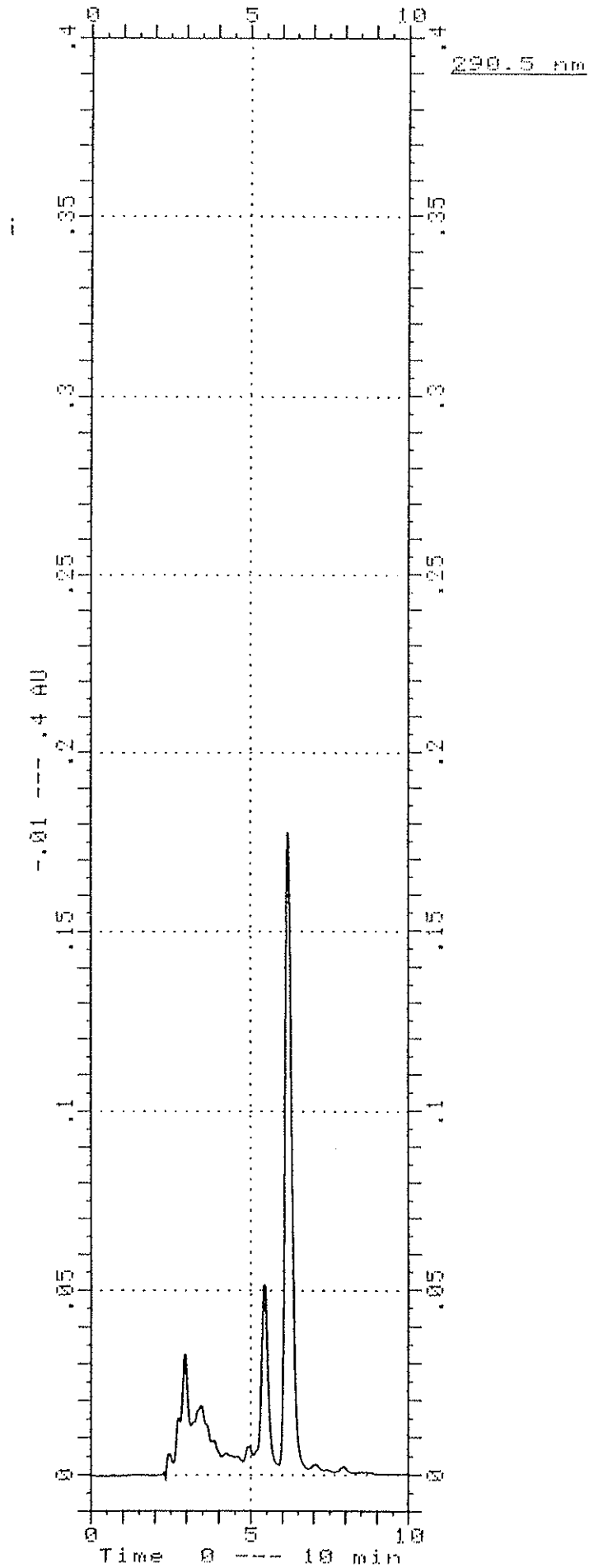
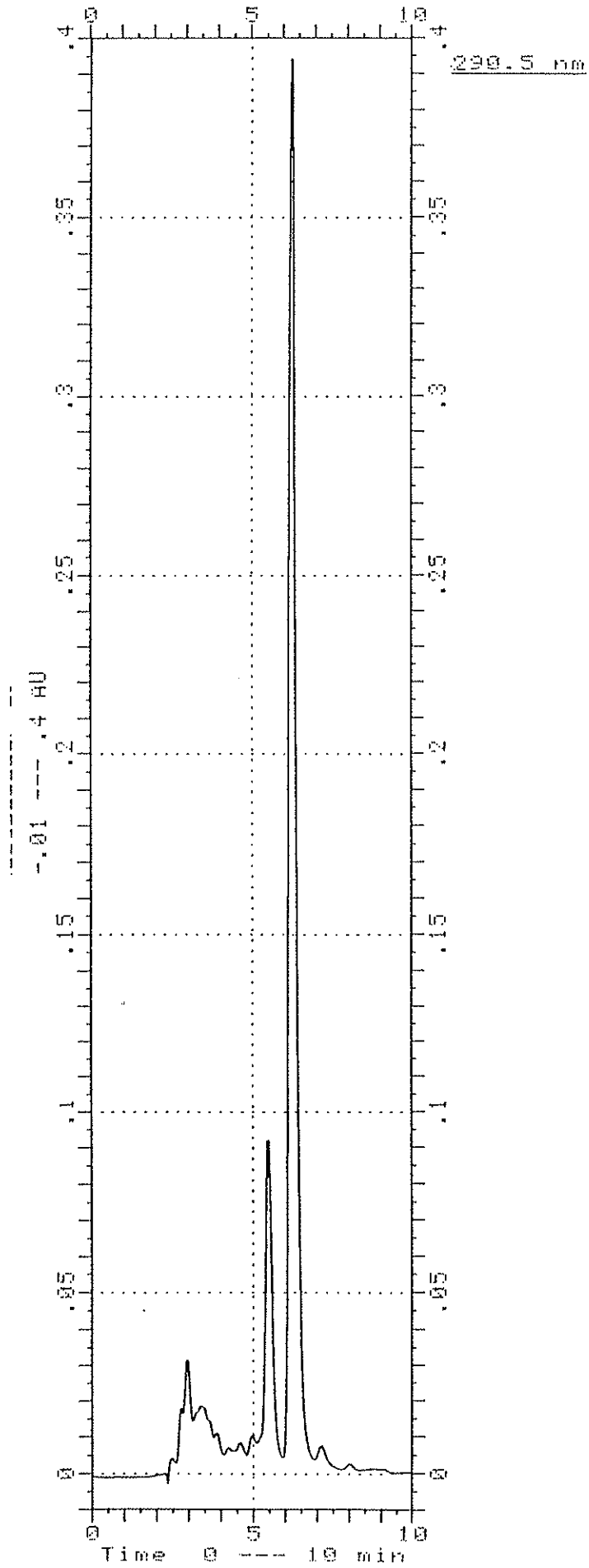


Figure 27 : chromatogramme de l'échantillon BET, avec β -glucuronidase (non dilué).



DOSAGE DU DIPYRIDAMOLE LIBRE DANS LES CALCULS

SUJET	Hauteur (50 µL)	Quantité calculée (µg/50µL)	Volume de reprise (µL)	Quantité totale (µg/p.e)	Prise d'essai (mg)	Dipyridamole/p.e (mg/mg)	% de dipyridamole libre
CHE	1.4773	25.0190	8000	4003.04	6.3	0.6954	69 %
LEV	0.5172	8.7447	8000	1399.15	10.5	0.1333	13 %
BET	0.1750	2.9442	200	11.78	11.3	0.0010	0,1 %
COU	0.4380	7.4022	800	118.44	11.7	0.0101	1 %
BRO	0.3541	5.9801	1200	143.22	13.6	0.0106	1 %
FOR	0.3562	6.0157	200	24.06	15.3	0.0016	0,16 %
JOR	0.4425	7.4785	500	74.79	12.6	0.0059	0,59 %
SAV	0.0118	0.1779	200	0.712	14.3	0.00005	0,005 %

*Tableau 10***DOSAGE DU DIPYRIDAMOLE TOTAL * DANS LES CALCULS**

(TOTAL = Libre + Glucuronoconjugué)

SUJET	Hauteur (50 µL)	Quantité calculée (µg/50µL)	Volume de reprise (µL)	Quantité totale (µg/p.e)	Prise d'essai (mg)	Dipyridamole/p.e (mg/mg)	% de dipyridamole libre
CHE	1.5388	26.0615	8000	4169.84	6.4	0.6515	65 %
LEV	0.5836	9.8703	8000	1579.25	11.4	0.1385	13 %
BET	0.3898	6.5852	200	26.34	12.8	0.0021	0,2 %
COU	0.5084	8.5956	800	137.53	12.2	0.0113	1,13 %
BRO	0.3672	6.2021	1200	148.85	15.0	0.0099	0,99 %
FOR	0.3643	6.1530	200	24.61	16.7	0.0015	0,15 %
JOR	0.5149	8.7057	500	87.06	13.0	0.0067	0,67 %
SAV	0.0576	0.9542	200	3.82	14.5	0.0003	0,03 %

Tableau 11

DISCUSSION

V. DISCUSSION

V.1. POPULATION ETUDIEE

Comme nous l'avons déjà précisé nous avons testé 240 calculs sur lesquels 19 ont présenté une fluorescence. Après étude du dossier clinique, la prise de dipyridamole n'a été confirmée que chez 13 patients et nous avons choisi d'approfondir l'analyse pour 8 patients. Les données clinico-biologiques des dossiers sont rarement complètes, ce qui pose un problème majeur, notamment par l'absence d'indications sur la durée de traitement.

Il est néanmoins intéressant de signaler que pour la majorité des patients, les données biologiques montrent une nette augmentation des globules blancs (contexte infectieux) avec un bilan hépatique très souvent perturbé et pour un patient sur deux une hypercholestérolémie associée.

Sur quelques rares dossiers on retrouve les résultats d'une biliculture ou d'une hémoculture. Ces données auraient pourtant été indispensables.

V.2. TECHNIQUE

V.2.1. Test de fluorescence sous lumière ultraviolette

Nous avons précisé à plusieurs reprises que ce test pouvait ne pas être spécifique du dipyridamole. Nous avons testé 8 calculs répondant positivement à ce test et même pour ceux dont la fluorescence est apparue très faible, l'analyse par CLHP a confirmé la présence de dipyridamole. Souvent, pour ces échantillons le médicament libre se trouve en faible quantité, mais l'action de la β -glucuronidase révèle alors la forme glucurono-conjuguée.

V.2.2. Chromatographie sur couche mince

Les 8 échantillons testés ont migré avec le même rapport frontal que le dipyridamole pur. Nous avons un doute concernant un seul échantillon mais en continuant les analyses nous avons constaté qu'il contenait lui aussi du dipyridamole.

Nous avons également mis en évidence un métabolite du médicament qui semble très proche structuralement de ce dernier. Il n'est donc pas impossible que ces deux molécules migrent d'une manière très semblable, ce qui expliquerait la présence d'un double spot pour l'échantillon "SAV".

V.2.3. Spectrophotométrie infrarouge

Cette technique d'analyse permet de faire un très bon "*screening*" des différentes molécules contenues dans un calcul. L'interprétation des spectres est délicate quand on est novice en la matière, mais malgré tout, nous avons pu repérer du dipyridamole dans les 8 échantillons que nous avons testé.

Il est impératif pour cette technique de faire un spectre sur chaque couche structurale constituant les calculs, car visiblement le dipyridamole n'est pas réparti de façon homogène dans ces derniers. Si le prélèvement n'est pas bien effectué, il est sûr que l'on ne retrouve pas le produit.

Ainsi, un échantillon non rentré dans cette étude n'a pas présenté de dipyridamole après analyse infrarouge, mais la CLHP en a révélé. Ce patient avait pris de la PERSANTINE 75[®] et a présenté un calcul de la voie biliaire principale. Nous pouvons en conclure que les prélèvements avant analyse infrarouge sont primordiaux.

La spectrophotométrie infrarouge nous a également permis de mettre en évidence la présence d'un mélange bilirubinate et palmitate de calcium. Nous verrons par la suite que cette découverte a son importance.

V.2.4. Chromatographie liquide haute performance

Cette technique présente l'avantage et l'inconvénient de ne rechercher qu'un seul produit. Le dipyridamole s'est révélé présent dans chacun de nos échantillons. La technique permet de repérer d'infimes quantités de produit et de les quantifier.

Nous avons également pu repérer un métabolite du dipyridamole qui est structuralement très proche de ce dernier, comme le confirme son spectre U.V...

Malgré le problème que pose le fait de ne pas avoir d'étalon interne, nous avons pu obtenir des résultats cohérents avec des gammes d'étalonnage ayant un coefficient de corrélation voisin de 1.

L'hydrolyse enzymatique par la β -glucuronidase nous a donné des renseignements précieux. Nous avons montré que dans les calculs contenant de fortes proportions en dipyridamole libre, le taux du métabolite glucuronoconjugué est faible. Par contre dans les calculs à faible teneur en dipyridamole, la proportion en dipyridamole conjugué est relativement importante.

V.3. EXPLOITATION DES RESULTATS : HYPOTHESE DE LITHOGENESE DES CALCULS MEDICAMENTEUX A DIPYRIDAMOLE

V.3.1. Introduction

Nous savons aujourd'hui que la formation des calculs biliaires peut nécessiter la conjonction de plusieurs facteurs comme la saturation de la bile, la stase vésiculaire et la précipitation d'une substance en excès.

Ces différentes étapes pourraient être favorisées par l'utilisation de certains médicaments.

Dans le cas des lithiases biliaires à dipyridamole, c'est vraisemblablement la précipitation d'une substance en excès qui est à incriminer.

V.3.2. Précipitation d'une substance en excès

Notre étude a montré que la fraction médicamenteuse était majoritairement constituée de dipyridamole libre.

Par extrapolation à partir des observations déjà réalisées sur la glafénine (4), la nature la plus souvent non conjuguée du médicament, son association quasi constante à un mélange bilirubinate-palmitate de calcium et la fréquence de l'hyperleucocytose pourraient évoquer une étiopathogénie infectieuse par déglucuronocouplage des métabolites sous l'influence des β -glucuronidases bactériennes.

CONCLUSION

VI. CONCLUSION

Depuis octobre 1993, l'analyse morphoconstitutionnelle des calculs par méthode séquentielle physico-chimique (infrarouge, diffraction X) a été publiée en France à la nomenclature des actes de biologie médicale.

Nous avons pu montrer qu'il n'est jamais aisé de mettre en évidence une molécule particulière et de la quantifier. Notre travail nous a permis de doser le dipyridamole et de le quantifier dans les calculs biliaires.

Ce travail a également montré que dans le cas particulier des calculs biliaires à dipyridamole, l'analyse par spectrophotométrie infrarouge gagne à être complétée par une analyse en chromatographie liquide haute performance. Cette dernière permet une meilleure quantification du médicament et la mise en évidence de métabolites mineurs éventuels.

Nous avons également proposé une hypothèse de formation de ces calculs médicamenteux, mais d'autres travaux éventuellement prospectifs sont indispensables pour la confirmer.

BIBLIOGRAPHIE

1. **ERLINGER S.**
Physiopathologie, épidémiologie et histoire naturelle de la lithiase biliaire.
Encycl. Méd. Chir., (Paris-France), Foie-Pancréas, 7047 A¹⁰, 09-1986, 10 p.
2. **MÆSCH C., SAUTEREAU D., BERRY P., CESSOT F.,
GAINANT A., RABY C., PILLEGAND B.**
Library of reference infrared spectra for the analysis of gallstones.
Gastroenterology, 1991, 100 (5-Part. 2) : A.776 (Abstract).
3. **MANOEUVRE J.**
Calculs biliaires. Composition et analyse par spectrophotométrie infrarouge.
Thèse doctorat en pharmacie, Limoges, 1989, 264 p.
4. **MÆSCH C., GAINANT A., SAUTEREAU D.**
Lithiase biliaire de glafénine. Identification par spectrophotométrie infrarouge.
Gastroenterol. Clin. Biol., 1988, 12, 387-389.
5. **SAUTEREAU D., MÆSCH C., CESSOT F., PILLEGRAND B.**
Lithiase biliaire médicamenteuse.
Editions Techniques Encycl. Méd. Chir. (Paris-France), Hépatologie, 1994,
F.a. 7-047-A-10, 1994, 3 p.
6. **HOLZBACH RT., KIBE A.**
Pathogenesis of cholesterol gallstones. In Gallstones.
COHEN SD., SOLOWAY RD. Ed. Churchill Livingstone, New-York, 1985,
73-100.
7. **TROTMAN BW.**
Formation of pigment gallstones. In Gallstones.
COHEN SD., SOLOWAY RD. Ed. Churchill Livingstone, New-York, 1985 ;
299-307.
8. **OSTROW D.**
The etiology of pigment gallstones.
Hepatology, 1984, 4 (5), 215S-222S.

9. **MAKI T., MATSUSHIRO T., SUZUKI N.**
Clarification on the nomenclature of pigment gallstones.
Am. J. Surg., 1982, 144, 302-305.
10. **SOLOWAY R.D., TROTMAN B.W., OSTROW J.D.**
Pigment gallstones.
Gastroenterology, 1977, 72, 167-182.
11. **MAKI T.**
Pathogenesis of calcium bilirubinate gallstones.
Ann. Surg., 1966, 164, 90-100.
12. **AKIYOSHI T., NAKAYAMA F.**
Bile acid composition in brown pigment stones.
Dig. Dis. Sci., 1990, 35, 27-32.
13. Body fluids : Bile. In Geigy Scientific Tables.
Ciba-Geigy limited, Basle, 1981, 139-144.
14. **THOMAE,**
Brit. Pat. 807, 826 (1959).
In The Merck Index, BUDAVARI S. Ed., Merck and Co. Inc., Rahway
(USA), 1989, 3354.
15. **BEISENHERZ G. KOSS F.W., SCHULE A., GEBAUER I., BARISCH R., FRODE R.**
Das Schicksal des 2, 6-Bis (diäthanolamino)-4,8-dipiperidinopyrimido
(5,4-d) pyrimidin im menschlichen und tierischen Organismus.
Arzneimittel-Forsch, 1960, 10, 307-312.
16. **ZAK S.B., TALLAN H.H., QUINN C.P., FRATTA L., GREENGARD P.**
The determination and physiological distribution of dipyridamole and its
glucuronides in biological material.
J. Pharmacol. Exp. Therap., 1963, 141, 392-398.

17. **Dossier pharmaceutique PRANDIOL 75[®]**
Pureté du principe actif/Biodisponibilité.
CARRION - *Bothu/département médical.*
5258 Av. du Maréchal Joffre - 92000 NANTERRE.
18. **E.S. DIPYRIDAMOLE 75 mg.**
Laboratoires Français des produits génériques.
Dossiers hospitaliers destinés aux pharmaciens des hôpitaux.
19. **NIELSEN - KUDSK F., PEDERSEN A.K.**
Pharmacokinetics of dipyridamole.
Acta Pharmacol. Toxicol., 1979, 44, 391-399.
20. **Dictionnaire VIDAL 1997**
Edition du Vidal, Paris, 1997, 359, 360, 392, 506, 1275.
21. **CHOY AM. LANG CC.**
Gallbladder perforation after long-term dapsone therapy.
J. Intern. Med., 1990, 228, 409-410.
22. **SCHAAD UB, TSCHAEPELER H., LENTZE MJ.**
Transient formation of precipitations in the gallbladder, associated with ceftriaxone therapy.
Pediatr. Infect. Dis., 1986, 5, 708-710.
23. **CAPRON JP.**
La lithiase biliaire médicamenteuse
Méd. Chir. Dig., 1993, 22, 86-87.
24. **Boston collaborative drug surveillance program**
Surgically confirmed gallbladder disease, venous thromboembolism and breast tumors in relation to post menopausal oestrogen therapy.
N. Engl. J. Med., 1974, 290, 15-19.
25. **BENNION L.J., GINSBERG RL., GARNICK MB., BENNETT PH.**
Effects of oral contraceptives on the gallbladder bile of normal women.
N. Engl. J. Med., 1976, 294, 189-192.

26. **VAN DER WREF SD, VAN BERGE HENEGOUWEN GP, RUBEN AT, PALSMA DM.**
Biliary lipids, bile acid metabolism, gallbladder motor function and small intestinal transit during ingestion of an subfifty oral contraceptive.
J. Hepatol., 1987, 4, 318-326.
27. **HENRIKSSON P., EINARSSON K., ERIKSSON A., KELTER U., ANGELIN B.**
Oestrogen-induced gallstone formation in males.
J. Clin. Invest., 1989, 84, 811-816.
28. **LA VECCHIA C., NEGRI E., D'AVANZO B.; PARAZZINI F., GENTILE A., FRANCESCHI S.**
Oral contraceptives and non contraceptive oestrogens in the risk of gallstone disease requiring surgery.
J. Epidemiol. Community Health, 1992, 46, 234-236.
29. **STEINER A., WEISSER B., VETTER W.**
A comparative review of the adverse effects of treatments for hyperlipidaemia.
Drug Saf., 1991, 6, 118-130.
30. **SPES CH., ANGERMANN CE., BEYER RW., SCHREINER J., LEHNERT P.**
Increased incidence of cholelithiasis in heart transplant recipients receiving cyclosporine therapy.
J. Heart Transplant, 1990, 9, 404-407.
31. **RANDALL LH., SHADDY RE., STURTEVANT JE., REID BS., MOLTENI RA.**
Cholelithiasis in infants receiving furosemide : a prospective study of the incidence and one year follow-up.
J. Perinatol., 1992, 107-111.

32. **BUSCAIL L., TAUBER JP., PUEL-BOSQUET C., ESCOURROU J. BAYARD F., RIBET A.**
Gallstones and treatment with octreotide for acromegaly.
Br. J. Med., 1989, 299, 1162-1163.
33. **TANKURT E., YEGEN BC., BIREN T. et al.**
Influence of pirenzepine on gallbladder contraction in man induced by sham feeding or an intraduodenal meal.
Digestion, 1992, 51, 103-109.
34. **SARLES JC.**
Hormonal control of sphincter of Oddi.
Dig. Dis. Sci., 1986, 31, 208-212.
35. **MALAVE A., YIM GK.**
Effects of chronic morphine on biliary trac responses to cholecystokinin-octapeptide in male guinea pigs.
Life Sci., 1992, 51, 513-517.
36. **DAUDON M., PROTAT MF., REVEILLAUD RJ.**
Toxicité rénale de la glafénine chez l'homme : calculs rénaux et insuffisance rénale aiguë.
Ann. Biol. Clin., 1983, 41, 105-111.
37. **MOESCH C.**
Rapid test for the detection of dipyridamole-containing gallstones.
Ann. Biol. Clin., 1994, 52, 293-294.
38. **PEDERSON A.K.**
Specific determination of dipyridamole in serum by HPLC.
J. Chromatogr., 1979, 162, 98-103.
39. **CHEVALIER C., ROMBACH P.**
Determination of dipyridamole in blood using HPLC.
Feuill. Biol., 1979, 106, 129-133.

40. **STEYN J.M.**
Spectrofluorimetric determination of dipyridamole in serum. A comparison of two methods.
J. Chromatogr. (Biomed. Appl.), 1979, 169, 487-494.
41. **WOLFRAM K.M.**
High-performance liquid chromatographic analysis of dipyridamole in plasma and whole blood.
J. Chromatogr. (Biomed. Appl.), 1980, 183, 57-64.
42. **ROTH W., BESCHKE K.**
Fully automated high-performance liquid chromatography. A new chromatography for pharmacokinetic drug monitoring by direct injection of body fluid.
J. Chromatogr. (Biomed. Appl.), 1981, 222, 13-22.
43. **ROSENFELD J., DEVEREAU D.**
High-performance liquid chromatographic determination of dipyridamole.
J. Chromatogr. (Biomed. Appl.), 1982, 231, 216-221.
44. **FONTANI F., FINARDI G.P.**
Purity evaluation of dipyridamole by high-performance liquid chromatography.
J. Chromatogr., 1983, 283, 181-187.
45. **BARBERI M., MERLIN J.L.**
Sensitive determination of free and plasma protein-bound dipyridamole by high-performance liquid chromatography.
J. Chromatogr. (Biomed. Appl.), 1991, 565, 511-515.
46. **SKAR V., SKAR A.G., STROMME J.M.**
Beta-glucuronidase activity related to bacterial growth in common bile duct bile in gallstone patients.
Scand. J. Gastroenterol., 1988, 23, 83-89.
47. **SAUTEREAU D., MOESCH C.**
Récurrence of biliary drug lithiasis due to dipyridamole
Endoscopy, 1997, 29, 421-423

TABLE des MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	12
<u>PREMIERE PARTIE : GENERALITES</u>	14
<u>A - ANATOMIE DES VOIES BILIAIRES ET DU FOIE</u>	15
<u>I. INTRODUCTION</u>	15
<u>II. ANATOMIE DESCRIPTIVE</u>	16
II.1. MORPHOLOGIE EXTERNE.....	16
II.2. MOYENS DE FIXITE DU FOIE.....	19
<u>III. ANATOMIE FONCTIONNELLE VASCULAIRE</u>	20
<u>IV. PEDICULE HEPATIQUE</u>	21
IV.1. VEINE PORTE.....	22
IV.2. ARTERES HEPATIQUES.....	22
IV.3. VOIES BILIAIRES EXTRA-HEPATIQUES.....	23
IV.4. VOIE BILIAIRE PRINCIPALE.....	23
IV.4.1. Confluent biliaire supérieur ou convergence biliaire.....	24
IV.4.2. Canal hépatocholédoque.....	24
IV.4.3. Terminaison de la voie biliaire principale.....	25
IV.5. VOIE BILIAIRE ACCESSOIRE.....	25
IV.5.1. Vésicule biliaire.....	25
IV.5.2. Canal cystique.....	26
IV.6. VASCULARISATION DES VOIES BILIAIRES.....	26
<u>V. MOYENS D'EXPLORATION</u>	27
<u>B - LES CALCULS BILIAIRES : GENERALITES</u>	28
<u>I. LES DIFFERENTS TYPES DE CALCULS</u>	28
I.1. LES CALCULS CHOLESTEROLIQUES.....	29
I.2. LES CALCULS PIGMENTAIRES.....	29

II. COMPOSITION DE LA BILE	36
II.1. LES ELEMENTS MINERAUX (<i>TABLEAU 3</i>)	36
II.2. LES ELEMENTS ORGANIQUES (<i>TABLEAU 4</i>)	38
<u>C - ETUDE DU DIPYRIDAMOLE</u>	40
I. INTRODUCTION	40
II. SYNTHESE	41
III. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	41
III.1. CARACTERES	41
III.1.1. Caractères organoleptiques	41
III.1.2. Solubilité	41
III.2. IDENTIFICATION	42
III.2.1. Point de fusion.....	42
III.2.2. Test de solubilité.....	42
III.2.3. Réactions colorées ou réactions d'halochromie	43
III.2.4. Spectre UV/visible	43
III.2.5. Chromatographie sur couche mince.....	43
III.2.6. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	44
III.2.6.1. Définition de la chromatographie.....	44
III.2.6.2. Application à la CLHP	45
III.2.6.3. Caractéristiques de la CLHP.....	46
III.2.6.4. Appareillage et schéma.....	46
III.2.6.5. Optimisation des conditions chromatographiques.....	49
III.2.6.6. Conclusion	50
III.2.7. Spectre infrarouge du dipyridamole.....	52
III.2.7.1. Introduction	52
III.2.7.2. Principe.....	52
III.2.7.3. Appareillage	54
III.2.7.4. Instrumentation	54
III.2.7.5. Cas du spectromètre à transformée de Fourier	57
III.2.7.6. Enregistrement des spectres IR du dipyridamole	59
III.2.7.7. Interprétation du spectre infrarouge du dipyridamole.....	62
III.3. DOSAGES	64
III.3.1. Protométrie en milieu non aqueux	64
III.3.2. Dosage spectrophotométrique dans l'U.V.....	65
IV. PHARMACOCINETIQUE	67
IV.1. ABSORPTION.....	67
IV.2. DISTRIBUTION.....	67

IV.3. METABOLISATION.....	67
IV.4. EXCRETION.....	68
V. PHARMACOLOGIE.....	69
V.1. ACTION SUR LES VAISSEAUX CORONAIRES.....	69
V.1.1. Effet vasodilatateur coronarien.....	69
V.1.2. Action sur la circulation collatérale.....	69
V.1.3. Action sur la consommation d'oxygène.....	70
V.2. MODIFICATIONS METABOLIQUES.....	70
V.3. ANTIAGREGANT PLAQUETTAIRE.....	70
V.4. AUTRES PROPRIETES.....	71
VI. INDICATIONS.....	71
VI.1. <u>MALADIES CORONARIENNES</u>	71
VI.2. <u>COMPLICATIONS THROMBOEMBOLIQUES SUR LES PROTHESES DE VALVES</u>	72
VI.3. <u>PREVENTION ET TRAITEMENT DES THROMBOSES ARTERIELLES</u>	72
VI.4. <u>AUTRES INDICATIONS</u>	72
VII. CONTRE-INDICATIONS.....	72
VIII. EFFETS SECONDAIRES ET INDESIRABLES.....	73
IX. INTERACTIONS MEDICAMENTEUSES.....	73
X. PRECAUTIONS D'EMPLOI.....	74
XI. POSOLOGIE ET FORMES PHARMACEUTIQUES.....	74
XI.1. POSOLOGIE.....	74
XI.2. FORMES PHARMACEUTIQUES - SPECIALITES.....	75
<u>D - LA LITHIASE BILIAIRE MEDICAMENTEUSE.....</u>	76
I. <u>INTRODUCTION</u>.....	76
II. <u>PHYSIOPATHOLOGIE, EPIDEMIOLOGIE</u>.....	76
II.1. SATURATION DE LA BILE EN CHOLESTEROL.....	77
II.1.1. Hormones sexuelles ; contraceptifs oraux et oestrogènes.....	77
II.1.2. Clofibrate.....	78

II.1.3. Ciclosporine	78
II.1.4. Furosémide	78
II.2. SATURATION DE LA BILE EN BILIRUBINE LIBRE	78
II.3. STASE VESICULAIRE	79
II.3.1. Octréotide	79
II.3.2. Progestérone et médroxyprogestérone.....	80
II.3.3. Les anticholinergiques (34).....	80
II.3.4. Morphiniques	80
II.4. PRECIPITATION D'UNE SUBSTANCE EN EXCES	80
II.4.1. Ceftriaxone	80
II.4.2. Glafénine.....	81
II.4.3. Dipyridamole.....	81

DEUXIEME PARTIE : ANALYSE.....84

I. INTRODUCTION 85

II. PATIENTS..... 85

III. MATERIELS ET METHODES..... 86

III.1. TEST DE DETECTION RAPIDE DU DIPYRIDAMOLE DANS LES CALCULS.....	86
III.1.1. Matériel et réactifs :	86
III.1.2. Méthode	86
III.2. ETUDE DU DOSSIER CLINIQUE	86
III.3. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.....	95
III.3.1. Matériel et réactifs	95
III.3.2. Méthode	95
III.4. SPECTROPHOTOMETRIE INFRAROUGE	96
III.4.1. Matériel et réactifs	96
III.4.2. Préparation des échantillons	96
III.4.3. Conditions d'enregistrement	97
III.5. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE.....	98
III.5.1. Introduction.....	98
III.5.2. Réalisation du mélange étalon	98
III.5.3. Réalisation de la gamme d'étalonnage du dipyridamole	99
III.5.4. Dosage du dipyridamole dans les calculs échantillons	99
III.5.4.1. Matériel et produits utilisés.....	99
III.5.4.2. Méthode	102
III.5.5. Dosage du dipyridamole total (libre et glucuroconjugué) dans les calculs biliaires	105

III.5.5.1. Matériel et produits utilisés :	105
III.5.5.2. Méthode :	107
IV. RESULTATS.....	111
IV.1. TEST DE DETECTION U.V. RAPIDE DU DIPYRIDAMOLE.....	111
IV.2. ETUDE DU DOSSIER CLINIQUE	111
IV.3. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.....	111
IV.4. SPECTROPHOTOMETRIE INFRAROUGE	113
IV.4.1. Evaluation en pourcentage des différentes couches.....	114
IV.4.2. Analyse infrarouge.....	114
IV.5. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE	120
IV.5.1. Chromatogramme et spectres du mélange étalon (indométhacine + dipyridamole)	120
IV.5.2. Gamme d'étalonnage du dipyridamole	120
IV.5.3. Dosage du dipyridamole dans les calculs échantillons	120
IV.5.3.1. Dosage sans dilution	120
IV.5.3.2. Essai dans le plasma	120
IV.5.4. Dosage du dipyridamole dans les échantillons après dilution.....	121
IV.5.5. Dosage du dipyridamole total (libre et glucuroconjugué) dans les échantillons	121
V. DISCUSSION	142
V.1. POPULATION ETUDIEE.....	142
V.2. TECHNIQUE	142
V.2.1. Test de fluorescence sous lumière ultraviolette	142
V.2.2. Chromatographie sur couche mince.....	143
V.2.3. Spectrophotométrie infrarouge.....	143
V.2.4. Chromatographie liquide haute performance.....	144
V.3. EXPLOITATION DES RESULTATS : HYPOTHESE DE LITHOGENESE DES CALCULS MEDICAMENTEUX A DIPYRIDAMOLE	144
V.3.1. Introduction	144
V.3.2. Précipitation d'une substance en excès	145
VI. CONCLUSION	147
<u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>	148

BON A IMPRIMER N° 2

LE PRESIDENT DE LA THESE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITÉ

GAUTIER (Annick). — Calculs biliaires médicamenteux et dipyridamole. — 160 f. ; ill. ; tabl. ; 30 cm (Thèse : Pharm. ; Limoges ; 1998).

RESUME :

En France, près de 3 à 4 millions de personnes font des calculs biliaires et 100 à 200 000 nouveaux cas sont découverts chaque année.

L'existence des lithiases médicamenteuses n'est plus à démontrer aujourd'hui et nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux lithiases biliaires à dipyridamole.

Après avoir réalisé une recherche rapide de cette molécule dans 240 calculs biliaires grâce à un test de fluorescence sous lumière ultraviolette, près de 8 % des calculs fluorescaient. Parmi ces calculs, nous en avons sélectionné 8 pour lesquels une étude complémentaire par chromatographie sur couche mince et spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier a été réalisée. Afin d'effectuer une quantification précise de la teneur en dipyridamole de ces calculs, une analyse par chromatographie liquide haute performance a été menée.

Ce travail a permis d'identifier et de doser le dipyridamole et un de ses métabolites dans les calculs biliaires.

L'étude du dossier clinique des patients réalisée en parallèle nous a permis d'établir une hypothèse de lithogénèse des calculs biliaires à dipyridamole.

MOTS-CLES :

- Calcul biliaire.
 - Dipyridamole.
 - Spectrophotométrie infrarouge.
 - Chromatographie liquide haute performance.
-

JURY : Président

: Monsieur le Professeur C. MCESCH.

Juges

: Monsieur le Professeur J. BUXERAUD.

Monsieur le Professeur D. SAUTEREAU.

Monsieur le Docteur B. FERRANDES.
