

Université de Limoges
U.F.R. des sciences pharmaceutiques

Année 2001

Numéro: 809/1

THESE



Pour obtenir le grade de

Docteur en pharmacie de l'université de Limoges

Présentée et soutenue publiquement

Par **Stephan CLUZEL**

Le 09 Mars à Limoges

Mise au point et validation d'une procédure pour le dosage de l'acide valproïque
dans le sérum humain par HPLC.

Directeur de thèse

J.P. BASLY, Maître de conférences, H.D.R.



Jury

M. BASLY Jean-Philippe, Maître de conférences, H.D.R.	Président
Mlle LOTFI Hayat, Maître de conférences	Juge
Mme RATSIMBAZAFY Voahirana, Praticien Hospitalier	Juge
M. ODONTIADIS John, M. Phil.	Juge

Remerciements

A mes parents que je ne remercierai jamais assez pour avoir supporté des études plus longues que prévu,

A mes amis pour leur soutien,

A mes enseignants et maîtres de stage pour m'avoir transmis leur savoir,

Je remercie M. Michael FRANKLIN pour m'avoir accepté dans le laboratoire et m'avoir fait confiance pour ce travail. Sa disponibilité et son aide m'ont touché.

Je remercie M. John ODONTIADIS pour m'avoir appris la HPLC, pour son aide et ses conseils et pour avoir pris le temps de venir juger ce travail.

Je tiens à remercier tous les chercheurs de l'unité de recherche en psychopharmacologie d'OXFORD pour leur accueil et leurs conseils.

Je remercie M. Hugh SUTHERLAND, pour son amitié, son accueil et ses cours du soir.

Je suis reconnaissant envers M. Jean Philippe BASLY pour avoir pris le risque et le temps de m'encadrer dans ce projet atypique et pour ces conseils dans la rédaction.

Je remercie Monsieur Jean Michel MARBOUTY pour son aide dans la rédaction de la version anglaise.

Je suis sensible à la présence de Mlle Hayat LOTFI et de Mme Voahirana RATSIMBAZAFY dans mon jury. Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie l'équipe du laboratoire de Pharmacologie pour leur aide et Monsieur James JAVELLAUD pour sa disponibilité et ses conseils dans la rédaction.

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE: Monsieur le Professeur GHESTEM Axel

ASSESEURS: Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard
Monsieur COMBY Francis, Maître de Conférences

PROFESSEURS:

BENEYTOUT Jean Louis	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DREYFUSS Gilles	PARASITOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	PHYSIQUE – BIOPHYSIQUE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE – HYDROLOGIE – ENVIRONNEMENT
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE

SECRETARE GENERAL DE LA FACULTE – CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

PLAN

1. Introduction: rappels sur les troubles bipolaires de l'humeur et leurs traitements	8
1.1. Les troubles bipolaires de l'humeur	8
1.1.1. Définition	8
1.1.2. Classification	8
1.1.3. Epidémiologie	9
1.1.4. Diagnostic	10
1.1.5. Manifestations et symptômes	10
1.1.5.1. Symptômes de la manie	10
1.1.5.2. Les symptômes de la phase dépressive	12
1.1.5.3. Le syndrome hypomaniaque	12
1.1.5.4. Les cycles rapides	14
1.1.5.5. Les états mixtes	14
1.1.6. Physiopathologie et origine biologique des troubles bipolaires	14
1.2. Traitement et prévention des troubles bipolaires	17
1.2.1. Les sels de lithium	17
1.2.1.1. Découverte et histoire	17
1.2.1.2. Indications thérapeutiques et effets cliniques	18
1.2.1.2.1. Traitement de la manie et de la dépression	18
1.2.1.2.2. Prophylaxie de la maladie maniaco-dépressive	19
1.2.1.2.3. Troubles bipolaires et suicide	20
1.2.1.2.4. Le syndrome d'interruption du lithium	20
1.2.1.3. Mécanisme d'action	21
1.2.1.3.1. Le lithium et le transport ionique	22
1.2.1.3.2. Neurotransmetteurs et neuropeptides	24
1.2.1.3.3. Transmission du signal	25
1.2.1.3.4. Expression génomique et neuroplasticité	26
1.2.1.4. Suivi thérapeutique ou therapeutic drug monitoring	26
1.2.1.5. Effets secondaires	28

1.2.1.6. Contre-indications et interactions médicamenteuses	29
1.2.2. Carbamazépine	30
1.2.2.1. Pharmacologie	30
1.2.2.2. Indications thérapeutiques	31
1.2.2.3. Suivi thérapeutique	31
1.2.2.4. Effets indésirables et contre-indications	32
1.2.3. Les dérivés de l'acide valproïque	34
1.2.3.1. Présentation	34
1.2.3.2. Propriétés thérapeutiques et pharmacologie	34
1.2.3.3. Effets indésirables et contre-indications	37
1.2.4. Autres normothymiques	40
1.2.4.1. Les antagonistes calciques	40
1.2.4.2. Gabapentine et lamotrigine	40
1.2.4.3. Les neuroleptiques	41
1.2.4.4. Les électrochocs ou Thérapie Electro Convulsive	41
1.3. L'étude BALANCE	42
1.3.1. Présentation	42
1.3.2. Méthode	42
1.3.3. Sujets	43
1.3.4. Procédure	43
1.3.5. Suivi	43
1.3.6. Dosage des médicaments dans le sérum	43
2. Mise au point d'une procédure pour le dosage de l'acide valproïque dans le sérum humain	46
2.1. Recherche de travaux antérieurs dans la littérature scientifique	46
2.2. Rappels sur la CLHP	48
2.3. Propriétés chimiques de l'acide valproïque	50
2.4. Matériel et réactifs	50
2.4.1. Réactifs	50
2.4.2. Matériel	51
2.5. Mise au point du système chromatographique	51
2.5.1. La colonne	51

2.5.2.	La phase mobile	55
2.5.3.	L'étalon interne	56
2.5.4.	La longueur d'onde de détection	57
2.5.5.	L'étape de précipitation des protéines	57
3.	Validation de la procédure	65
3.1.	Introduction	66
3.2.	Préparation des lots d'échantillons de contrôle qualité	67
3.3.	Procédure	68
3.4.	Résultats et discussion	69
3.4.1.	Stabilité	75
3.4.2.	Linéarité	75
3.4.3.	Précision et fidélité	75
3.4.4.	Rendement d'extraction	76
3.4.5.	Spécificité	76
3.4.6.	Sensibilité	77
3.5.	Comparaison HPLC-EMIT	78
3.5.1.	Présentation	78
3.5.2.	Résultats	79
4.	Conclusion	86
5.	Bibliographie	97
6.	Annexes	90

1. Introduction: rappels sur les troubles bipolaires de l'humeur et leurs traitements

1.1. Les troubles bipolaires de l'humeur

1.1.1. Définition

Au départ, le terme «trouble bipolaire» faisait référence à la psychose maniaco-dépressive, caractérisée par une alternance d'épisodes maniaques et dépressifs entrecoupés de périodes de rémission ou euthymie. Récemment, ce concept de troubles bipolaires a été élargi pour inclure des sous-types avec des évolutions, des origines, des antécédents familiaux et des réponses aux traitements similaires; ces sous-types, qui comprennent les cycles rapides et les états mixtes, forment un ensemble de troubles reliés sur une échelle de sévérité.

1.1.2. Classification

Les épisodes mélancoliques et maniaques sont décrits depuis l'antiquité et leur possible alternance reconnue dès cette époque, mais la réunion de ces deux tableaux cliniques si opposés en une même affection ne s'opèrera vraiment qu'au XIX^{ème} siècle. En France, FALRET propose en 1851 le vocable de « folie circulaire » et décrit l'alternance des troubles. En 1854 BAILLARGER parle de « folie à double forme ». La synthèse de tous ces travaux est peu à peu opérée par KRAEPELIN et en 1899 il nomme l'ensemble des troubles à double forme « folie maniaco-dépressive ». KRAEPELIN s'aïda de l'évolution de la maladie pour rassembler la manie et la dépression en une seule entité. Il observa que l'évolution était similaire, que le trouble soit de type maniaque ou dépressif. Il réunit donc les deux dans une seule catégorie appelée psychose maniaco-dépressive. Cette vision des choses a été largement acceptée jusqu'à ce que LEONHARD et al. suggère une division en trois groupes en 1962:

- patients ayant eu des troubles dépressifs uniquement (dépression unipolaire) ;
- patients ayant eu des épisodes maniaques uniquement (manie unipolaire) ;
- patients ayant eu les deux types de troubles (troubles bipolaires).

De nos jours, il est devenu commun de ne plus utiliser le terme manie unipolaire, mais de l'inclure dans le groupe des troubles bipolaires. Ceci est basé sur le fait que la plupart des patients qui passent par une phase maniaque connaîtront éventuellement une phase de dépression. Il peut y avoir un chevauchement entre les deux groupes (unipolaire et bipolaire) étant donné qu'un patient classé dans la catégorie dépression unipolaire à un moment donné,

peut avoir un épisode maniaque ultérieurement; en d'autres termes, le groupe unipolaire contient inévitablement des cas bipolaires qui ne se sont pas encore déclarés.

Une classification parmi le groupe bipolaire a été proposée par AKISKHAL et al. (PAROT et al., 1982): il divise le groupe selon la sévérité de la phase maniaque;

- type I : manie psychotique, troubles schizo-affectifs, lésion cérébrale droite, abus de substances stimulantes, hallucinations;

- type II : hypomanie, labilité émotionnelle, caractères impulsifs, anxiétés, personnalités pathologiques (état limite, hystérie).

KRAEPELIN a classé les différentes formes de manie en plusieurs étapes allant de l'hypomanie à la manie délirante. Ces classifications n'ont cependant aucune importance théorique ou pratique, les différentes manifestations formant un ensemble le long d'un axe de sévérité.

1.1.3. Epidémiologie

Le risque de souffrir de manie est d'environ 0,1% dans la population générale et les maniaques représentent jusqu'à 25% des admissions pour hospitalisation dans des services psychiatriques. La plupart des cas sont bien trop malades pour rester à domicile. Dans l'ensemble, les troubles de l'humeur (dépression et maladie maniaco-dépressive) sont relativement communs; on estime qu'il y a une incidence d'au moins 2% dans la plupart des sociétés à travers le monde.

Une étude (COMPTON et al., 2000) a observé que 25 à 50% des patients bipolaires faisaient une tentative d'autolyse au moins une fois. La dépression bipolaire est une phase grave et potentiellement fatale des troubles bipolaires, avec un taux de suicide élevé comparé avec la phase maniaque. DILSAVER et al. (1997) ont observé lors d'une étude que le risque relatif de tentative d'autolyse parmi les sujets souffrant de dépression, comparé avec les sujets souffrant de manie est de 34,9 et que le risque relatif de tentative d'autolyse parmi les sujets souffrant de maladie maniaco-dépressive est de 24,6.

1.1.4. Diagnostic

Le trio habituel composé d'euphorie, de suractivité et de logorrhée, auquel nous pouvons ajouter une fréquente impression de grandeur et une fuite des idées, constitue le centre de l'état maniaque. Cependant, l'humeur n'est pas obligatoirement élevée et l'irritabilité et une labilité émotionnelle sont assez communes.

Le début de la maladie se manifeste généralement sous forme d'une crise aiguë, apparaissant entre 18 et 25 ans. Ce trouble est plus fréquent chez les femmes, avec un rapport femme/homme de 3:2 et présente un fort caractère héréditaire (JAMISON et al., 1996). A peu près 40% des patients maniaques ne connaissent jamais d'épisodes dépressifs mais ces patients unipolaires ne diffèrent pas de manière importante de ceux rencontrant les deux types d'épisodes.

1.1.5. Manifestations et symptômes

1.1.5.1. Symptômes de la manie

Les symptômes de la crise se manifestent par différents phénomènes :

Humeur : euphorique, expansive, irritable, hostile, labile, dépression transitoire ;

Pensée et parole : parole rapide, accélérée, fuite des idées, associations d'idées, logorrhée, graphorrhée, rimes, plaisanteries, grandiosité;

Thèmes dominants dans la discussion : religion, sexe, affaires, finances, persécution, nouvelles théories, invention;

Aspect cognitif : distractible, mauvaise concentration, attention volontaire impossible, accélérations des représentations mentales;

Comportement : hyperactif, animé, enjoué, furieux, agité, jovial, hypervigilant, intrusif, gênant, demandeur, moqueur, vulgaire, grossier, agressif, violent, séducteur, provocation sexuelle, exhibitionnisme, autodécoration, extravagant, déclamation, rires, chants, danses, gesticulation;

Comportement social : extravagance, dépensier, voyages soudains, cadeaux, paris;

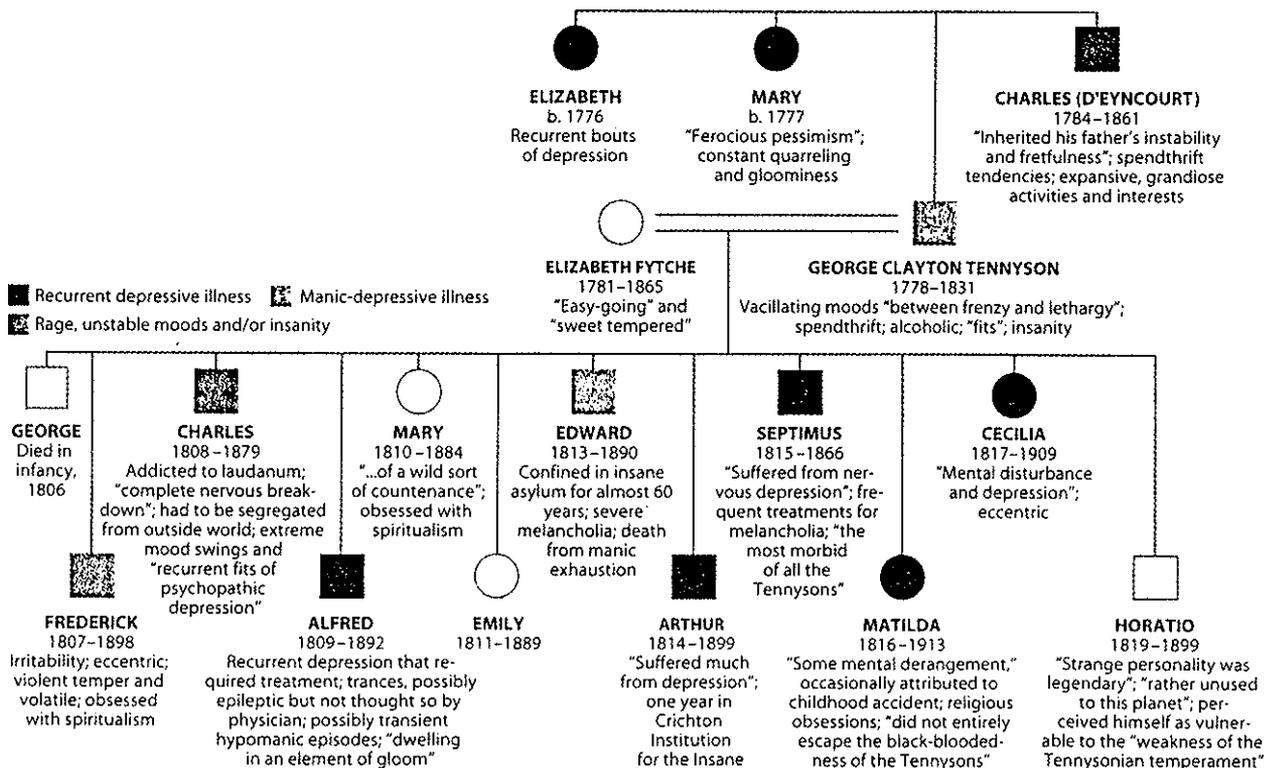
Signes végétatifs : insomnie, libido augmentée, appétit augmenté, amaigrissement.

The Tainted Blood of the Tennysons

Alfred, Lord Tennyson (*right*), who experienced recurrent, debilitating depressions and probable hypomanic spells, often expressed fear that he might inherit the madness, or “taint of blood,” in his family. His father, grandfather, two of his great-grandfathers as well as five of his seven brothers suffered from insanity, melancholia, uncontrollable rage or what is today known as manic-depressive illness. His brother Edward was confined to an asylum for nearly 60 years before he died from manic exhaustion. Lionel Tennyson, one of Alfred’s two sons, displayed a mercurial temperament, as did one of his three grandsons.



Modern medicine has confirmed that manic-depression and creativity tend to run in certain families. Studies of twins provide strong evidence for the heritability of manic-depressive illness. If an identical twin has manic-depressive illness, the other twin typically has a 70 to 100 percent chance of also having the disease; if the other twin is fraternal, the chances are considerably lower (approximately 20 percent). A review of pairs of identical twins reared apart from birth—in which at least one had been diagnosed as manic-depressive—found that in two thirds or more of the sets, the illness was present in both twins. —K. R. J.



SOURCE: Adapted from *Touched with Fire: Manic-Depressive Illness and the Artistic Temperament*; based on biographies, autobiographical writings and letters.

Illustration 1: Arbre généalogique de la famille Tennyson présentant un nombre important de cas de troubles bipolaires, tendant à montrer le caractère héréditaire des troubles de l'humeur.

1.1.5.2. Les symptômes de la phase dépressive

L'élément sémiologique de base est un affaiblissement de l'humeur (une thymie qui devient sombre et triste). Autour de ce symptôme se groupent d'autres symptômes; de fait, il s'agit d'un processus pathologique extrêmement complexe qu'il semble impossible de ramener à un effet primaire. Nous trouvons ajouté aux troubles de l'humeur 2 autres phénomènes: l'inhibition et la douleur morale.

Inhibition psychomotrice : ralentissement des processus vitaux, réduction du champs des intérêts, repli sur soi même, fuite des relations avec autrui, lassitude morale, difficulté à penser, troubles de la mémoire, fatigue psychique, asthénie physique;

Douleur morale : sentiments forts et vagues d'ennui, de dégoût, de découragement, de désespoir, et de regrets, autodépréciation, autoaccusation, autopunition, sentiment de culpabilité, impression d'impuissance, anesthésie affective, idées de mort, tentative d'autolyse;

Existence de troubles somatiques : céphalées, algies diverses, sensation d'étouffement, palpitations, troubles digestifs, constipation, douleurs articulaires, insomnie ou hypersomnie.

1.1.5.3. Le syndrome hypomaniaque

Il s'agit d'un état d'excitation qui, selon les auteurs, a été forme bénigne, atténuée, mineure de l'excitation maniaque; il est considéré comme de plus en plus fréquent.

L'état hypomaniaque peut être caractérisé d'une manière descriptive par une humeur fondamentalement enjouée, euphorique, une surabondance des idées et de l'activité. L'exubérance de la pensée et du langage s'exprime par une grande aisance dans les propos et surtout par une surabondance excessive de la parole et des écrits. Mais cette locacité reste cohérente, la mémoire demeure excellente.

Au degré le plus léger, le sujet passe pour vif, spirituel, intelligent, brillant mais rapidement agressif, irritable, autoritaire, sarcastique. Dans le domaine de l'activité, l'hypomaniaque est constamment en activité, ne semble jamais en repos et ne semble pas éprouver de fatigue.

Cet état peut évoluer vers une période de crise, un accès, ou forme mineure de la manie aiguë mais souvent il s'agit d'un état habituel d'exaltation et de mobilité de l'humeur, d'hyperactivité le plus souvent brouillonne qui rend très difficile la relation avec ces sujets.

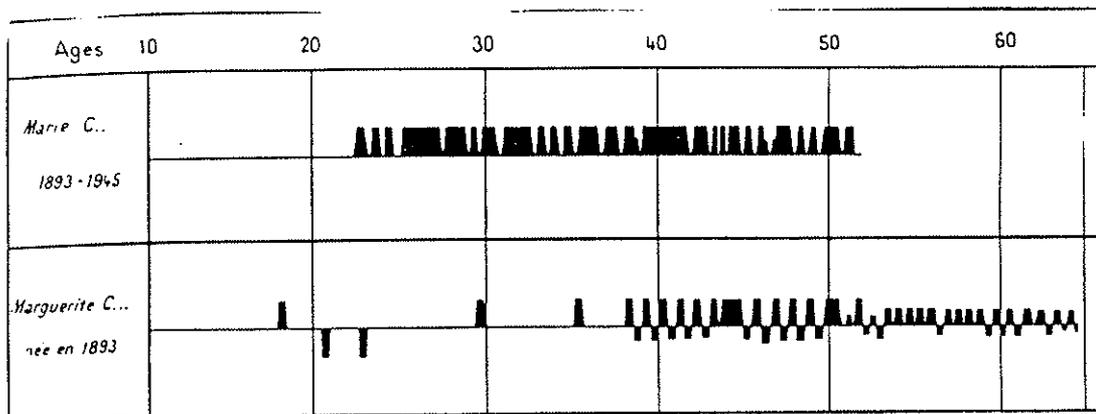
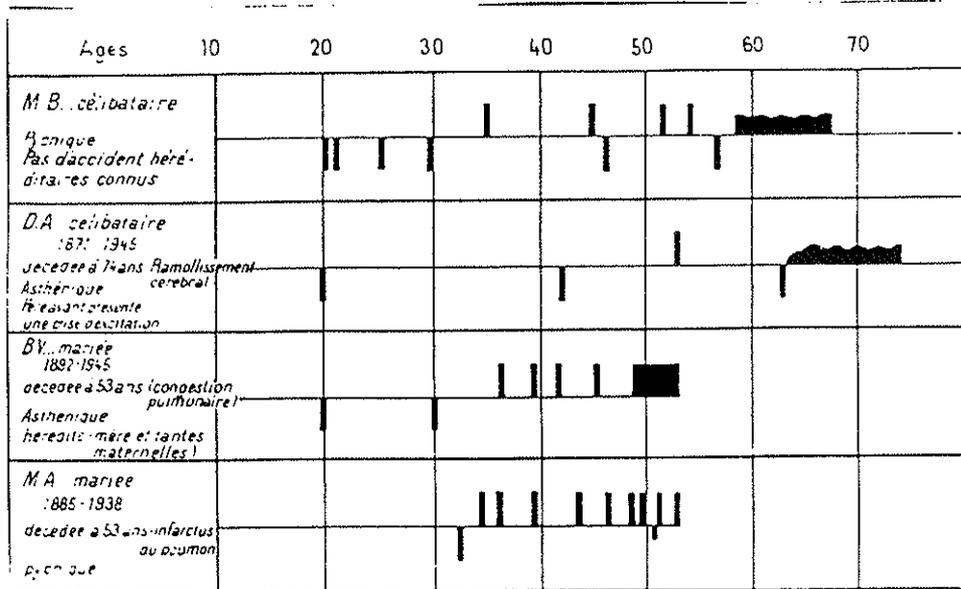


Illustration 2: Exemples d'historiques psychiatriques de quelques patients bipolaires.

Les barres inférieures représentent les épisodes mélancoliques ou dépressifs (généralement 4 à 6 mois); les barres supérieures représentent les épisodes maniaques (habituellement 2 mois dans les cas classiques).

1.1.5.4. Les cycles rapides

La définition du trouble maniaco-dépressif à cycles rapides est due à DUNNER et FIEVE (cité par KOUKOPOULOS et al., 1995), qui en 1974 appelèrent « Rapid cyclers » les patients qui souffrent au moins de 4 épisodes thymiques par an. La résistance au lithium (82% d'échec) constitue un deuxième caractère fondamental qui représente un fait d'une importance primordiale.

Aujourd'hui il est largement reconnu que la plupart des cycles rapides sont pharmacologiquement induits par des substances stimulantes, principalement par les antidépresseurs.

1.1.5.5. Les états mixtes

Des symptômes de mélancolie s'associent parfois aux symptômes de la manie; dans les états mixtes de KRAEPELIN (dont il avait décrit 6 formes), se combinent de façons diverses, au cours du même accès, des signes de la série mélancolique avec des signes de la série maniaque (par exemple des idées de suicide au cours de la manie ou une excitation sexuelle pendant la mélancolie). Quoiqu'il en soit des détails descriptifs, l'association des deux séries est une réalité clinique indiscutable, souvent faite d'une alternance rapide, plusieurs fois dans la journée et parfois dans la même heure de symptômes opposés.

L'état mixte, quand il n'est pas précédé d'une phase typique peut être source d'erreurs diagnostiques. L'électrochoc y trouve une de ses meilleurs indications.

1.1.6. Physiopathologie et origine biologique des troubles bipolaires

Le mécanisme exact expliquant la physiopathologie des troubles bipolaires de l'humeur est toujours inconnu. Alors que de nombreuses études ont tenté d'expliquer le processus menant aux manifestations observées, aucune des différentes pistes explorées, que ce soit les facteurs génétiques ou une modification de la neurotransmission, ne sont satisfaisantes et ne donnent une vue d'ensemble du phénomène.

De nombreuses hypothèses qui ont été avancées sur la cause biochimique de la manie sont principalement réunies autour de l'idée qu'il y a un déséquilibre dans la

neurotransmission: il y aurait un excès relatif en noradrénaline et probablement en dopamine alors qu'il y aurait un déficit dans la disponibilité en sérotonine et en acétylcholine (LEONARD, 1992). Cette vision simpliste forme la base de la théorie monoaminergique des troubles de l'humeur. En résumé, cette théorie affirme que la dépression apparaît comme la conséquence d'un déficit en amines biogéniques, alors que la manie est due à un excès de ces amines dans les synapses du système nerveux central (SNC). Il a été montré (SWANN et al., 1987, 1994, OSTROW et al., 1984) que les concentrations urinaires du principal métabolite de la noradrénaline, le 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) changent de manière anormale chez les patients maniaques.

Il a été observé (GERNER et al., 1984) que le métabolite principal de la dopamine, l'acide homovanilique (HVA), augmentait dans les épisodes maniaques, mais il n'est pas certain que ces changements aient une relation de cause à effet avec les principaux symptômes de la maladie.

Alors qu'il a été observé que des changements survenaient dans le système sympathique lors des épisodes maniaques, peu d'études ont tenté d'évaluer les changements dans le système sérotoninergique (LEONARD, 1992). Il a été reporté que des épisodes maniaques et hypomaniaques se sont produits chez des patients souffrant de dépression, à la suite d'un traitement avec du tryptophane en combinaison avec la clomipramine, dont une des activités est d'inhiber la recapture de la sérotonine (LEONARD, 1992). En pratique clinique, il a été observé que les antidépresseurs tricycliques ont plus tendance à provoquer des épisodes maniaques chez des patients dépressifs. Cependant il n'existe aucun rapport sur des agonistes sérotoninergiques augmentant les symptômes maniaques chez des patients hypomaniaques.

Si l'on regarde le système dopaminergique, les expériences montrent que des agents dopaminomimétiques tel que l'amphétamine peuvent provoquer l'apparition d'une phase maniaque chez des patients prédisposés en cours de rémission. L'efficacité des neuroleptiques, qui atténuent les symptômes de la maladie, sont une autre preuve en faveur d'un changement dans le système dopaminergique.

Depuis que les techniques de biologie moléculaire se sont développées et prennent une place importante dans le domaine de la recherche en psychiatrie, les causes génétiques des troubles bipolaires font maintenant l'objet de nombreuses recherches. L'hypothèse (ROSENTHAL et al., 1998, KUNUGI et al., 1997, REES et al., 1997) a été émise qu'un

polymorphisme (un polymorphisme est l'existence de différentes formes d'un gène dans une population) de plusieurs gènes codant pour la synthèse de plusieurs protéines qui interviennent dans le système sérotoninergique pouvait jouer un rôle dans la physiopathologie de la maladie maniaco-dépressive.

FURLONG et al., (1998) et REES et al., (1997) ont suggéré que l'allèle de la région promotrice du transporteur de la sérotonine, qui comme il a été prouvé précédemment, diminue le niveau de transcription du transporteur de la sérotonine, pourrait être associé à un risque de trouble affectif: les résultats d'une étude menée sur une population britannique de type caucasien (REES et al., 1997) ont montré que des variations sur ou autour du gène du transporteur de la sérotonine (5HTT) influenceraient la susceptibilité de souffrir de troubles bipolaires. Cependant, les conclusions d'une étude menée par GUTIERREZ et al. (1998) sur une population espagnole suggèrent que la variabilité du gène du 5HTT n'est pas un facteur de risque majeur pour la maladie maniaco-dépressive.

Une approche alternative pour l'étude de la physiopathologie des troubles bipolaires est de se pencher sur des composés tels que les sels de lithium utilisés pour traiter cette affection et sur le mécanisme d'action.

1.2. Traitement et prévention des troubles bipolaires

1.2.1. Les sels de lithium

1.2.1.1. Découverte et histoire

Les sels de lithium sont apparus sur la scène médicale en 1949 en Australie avec l'aide du psychiatre CADE. Le rapport de CADE, « Lithium Salts in the Treatment of Psychotic Excitement », fut publié en 1949 dans le Medical Journal of Australia. Il n'a alors pas engendré beaucoup d'excitation ou d'intérêt hors d'Australie. Cependant il a précédé de nombreux événements importants. Le lithium occupe une position unique et de pivot dans la psychopharmacologie. Il a précédé l'introduction de la chlorpromazine (1953) en psychiatrie et en fait a provoqué la brèche qui a initié l'ère moderne de la psychopharmacologie. Cependant avec le lithium, il y a eu un délai énorme entre la découverte de ses effets et l'acceptation de son utilisation aux Etats Unis et dans les pays européens, l'autorisation de mise sur le marché par la FDA datant de 1970.

La découverte des effets du lithium fut fortuite. CADE poursuivait l'idée que la psychose était due à la présence d'une toxine dans les urines. CADE supposait que le syndrome maniaque constituait un état d'intoxication, résultant d'un excès de métabolites alors que la dépression présentait les effets de niveaux anormalement bas des mêmes métabolites.

CADE injecta alors l'urine collectée chez des patients maniaques, dépressifs et schizophrènes à des cobayes et observa leurs réactions agressives. Après injection de sels de lithium il observa qu'ils « restaient couchés et le fixaient calmement ». Ensuite il administra du lithium à 6 patients maniaques et observa une efficacité remarquable chez ces 6 patients. Par hasard, la dose thérapeutique utilisée la première fois s'avéra la être la dose optimale: 1200 mg de citrate de lithium ou 600mg de carbonate de lithium 3 fois par jour.

Le premier article sur un essai clinique dans la littérature scientifique, qui suivit le rapport de CADE et son traitement de 6 cas maniaques, fut publié en 1951 par NOACK et TRAUTNER dans le Medical Journal of Australia (cité par SOARES et al., 2000). Ils rapportaient que 29 cas sur 30 cas de maniaques, parmi 100 patients présentant des troubles psychiatriques variés que comportait l'étude, avait connu une amélioration; ceci favorisait

l'idée d'une spécificité dans l'action du lithium. NOACK et TRAUTNER ont introduit la pratique et ont insisté sur l'importance de mesurer les taux plasmatiques de lithium. A la suite de cet article australien, les publications sur le sujet ont été très limitées, les travaux américains et canadiens n'arrivèrent que dans les années 60.

1.2.1.2. Indications thérapeutiques et effets cliniques

Les sels de lithium sont utilisés dans le traitement et la prophylaxie des épisodes maniaques, dans la prophylaxie de la maladie maniaco-dépressive (trouble ou dépression bipolaire) et dans la prophylaxie des dépressions récurrentes (unipolaires). C'est actuellement le composé de première intention et le plus approprié pour le traitement de la dépression bipolaire aiguë.

1.2.1.2.1. Traitement de la manie et de la dépression

Le lithium est en général la médication la plus efficace dans le traitement des épisodes maniaques aigus produisant une amélioration dans environ 70 à 80 % des cas.

Il a été montré qu'il était aussi voire plus efficace que les neuroleptiques dans plusieurs essais cliniques (BOWDEN, 2000); dans ces études, le lithium était plus spécifique pour corriger les symptômes maniaques centraux (symptômes affectifs et relatifs à la fuite des idées) alors que les neuroleptiques étaient aussi effectifs sinon plus pour l'hyperactivité et l'agitation motrice. Ceci suggère que les principaux effets des neuroleptiques impliqueraient une sédation non spécifique plus qu'une action antimaniaque au sens strict.

Les premières études contrôlées avec un placebo furent positives; cependant elles furent conduites avant que les critères de diagnostic et les échelles d'évaluation ne soient développées. Des études plus récentes, utilisant et suivant les derniers critères de diagnostic ont démontré depuis, la nette supériorité du lithium sur le placebo. L'étude de BOWDEN et al., (1994) est la plus large à avoir été conduite sur les épisodes maniaques, de manière contrôlée par placebo, en groupes parallèles et en double aveugle, et montrant une efficacité significative. POOL et al., (1978) ont mesuré la durée des épisodes maniaques et ont observé que le lithium réduisait nettement cette durée.

Les taux de réponse au traitement varient avec le type de patients bipolaires utilisés dans l'échantillon; dans les états maniaques typiques, le lithium semble être le plus efficace, alors que dans les états mixtes, atypiques ou dans les manies secondaires, les taux de réponse au lithium semblent être plus bas avec des articles rapportant des taux allant de 29 à 42 % seulement.

Dans une revue sur le traitement aigu de dépression bipolaire non psychotique, ZORNBERG et POPE, (1993) ont reporté que 9 études comparaient le lithium avec un placebo avec un taux de réponse approchant les 79%.

1.2.1.2.2. Prophylaxie de la maladie maniaco-dépressive

De nombreuses études (COMPTON et al., 2000, BOWDEN, 2000, DAVIS et al., 1999), depuis le rapport de CADE qui mentionnait un effet préventif sur les manies récurrentes, ont découvert l'efficacité du traitement au lithium dans la prophylaxie des phases dépressives et maniaques des troubles bipolaires. En général les patients bipolaires sont ceux qui répondent le mieux.

Une revue de 19 études en double aveugle, à affectation aléatoire et contrôlées par un placebo (DAVIS et al., 1999), comprenant 865 patients ont trouvé le lithium très efficace pour la prophylaxie. Au total, 74% des patients ont connu une rechute avec le placebo contre 29% pour ceux recevant le lithium. Cette diminution de 45 % des rechutes est une différence très significative. La méta-analyse de l'efficacité du lithium, réalisée par DAVIS et al., 1999, a montré que pour les troubles bipolaires seulement, la réduction des rechutes par le lithium est très significative ($\text{Chi}^2 = 126; p = 10^{-29}$). On observe aussi un effet dose-dépendant significatif, le groupe avec les doses basses présente une réponse moins efficace que le groupe avec les hautes doses.

Les états maniaques classiques et les manies suivies d'euthymie et de dépression sont un bon pronostic pour le traitement prophylactique du lithium. La manie avec des éléments mixtes ou dysphoriques, les cycles rapides ou les manies secondaires n'obtiennent pas de bonne réponse thérapeutique avec le lithium. Des antécédents familiaux de troubles de l'humeur est liée à une meilleure réponse au lithium. Ces informations renforcent l'idée de spécificité d'action du lithium dans les troubles bipolaires.

Dans la population des patients bipolaires II, le lithium est aussi un traitement efficace dans la prophylaxie des épisodes hypomaniaques et pourrait réduire la sévérité des épisodes dépressifs mais pas leur fréquence.

Il n'est pas aussi efficace que les antidépresseurs dans le traitement des épisodes aigus de dépression (bipolaire ou unipolaire); cependant il a des effets thérapeutiques dans ces troubles. Il a été montré que le lithium avait des effets dans les troubles schizoaffectifs, dans la schizophrénie et l'agressivité mais avec des résultats très inconstants, ce qui renforce encore sa spécificité pour les troubles bipolaires.

Dans une étude menée par CHEN et al, (1999) sur des personnes âgées, souffrant d'épisodes maniaques aigus sans lésions neurologiques, le lithium s'avéra être aussi efficace que le valproate de sodium, avec peut être une meilleure efficacité que ce dernier, au moins dans le traitement des épisodes maniaques classiques.

1.2.1.2.3. Troubles bipolaires et suicide

DAVIS et al., (1999) ont rapporté que le taux de tentative d'autolyse est inférieur chez les patients prenant du lithium à titre prophylactique en comparaison du groupe de patients témoins (sous placebo). Le taux de mortalité standardisé (TMS) chez les patients bipolaires avant traitement avec le lithium est supérieur à celui de la population normale. Deux études ont trouvé que le TMS de patients bipolaires retournait à la normale pendant le traitement; le TMS augmente quand les patients arrêtent de prendre leur traitement. SCHOU (cité par DAVIS et al., 1999) a réalisé une revue de 4 articles sur les actes suicidaires parmi un total de 200 patients et a montré que le nombre d'actes suicidaires diminue de 60% chez les patients traités par le lithium. TONDO et al. (cité par DAVIS et al., 1999) ont aussi comparé le taux de suicide réussi entre ceux qui arrêtaient et ceux qui continuaient à prendre le lithium et ont trouvé que le nombre d'accidents mortels était divisé par 9 chez ceux qui maintenaient leur traitement.

1.2.1.2.4. Le syndrome d'interruption du lithium

L'existence d'un syndrome d'interruption du lithium a été proposé par plusieurs psychiatres. Il est possible qu'une interruption trop rapide de la prise du lithium produise un phénomène biologique de rebond, menant à des rechutes. Si l'arrêt de la prise de lithium

provoque réellement une rechute, alors, étant donné que dans la plupart des essais cliniques les patients du groupe placebo arrêtent le lithium pour rentrer dans l'étude, cet arrêt devrait augmenter le taux de rechute observé dans le groupe placebo et la différence d'efficacité du lithium. MONCRIEFF, (1995, 1997) a émis la critique que le syndrome d'arrêt du lithium contribue à un taux faussement élevé de rechutes sous placebo, et la différence d'efficacité entre lithium et placebo observée dans les études en double aveugle, serait entièrement due à ce phénomène. L'argument principal de MONCRIEFF est que l'efficacité apparente du lithium était plus due au nombre de rechutes après l'arrêt du lithium dans le groupe placebo qu'à une action bénéfique propre au lithium.

Cependant, les cliniciens n'ont pas réussi à trouver des symptômes mineurs dus à l'arrêt du lithium. Par exemple BAASTRUP et SCHOU, (1968) ont commenté qu'ils n'ont pas observé de symptômes dus au retrait du lithium chez les patients qui arrêtaient leur traitement. De plus les études à image réfléchie, de cas comparés (mirror-image studies) contourne ce problème sachant qu'elles ont été réalisées juste après la découverte du lithium avec des patients naïfs de lithium. Ces études constituent une preuve importante en faveur de l'efficacité du lithium.

La leçon à retenir de cette discussion est que le lithium n'est peut-être pas utilisé correctement et régulièrement. Son efficacité prouvée lors des études n'a pas été observée en pratique courante; le terme « non observance du médecin » a été utilisé pour faire référence au fait que le docteur passe un temps insuffisant avec le patient pour s'assurer de la compréhension et de l'observance du malade. On peut cependant présumer que le syndrome d'arrêt du lithium n'existe pas. On recommande quand même d'arrêter le lithium progressivement au cas où des rechutes dues une interruption du lithium existe réellement, mais ne soient pas prouvées officiellement.

1.2.1.3. Mécanisme d'action

Nous venons de voir que le lithium, à travers la présentation de ses effets cliniques et de ses propriétés thérapeutiques, a une action très spécifique sur les troubles bipolaires et leur physiopathologie. Si nous regardons maintenant son mécanisme d'action, nous nous retrouvons confrontés à la même situation que pour expliquer l'origine des troubles bipolaires: la tâche est immense, de nombreuses voies biochimiques sont impliquées, rendant le problème

complexe. Les dernières découvertes en psychiatrie biologique et en psychopharmacologie ont permis d'ouvrir de nouvelles pistes, mais le chantier n'est encore qu'un enchevêtrement d'hypothèses.

Alors que les différentes études sur l'action du lithium ont évolué du transport ionique et des phénomènes présynaptiques aux régulations postsynaptiques, aux cascades de transmission du signal, à l'expression génomique et aux changements neuroplastiques, la recherche n'a cessé de se concentrer sur la capacité de ce cation monovalent à modifier, de manière unique, la transmission du signal nerveux dans certaines régions du cerveau.

1.2.1.3.1. Le lithium et le transport ionique

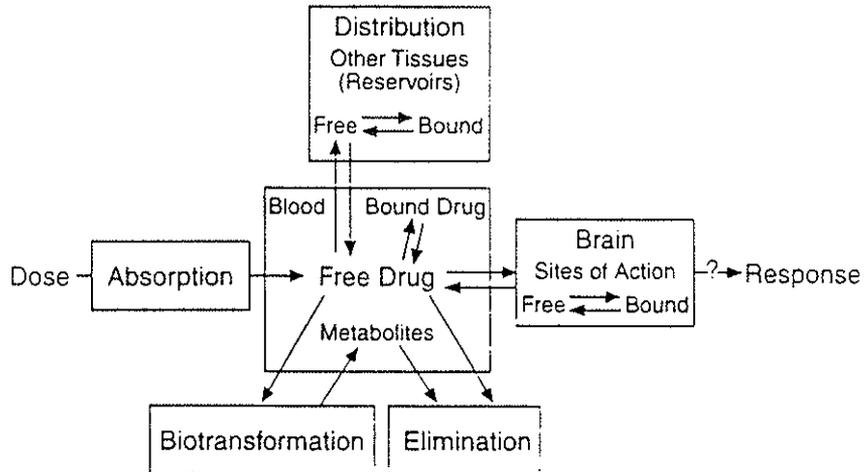
Les canaux ioniques, activés par l'ATP (adénosine triphosphate) et l'énergie libre résultant des gradients de concentration transmembranaires, régulent la distribution du lithium à travers les membranes cellulaires. Ces systèmes de transport sont d'une importance cruciale pour la régulation du lithium dans le cytoplasme, étant donné qu'ils régulent la concentration de tous les ions intracellulaires.

La pompe Na-K-ATPase, impliquée dans la repolarisation et les modifications de l'excitabilité neuronale a été l'objet de quelques études (LENOX et al., 2000). Il a été observé que le traitement chronique avec le lithium diminue l'activité de la Na-K-ATPase, particulièrement dans l'hippocampe (LENOX et al., 2000, LEONARD, 1992). Les recherches ont mené à l'hypothèse que la pathogénèse des troubles de l'affect serait liée à une dysfonction des membranes cellulaires; cependant les variations inter-individuelles et les paramètres cliniques confus empêchent la reproductibilité des résultats. Fait intéressant mais contradictoire, il a été observé que l'activité de la Na-K-ATPase augmentait chez les patients bipolaires traités par le lithium.

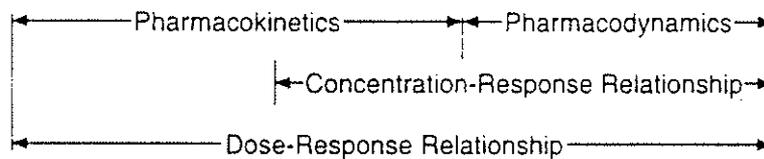
Il existerait un mécanisme par lequel le lithium s'accumule de manière sélective dans les neurones avec une activité synaptique élevée et une telle accumulation du lithium activité-dépendante peut être cruciale pour la spécificité thérapeutique du lithium et sa capacité à réguler les fonctions synaptiques dans le cerveau.

Figure 1. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Events That Define the Dose-Response Relationship for Psychoactive Medications

A. Relationship between drug pharmacokinetics and pharmacodynamics in defining the dose-response relationship



B. Theoretical basis for the use of therapeutic drug monitoring in optimizing and individualizing pharmacotherapy



C. Dose-response model reflecting the unique pharmacokinetic properties of lithium

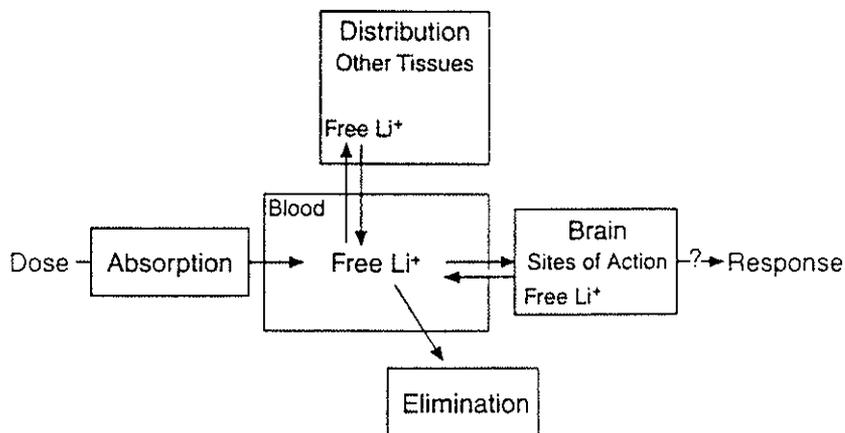


Illustration 3: Pharmacocinétique du lithium

1.2.1.3.2. Neurotransmetteurs et neuropeptides

L'effet du lithium sur tous les systèmes de neurotransmetteurs a été particulièrement étudié à la recherche d'une liaison entre le mécanisme d'action du lithium et la neurotransmission. Les études antérieures étaient concentrées sur la modulation des éléments présynaptiques, dont la synthèse, la libération, la dégradation et la recapture des neurotransmetteurs. Ces dernières années, l'attention s'est portée sur les événements postsynaptiques tels que la régulation des mécanismes de transmission du signal nerveux. Malgré le fait que les résultats des recherches au niveau pré et post-synaptique ne sont pas encore en accord, ils prouvent que l'action du lithium se fait à différents sites qui modulent la neurotransmission.

Apparemment, le lithium réduit l'activité dopaminergique pré-synaptique et post-synaptique et évite le développement d'une sursensibilisation des récepteurs. Au niveau présynaptique, le lithium augmente le catabolisme de la dopamine de manière spécifique selon les régions du cerveau, et diminue la synthèse de ce neurotransmetteur. Fait intéressant, le lithium semble bloquer les changements de comportement induits par l'amphétamine tels que l'augmentation de l'activité locomotrice chez les animaux et les effets euphorisants chez les patients dépressifs (LENOX et al.,2000; LEONARD, 1992).

Dans le système cholinergique, le lithium augmente le signal transmis par les récepteurs à différents niveaux, neurochimique, électrophysiologique et comportemental. Le traitement chronique avec le lithium augmente divers comportements commandés par le système cholinergique. Le lithium peut aussi bloquer le développement d'une hypersensibilité des récepteurs cholinergiques centraux (LENOX et al.,2000; LEONARD, 1992).

Les études précliniques ont montré que le lithium modifie le système sérotoninergique à différents niveaux. Le lithium semble augmenter la neurotransmission sérotoninergique présynaptique. De nombreux résultats montrent que le traitement au lithium produit une diminution de la sensibilité des récepteurs présynaptiques inhibiteurs 5HT_{1A}, ce qui résulte en une nette augmentation de la quantité de 5HT libérée à chaque impulsion. D'autres équipes se sont penchées sur les récepteurs 5HT_{1B} (MASSOT et al., 1999) et ont émis l'hypothèse qu'ils seraient aussi une cible pour l'action du lithium.

Le GABA (acide gamma amino-butyrique), neurotransmetteur inhibiteur majeur du SNC serait impliqué dans l'étiologie des troubles de l'humeur. Il a été observé (LENOX et al, 2000) que le lithium augmente les niveaux de GABA dans le plasma et le liquide céphalo-rachidien (LCR) de sujets humains et dans différentes régions de cerveaux d'animaux. Les niveaux de GABA, diminués chez les patients bipolaires par rapport aux volontaires sains, semblent retourner à la normale dans le LCR après un traitement avec le lithium. Des résultats expérimentaux ont montré que l'administration chronique de lithium diminue les liaisons de basse affinité du GABA dans le corps strié et l'hypothalamus. Cependant, lorsque l'action régulatrice du lithium sur les récepteurs GABA a été évaluée en utilisant des agonistes spécifiques pour les sous-types a et b, il a été observé que le nombre de récepteurs GABA_b avait augmenté après un traitement par le lithium et d'autres normothymiques anticonvulsivants.

L'entrée de glutamate dans le corps cellulaire des neurones est augmenté de manière significative après un traitement chronique par le lithium. Ceci pourrait suggérer que l'absorption accrue de glutamate serait liée à l'effet antimaniaque du lithium. L'effet neuroprotecteur du lithium pourrait être lié à sa capacité à réguler l'entrée de glutamate dans les neurones.

Divers systèmes de transmission neuropeptidiques ont été l'objet de recherches; il a été observé que les niveaux de dynorphine, substance P, tachykinine, neuropeptide Y et neurokinine A augmentent dans certaines régions du cerveau après un traitement par le lithium. D'autres pistes ont été explorées mais de nombreuses autres études sont nécessaires pour comprendre la régulation des récepteurs neuropeptidiques par le lithium.

1.2.1.3.3. Transmission du signal

Depuis que l'on sait que le lithium est un puissant inhibiteur de l'inositolmonophosphatase (IMP) (enzyme intracellulaire), l'hydrolyse du phosphoinositol médiée par les protéines G a été explorée comme pouvant être un site d'action du lithium. Etant donné que le cerveau a un accès limité aux molécules d'inositol, à l'exception de celles

recyclées avec de l'inositolphosphate, le blocage de l'IMP par le lithium peut provoquer une déplétion en inositol, nécessaire à la synthèse de PIP2 qui rentre dans la cascade de transmission du signal nerveux. Il a donc été proposé que l'action du lithium provenait d'une déplétion en inositol libre et que la sélectivité d'action du lithium pourrait être attribuée à son action préférentielle sur les systèmes de neurotransmissions suractifs.

L'adénylate cyclase (AC), une autre enzyme intervenant comme second messenger couplé aux récepteurs, voit aussi son activité diminuée par le lithium. Cet effet inhibiteur est antagonisé par le magnésium, ce qui suggère que l'action du lithium sur l'AC se fait par compétition directe avec le Mg^{2+} (LENOX et al., 2000)

Le lithium pourrait aussi avoir une action sur les protéines G en diminuant l'expression de ces protéines. Le lithium exerce un effet majeur sur les protéines G, probablement par l'intermédiaire d'un processus posttranslational qui stabilise la forme inactive de la protéine (MORK et al., 1992).

1.2.1.3.4. Expression génomique et neuroplasticité

Les données cliniques indiquant que l'apparition des effets thérapeutiques du lithium, ainsi que leur inversion après arrêt du traitement, nécessite un délai allant de quelques jours à quelques semaines et suggèrent que l'action du lithium implique des changements neuroplastiques à long terme par l'intermédiaire d'une régulation génétique. Une modification de l'expression des gènes par le lithium pourrait expliquer l'effet neuroprotecteur dans certains systèmes cellulaires. Il reste encore à démontrer la relation entre les propriétés neuroprotectrices et l'effet prophylactique à long terme dans les troubles bipolaires et les changements morphologiques du cerveau (observés grâce aux techniques d'imagerie médicale).

1.2.1.4. Suivi thérapeutique ou therapeutic drug monitoring

L'utilisation clinique du lithium dans les troubles bipolaires est inextricablement liée à la pratique du suivi thérapeutique ou TDM.

Le lithium est généralement trouvé sous forme de carbonate (Téralithe*), de gluconate anhydre (Neurolithium*) ou de citrate et glutamate en Angleterre. Ces sels sont rapidement

absorbés dans le tractus digestif et atteignent leur pic plasmatique ou C_{\max} en 2 à 4 heures. Les variations importantes dans la lithiémie, associées à des effets indésirables accrus (nausées, vomissements, diarrhées, crampes abdominales) peuvent être réduites par l'utilisation de formulations à libération prolongée. Le lithium n'est pas lié aux protéines plasmatiques; il diffuse largement à travers le compartiment hydrique de l'organisme.

Pour éviter la toxicité et obtenir une efficacité optimale, il est essentiel de mesurer la lithiémie régulièrement. Les psychiatres ont encore des avis divergents sur la fréquence de prise de sang pour doser la lithiémie. Cependant il existe un consensus sur les concentrations sériques optimales qui permettent d'obtenir la meilleure probabilité d'effets thérapeutiques avec le moins d'effets indésirables. Cette fenêtre est de 0,5 à 1,2 mEq/l ou mM. On peut rencontrer l'effet toxique sur les organes quand les concentrations sériques dépassent 1,5 mM; une intoxication menaçant le pronostic vital est observée quand la lithiémie dépasse 3,5 mM. Il existe cependant quelques exceptions qui ne répondent pas à la relation concentration-effet. Certains patients sont traités efficacement avec des concentrations inférieures à 0,5 mM alors que d'autres nécessitent des lithiémies supérieures à 1,2 mM pour observer des effets thérapeutiques.

Le lithium étant un métal alcalin, il est facilement échangeable avec le sodium et le potassium. Il est activement transporté à travers les membranes cellulaires (plus dans le rein que le foie ou les os). Il a été observé que le rapport $[Li]_{\text{plasmatique}}$ sur $[Li]_{\text{LCR}}$ se trouvait entre 2:1 et 3:1, valeurs similaires au rapport $[Li]_{\text{plasmatique}}$ sur $[Li]_{\text{intraérythrocytaire}}$. Ceci suggère que le rapport $[Li]_{\text{plasma}}$ sur $[Li]_{\text{globule rouge}}$ pourrait être un indicateur utile des concentrations obtenues au niveau du SNC, et pourrait aider à prédire l'évolution des effets indésirables.

La majeure partie du lithium est éliminée dans les urines selon une cinétique biphasique: la première phase dure entre 6 et 8 heures après administration; la seconde phase peut durer jusqu'à 2 semaines. Les composés diurétiques tels que le furosémide (Lasilix*), l'acide étacrinique et les dérivés thiazidiques qui provoquent une déplétion sodée, augmentent la rétention de lithium dans l'organisme et la toxicité. Ils sont donc contre-indiqués pendant un traitement par le lithium. Les diurétiques osmotiques tels que le mannitol augmentent l'élimination du lithium.

Il est conseillé de réaliser un bilan rénal, cardiaque, thyroïdien et sanguin avant de commencer un traitement et en cours de traitement. La prise de sang pour la mesure de la lithiémie doit être faite à des heures régulières, généralement 12 heures après la dernière

administration du soir ou avant la dose du matin. La lithiémie est mesurée par photométrie de flamme ou émission atomique.

La posologie initiale dépend de l'âge et de la fonction rénale: chez un adulte avec une clairance de la créatinine normale, la posologie initiale est de 3 comprimés de Téralithe ou de 3 ampoules de 5 ml de Neurolithium par jour. Le dosage de la lithiémie doit être effectué une semaine plus tard; une lithiémie inférieure à 0,6 mM incite à l'augmentation d'un comprimé ou d'une ampoule; une lithiémie thérapeutique impose le maintien de la posologie; une lithiémie supérieure à 1 mM impose la réduction posologique.

1.2.1.5. Effets secondaires

Système digestif: nausées, vomissement, diarrhées, douleurs et crampes abdominales, soif;

Système neuromusculaire: faiblesse musculaire générale, ataxie, trémeur et fasciculation, tremblement fin des extrémités, mouvements choréoathétosiques, réflexes tendineux hyperactifs*;

Système nerveux central: langage ralenti*, vision trouble, vertiges, attaques épileptiformes, somnolence, confusion*, stupeur*, coma*;

Système cardiovasculaire: hypotension, irrégularités du pouls, changements à l'ECG, collapsus circulatoire;

Autres: polyurie, polydypsie, glycosurie, albuminurie, fatigue générale*, léthargie*, déshydratation, hypothyroïdisme.

* : signes de toxicité

De nombreux effets indésirables du lithium peuvent être attribués à l'action sur l'adénylate cyclase, enzyme pivot dans la transmission intracellulaire du signal hormonal. Ainsi, l'AC des récepteurs à l'ADH et à la TSH sont inhibés par des concentrations thérapeutiques, ce qui mène fréquemment à une diurèse augmentée et à un hypothyroïdisme et au goût.

Un effet indésirable majeur du lithium est la prise de poids. Il a été estimé par certains investigateurs qu'on observait ce phénomène dans 60% des patients: le lithium augmente la prise de nourriture et a aussi un effet sur le métabolisme des hydrates de carbone.

Une étude conduite par MARIE-CARDINE et al., 1992 a montré que, parmi 40 patients traités par le lithium pour des troubles bipolaires et suivis au moins 5 ans, les effets

indésirables le plus souvent reportés étaient la prise de poids (5 à 30 kg), le tremblement fin des extrémités, un syndrome polyuro-polydypsique. Les troubles les plus sévères sont les nodules thyroïdiens et l'utilisation concomitante de diurétiques a causé la mort d'un patient. Ces effets indésirables ont tendance à contribuer à la mauvaise observance et à l'arrêt du traitement par le lithium.

1.2.1.6. Contre-indications et interactions médicamenteuses

Contre-indications : insuffisance cardiaque décompensée, troubles coronariens sévères, certaines arythmies, insuffisances rénale et hépatique, hypothyroïdisme, incapacité de doser la lithiémie, grossesse et allaitement, troubles ioniques, hyponatrémie, régime sans sel

Interactions médicamenteuses :

Anti Inflammatoires Non Stéroïdiens (augmentent la lithiémie);

Carbamazépine (risque de neurotoxicité);

Diurétiques (augmentent le lithiémie);

Inhibiteurs de l'enzyme de conversion (augmente la lithiémie);

Neuroleptiques (syndrome confusionnel);

Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de la Sérotonine (risque de syndrome sérotoninergique).

1.2.2. Carbamazépine

Les composés anticonvulsivants comme la carbamazépine se sont montrés d'une grande utilité pour le traitement de un quart à un tiers des patients en phase maniaque qui ne répondent pas suffisamment au lithium et pour les 25 à 50 % de patients qui arrêtent ou réduisent le lithium à cause des effets indésirables.

1.2.2.1. Pharmacologie

La carbamazépine (CBZ) est un composé tricyclique, chimiquement parenté à l'imipramine. C'est un anticonvulsivant très utilisé pour le traitement des épilepsies du lobe temporal et il est devenu évident qu'il possédait une activité psychotrope; la carbamazépine améliore l'humeur et les fonctions cognitives et diminue l'agressivité. Le mécanisme d'action de la CBZ est complexe et rendu encore plus compliqué par l'existence d'un métabolite à demi-vie longue (CBZ-époxyde) qui possède aussi des propriétés psychotropes (COMPTON et al., 2000).

Les propriétés anticonvulsivantes de la CBZ pourraient être dues à sa capacité à inhiber les canaux sodiques rapides. Il a été montré (LEONARD, 1992) que la CBZ, comme le lithium, réduisait la libération de noradrénaline et diminuait l'activité de l'adénylate cyclase induite par la noradrénaline. Cependant, la différence avec le lithium réside dans le fait que la CBZ n'a pas d'effet sur la sérotonine aux concentrations thérapeutiques. Elle réduit aussi le turnover de la dopamine chez les patients maniaques et augmente la synthèse d'acétylcholine dans le cortex. Il a été observé (DUBOVSKY et al., 1997, POST et al., 1987) que la CBZ pourrait avoir une action sur les flux intracellulaires de calcium dans les neurones du CNS, phénomène responsable de son effet thymorégulateur.

L'effet de la CBZ sur la fonction GABAergique semble être liée à son interaction avec les récepteurs GABA b. Rien ne montre que les concentrations de GABA soient altérées dans le LCR des patients. Sa haute affinité pour les récepteurs périphériques aux benzodiazépines pourrait expliquer certains de ses effets psychotropes. Quelques neuropeptides (tels que les opioïdes, la vasopressine, la substance P et la somatostatine) pourraient être impliqués dans l'action de la CBZ : il a été montré que la réduction des concentrations en somatostatine dans le

LCR pourrait expliquer les effets sur la cognition et sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.

1.2.2.2. Indications thérapeutiques

La CBZ peut être utilisée pour la prophylaxie de la maladie maniaco-dépressive chez les patients qui ne répondent pas au lithium. Elle semble particulièrement efficace pour les patients présentant des cycles rapides. Ce composé est supposé être meilleur pour les maladies se déclarant plus précocement et il réduit le nombre d'épisodes dépressifs et maniaques. Des antécédents familiaux de troubles de l'humeur, des cycles rapides, de l'anxiété et de la dysphorie, des phases maniaques et dépressives sévères sont des éléments en faveur d'une bonne réponse à la CBZ. L'efficacité de la CBZ a été évaluée en comparaison avec le lithium dans 10 études en double aveugle et aléatoires : alors que la CBZ s'est montrée légèrement moins efficace que le lithium, la différence n'est pas statistiquement significative et rien ne permet de désigner un composé supérieur à l'autre (COMPTON et al., 2000).

Les résultats d'une revue de plusieurs études de cas indiquent que la CBZ aurait des effets antimaniaques et antidépresseurs soit en monothérapie soit en combinaison avec le lithium ou un antidépresseur (COMPTON et al., 2000).

Le lithium pourrait potentialiser l'action antidépressive de la CBZ, comme il a été montré pour d'autres antidépresseurs. Lors d'un essai, les premiers effets antidépresseurs ont été observés plus précocement dans le groupe lithium+CBZ que dans le groupe lithium en monothérapie.

KARINE et al. (2000) , dans une étude de cas, a montré qu'il ne se produisait pas d'effet rebond ou de rechute après l'arrêt de la CBZ.

1.2.2.3. Suivi thérapeutique

L'utilisation clinique de la CBZ est gênée par le fait que ce composé possède la propriété d'induire son propre métabolisme et le métabolisme d'autres médicaments dégradés par l'isoenzyme 3A4 du cytochrome P450 (pilule, phénytoïne...).

Comme pour le traitement des épilepsies, on cherche à rester dans une fourchette de concentration plasmatique comprise entre 4 et 15µg/mL.

La posologie de départ est de 200 à 400 mg de Tégrétol* par jour en augmentant de 200 mg tous les 3 jours jusqu'à atteindre 800 à 1200 mg par jour. On peut aussi utiliser des formes à libération prolongée pour avoir une meilleure stabilité des concentrations au steady state.

1.2.2.4. Effets indésirables et contre-indications

Les effets indésirables de la CBZ sont assez fréquents. Les effets secondaires de type neurologiques sont présents chez 15% des patients; ils incluent somnolence, vertiges, céphalées, troubles de la vue et occasionnellement des paresthésies.

Les effets secondaires de type gastro-intestinal semblent moins fréquents; ils incluent des douleurs épigastriques, des nausées, vomissement, de l'anorexie, une hyposialorrhée, des diarrhées et de la constipation.

Des rashes de type érythémateux, morbilliforme ou urticarien ont lieu dans 3% des patients et peuvent nécessiter l'arrêt du traitement.

Des cas de troubles de certaines lignées sanguines ont été signalées avec agranulocytose, anémie aplasique, éosinophilie, leucopénie, leucocytose et thrombocytopénie; très peu de purpuras ont été signalés. Des changements dans les fonctions hépatiques et rénales ainsi que des cas de jaunisse ont été reportés.

Le surdosage provoque des signes d'agitation, de tremblement, de réflexes anormaux, de stupeur, d'hypertension ou d'hypotension, un coma et des changements sur l'EEG.

La CBZ doit être employé avec précaution chez les patients avec un glaucome ou une maladie cardiovasculaire. Il faut aussi faire attention aux personnes âgées chez qui les signes de confusion ou d'agitation peuvent être aggravés et aux médications prises en même temps à cause du pouvoir inducteur enzymatique. Elle ne doit pas être administrée aux personnes avec une insuffisance hépatique et son utilisation est contre-indiquée dans les 3 premiers mois de grossesse.

1.2.3. Les dérivés de l'acide valproïque

1.2.3.1. Présentation

Les dérivés de l'acide valproïque sont présents dans différentes spécialités: le valproate de sodium a été utilisé pendant les 20 dernières années pour le traitement et la prévention des épilepsies tonico-cloniques, particulièrement dans les épilepsies primaires et généralisées, dans les crises myocloniques et le petit mal, situations dans lesquelles il est un médicament de référence. Il peut être utilisé dans les crises atypiques de type aclone ou tonique. Les essais cliniques ont montré qu'il avait une efficacité équivalente à la CBZ et à la phénytoïne.

L'acide valproïque existe sous la forme amide, le valpromide, commercialisé en France sous le nom commercial de Dépamide* pour le traitement des troubles de l'humeur. Aux Etats Unis, il est commercialisé sous sa forme dimérique, le sodium divalproex (voir formules) avec une autorisation de mise sur le marché pour le traitement des troubles bipolaires de l'humeur et les cycles rapides.

Une augmentation de l'utilisation du divalproex à travers les Etats Unis a été observée depuis le début des années 90 (seul ou en combinaison avec le lithium) pour le traitement et la prophylaxie des troubles bipolaires; son taux de prescription y a maintenant dépassé celui du lithium. La situation est différente en Europe où le lithium est toujours le normothymique le plus utilisé. Le divalproate de sodium vient d'être récemment commercialisé en Europe sous le nom de Dépakote*.

1.2.3.2. Propriétés thérapeutiques et pharmacologie

L'utilisation des anticonvulsivants comme normothymiques a été guidée par l'hypothèse que des mécanismes similaires seraient responsables du comportement neuronal produisant conjointement les crises épileptiques et les troubles chroniques de l'humeur. Les anticonvulsivants ont une efficacité dans la phase maniaque, et on retrouve des points communs entre les mécanismes d'action du lithium et du valproate de sodium .

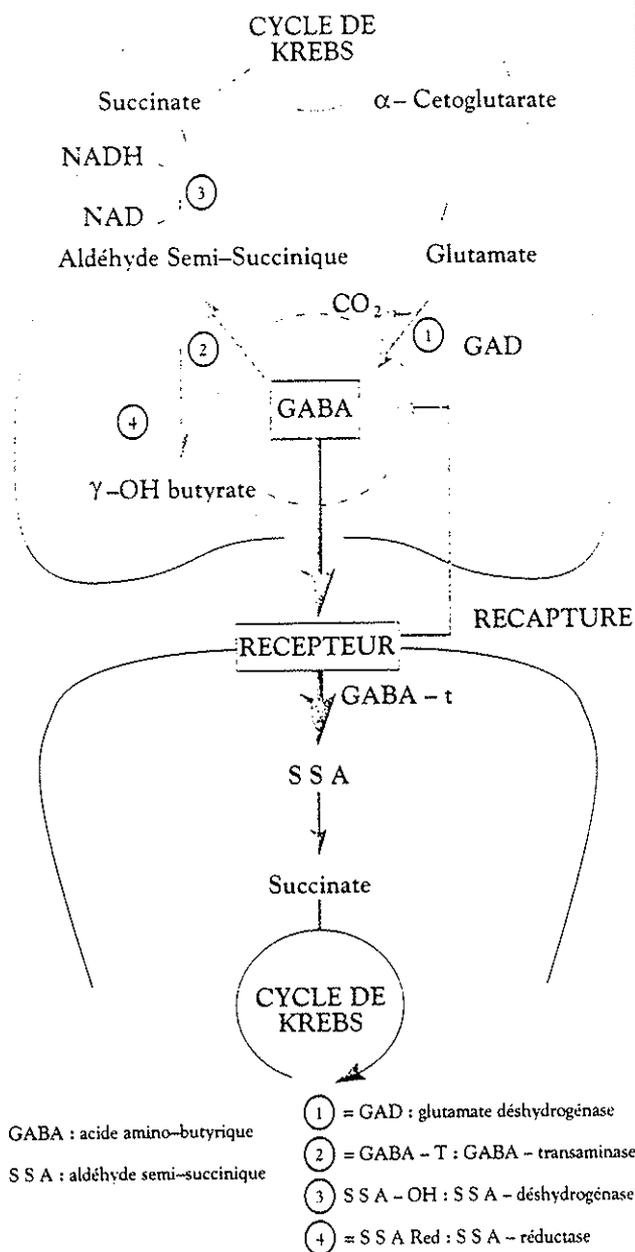
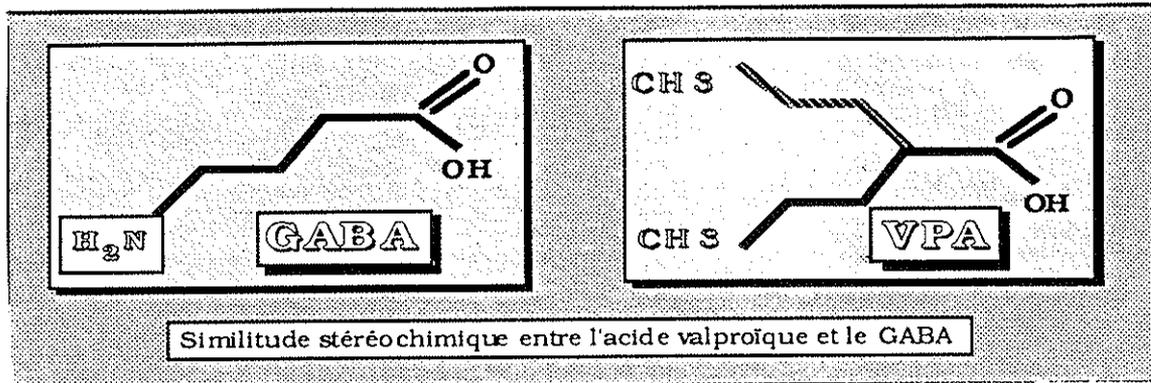


Illustration 5: Formules du GABA et schéma de la synapse GABAergique

L'acide valproïque (VPA) a une action inhibitrice sur plusieurs enzymes intervenant dans la neurotransmission GABAergique (Succinate semialdéhyde deshydrogénase, GABA transaminase, alpha-cétoglutarate deshydrogénase) (JOHANNESSEN, 2000). Par différents mécanismes, l'administration chronique de lithium et le valproate de sodium a des effets similaires sur la voie de transmission du signal de la protéine kinase C. Le valproate partage avec le lithium et la CBZ un mécanisme d'action commun: ils agissent tous sur les récepteurs GABA_B dans l'hippocampe.

Il a été montré que le VPA est efficace pour le traitement des épisodes maniaques aigus. Cette observation a conduit à son utilisation pour le traitement d'entretien ou prophylaxie des troubles bipolaires malgré le manque de preuve en faveur d'une action préventive dans les troubles bipolaires à long terme. Le VPA possède des propriétés antimaniaques et a une action sur les états mixtes aussi bien dans les épisodes aigus qu'en prophylaxie. Cependant ses propriétés antidépressives sont légères à modérées. Dans une étude rétrospective, CHEN et al., 1999 ont comparé l'efficacité du lithium et du valproate pour le traitement des épisodes maniaques dans une population de personnes âgées; ils ont montré que les 2 produits étaient efficaces mais le lithium s'avérait meilleur pour le traitement des épisodes maniaques classiques.

En résumé, il semble que le VPA soit plus efficace pour les épisodes maniaques, les cycles rapides, les états mixtes que pour les épisodes dépressifs, aussi bien pour les phases aiguës qu'en prophylaxie. Il sera préféré ou associé au lithium en cas d'intolérance ou de mauvaise réponse à ce dernier.

HIRSCHFELD et al., (1999) ont testé avec succès une stratégie de dose de charge par voie orale pour le début du traitement: ils pensaient qu'il était souhaitable d'obtenir des concentrations thérapeutiques aussi rapidement que possible dans les épisodes maniaques aigus. Ils ont administré 30mg/kg/jour de VPA pendant 2 jours puis 20mg/kg/jour les 8 jours suivants à un groupe de patient alors que le groupe témoin a reçu une posologie normale et plus progressive. 84% du groupe de charge avaient des taux sériques thérapeutiques (50µg/mL) à J3, pour seulement 30% dans le groupe témoin. Ce schéma d'administration de charge a été bien toléré ; il n'y avait pas de différences significatives entre les 2 groupes dans la fréquence et la nature des effets indésirables observés.

GRUNZE et al., (1999) ont essayé d'obtenir des concentrations sériques thérapeutiques rapidement en commençant le traitement d'épisodes maniaques par des doses d'attaque en intraveineux (IV). Ils ont administré le valproate par IV au début du traitement, suivi par un traitement par voie orale en relais. Les doses d'attaques ont été bien tolérées. La plupart des patients de l'étude (6 sur 7) ont bien répondu au traitement et les doses d'attaques par IV ont accéléré l'apparition des premiers effets thérapeutiques.

En général, la posologie par voie orale est de 600 mg par jour en 2 prises au début du traitement (de préférence après les repas); les doses sont ensuite augmentées de 200 mg/j tous les 3 jours jusqu'à 2,5 g/j, avec habituellement une posologie d'entretien de 1 à 2 g/j.

Le valproate est bien absorbé par voie orale, puis largement fixé aux protéines plasmatiques (>90%). Le composé est métabolisé par oxydation (β et ω) au niveau des mitochondries ou des cytochromes (voir schéma) en 3-oxoVPA, 3, 4 et 5 hydroxyVPA, valproyl-4lactone. Environ 20% d'une dose est excrété dans les urines sous forme de glucuronide des métabolites. Moins de 5% est éliminé sous forme inchangée. Les concentrations sanguines sont très fluctuantes, du fait de sa courte demi-vie (8 à 15 H)

1.2.3.3. Effets indésirables et contre-indications

Les effets indésirables incluent des douleurs gastriques, des nausées, ataxie et trémeur, de l'hyperammoniémie et une inhibition de l'agrégation plaquettaire. Une modification de la fonction hépatique mène rarement à une insuffisance hépatique fatale.

Le traitement doit être arrêté en cas de vomissement, d'anorexie, de jaunisse ou de somnolence. Une sédation ainsi qu'une vigilance accrue ont été reportés (rarement confusion et léthargie, associés avec des doses initiales trop élevées). Les cas de pancréatite sont rares (mesurer l'amylasémie en cas de douleurs abdominales aiguës).

Les autres troubles, cependant plus rares, incluent leucopénie, pancytopenie, diminution du taux de fibrinogène, diminution du nombre de globules rouges, irrégularités des menstruations, aménorrhée, gynécomastie, perte de l'audition, nécrose épidermique toxique et syndrome de Stevens-Johnson.

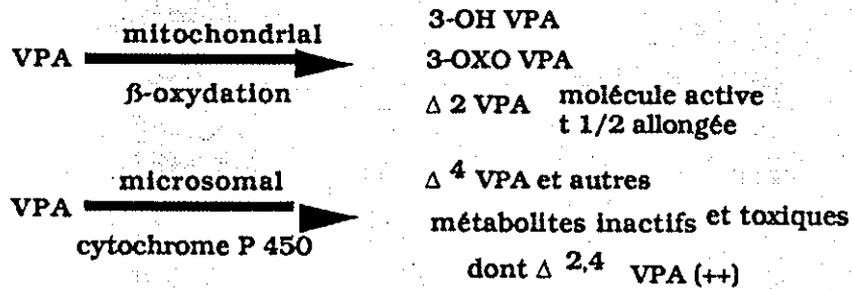
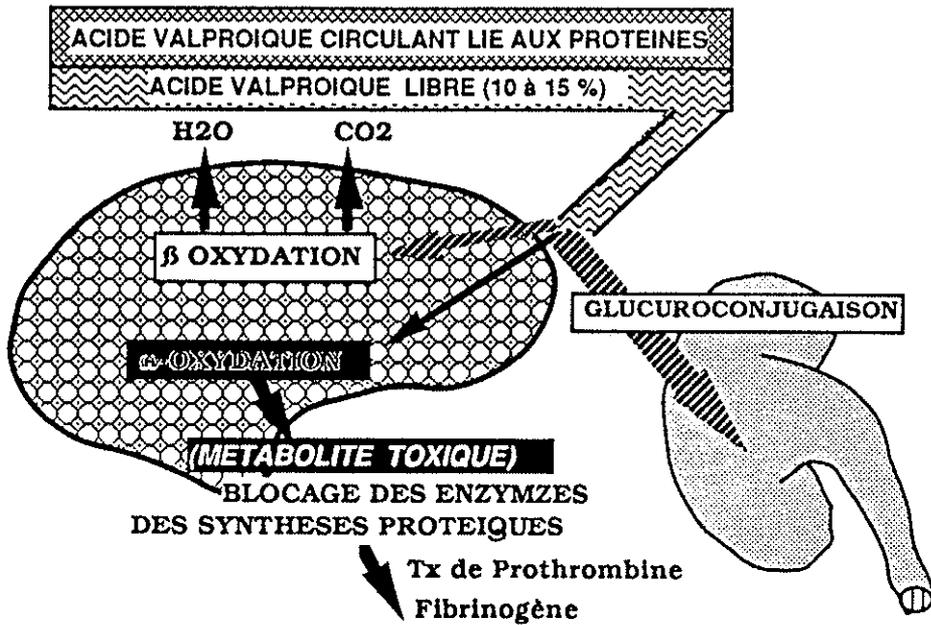
Des signes de dysfonction et de toxicité hépatique (dont l'insuffisance hépatique fatale) ont été signalés avec la prise de VPA (spécialement chez les enfants de moins de 3 ans et chez les personnes souffrant de troubles métaboliques et dégénératifs), généralement dans les 6

premiers mois de traitement. Une élévation des enzymes hépatiques est assez commune avec le VPA, et généralement transitoire. Cependant les patients doivent être réexaminés et la fonction hépatique (taux de Prothrombine) suivie jusqu'au retour à la normale.

Les précautions seront à prendre dans les cas suivants: grossesse et allaitement, lupus érythémateux, tests urinaires faussement positifs pour les corps cétoniques. Eviter d'arrêter brutalement le traitement. Suivre la fonction hépatique avant et pendant les 6 premiers mois de traitement surtout chez les personnes à risque. C'est aussi un inhibiteur enzymatique qui peut augmenter les concentrations plasmatiques de médicaments pris en même temps.

Les contre-indications sont: une maladie hépatique active, des antécédents familiaux de maladie hépatique sévère, une porphyrie et la prise de Lariam*.

VOIES D'ELIMINATION DE L'ACIDE VALPROIQUE



D'après B.J. Wilder, Pharmacokinetics of Valproate and Carbamazepine
Journal of Clinical Psychopharmacology Vol 12, N° 1, Suppl. 1992

Illustration 6: Métabolisme de l'acide valproïque

1.2.4. Autres normothymiques

1.2.4.1. Les antagonistes calciques

Selon certains résultats expérimentaux, les concentrations intracellulaires de calcium libre, qui sont régulées de manière très précise dans l'organisme, augmentent chez les patients bipolaires. L'hypothèse a été émise que les antagonistes calciques pourraient donc se montrer efficace dans le traitement des troubles bipolaires. Les antagonistes calciques réduisent l'afflux de calcium dans les cellules nerveuses, à travers les canaux calciques potentiel-dépendant de type lent. Ces derniers ne participent pas directement dans les phénomènes de libération des neurotransmetteurs, mais jouent un rôle important dans l'excitabilité neuronale. Lors d'une étude en double aveugle et contrôlée par placebo, (DUBOVSKY et al., 1982) le vérapamil a été le premier composé antagoniste calcique à présenter une efficacité dans le traitement des épisodes maniaques aigus.

Cependant, les autres études menées depuis ont été réalisées avec un faible nombre de patients et sur de courtes périodes. DUBOVSKY et al., 1997 ont observé dans une revue d'articles que le vérapamil avait des effets normothymiques équivalents à supérieurs au lithium. Cependant POST et al., 1987, estiment que le vérapamil n'est pas efficace, du à un faible passage de la barrière hémato-encéphalique. La nimodipine a aussi été utilisée, et il a été montré (DUBOVSKY et al., 1997) qu'elle diminuait la fréquence des cycles. Les antagonistes calciques sont généralement bien tolérés, il n'y a pas de phénomènes de tachyphylaxie ou de rebond après arrêt du traitement. Les effets indésirables les plus rencontrés sont liés à la vasodilatation causée et incluent hypotension, tachycardie, nausées, et rougeur du visage.

1.2.4.2. Gabapentine et lamotrigine

Il a été suggéré (BNF, 1999; DUBOVSKY et al., 1997) que la lamotrigine avait un effet positif sur l'humeur car ce composé semblait améliorer la sensation de bien-être chez les patients épileptiques plus qu'il ne contrôlait les crises. La gabapentine (Neurotin*) et la lamotrigine (Lamictal*) ont été testées avec succès lors de quelques essais cliniques de petite taille chez des patients réfractaires aux autres traitements. Ils sont bien tolérés et ont moins d'interactions médicamenteuses que la CBZ et le VPA. Cependant, même si les premiers

résultats expérimentaux se sont avérés positifs, des essais contrôlés à plus grande échelle sont nécessaires pour évaluer l'efficacité et la sûreté de ces médicaments dans les troubles bipolaires.

1.2.4.3. Les neuroleptiques

Les neuroleptiques sont généralement utilisés chez les patients maniaques pour contrôler l'agitation avant que le lithium ou d'autres composés antimaniaques commencent à agir et pour traiter les symptômes psychotiques assez communs chez les patients maniaques. Comme il a été vu en 1.2.1.2., les neuroleptiques semblent être plus spécifiques pour l'agitation psychomotrice et l'hyperactivité. Il a été évalué (BOWDEN, 2000) que même s'ils sont supérieurs au lithium dans le traitement de l'agitation chez les patients maniaques, les neuroleptiques sont moins efficaces que le lithium pour traiter les symptômes centraux et chroniques de la manie; des observations controversées indiquent que les neuroleptiques exposent les patients à des épisodes dépressifs plus sévères et plus prolongés et à des cycles rapides.

Les neuroleptiques tels que la clozapine et la rispéridone, qui possèdent des sites d'action différents des neuroleptiques typiques, semblent avoir des effets positifs mais des études contrôlées sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

1.2.4.4. Les électrochocs ou Thérapie Electro Convulsive

La TEC devrait être considérée comme le traitement initial de premier choix si le patient traverse un épisode sévère, est délirant, s'il y a un risque élevé de suicide, ou s'il a des antécédents de bonne réponse à la TEC. Le lithium doit être arrêté pendant un cycle d'électrochocs à cause de la neurotoxicité signalée avec l'association. La TEC a le taux de réponse le plus rapide et le plus élevé, mais a aussi l'inconvénient d'avoir des taux de rechute élevés. De plus elle ne permet pas de connaître la médication la plus adaptée après l'arrêt du cycle d'électrochocs et pour le choix du traitement d'entretien.

1.3. L'étude **BALANCE**

1.3.1. Présentation

Il existe toujours une incertitude sur la nature du composé à utiliser pour la prophylaxie des troubles bipolaires de l'humeur. De nombreuses preuves sont en faveur de l'efficacité du lithium pour réduire le risque de rechute. Cependant les problèmes de tolérance et le risque de rechute en cas d'arrêt du traitement ont mené à l'utilisation d'autres médicaments. Comme il a été vu en 1.3.1.1., les dérivés de l'acide valproïque sont de plus en plus utilisés et ont montré qu'ils étaient efficaces dans le traitement des phases maniaques aiguës et des troubles atypiques, mais moins efficaces dans le traitement d'entretien des troubles bipolaires de l'humeur.

Les études précédentes n'ont pas inclus un nombre suffisant de patients et n'ont pas été conduites sur une durée suffisante. Il existe toujours une incertitude quant à l'efficacité relative du lithium et du valproate dans la prévention des rechutes dans les troubles bipolaires. Il y a besoin réel d'un essai clinique comparant l'efficacité du lithium et du valproate à une grande échelle. De plus nous ne savons pas si l'association des 2 composés est plus efficace que chaque produit pris séparément.

BALANCE (Bipolar Affective disorder : Lithium/Anticonvulsant Evaluation) est un essai clinique multicentrique de grande taille, organisé par le département de psychiatrie à l'université d'Oxford sous la direction des professeurs G.GOODWIN, J.GEDDES et R. PETO. C'est une étude mise au point de manière à être la plus simple possible pour les investigateurs et les cliniciens, randomisée, qui compare l'association du lithium-VPA avec chaque composé pris en monothérapie dans le traitement d'entretien des troubles bipolaires. Le but est d'obtenir des résultats fiables sur l'efficacité relative des 2 agents pris séparément et de déterminer si leur association est plus efficace que s'ils sont pris en monothérapie.

1.3.2. Méthode

BALANCE va comparer le lithium et le divalproate de sodium (Depakote*), seuls et en association, sur une durée d'au moins 2 ans, pour examiner l'efficacité relative des 2

médicaments pour la prophylaxie et pour évaluer si la « bithérapie » produit des effets bénéfiques supplémentaires.

1.3.3. Sujets

Les critères d'inclusion à l'essai sont délibérément larges pour permettre le recrutement d'un ensemble hétérogène de patients. En fait, le but est d'inclure tous les patients bipolaires qui sont d'accord pour commencer un traitement prophylactique mais pour lesquels il y a une incertitude quant au composé normothymique optimal et le plus adapté pour eux. Les patients pourront être inclus dans l'étude s'ils répondent à ce principe d'incertitude.

1.3.4. Procédure

Les participants seront d'abord stabilisés par un traitement avec du lithium (400 ou 800 mg) et avec du divalproate de sodium (1000 mg), puis assignés aléatoirement à un groupe de traitement par le centre de coordination de l'étude (voir schéma). Le médicament devant être arrêté pour les besoins de l'essai clinique sera retiré de manière progressive sur une période de 4 semaines pour éviter les symptômes d'arrêt.

1.3.5. Suivi

Durant le suivi, les patients seront vus régulièrement lors des visites de routine déterminées par le protocole de l'étude. Les visites de suivi seront prévues après 3 mois puis tous les 6 mois pour des prises de sang, la dispensation des « packs » de traitement, pour encourager l'observance au traitement et pour enregistrer les informations sur les résultats.

1.3.6 Dosage des médicaments dans le sérum

Il est nécessaire de mettre au point une procédure de dosage pour les 2 composés. Les concentrations sériques de lithium seront dosées par émission atomique. Les organisateurs de l'essai clinique ont décidé que la mise au point et la validation d'une méthode originale pour le

dosage du valproate de sodium dans le sérum seraient un bon sujet de thèse d'exercice de pharmacie.

Les pré-requis de ce travail sont apparus très rapidement: étant donné la taille de l'essai et le grand nombre de patients et d'échantillons sanguins à traiter (2200 à 4000 personnes sont prévues), la procédure devra être simple et aussi rapide que possible, avec un nombre minimal d'étapes de manipulation, tout en étant sensible et précise, répétable, reproductible et robuste.



BALANCE

Bipolar Affective disorder: Lithium / ANti-Convulsant Evaluation

Protocol

October 2000

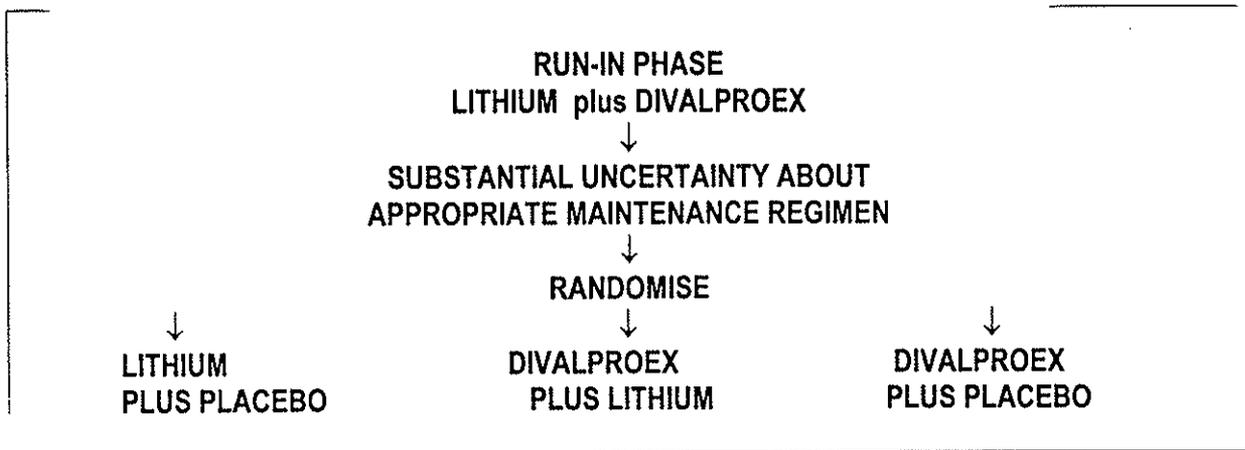


Illustration 7: Présentation et schéma de répartition des patients dans l'étude BALANCE

2. Mise au point et validation d'une procédure pour le dosage de l'acide valproïque dans le sérum humain

2.1. Recherche de travaux antérieurs dans la littérature scientifique

Dans le cadre d'une étude clinique comparant l'efficacité du divalproate de sodium et du lithium, la nécessité de mettre au point une méthode rapide, simple et précise pour doser les concentrations sériques de valproate est apparue.

De nombreuses techniques sont déjà utilisées dans les structures hospitalières pour réaliser le suivi thérapeutique (therapeutic drug monitoring) du valproate pour le traitement de l'épilepsie. Plusieurs méthodes sont décrites dans la littérature scientifique sur le dosage de l'acide valproïque dans les milieux biologiques humains.

Les tests immunoenzymatiques tels que l'EMIT en phase homogène (enzyme multiplied immunoassay technique) développé par Syva ou la FPIA (fluorescence polarisation immunoassay) représenté par les automates TDx et AxSYM d'Abbott sont largement utilisées pour le dosage en routine en hôpital mais ces techniques nécessitent l'utilisation de réactifs coûteux, souffrent de problèmes de réactivité croisée des anticorps avec des métabolites du produit à doser et sont peu sensibles: RICHARD et al.(1985) rapportent des coefficients de variation pour l'EMIT de 22 à 27% dans la gamme de concentration de 5 à 10 µg/ml (45).

Des techniques de chromatographie en phase gazeuse, rapides, adaptées à une utilisation pour le suivi clinique de patients ont été développées (LIN et KELLY, 1985; REGE et al., 1984). Ces deux procédures déclarent avoir une bonne sensibilité en utilisant une détection par ionisation de flamme. Leurs limites de détection sont 1 et 5 µg/ml respectivement. La méthode de LIN et KELLY qui utilise le procédé d'extraction sur colonne en phase solide, s'avère longue et se trouve confrontée à un problème de bruit de fond important, qui pourrait être du à l'agent de dérivatisation.

REGE et al.(1984) utilisent un procédé d'extraction liquide-liquide relativement long si un nombre élevé d'échantillons à traiter est impliqué, associé à une étape de dérivatisation. De plus ce procédé nécessite l'utilisation d'un important volume de plasma (250 µL). Deux méthodes utilisant une détection par spectrométrie de masse ont été développées pour le dosage du valproate mais ne sont pas adaptées à une pratique clinique de routine; de plus la sensibilité

obtenue par ces méthodes n'est pas nécessaire en suivi thérapeutique (NAU et al., 1981, DARIUS et al., 1994).

De nombreuses procédures utilisant la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ont été développées. L'acide valproïque a une absorbance faible dans la région ultraviolette (UV); de plus il est volatil sous sa forme d'acide libre, gênant les extractions de type liquide-liquide du à la perte éventuelle d'analyte lors de l'évaporation du solvant. Pour éviter ces problèmes, la majorité des procédures CLHP (LAU-CAM et al., 1997, LIU et al., 1992, LUCARELLI et al., 1992, WOLF et al., 1989, YU et al., 1991) utilise une étape de dérivatisation, dans laquelle l'acide valproïque est lié à un dérivé phénacyle le plus souvent, pour augmenter l'absorption dans la région UV, ou à un dérivé fluorophore tels que les dérivés de la coumarine pour une détection par fluorescence. Cette étape additionnelle permet d'obtenir de meilleures sensibilités, au détriment de procédures plus longues en temps de manipulation. Les méthodes d'extraction les plus communément utilisées sont l'extraction en phase solide ou une simple précipitation des protéines de la matrice biologique. Des procédés utilisant une extraction liquide-liquide ont été développées mais une perte de composé peut avoir lieu à cause de la volatilisation.

La procédure mise au point par LOVETT et al., (1987) utilise une étape rapide de précipitation des protéines dans laquelle l'étalon interne est inclus. La détection est réalisée par absorption UV sans dérivatisation. Ils obtiennent ainsi une bonne sensibilité (limite de quantification de 2,5µg/mL) mais leur méthode nécessite un volume de sérum important (250µL). De plus leurs paramètres chromatographiques (pH = 2,3 et débit de la phase mobile = 2,5mL/min) semblent pouvoir endommager la colonne dans le long terme. La procédure validée par KUSHIDA et al., (1985) permet le dosage concomitante de l'acide valproïque et de quatre autres anticonvulsivants, sans étape de dérivatisation et rapporte une limite de détection de 2,6µg/mL pour le VPA. Cependant elle nécessite deux étapes de manipulation pour la précipitation des protéines rendant la procédure plus longue. Au regard de ces observations, nous pensons qu'il est nécessaire d'améliorer les méthodes existantes pour les besoins de notre étude.

Nous présentons ici une procédure spécifique, sensible et précise pour le dosage du VPA par CLHP qui utilise seulement 50µL de sérum. La détection est réalisée par absorption UV et l'extraction des analytes est remplacée par une simple précipitation des protéines.

2.2. Rappels sur la CLHP

La chromatographie liquide à haute performance ou à haute pression, est une technique de séparation réalisée grâce à l'affinité différentielle d'une molécule pour la phase mobile liquide dans laquelle elle est contenue, ou pour la phase stationnaire solide qu'elle traverse. Cette différence d'affinité pour la phase solide ou la phase mobile repose sur la polarité et le comportement hydrophile ou hydrophobe de l'analyte et de son environnement. La phase stationnaire dont est remplie la colonne est constituée d'un matériau inerte robuste. Ce sont le plus souvent des particules de silice poreuses, de large surface. Elles sont le support de greffons ou groupements de nature chimique variée. Une pouvoir de séparation élevé est possible en utilisant des particules de 3 à 10 μ m de diamètre. La phase mobile et la phase stationnaire sont de polarités différentes (l'une hydrophile et l'autre hydrophobe).

Dans la CLHP à polarité de phases inversée, une solution tampon aqueuse contenant une quantité variable d'un solvant organique miscible est utilisée comme phase mobile polaire ou hydrophile. Des groupements de type C18 (chaîne carbonée avec 18 C) constituent la phase stationnaire apolaire ou hydrophobe. Chaque molécule est caractérisée par une polarité différente, et une affinité différente pour une des deux phases du système. Cette différence d'affinité permet la séparation d'un ensemble de composés variés.

La phase mobile est poussée en continu dans le système à un débit régulier (le plus souvent 1mL/min) et avec une pression élevée. Une fois que les analytes ont été séparés les uns des autres dans la colonne, ils "éluent" ou sortent de la colonne, sous la forme d'une fine bande de molécules dans la phase mobile. Celle ci passe alors dans un détecteur, où les molécules présentes sont visualisées de manière différente (absorption UV, émission de fluorescence, coulométrie...) et quantifiées. Le signal obtenu est finalement amplifié et représenté sur un enregistreur sous la forme d'un pic distinct.

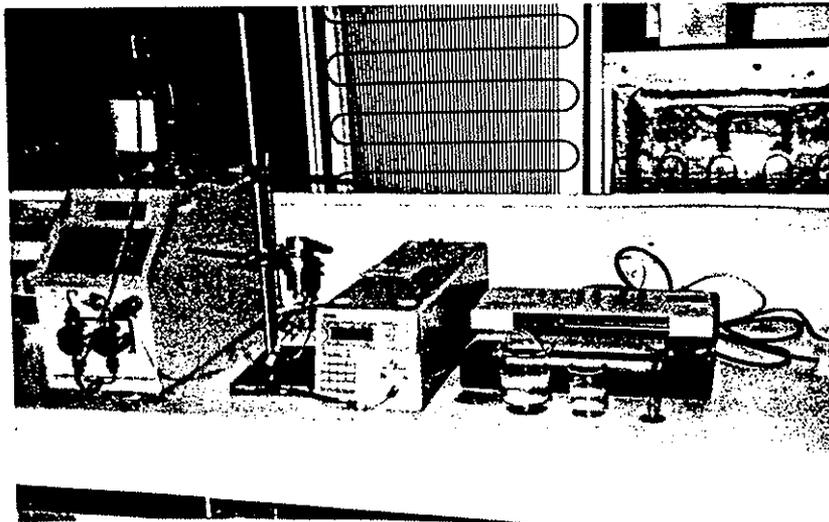
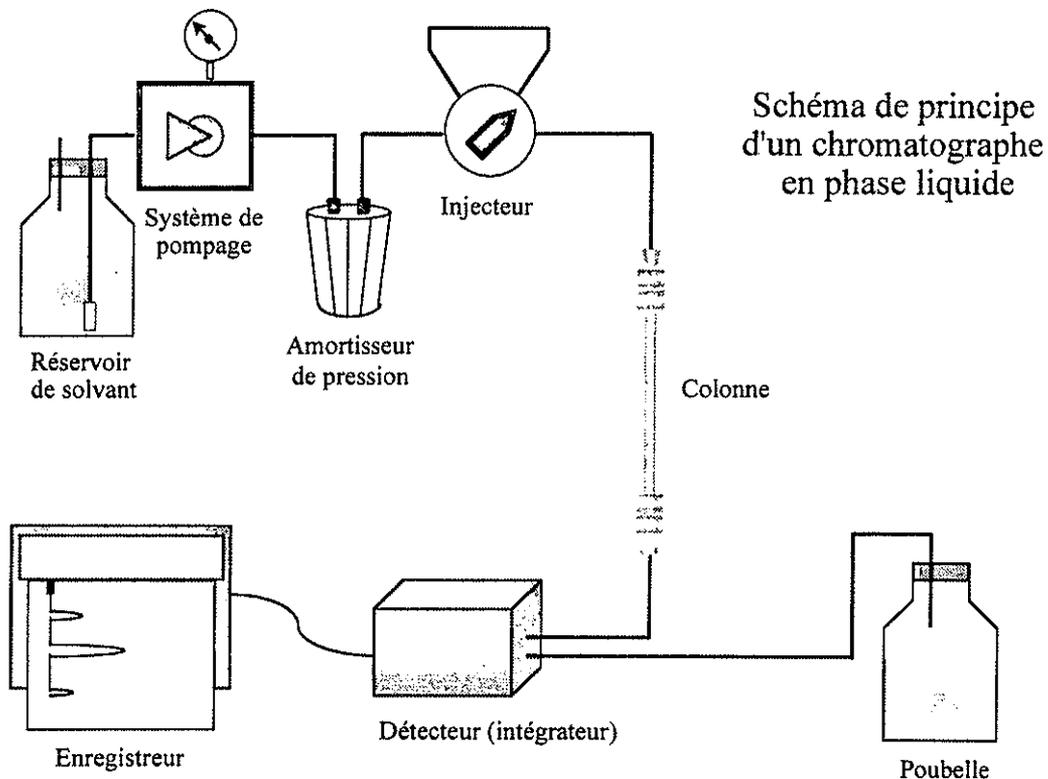


Illustration 8: Schéma d'un système chromatographique et photo du matériel utilisé pour la mise au point

2.3 Propriétés chimiques de l'acide valproïque

L'acide valproïque (VPA), acide 2-propyl-pentanoïque est un acide carboxylique. Sa structure chimique est représentée dans le tableau 1. Son poids moléculaire est de 144,2g/mol mais il est le plus souvent rencontré sous la forme de son sel, le valproate de sodium de poids moléculaire 166,2g/mol. Le valproate de sodium est soluble dans l'eau et l'éthanol (une part pour cinq parts de solvant) alors que l'acide n'est que très faiblement soluble dans l'eau.

La longueur d'onde d'absorbance maximale dans la région UV est de 201 nm pour le valproate mais cette absorbance est faible.

Le pKa de l'acide valproïque est de 4,8. Ainsi selon le pH de la solution contenant les molécules, la proportion de forme ionisée et non ionisée de molécules varie. Ce pourcentage de forme ionisée et non ionisée (polaire et apolaire) influence la rétention dans un système CLHP à polarité de phases inversée. L'acide valproïque possède une chaîne carbonée aliphatique ramifiée à 8C qui procure à la molécule son caractère apolaire.

2.4 Matériel et réactifs

2.4.1 Réactifs

Tous les réactifs utilisés dans la procédure sont de qualité analytique. L'acétonitrile (MeCN) a été acheté chez BDH (GB), les sels sodiques de valproate, d'octanoate, d'octanoate et de décanoate ont été fournis par Sigma Aldrich (UK). Le dihydrogénophosphate de potassium et l'hydrogénophosphate dipotassique de qualité HPLC ont été achetés chez Fisons (GB). L'eau utilisée est bidistillée.

Les solutions mères (1mg/mL) de valproate de sodium et d'octanoate de sodium sont préparées dans de l'eau alcalinisée (KOH 1M) tous les 15 jours. Le méthanol a été utilisé comme solvant mais donnait des interférences sur le chromatogramme. Les solutions de travail, 10-400µg/ml pour le valproate de sodium et 500µg/ml pour l'étalon interne sont préparées quotidiennement en diluant les solutions mères avec de l'eau distillée.

Le sérum vierge est collecté auprès de donneurs de sang volontaires.

2.4.2 Matériel

Le système chromatographique est constitué -d'une pompe LDC Constametric modèle 3200 (qui distribue la phase mobile dans le système), ultérieurement remplacée par une pompe JASCO PU1580;

-d'un injecteur Rhéodyne 7010, pour la mise au point remplacé par un injecteur automatique GBC LC1610 avec une boucle de 50 μ L;

-d'un détecteur UV/VIS JASCO 975;

-d'un enregistreur LKB 2210 et d'un intégrateur Philips 3000.

2.5. Mise au point du système chromatographique

2.5.1. La colonne

La technique HPLC à polarité de phases inversée développée par LOVETT et al., (1987) a servi de référence au début de cette étude. Ils utilisaient une colonne de 15cm avec une phase stationnaire de type C18; la silice était de type ZORBAX, les particules de 5 μ m. Il a été décidé de commencer les manipulations avec une colonne C18 de 15cm. La première phase mobile utilisée était composée d'un simple mélange eau/ MeCN dans des proportions 70:30. La détection était réalisée à 210 nm. Avec ces premiers paramètres fixés, 50 μ L de solutions aqueuses standards de VPA ont été injectés: le composé n'a pas été retenu sur la colonne, comme le montraient les chromatogrammes (temps de rétention, $t_r=1,4$ min).

Une colonne plus longue (25cm, 4,6mm de diamètre intérieur) a été installée: les particules étaient toujours de 5 μ m et greffées avec des groupes C18. La phase mobile était composée d'eau/MeCN (60:40). De nouveau les chromatogrammes obtenus après injection de solutions étalons de VPA n'ont pas montré de rétention sur la colonne; il semblait cependant qu'une colonne plus longue augmenterait la rétention. Une modification de la phase mobile a été testée en diminuant la proportion de modificateur organique à 10% avec 90% d'eau. La rétention sur la phase apolaire devrait ainsi augmenter. Le temps de rétention obtenu était de 4,1 min, mais le pic de l'analyte présentait une importante asymétrie.

Une nouvelle colonne de 15cm et 4,6mm de diamètre intérieur a été essayée: elle était remplie d'une silice de type Hypersil 5 μ m avec des greffons CN ou cyanopropyle; la phase mobile utilisée avec était composée d'un mélange eau/MeCN, 60:40. Le pic obtenu avait un aspect convenable. Cependant il était nécessaire de régler la sensibilité du détecteur sur sa valeur maximale (0,0005 AUFS) pour obtenir un bon signal.

L'étalon interne a alors été introduit dans la mise au point. Le premier composé choisi était l'acide caproïque. Quand injecté seul dans le système avec les derniers paramètres fixés, l'acide caproïque donnait un pic symétrique. Cependant quand les 2 composés étaient injectés ensemble, les deux pics étaient faiblement séparés. La composition de la phase mobile a été modifiée à un rapport eau/MeCN de 45:55. Il n'a pas été observé de modifications dans la résolution des 2 composés.

Il a été décidé de changer de colonne, pour améliorer la résolution des 2 composés. La nouvelle phase stationnaire utilisée, appelée colonne à mode mixte, consistait en un mélange de greffons C18 et CN. Cette colonne mesurait 15 cm avec un diamètre intérieur de 4,6 mm et des particules de type Spherisorb de 3 μ m. La phase mobile utilisée était un mélange eau/MeCN , (60:40) avec un débit réduit (0,5ml/min) pour éviter d'endommager les particules. Après injection d'un mélange de VPA et d'étalon interne, le chromatogramme présentait des temps de rétention de 5,5 et 3 minutes respectivement. Les 2 pics obtenus étaient relativement symétriques; la résolution était satisfaisante malgré un K' trop faible.

Afin d'augmenter leur rétention, la proportion de modificateur organique a été diminuée à 35%. Le chromatogramme obtenu après cette modification présentait des temps de rétention de 7 et 14 minutes pour l'étalon interne et le VPA.

Cette colonne semblait être convenable et la plus adaptée, tant que des solutions étalons aqueuses étaient utilisées. Dès que des extraits de sérum après précipitation des protéines ont été injectés, la colonne à modes mixtes de 15cm ne donnait plus de résultats satisfaisants.

La dernière colonne testée avait le même type de phase stationnaire (C18 et CN) sur une silice de 5 μ m de type Spherisorb. La colonne de 25cm avait un diamètre interne de 4,6mm. La phase mobile était constitué du mélange eau/MeCN, 65:35 à un débit de 1mL/min. Les chromatogrammes obtenus étaient très satisfaisants en terme de d'aspect et de résolution des pics.

Les phases stationnaires de type C18 ou octadécylsilane sont les plus communément utilisés en CLHP à polarité de phases inversée. La mise au point du système a débuté avec l'utilisation d'une telle colonne. Cependant les paramètres de phase mobile de LOVETT et al. (1987) ont été jugés délétères au long terme pour les greffons: les pH bas (2,3) et les débits de phase mobile élevés (2,5mL/min) sont mal tolérés par certaines silices alkylées et peuvent endommager les liaisons siloxanes. Ces observations nous ont poussé à éviter ces paramètres et nous ont conduit à utiliser d'autres phases stationnaires.

Les phases "cyano" ou cyanopropyl (CN) peuvent être utilisées en chromatographie liquide à polarité normale et à polarité inversée. Les mécanismes de rétention sont mixtes avec des interaction hydrophobes et silanophiles (HERON et al.,1993), le groupe cyano étant plus polaire que les chaînes alkyles conventionnelles. Cependant ces phases peuvent souffrir de problèmes de stabilité.

Les phases stationnaires de type mode mixte sont constituées d'une combinaison de fonctionnalités octadécyle et cyanopropyle. L'introduction d'une partie hydrophile apporte une sélectivité et des caractéristiques de rétention différentes en comparaison avec les matériaux traditionnels en phase inverse.

Le support consiste en un substrat en silice sphérique de haute pureté, avec des pores de 100Å liées à des greffons cationiques (amine) et à des greffons octadécyle conventionnels dans des proportions 30:70.

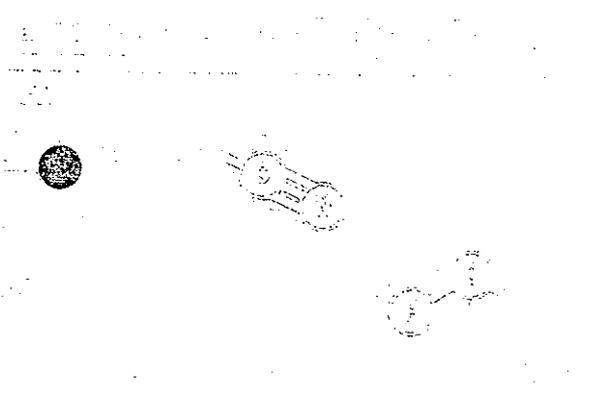
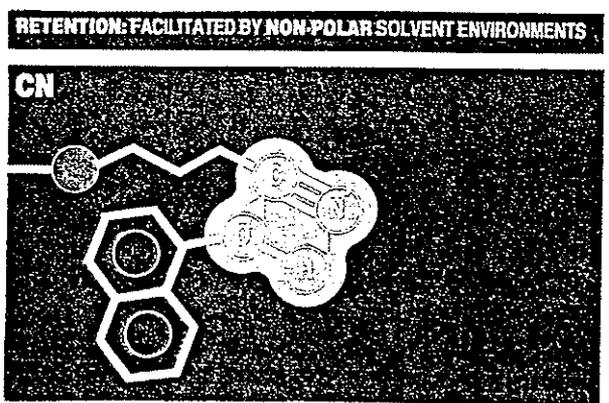
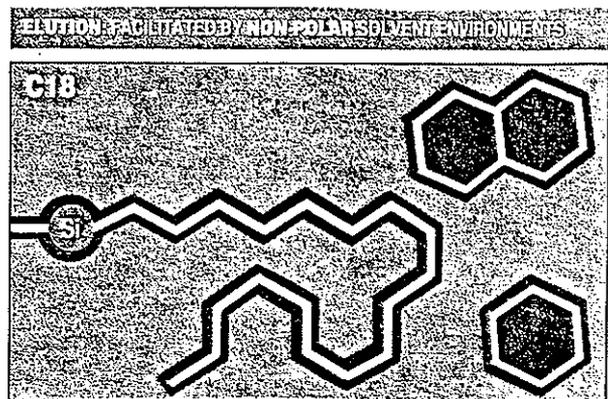
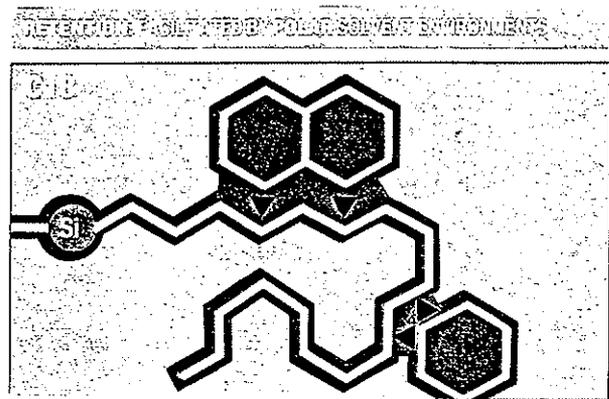


Illustration 9: Caractéristiques des phases stationnaires C18 et CN

2.5.2. La phase mobile

Comme pour la phase mobile, le type de phase mobile a été inspiré de la procédure de LOVETT et al. (1987) qui utilisait l'acétonitrile comme modificateur organique avec un tampon phosphate.

Le travail de mise au point analytique a débuté avec un simple mélange d'eau et d'acétonitrile avec un rapport 70:30, v/v. Après mesure, le pH de l'eau distillée utilisée était de 4,5. La quantité de modificateur organique fut le premier paramètre testé pour obtenir la rétention et la résolution voulue. Quand les chromatogrammes obtenus n'étaient pas satisfaisants pour une colonne donnée, la quantité de MeCN était modifiée. Finalement c'est le rapport eau/MeCN de 65:35 qui a été retenu, en association avec la colonne à modes mixtes de 25cm.

Les deux pics étaient bien séparés; cependant leur facteur de résolution était trop important et leur k' trop faible.

. Une fois le pourcentage de modificateur organique fixé, la partie aqueuse de la phase mobile devait être remplacée par une solution tampon; les variations de pH et donc de rétention dues à des facteurs externes (température) sont ainsi évitées. Le choix du pH le plus approprié aux nécessités d'une analyse (temps total d'analyse, résolution des composés, distance du front de solvant) est primordial.

Une solution tampon phosphate (KH_2PO_4) à 0,1M a d'abord été utilisé avec un pH de 7,2. Cette solution tampon a ensuite été mélangée avec de l'acétonitrile dans les proportions déterminées précédemment, (65:35). Les chromatogrammes obtenus avec ce premier réglage n'ont pas présenté de rétention des composés: le pH de la phase mobile était alors 2,4 unité de pH au dessus du pKa des composés; dans ces conditions 100% des molécules se trouvent ionisées; elles n'auront donc que peu d'affinité pour la phase stationnaire apolaire.

Le pH du tampon phosphate a été réduit à 5,8 et la molarité du sel d'hydrogénophosphate réduite à 0,05M. Cependant à ce pH, la rétention des composés sur la phase stationnaire a été trop importante avec des temps de rétention pour le VPA et l'étalon interne de 9,6 et 25 minutes. Le réglage suivant a été d'ajuster le pH à 6,2 avec des temps de rétention de 5,6 et 12,4. L'étalon interne a alors été changé pour obtenir un temps de rétention de 7,4.

Le dernier changement de pH de la solution tampon a été réalisé suite à la persistance d'un pic interférent, provenant d'un composé endogène du sérum, avec un temps de rétention de 7,3 min. Le pH a été augmenté à 6,35 et les temps de rétention ainsi obtenus étaient de 4,9 et 6,1 min, le pic qui gênait restant à 7,3 min.

2.5.3. L'étalon interne

Les procédures analytiques de dosage comprenant une étape d'extraction, nécessitent l'utilisation d'un étalon interne. La procédure mise au point par LOVETT et al. (1987) utilise le diazépam comme étalon interne mais le choix d'un composé chimiquement proche semblait plus judicieux: un homologue de l'acide valproïque avec une fonction carboxyle a été préféré. RICHARD et al., (1985) ont utilisé l'acide nonanoïque, tandis que LIN et KELLY, (1985) se sont servi de l'acide α -méthyl- α -éthylcaproïque. L'acide caproïque, un acide carboxylique en C6 fut le premier composé utilisé. Il fut remplacé par des composés de chaîne carbonée plus longue car il éluait avant le composé à doser.

L'acide nonanoïque et l'acide décanoïque ont ensuite été essayés. Cependant la distance entre le pic du VPA et de l'étalon interne était trop importante et produisait un temps d'analyse trop long. Il a été observé que les sels sodés des acides décanoïque et nonanoïque donnaient des pics de meilleure qualité (symétrie, largeur) en comparaison des acides libres correspondant; Le sel sodique de l'acide octanoïque a finalement été choisi pour la qualité du pic obtenu et le temps de rétention, permettant une bonne résolution avec le pic du VPA (facteur de résolution) et un temps d'analyse inférieur à 10 minutes.

Il est intéressant de noter tout de même que, alors que le VPA et l'étalon interne ont le même nombre de carbones (8 au total), l'arrangement différent de ces carbones permet une séparation et une résolution convenable de ces composés dans le système CLHP.

2.5.4. La longueur d'onde de détection

La détection des composés est réalisée par absorption ultraviolette (UV). Le rayonnement UV émis par la lampe D2 excite et fait passer un électron de la molécule éluée dans une couche supérieure. Cette énergie absorbée par la molécule est dépendante de la longueur d'onde du faisceau incident: l'énergie nécessaire à l'excitation d'un électron et à son passage à un niveau énergétique supérieur dépend de la longueur d'onde d'excitation. Chaque molécule possède son propre spectre UV représentant l'absorbance en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Le détecteur compare l'énergie lumineuse en absence et en présence de molécules dans la phase mobile; le signal obtenu est ensuite amplifié et représenté sur le chromatogramme.

Le VPA a une absorbance maximale à 210 nm cependant il n'est pas nécessaire de se placer à cette longueur d'onde exactement. Différentes longueurs d'ondes ont été testées autour de 210 nm: la détection à 215 et 220 nm a permis de diminuer le bruit de fond mais a réduit la sensibilité. L'utilisation de 204 nm a réduit le bruit de fond tout en conservant une bonne sensibilité.

L'acétonitrile utilisé dans la phase mobile est une molécule avec un point de «cut-off» de 190 nm. Tout air dissout dans l'acétonitrile provoquera l'apparition d'un bruit de fond important; il est donc impératif d'utiliser une phase mobile parfaitement dégazée. Du fait de la faible absorbance de l'acide valproïque, la sensibilité du détecteur doit être réglée à une valeur élevée: 0,001 AUFS (maximum = 0,0005).

2.5.5. L'étape de précipitation des protéines

La plupart des méthodes de dosage du VPA rencontrées dans la littérature scientifique utilisent des procédures d'extraction liquide-liquide ou en phase solide afin d'isoler les analytes de la matrice biologique. De plus la majorité des procédures HPLC utilise une étape de dérivation des analytes: pour palier la faible absorbance du VPA, une molécule est liée à l'analyte. Ce type de réaction chimique réalisée après la phase d'extraction rallonge le temps total d'analyse. LOVETT et al. (1987), RICHARD et al. (1985) et KUSHIDA et al. (1985) utilisent seulement une étape de précipitation des protéines du sérum en ajoutant de l'acétonitrile surchargé en étalon interne à un volume déterminé de sérum.

Cependant la précipitation des protéines ne peut être considéré comme une phase d'extraction *stricto sensu*; il n'est donc théoriquement pas nécessaire de suivre le taux de recouvrement de l'analyte.

Plusieurs composés peuvent être utilisés comme réactif pour la précipitation des protéines du sérum: méthanol (MeOH), acétonitrile (MeCN), sulfate d'ammonium, acide trichloroacétique à 3%. Dans une première expérience ces 4 réactifs ont été comparés: l'efficacité des produits a été évaluée par l'aspect des chromatogrammes obtenus après injection du surnageant de sérum vierge mis en contact avec les différents réactifs, mélangé par vortex et centrifugé.

Volume de sérum vierge	Acetonitrile	Methanol	Sulfate d'ammonium	Acide trichloro-acétique 3%	Chromatogramme
200µL	800µL				propre
200µL		800µL			relativement propre avec temps mort important
200µL			800µL		Sale avec temps mort important
200µL	400µL		400µL		Pas injecté
25µL				875µL	Réponse du détecteur hors échelle 30min
25µL	875µL				Propre avec un temps mort réduit

A partir de l'observation des résultats de cette première expérience, le choix du MeCN s'est rapidement imposé comme le plus approprié pour précipiter les protéines du sérum. Le chromatogramme obtenu est relativement propre avec peu de bruit de fond.

L'étape suivante consistait à déterminer la proportion de MeCN à utiliser avec le sérum. LOVETT et al. (1987) ont utilisé un rapport MeCN+étalon interne/sérum de 2:1. Lors d'une deuxième expérience plusieurs rapports MeCN/sérum ont été essayés: 2:1, 4:1, 5:1, 7:1. 200, 400, 500 et 700 µL de MeCN ont été ajoutés à 100µL de sérum vierge, mélangés par vortex et centrifugés 5min à 8000g. 50 µL du surnageant ont été injectés dans le système

vortex et centrifugés 5min à 8000g. 50 µL du surnageant ont été injectés dans le système chromatographique. L'analyse des chromatogrammes obtenus s'est portée sur l'importance du bruit de fond et le nombre de pics interférant près du temps mort. Le rapport 7:1 s'est avéré être le plus satisfaisant.

Cependant l'aspect du temps mort devait encore être amélioré: un pic apparaissait près de celui-ci. Par addition de 10µL d'acide chlorhydrique, le pic a disparu. Pour expliquer ce phénomène, l'hypothèse a été émise que l'acidification du sérum diminue l'ionisation de certains composés endogènes et réduit leur rétention. En conséquence cette diminution de rétention pousse certains composés dans le front de solvant.

A ce point de la mise au point, plusieurs paramètres étaient fixés: nature du réactif, proportion de réactif à utiliser et longueur d'onde de détection. Pour les besoins de l'étape de validation et la préparation de la gamme étalon et des échantillons de contrôle qualité, il était nécessaire de sélectionner un sérum vierge le plus propre possible. Ceci a été réalisé en répétant l'étape de précipitation des protéines avec plusieurs sérums d'origine différente, ces sérums ont été collectés auprès de donneurs de sang.

Une expérience a été menée en utilisant 5 sérums différents (MC, MF, DL, SC, GB). L'étape de précipitation des protéines a été réalisée en utilisant le rapport MeCN/sérum de 7:1 et avec l'addition de 10µL d'acide chlorhydrique. Les résultats ont montré que le sérum DL donnait les chromatogrammes les plus propres, c'est à dire avec le plus petit nombre de pics endogènes et avec la ligne de bas la plus plate.

Le dernier paramètre à étudier était la quantité de sérum à utiliser pour chaque échantillon dans l'étape de précipitation des protéines. LOVETT et al. (1987) ont utilisé 250µL. Notre but a été d'utiliser la plus petite quantité possible tout en gardant une sensibilité convenable. 50µL s'est avéré être le plus faible volume utilisable une limite de détection acceptable.

Une fois tous les paramètres fixés, il était nécessaire d'évaluer la linéarité de la mesure avant de commencer la validation de la méthode. L'expérience a consisté à préparer une gamme étalon 2 jours de suite. Cette gamme a été réalisée en surchargeant du sérum vierge avec des solutions de concentrations croissantes en VPA (5-200µg/mL en VPA sel sodique et 4,33-173,4µg/mL en VPA). Les 7 concentrations suivantes ont été sélectionnées pour évaluer la

linéarité des résultats obtenus par cette méthode. Le tableau suivant indique les concentrations en acide valproïque et en valproate de sodium.

Tube n°	Concentration en valproate de sodium: $\mu\text{g/mL}$ de sérum	Concentration en acide valproïque: $\mu\text{g/mL}$ de sérum
1	0	0
2	5	4,33
3	10	8,67
4	25	21,67
5	50	43,35
6	100	86,7
7	150	130,05
8	200	173,4

La droite étalon est calculée en utilisant le modèle de régression linéaire avec calcul de la droite des moindres carrés. La concentration en valproate de sodium est représentée contre le rapport des hauteurs de pics (H_{VPA}/H_{EI}) noté R.H.P. dans les tableaux. Les concentrations en acide valproïque dans les échantillons inconnus sont calculées en rapportant le rapport de hauteur de pic obtenu sur la droite étalon et en multipliant par un facteur pour tenir compte des dilutions (volume de surnageant retiré/volume total et masse molaire de l'acide valproïque/valproate de sodium, soit $410/250 \cdot 144,2/166,2 = 1,4218$).

La gamme étalon a été mesurée 2 jours de suite. Les tableaux présentent les concentrations en VPA sel sodique en abscisses (x) et le rapport de hauteurs de pics en ordonnées (RHP) (y). Au bas de chaque tableau, l'équation de la droite est donnée sous la forme $y=ax+b$, a étant la pente et b l'intercept ou ordonnée à l'origine. R, le coefficient de corrélation, doit se rapprocher de 1.

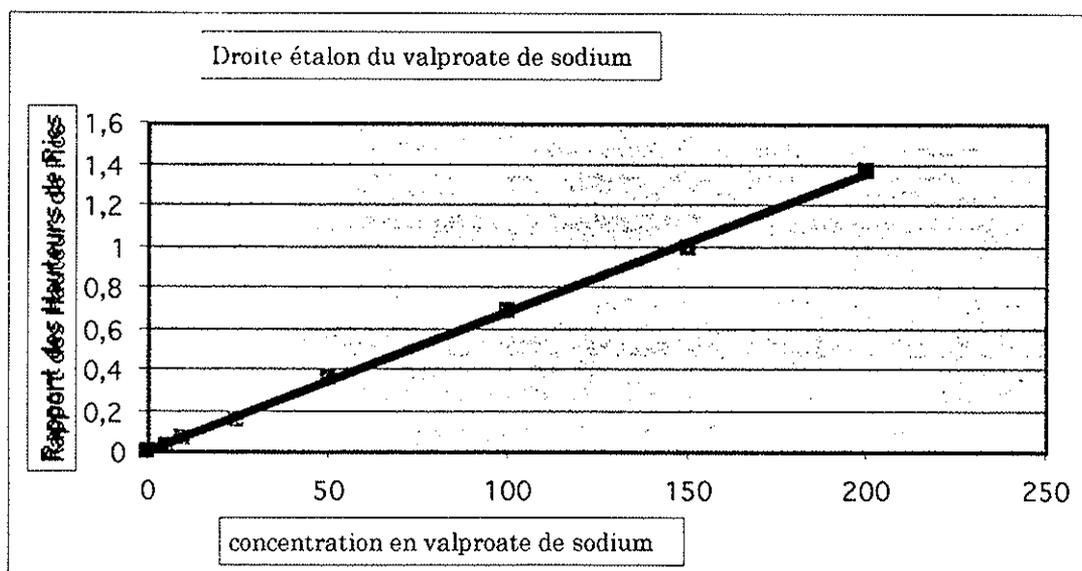
JOUR1

Droite étalon de l'acide valproïque avec l'acide octanoïque pour étalon interne

09.01.01

Echelle de sensibilité 0,001AUFS, détection à 204nm

concentration en valproate de sodium ($\mu\text{g/mL}$)	R. H. P.
0	0
5	0,0315
10	0,0591
25	0,1555
50	0,355
100	0,681
150	0,989
200	1,372
Ordonnée à l'origine	-0,0038
Pente	0,0068
Correlation	0,99958

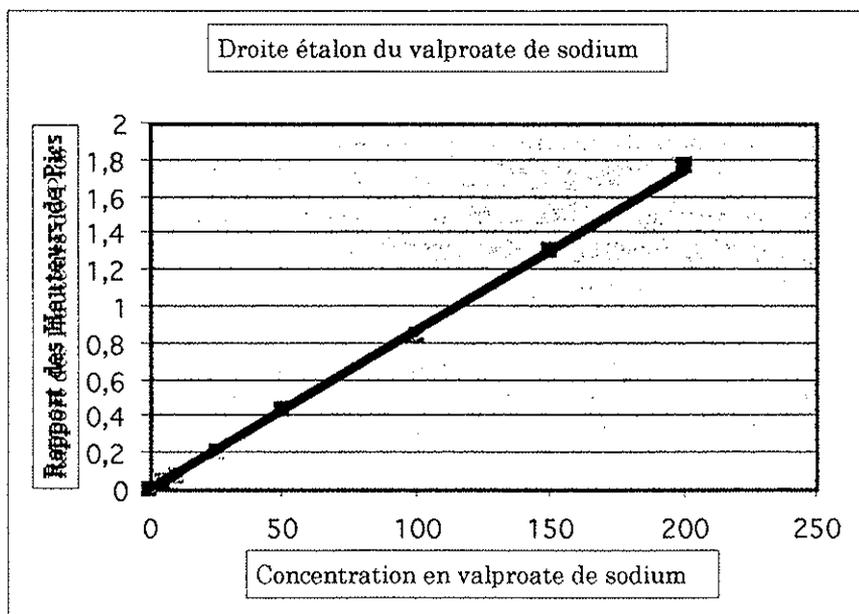


JOUR2

**Droite étalon de l'acide valproïque
acide, avec l'acide octanoïque comme
étalon interne**

10.01.01
Echelle de sensibilité 0.001aufs; 204nm;
L' autosampler a été installé

Concentration en valproate de sodium en µg/mL	R. H. P.
0	0
5	0,0377
10	0,0783
25	0,207
50	0,432
100	0,836
150	1,305
200	1,762
Ordonnée à l'orig.	-0,010447
Pente	0,0087807
Correlation	0,99977



Les résultats des deux jours d'analyse montrent que la méthode produit des résultats linéaires sur l'intervalle de concentration 5-200 µg/mL en VPA sel sodique (VPA.Na). Le coefficient de corrélation est de très bonne qualité ($r=0,9995$ et $0,9997$). La pente de la droite était peu constante (0,068 et 0,088). Cependant la régularité de la pente pourra être améliorée dans l'étape de validation par l'utilisation de points en duplicats.

Procédure pour la précipitation des protéines d'échantillons de sérum.

1 Sortir les échantillons et les différentes solutions étalons du congélateur et les laisser dégeler;

Allumer la pompe et le détecteur;

Identifier les tubes;

2 Préparer les solutions étalons de VPA dans des fioles jaugées de 5mL selon le plan suivant. Vortexer 10 secondes chaque fiole;

[VPA.Na] ug/mL	V _{VPA} de Sol. mère(1mg/mL)	H ₂ O
10	50µl	4.950mL
20	100µL	4.900mL
50	250µL	4.750mL
100	500µL	4.500mL
200	1mL	4.00mL
300	1.5mL	3.500mL
400	2mL	3.0mL

3 Préparer les tubes pour la gamme étalon en double: 50µL de sérum vierge+50µL de solutions étalons de concentration croissante;

Préparer les échantillons à doser et les contrôles qualité: 50µL de sérum + 50µL d'eau afin d'obtenir un volume final identique aux points d'étalonnage);

4 Ajouter 10µL d'HCl 0,1M dans tous les tubes;

5 Vortexer les tubes 10sec;

6 Ajouter 350µL de MeCN dans tous les tubes;

7 Vortexer tous les tubes 20sec;

8 Centrifuger 5min à 8000g;

9 Pipeter 20µL de la solution d'étalon interne à 500µg/mL dans des tubes (Chromacol ou SMI)

10 Retirer 250µL du surnageant de chaque tube centrifugé et les verser dans les tubes en verre;

11 Sceller les tubes et vortexer 10sec. et charger sur l'injecteur automatique.

3. VALIDATION

3.1. Introduction

Toute nouvelle procédure analytique mise au point doit être validée avant son application au long terme. C'est une nécessité scientifique d'évaluer les performances d'une nouvelle procédure. Il existe six principaux critères de validation:

- stabilité;
- linéarité;
- précision: intra-essai (répétabilité) et inter-essai (reproductibilité) et fidélité;
- rendement d'extraction;
- spécificité (sélectivité);
- sensibilité: limites de détection et de quantification.

Le premier critère examine la stabilité du composé à analyser, lorsqu'il est soumis à l'effet de différents facteurs (lumière, temps, température). La stabilité est évaluée pour une solution pure du composé et lorsque la substance à doser est surajoutée à la matrice biologique utilisée dans la procédure d'analyse.

La linéarité d'une procédure est sa capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle, à donner des résultats proportionnels aux concentrations de la substance dans l'échantillon à doser. L'équation de la droite étalon correspondant à cet intervalle est calculé sous la forme $y=ax+b$. R, le coefficient de corrélation, doit se rapprocher de 1.

La précision d'une technique est évaluée pour une même série d'essais (répétabilité) et d'une série d'essais à l'autre (reproductibilité). Elle mesure le rapprochement entre les différentes mesures d'une série. L'exactitude ou justesse de la méthode est connue en calculant le biais ou pourcentage d'erreur par rapport à la valeur théorique.

Le rendement d'extraction ou taux de recouvrement permet d'apprécier la quantité d'analyte perdue lors de l'étape d'extraction. Il est évalué en comparant le signal obtenu après extraction d'une quantité de produit surchargé à la matrice biologique et le signal obtenu avec la même quantité injectée sans extraction.

La spécificité d'une méthode analytique doit être testée contre d'éventuelles interférences. Celles-ci peuvent provenir:

- de substances endogènes présents dans la matrice biologique;

- de métabolites du composé à doser;
- de produits ou leurs métabolites associés à la substance à doser dans le cas de polythérapies médicamenteuses.

La sensibilité définit deux choses: la limite de détection est la plus petite quantité de produit pouvant être décelée dans un échantillon; la limite de quantification est la plus petite quantité pouvant être quantifiée avec une exactitude convenable.

3.2. Préparation des lots d'échantillons de contrôle qualité

Pour les besoins de l'étape de validation, trois lots d'échantillons de contrôle qualité ont été préparés. Trois niveaux de concentrations en acide valproïque ont été sélectionnés pour couvrir l'intervalle de concentration de la gamme étalon. Ces niveaux permettront d'évaluer les différents paramètres de validation aux différentes concentrations.

LOT	VPA.Na $\mu\text{g}/\text{mL}$ sérum	VPAacide $\mu\text{g}/\text{mL}$ sérum
BAS	12	10,4
MOYEN	45	39
HAUT	250	216,75

Pour chaque essai pendant la procédure de validation, cinq échantillons de chaque lot de contrôle qualité ont été analysés. Deux millilitres de solution pour chaque niveau de concentration ont été préparés en surchargeant du sérum vierge avec des volumes déterminés de solutions de valproate de sodium.

LOT	Vol. de sérum	Vol. de sol. de VPA.	Conc. des sol. en VPA.Na
BAS(12)	1,760mL	240 μL	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
MOYEN(45)	1,820mL	180 μL	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
HAUT(250)	1,750mL	250 μL	2mg/mL

Ces solutions ont été vortexées, aliquotées dans 25 tubes Eppendorf avec 50 μ L chacun. Ces tubes ont ensuite été stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Un quatrième lot de tubes a été préparé pour l'évaluation de la sensibilité: ce lot appelé "limite de détection" (LDD) a été préparé en aliquotant du sérum vierge (50 μ L) et stocké à -20°C .

3.3. Procédure

L'expérience pour la mesure de la reproductibilité et de la répétabilité a consisté à préparer et à analyser une série d'échantillons comprenant une gamme étalon à six points de concentration et les trois lots de contrôle qualité plus les tubes LDD.

Chaque point de concentration de la gamme étalon a été préparé en double ainsi que les tubes LDD; les échantillons de contrôle qualité ont été préparés en quintuple.

Afin d'obtenir un volume final identique pour tous les tubes analysés, 50 μ L d'eau distillée est ajoutée au sérum des échantillons LDD et contrôle qualité. En effet les tubes de la gamme étalon ont un volume final de 100 μ L (50 de sérum vierge + 50 de solution standard de VPA) alors que les contrôles qualité n'ont que 50 μ L.

La gamme étalon nécessite l'utilisation de solutions standards diluées préparées quotidiennement. Les dilutions de la solution mère de VPA.Na sont réalisées dans des fioles jaugées de 5mL à partir d'aliqouts congelés de 6mL de solution mère.

L'étape de précipitation des protéines pour les points de la gamme étalon est effectuée dans des tubes Eppendorf de 1,5mL. A 50 μ L de sérum vierge, sont ajoutés 50 μ L de solutions étalons de concentration croissante ([VPA.Na]=10-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), pour produire des concentrations finales en VPA.Na de 5 à 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sérum. Les échantillons de contrôle qualité et les échantillons inconnus ne nécessitent que l'addition de 50 μ L d'eau distillée aux 50 μ L de sérums versés. On distribue ensuite 10 μ L de HCl 0,1 M dans tous les tubes qui sont mélangés par vortex. 350 μ L d'acétonitrile sont ajoutés; le contenu des tubes est à nouveau mélangé par vortex pendant 20 secondes et centrifugé à 8000 g pendant 5 minutes. 250 μ L du surnageant est récupéré et transféré dans les tubes à col pour injecteur automatique (SMI Ltd)

dans lesquels 20µL de solution de l'étalon interne ont été versés. Les tubes sont scellés et chargés sur l'injecteur automatique pour l'analyse. Les concentrations en acide valproïque des échantillons à doser sont calculés en comparant le rapport de hauteur de pic mesuré avec celui de la droite étalon.

3.4. Résultats et discussion

A partir des quatre séries d'expériences effectuées pour la procédure de validation, les résultats de trois essais ont été utilisés pour le calcul des coefficients de variation intra-essai et inter-essai. Les tableaux 1, 2 et 3 présentent les feuilles de résultats pour ces trois expériences. Les points de la gamme étalon ont été analysés en double exemplaire afin de dégager une valeur moyenne pour le rapport de hauteurs de pics. A partir des chromatogrammes obtenus pour chaque point de la gamme étalon, le rapport de hauteurs de pics a été calculé (RHP1 et RHP2) ; la moyenne de ces deux valeurs est donnée sous le nom RHP moy. Les coordonnées de la droite étalon sont évalués en appliquant le modèle de régression linéaire des moindres carrés : la pente, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de corrélation sont présentés au bas de chaque série de valeurs.

Dans la seconde partie de chaque essai, les échantillons de contrôle qualité sont analysés en cinq exemplaires par niveau de concentration (bas, moyen et haut). Le rapport de hauteurs de pics est calculé pour chaque échantillon; la concentration en VPA dans chaque tube est calculée en extrapolant le rapport de hauteur de pics mesuré sur la droite étalon et en appliquant un coefficient ou facteur de dilution (volume de surnageant retiré/volume total et masse molaire de l'acide valproïque/valproate de sodium, soit $410/250 \times 144,2/166,2 = 1,4218$). La moyenne des concentrations en VPA +/- l'écart type (noté dev.st. pour déviation standard), le coefficient de variation et le rendement d'extraction sont donnés pour chaque essai, et pour chaque niveau de concentration des tubes contrôle qualité. Les formules utilisées pour les calculs sont présentées en annexe.

Les valeurs obtenues pour le calcul des variations intra et inter-essais sont données dans les tableaux 5 et 6. L'expérience n°1 a été choisie pour les valeurs de variation intra-essai. Dans la deuxième partie des tableaux, le biais, qui mesure la fidélité de la mesure par rapport à la valeur théorique, est rangé avec la moyenne observée et la valeur théorique.

Tableau 1

ETAPE DE VALIDATION, FEUILLE DE RESULTATS N°1
22.01.01

DROITE ETALON MESUREE A PARTIR DE L'ENREGISTREUR

VPA.Na µg/mL	RHP1	RHP2	RHPmoy	Equation de la droite: y=ax+b, (r coefficient de corrélacion)
0	0	0	0	
5	0,0526	0,055	0,0538	<u>Pente:</u> 0,0077
10	0,0923	0,0931	0,0927	<u>Ordonnée à l'origine:</u> 0,0025
50	0,378	0,382	0,38	<u>Correlation:</u> 0,9989
100	0,755	0,77	0,7625	
150	1,107	1,105	1,107	
200	1,589	1,58	1,5845	

Résultats des échantillons contrôle qualité

CQ	RHP	VPA (µg/mL)(acide)	Résultats
B	0,0645	10,202	
B	0,0617	9,7413	moy+/-dev.st. =9,97+/-0,52
B	0,0585	9,2149	coefficient de variation=5,3%
B	0,067	10,613	rendt. d'extract. =95,8%
B	0,0638	10,087	
M	0,184	29,858 (valeur rejetée)	
M	0,219	35,616	
M	0,239	38,905	moy+/-dev.st. =36,9+/-1,53
M	0,229	37,26	coefficient de variation=4,2%
M	0,22	35,78	rendt. d'extract. =94,6%
H	1,28	210,14	
H	1,284	210,8	moy+/-dev.st. =211,3+/-2,4
H	1,279	209,97	coefficient de variation=1,1%
H	1,28	210,14	rendt. d'extract. =97,5%
H	1,313	215,57	

Rendement d'extraction moyen = 95,9%

Tableau 2

ETAPE DE VALIDATION, FEUILLE DE RESULTATS

N°2

24.01.01

DROITE ETALON MESUREE A PARTIR DE L'ENREGISTREUR

VPA.Na (µg/mL)	RHP1	RHP2	RHPmoy	
				Equation de la droite étalon: $y=ax+b$
0	0	0	0	
5	0,0416	0,04	0,0408	
10	0,0824	0,0804	0,0814	<u>Pente:</u> 0,0063
50	0,34	0,34	0,34	<u>Ordonnée à l'origine:</u> 0,0136
100	0,653	0,67	0,6615	<u>Correlation:</u> 0,9996
150	0,923	0,943	0,933	
200	1,274	1,276	1,275	

Résultats des échantillons de
contrôle qualité

CQ	RHP	VPA (acide) µg/mL		résultats
B	0,0552	8,36		
B	0,0543	8,18		moy+/-dev.st.=8,26+/-0,1
B	0,054	8,12		coefficient de corrélation=1,3%
B	0,0552	8,36		rendt. d'extract.=79,4%
B	0,0546	8,24		
M	0,197	36,85		
M	0,203	38,05		moy+/-dev.st.=37,1+/-0,74
M	0,201	37,65		coefficient de corrélation=1,9%
M	0,196	36,65		rendt. d'extract.=95,1%
M	0,194	36,25		
H	1,197	237,77		
H	1,17	232,35		moy+/-dev.st.=234,8+/-6,25
H	1,21	240,39		coefficient de corrélation=2,6%
H	1,14	226,32		rendt. d'extract.=108,3%
H	1,09	216,27		

Rendement d'extraction
moyen=94,3%

Tableau 3

ETAPE DE VALIDATION, FEUILLE DE RESULTATS N°3

25.01.01

DROITE ETALON MESUREE A PARTIR DE L'ENREGISTREUR

VPA.Na µg/mL	RHP1	RHP2	RHPmoy	Equation de la droite
				y=ax+b, r coefficient de correlation
0	0	0	0	
5	0,0301	0,0315	0,0308	
10	0,0722	0,0609	0,0665	<u>Pente:</u> 0,00646
50	0,331	0,31	0,32	<u>Ordonnée à l'origine:</u> 0,00227
100	0,653	0,697	0,675	<u>Corrélation:</u> 0,9997
150	0,989	0,934	0,961	
200	1,261	1,322	1,2915	

Résultats des échantillons de
contrôle-qualité

CQ	RHP	VPA (µg/mL) (acide)		Résultats
B	0,0421	8,76		
B	0,0412	8,56		moy+/-dev.st.=8,66+/-0,11
B	0,0483	10,13	(rejetée)	coefficient de variation=1,3%
B	0,0421	8,76		rendt. d'extract.=83,3%
B	0,0412	8,56		
M	0,1937	42,11		
M	0,18	39,10		
M	0,205	44,59		moy+/-dev.st.=41,35+/-2,5
M	0,182	39,54		coefficient de variation=6,2%
M	0,159	34,48	(rejetée)	rendt. d'extract.=105,9%
H	1,151	252,69		
H	1,171	257,08		
H	1,143	250,93		moy+/-dev.st.=250,8+/-5,98
H	1,07	234,87	(rejetée)	coefficient de variation=2,4%
H	1,106	242,79		rendt. d'extract.=115,7%

**Rendement d'extraction
moyen = 101,6%**

Tableau 4 : Calcul du coefficient de variation intra-jour;

-Le jour 1 d'essai a été choisi pour le calcul intra-essai.

-La droite étalon est linéaire sur l'intervalle de concentration 5-200µg/mL de sérum pour le valproate de sodium (4,33-173µg/mL pour l'acide valproïque).

-Pour le premier jour d'essai, l'équation de la droite était $y = 0,007695x + 0,002479$,
($r=0,9989$, $n=5$).

Niveau des contrôles qualité	Moy+/-écart type	Intervalle	C.V.
BAS	9.96 +/- 0.52	9.7-10.6	5.2%
MOYEN	36.9 +/- 1.53	35.6-38.9	4.1%
HAUT	211.3 +/-2.35	210-215.6	1.1%

Niveau des CO	Rendt. D'extract.	Biais	Moyenne	Valeur théorique
BAS	95.8%	-4.2%	9.96	10.4
MOYEN	94.6%	-5.4%	36.9	39
HAUT	97.5%	-2.5%	211.3	217

Tableau 5: Calcul du coefficient de variation inter-jour.

-Le calcul pour chaque niveau de concentration a été effectué en utilisant les valeurs obtenues sur les 3 essais.

-L'équation de la droite étalon obtenue avec les valeurs sur 3 jours est $y = 0,00681x + 0,00612$ ($r=0,9994$, $n=14$).

Niveau de contrôle qualité	Moy+/-écart type	Intervalle	C.V
BAS	9.0 +/- 0.81	8.2-10.6	9.0%
MOYEN	38.5 +/- 2.6	35.6-44.6	6.7%
HAUT	230 +/- 17.0	210-257.1	7.4%

Niveau de C.O.	Rendt. d'extract.	Biais	Moyenne	Valeur théorique
BAS	86.6%	-13.4%	9.0	10.4
MOYEN	98.7%	-1.3%	38.5	39
HAUT	106.1%	+6.1%	230	217

3.4.1. Stabilité

La stabilité des solutions mères et des solutions de travail diluées de valproate et d'octanoate de sodium a été évaluée pendant les expériences: quotidiennement, des injections de solutions diluées des composés ont été effectuées. Les résultats n'ont pas montré de variations de la taille et de l'aspect des chromatogrammes obtenus. Cependant les solutions mères de valproate et d'octanoate de sodium sont renouvelées tous les 15 jours. Les solutions mères sont gardées à +4°C à l'abri de la lumière. Le flacon de valproate pur est conservée dans un sachet de cristaux de silice pour la dessiccation, et à l'abri de la lumière dans un dessiccateur.

La stabilité des sérums après précipitation des protéines et addition de l'étalon interne a été évaluée: deux échantillons ont été gardés une semaine et 50 µL de chaque ont été injectés chaque jour; les résultats n'ont pas montré de variation dans le rapport de hauteurs de pics. L'évaporation est évitée en scellant les tubes en verre pour autoinjecteur

3.4.2. Linéarité

La linéarité (proportionnalité entre la réponse et la concentration dans un certain intervalle) de cette procédure est donnée par le coefficient de corrélation de la droite des moindres carrés. La linéarité de la mesure est excellente avec des valeurs toujours supérieures à 0,9989 sur l'intervalle de concentration de 4,33 à 176 µg/mL de sérum pour l'acide valproïque. Cependant un coefficient de variation de 11,5% a été observé sur les pentes des trois essais.

3.4.3. Précision et fidélité

Les résultats des coefficients de variation intra-jour sont acceptables pour les trois essais conservés pour l'analyse des données. Le coefficient de variation n'a pas dépassé les 10% sur les trois essais et les trois niveaux de concentration; la valeur maximale observée pour le C.V. intra-essai sur les trois jours est de 6,2%. Ceci montre que la méthode produit des résultats répétables.

Les coefficients de variation inter-essai sont aussi inférieurs à la valeur limite de 10%, au delà de laquelle l'imprécision est considérée comme significative. Le CV le plus élevé est de 9% pour l'échantillon de faible concentration. La méthode peut donc être considérée comme reproductible et significativement précise sur l'intervalle de concentration 10,4-217µg/mL de sérum.

La fidélité a été évaluée par le calcul du biais de la mesure, ou différence entre la moyenne des valeurs mesurées et la valeur théorique. Dans l'analyse des résultats intra-série, le biais a dépassé les 15% à trois occasions, dont deux fois sur l'échantillon de faible concentration. La valeur a même dépassé les 20% avec la basse concentration. Dans l'analyse inter-série, parmi les trois niveaux de concentration, la valeur maximale du biais a été de 13,4% pour le niveau bas. Cependant, la fidélité des résultats produits par la méthode est acceptable.

3.4.4. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est le rapport entre la concentration mesurée après extraction et la concentration théorique du produit pur. Les rendements d'extraction obtenus par cette méthode allaient de 74,1 à 115,7%, pour un nombre d'échantillon n=15 (résultats intra-série), avec un rendement d'extraction moyen pour les trois essais est de 97,3%. Si les valeurs mesurées à chaque essai sont prises séparément avec un nombre d'échantillon n=41 (résultats inter-série), le rendement d'extraction va de 86,5 à 106,1% avec une valeur moyenne de 96,4%.

Ces résultats montrent que la méthode de précipitation des protéines du sérum par l'acétonitrile, avec un rapport MeCN/sérum de 7:1, et avec ajout d'acide chlorhydrique dilué, produit des rendements d'extraction de bonne qualité. Le rendement moyen obtenu ainsi est significativement meilleur que les 75% publiés par LOVETT et al. (1987). Cependant la précipitation des protéines ne peut être considéré comme une extraction *stricto sensu*. La perte de composés pourrait être expliquée par une coprécipitation de l'acide valproïque avec les protéines du sérum.

3.4.5. Spécificité

La spécificité ou sélectivité de cette méthode est déterminée à partir de l'observation des chromatogrammes. Nous n'avons pas rencontré de problèmes d'interférences lors de l'analyse des échantillons de contrôle qualité. Les composés endogènes n'ont pas gêné la mesure de l'acide valproïque et de l'étalon interne. La majorité des molécules éluent dans le front de solvant ou ne sont pas détectées à la longueur d'onde utilisée. Les autres interférences ont été évitées par les réglages réalisés sur la phase mobile. Cependant ces échantillons étaient préparés en surchargeant du sérum vierge avec une solution étalon de VPA; ils ne provenaient

donc pas d'échantillons biologiques et ne contenaient pas de métabolites ou d'autres médicaments.

Lors de l'analyse des échantillons de plasma provenant de patients inconnus, il n'a pas été observé d'interférences avec les pics d'intérêt. Un pic important, probablement un métabolite, éluait à 12 minutes. Le temps total d'analyse a été fixé à 15 minutes pour permettre l'élution des interférences.

Afin de déterminer la nature d'éventuelles interférences, un échantillon de contrôle fourni par les laboratoires Chromsystem, composé de plusieurs antiépileptiques a été analysé sur le système HPLC. Un des composé a interféré avec le pic du VPA. Dans une deuxième expérience des solutions étalons de différents composés psychotropes (venlafaxine, norvenlafaxine, fluoxétine, norfluoxétine, clomipramine, imipramine, desméthylimipramine, réboxétine, halopéridol). Un des composés, la norvenlafaxine, éluait en même temps que le VPA.

Cependant il n'est pas possible de tester tous les produits pouvant interférer; on ne peut donc exclure la probabilité d'une interférence en cas de polymédication.

3.4.6. Sensibilité

La sensibilité d'une procédure d'analyse comprend deux valeurs: la limite de détection et la limite de quantification. Lors de chaque expérience, deux tubes appelés LDD (limite de détection) ont été analysés. Ces derniers ne contenaient que du sérum vierge et une quantité déterminée de l'étalon interne. Les chromatogrammes obtenus ont permis la mesure du bruit de fond. La hauteur maximale des pics de la ligne de base était inférieure à 0,5mm. La hauteur d'un pic de 4,33µg/mL de VPA était de 3mm. La limite de détection, est la plus petite quantité de composé détectable, avec un rapport signal/bruit de fond de 3:1; elle est ici inférieure à 2µg/mL de sérum.

La limite de quantification est la plus petite quantité de composé pouvant être dosée avec une précision acceptable avec un rapport signal/bruit de 3:1. Cette procédure permet de doser précisément le VPA à partir de 4µg/mL de sérum.

3.5. Comparaison HPLC-EMIT

3.5.1. Présentation

Un lot de 16 échantillons de sang a été donné par le Dr Quantrill du département de biochimie clinique du John Radcliffe Hospital. Ces échantillons de plasma avaient été dosés par la technique EMIT développée par Syva pour la détermination des niveaux d'acide valproïque chez des patients épileptiques.

Ces échantillons ont été analysés deux fois avec la procédure HPLC mise au point. Une gamme étalon a d'abord été préparée. Sept points de concentration ont été choisis pour couvrir l'intervalle de linéarité. Chaque point de la gamme a été préparé en double. Les rapports de hauteur de pics et la droite étalon ont été calculés à partir des chromatogrammes de l'enregistreur et de l'intégrateur. Les coordonnées de la droite étalon sont très similaires quelle que soit l'appareil de mesure utilisé: les pentes étaient de 0,00807 et 0,0073 avec l'intégrateur et de 0,0081 et 0,0072 avec l'enregistreur. Les deux séries de valeurs peuvent donc être utilisées pour le dosage des échantillons inconnus. Les deux séries de série de mesure ont une très bonne linéarité.

Chaque échantillon inconnu a été traité et analysé en double. Le calcul de la concentration en VPA dans les plasmas de patients a été effectué en extrapolant les rapports de hauteurs de pics mesurés sur la droite étalon. Le deuxième jour, deux échantillons de contrôle qualité ([VPA]= 43,5 et 130 μ g/ml de sérum) ont été dosés en fin d'analyse.

3.5.2 Résultats

-Feuille de résultats N°1: dosage du VPA dans les échantillons de plasma

1-COURBE ETALON MESUREE A PARTIR DE L'ENREGISTREUR

VPA.Na (µg/mL)	RHP1	RHP2	RHPmoy
0	0	0	0
5	0,0542	0,0476	0,051
10	0,0941	0,0941	0,0941
25	0,217	0,215	0,216
50	0,423	0,41	0,4165
100	0,827	0,82	0,8235
150	1,261	1,279	1,27
200	1,574	1,63	1,602

Equation de la droite étalon, $y=ax+b$

Pente: 0,0081

Ordonnée à l'origine: 0,0117

Corrélation: 0,9994

2-COURBE ETALON MESUREE A PARTIR DE L'INTEGRATEUR

VPA.Na (µg/mL)	RHP1	RHP2	RHPmoy
0	0	0	0
5	0,0951	0,0915	0,0933
10	0,119	0,11	0,1145
25	0,247	0,26	0,2535
50	0,478	0,438	0,458
100	0,849	0,855	0,852
150	1,278	1,306	1,292
200	1,589	1,641	1,615

Equation de la droite étalon, $y=ax+b$

Pente: 0,00807

Ordonnée à l'origine: 0,04021

Corrélation: 0,9989

Table de résultats des échantillons de plasma: premier jour

échantillon n°	tube n°	RHP	VPA (µg/mL)	moyenne (µg/mL)	[VPA] (mmol/L)
14365N	17	0,237	30,88	30,95	0,21
	18	0,238	31,03		
20972H	19	0,1838	22,53	22,3	0,15
	20	0,181	22,09		
22851N	21	0,264	35,11	35,55	0,25
	22	0,27	36,05		
12142W	23	0,1617	19,06	20	0,14
	24	0,175	21,15		
20969T	25	0,0816	6,50	7,8	0,05
	26	0,0985	9,15		
45097A	27	0,2466	32,38	31,2	0,22
	28	0,2317	30,05		
45491K	29	0,224	28,84	29,5	0,20
	30	0,233	30,25		
20453X	31	0,248	32,60	32,6	0,23
	32	0,248	32,60		
12757Y	33	0,1269	13,60	15,6	0,11
	34	0,1534	17,76		
14369K	35	0,2582	34,20	34,2	0,24
	36	0,258	34,17		
45696W	37	0,323	44,37	45,5	0,32
	38	0,337	46,57		
23340Y	39	0,154	17,85	18,9	0,13
	40	0,167	19,89		
18689T	41	3,33	516,15	rejetée	ND
	42	3,347	518,82		
22867A	43	0,175	21,15	21,3	0,15
	44	0,177	21,46		
23267S	45	0,218	27,90	27,5	0,19
	46	0,213	27,11		
20405L	47	0	0,00	0	0
	48	0	0,00	0	0

ND: non déterminé

-Feuille de résultats N°2: dosage du VPA dans les échantillons de plasma

1 COURBE ETALON MESUREE A PARTIR DE L'ENREGISTREUR

VPA.Na (µg/mL)	RHP1	RHP2	RHPmoy
0	0	0	0
5	0,0257	0,0255	0,0256
10	0,0625	0,067	0,06475
25	0,18	0,182	0,181
50	0,374	0,373	0,3735
100	0,731	0,734	0,7325
150	1,12	1,04	1,09
200	1,4	1,461	1,4305

Equation de la droite étalon, $y=ax+b$

Pente: 0,0072

Ordonnée à l'origine: -8E-05

Corrélation: 0,9998

2- COURBE ETALON MESUREE A PARTIR DE L'INTEGRATEUR

VPA.Na (µg/mL)	RHP1	RHP2	RHPmoy
0	0	0	0
5	0,0482	0,0527	0,05045
10	0,107	0,0899	0,09845
25	0,21	0,213	0,2115
50	0,423	0,392	0,407
100	0,766	0,76	0,763
150	1,185	1,073	1,129
200	1,47	1,475	1,4725

Equation de la droite étalon, $y=ax+b$

Pente: 0,0073

Ordonnée à l'origine: 0,0216

Corrélation: 0,9997

Table de résultats des échantillons de plasma: deuxième jour

Echantillon n°	tube n°	RHP	VPA (µg/mL)	moyenne (µg/mL)	[VPA] (mmol/L)
18689T	17	ND	ND	ND	ND
	18	ND	ND		
20453X	19	0,23	40,2	40,9	0,28
	20	0,24	41,6		
23267S	21	0,18	30,9	31,0	0,22
	22	0,18	31,1		
22867A	23	0,15	24,9	27,2	0,19
	24	0,17	29,6		
45491K	25	0,20	35,4	35,3	0,24
	26	0,20	35,2		
20969T	27	0,07	9,9	10,2	0,07
	28	0,08	10,6		
20405L	29	ND	ND		ND
	30				
14365N	31	0,20	34,0	34,4	0,24
	32	0,20	34,8		
45097A	33	ND	ND	ND	ND
	34				
45696N	35	0,27	48,8	50	0,35
	36	0,29	52,2		
12142W	37	0,14	22,4	22,3	0,15
	38	ND			
12757Y	39	ND		17,7	0,12
	40	0,11	17,7		
22851N	41			36,7	0,25
	42	0,21	36,7		
20972H	43			26,6	0,18
	44	0,16	26,6		
14369K	45	0,21	35,8	35,8	0,25
	46				
QC50	47			77,3	
	48	0,42	77,3		
QC150	49	1,21	229,5	226,8	
	50	1,18	224,1		

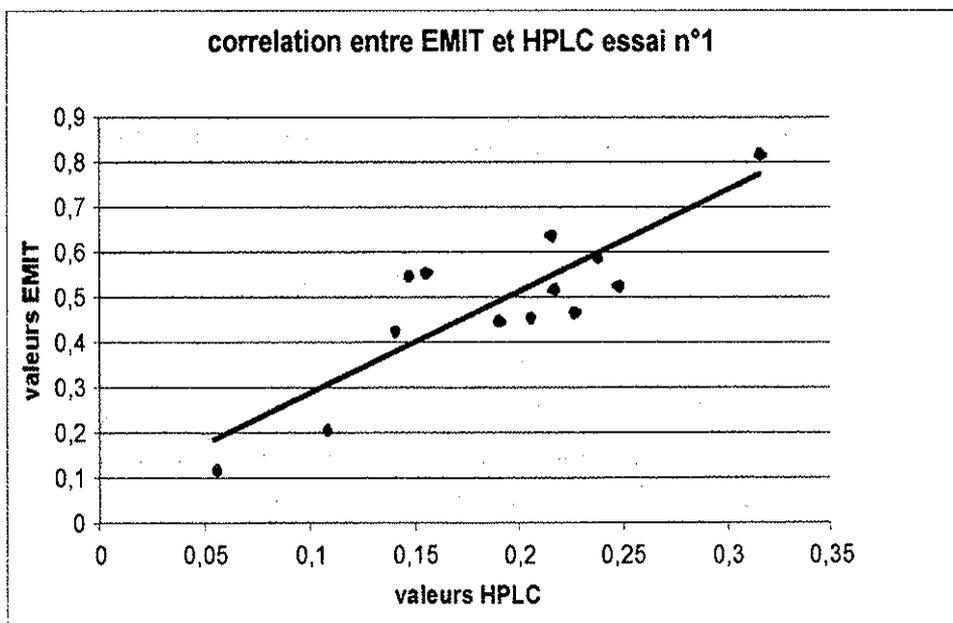
ND: non déterminé

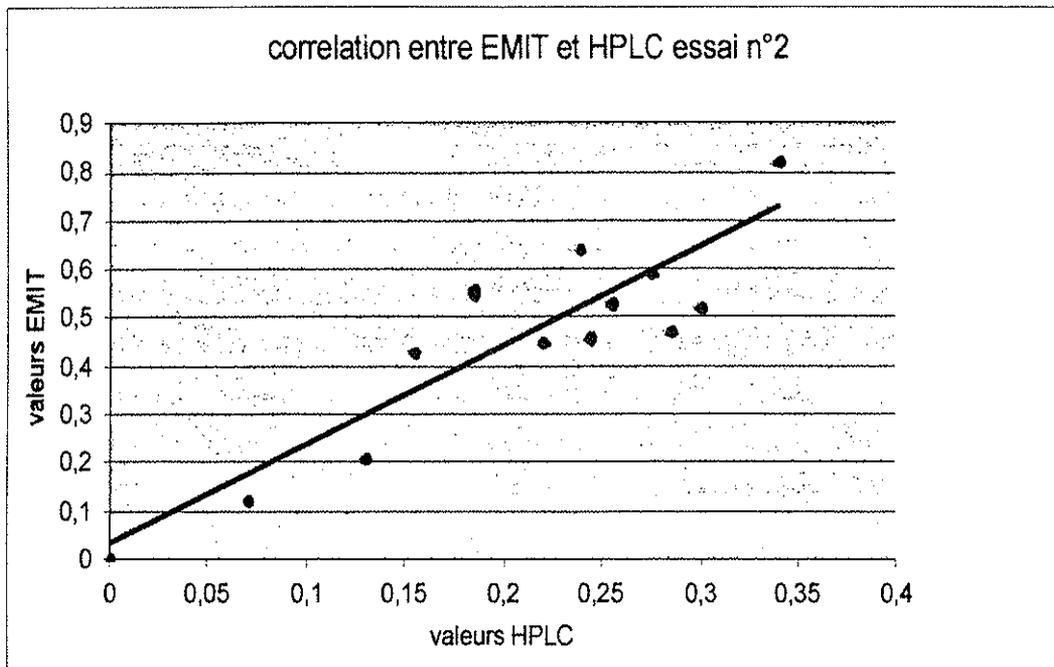
Comparaison entre les deux séries de valeurs et les valeurs de référence obtenue par EMIT

Les concentrations mesurées par HPLC en µg/mL ont été converties en mmol/L.

échantillon n°	essai 1	EMIT	essai2
14365N	0,21	0,64	0,24
20972H	0,15	0,56	0,19
22851N	0,25	0,53	0,26
12142W	0,14	0,43	0,16
20969T	0,05	0,12	0,07
45097A	0,22	0,52	0,30
45491K	0,20	0,46	0,24
20453X	0,23	0,47	0,29
12757Y	0,11	0,21	0,13
14369K	0,24	0,59	0,28
45696W	0,32	0,82	0,34
23340Y	0,13	0,51	ND
18689T	ND	ND	ND
22867A	0,15	0,55	0,19
23267S	0,19	0,45	0,22
20405L	0,00	<0,02	ND

Graphique1: Corrélation entre les valeurs EMIT et les valeurs obtenues par HPLC lors de la première analyse.





Graphique n°2: corrélation entre les valeurs EMIT et les valeurs obtenues par HPLC lors de la deuxième analyse.

Comparaison EMIT-HPLC essai 1

Le coefficient de corrélation r entre les valeurs EMIT et les résultats HPLC de la première analyse, calculé avec un test de Pearson bilatéral, est de 0,822, $p < 0,0001$, $n = 14$.

L'équation de la droite de régression linéaire entre les valeurs EMIT (y) et les valeurs HPLC (x) est: $y = 2,106x + 0,102$.

Comparaison EMIT-HPLC essai 2

Le coefficient de corrélation r entre les valeurs EMIT et les résultats HPLC de la deuxième analyse est de 0,8172, $p = 0,0001$, $n = 13$. L'équation de la droite de régression linéaire entre les deux séries de valeurs (EMIT=y, HPLC=x) est $y = 1,92x + 0,061$.

Comparaison analyse 1-analyse 2

Le coefficient de corrélation r entre les deux séries de mesures obtenues par HPLC est de 0,966.

Quand la corrélation entre les résultats EMIT et HPLC est analysée, on observe une corrélation significative entre les valeurs mesurées par les deux méthodes. Cependant il semble que la mesure HPLC sous-estime les concentrations par un facteur de 2 par rapport aux mesures EMIT ou la technique EMIT commet une erreur de 100%. Comment expliquer cette différence?

Tout d'abord, la nouvelle procédure a été mise au point et prévue pour l'utilisation de sérum comme matrice biologique. Lors de ces deux analyses, la matrice biologique des deux échantillons dosés était le plasma. A la différence du sérum, le plasma contient les protéines de la coagulation (fibrine et fibrinogène). Le sérum est collecté après coagulation et centrifugation du sang coagulé, c'est à dire exempt de fibrine et fibrinogène. La présence de ces protéines pourrait rendre compte de la différence de concentration observée: il est possible qu'une quantité supérieure de protéines a précipité lors de l'étape de traitement des échantillons. La quantité de VPA copécipitée avec les protéines a augmenté, diminuant de fait la quantité dosable. De plus, la proportion de plasma dans un millilitre de sang total est supérieure à la proportion de sérum: l'expression des résultats en ug/ml de sérum induit une dilution de la concentration en VPA par rapport aux résultats exprimés en µg/ml de plasma.

L'autre hypothèse serait que les mesures EMIT surestiment de façon constante et significative les concentrations en composé dosé. De nombreux auteurs ont montré que cette technique immunoenzymatique connaît des problèmes de réactivité croisée des anticorps employés pour les métabolites de la substance à doser. Ce phénomène de surestimation a été observé pour plusieurs composés (ciclosporine, mycophénolate de mofétil, phénytoïne) (SCHUTZ et al.,1998, SHIPKOVA et al.,2000, KUGLER et al.,1998).

4. CONCLUSION

Dans la première partie de ce travail, nous avons passé en revue la classification et la description des symptômes observés dans la maladie ou psychose maniaco-dépressive (PMD), aussi appelé trouble bipolaire de l'humeur. Nous avons examiné les différents aspects et sous-types décrits pour cette maladie. Chez les personnes souffrant de ce trouble psychiatrique, la vie sociale et professionnelle est sévèrement altérée; un risque de suicide significativement élevé a été reporté chez les personnes en phase de dépression bipolaire. La recherche en biologie psychiatrique tente de déterminer l'étiologie de cette maladie et de ses manifestations: alors que l'attention des chercheurs était auparavant concentrée sur les modifications du métabolisme des amines cérébrales, l'aspect génétique de la neurotransmission est maintenant l'objet de nombreux travaux mais de nombreuses études sont encore nécessaires pour déterminer les origines exactes de ce trouble.

Nous avons ensuite examiné les médicaments les plus utilisés pour le traitement et la prophylaxie des différentes phases de la PMD: le lithium est le composé le plus utilisé pour le traitement et la prévention des manifestations classiques de la PMD. Malgré son efficacité reconnue, la thérapie par les sels de lithium entraîne de nombreux effets indésirables. De nouveaux composés tels que les anticonvulsivants (carbamazépine et valproate de sodium) sont des alternatives très appréciées pour les patients ne tolérant pas ou ne répondant pas au lithium. D'autres composés ont été testés à titre expérimental dans des études de petites tailles mais leur efficacité rest encore à démontrer.

Une étude va comparer l'efficacité du lithium et du divalproex de sodium, seuls et en association pour la prophylaxie de la PMD, dans la prévention des rechutes. Dans le cadre de cet essai clinique de grande dimension, la mise au point d'une procédure simple pour le dosage du VPA était demandée.

La CLHP a été choisie comme la technique d'analyse la plus facile, sensible et sélective et la moins chère. Simplicité, rapidité étaient les pré-requis de cette méthode. L'analyse de la littérature a permis de prendre le travail de LOVETT et al., (1987) comme base de départ à améliorer. Parmi les différentes options disponibles, il a été décidé d'utiliser une détection UV et une étape de précipitation des protéines sans dérivation. Ces choix étaient les plus appropriés pour les pré-requis de l'étude.

Les différents paramètres d'un système CLHP à polarité de phases inversée (colonne, phase mobile, longueur d'onde de détection, étalon interne) ont été testés un par un afin d'obtenir une bonne séparation des composés analysés et une rétention convenable. Une fois le système CLHP mis au point, la procédure de précipitation des protéines du sérum a été

améliorée en modifiant le rapport réactif/sérum et en ajoutant de l'acide chlorhydrique dilué au sérum.

La nouvelle procédure devait ensuite être validée avant son application aux cas concrets. La validation d'une méthode analytique de dosage est nécessaire pour prouver qu'elle respecte certains critères: linéarité, spécificité, précision et fidélité, sensibilité, rendement d'extraction acceptable. Ces critères ont été évalués lors d'une série d'essais. Chaque essai, répété quatre jours de suite, a consisté à préparer et analyser une gamme étalon à 6 points en double et 3 lots d'échantillons de contrôle qualité (concentration en VPA bas, moyen et haut). Les résultats des dosages ont montré que la méthode mise au point est linéaire, sensible et sélective. La reproductibilité et la répétabilité ont été évaluées en calculant les coefficients de variation observés dans une même série de mesures (C.V. intra-essai) et entre plusieurs séries de mesures (C.V. inter-essai). La méthode produit des résultats précis et fidèles (C.V.<10%) pour les trois niveaux de concentration sélectionnés pour le contrôle qualité. La sensibilité de la méthode est donnée par la limite de détection (2 µg de VPA/ml de sérum) et de quantification (4 µg/mL de sérum).

L'analyse d'un lot d'échantillons de plasmas inconnus (précédemment dosés par EMIT) nous a renseigné sur les handicaps de la procédure. Un effet de matrice a été rencontré: l'utilisation de plasma au lieu de sérum a donné des résultats faibles et peu fiables. Cependant ces échantillons inconnus ont été dosés à deux reprises et les deux séries de valeurs obtenues se corrélaient bien ($r=0,966$); une corrélation statistiquement significative a été observée entre les valeurs HPLC et EMIT, malgré une différence d'environ 100% entre les deux. Cette surestimation par l'EMIT a été expliquée par une réactivité croisée des anticorps pour les métabolites du composé à doser.

L'utilisation d'acétonitrile comme modificateur organique de la phase mobile, associé à une courte longueur d'onde de détection UV (204nm) oblige à avoir une phase mobile parfaitement dégagée afin d'éviter un bruit de fond important. De plus l'injection de sérum après une simple précipitation des protéines nécessite le changement régulier des filtres précolonne. En effet les impuretés peuvent s'accumuler en tête de colonne et le relargage progressif donne des interférences. Pour remédier à ces problèmes, il est envisageable d'installer un dégaseur et une colonne de garde en C2.

Comparée au travail de référence de LOVETT et al., (1987), cette méthode est moins sensible (LLQ=4µg/ml au lieu de 2,5µg/ml), mais utilise moins de sérum (50µL au lieu de 250µL). De plus elle ne nécessite pas l'utilisation d'un gradient de phase mobile pour nettoyer

la colonne, pour un temps d'analyse similaire (15minutes). Enfin le rendement d'extraction et donc le biais sur la mesure est meilleure avec la nouvelle procédure (97% au lieu de 75%).

Cette procédure peut donc être utilisée pour le dosage de l'acide valproïque et le suivi thérapeutique des patients de l'étude BALANCE.

5. BIBLIOGRAPHIE

- BAASTRUP P.C., SCHOU M. Prophylactic lithium. *Lancet*, 2(7557), pp 1419-22.
- BAZIRE Stephen, *Psychotropic Drug Directory*; Lundbeck editions; Quay Books 1997, p 64.
- BOWDEN C.L. Efficacy of lithium in mania and maintenance therapy for bipolar disorder. *J. Clin. Psychiatry*, 2000, 61(9), pp 35-40.
- BOWDEN C.L., BRUGGER A.M, SWANN AC et al. Efficacy of Divalproex vs. Lithium and Placebo in the Treatment of Mania. *JAMA*, 1994, 271, pp 918-924.
- BRAITHWAITE A., SMITH F.J., *Chromatographic methods*, fifth edition, 1996, Blackie Academic & Professional.
- BRITISH NATIONAL FORMULARY, Edited by the British Medical Association and the Royal Pharmaceutical Society, March 1999, 37th edition, p221.
- CADE John, Lithium salts in the Treatment of Psychotic Excitement. *Med. J. Aust.*, 1949, 14, pp 349-352.
- CHEN S.T., ALTSHULER L.L., MELNYK K.A. et al. Efficacy of Lithium vs. Valproate in the Treatment of Mania in the Elderly: A Retrospective Study. *J.Clin. Psychiatry*, 60(3), 1999, pp 181-186.
- COMPTON P.T., NEMEROFF C.B.; *The Treatment of Bipolar Depression*. *J. Clin. Psychiatry*, 2000, 61(9), pp 57-67.
- DARIUS J., MEYER F.P., Sensitive capillary gas chromatography-mass spectrometric method for the therapeutic drug monitoring of valproic acid and seven of its metabolite in human serum. Application of the assay for a group of pediatric epileptics. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 1994, 656(2), pp 343-351.
- DAVIS J.M., JANICAK P.G., HOGAN D.M. Mood stabilizers in the prevention of recurrent affective disorders: a meta-analysis; *Acta Psychiatr. Scand.*, 1999, 100, pp 406-417.
- DENIKER P., OLIE J.P. *Dérèglements de l'humeur, états dépressifs et maniaques*.

In: Précis de Psychiatrie Clinique de l'Adulte ed. par DENIKER P., LEMPERIERE T., et GUYOTAT J. Paris: Masson.-1990;633p.

DILSAVER SC, CHEN YW, SWANN AC et al. Suicidality, panic disorder and psychosis in bipolar depression, depressive-mania, and pure mania. *Psychiatry Research*, 1997, 73, pp 47-56.

DUBOVSKY S.L., FRANKS R.D., LIFSCHITZ M. Effectiveness of verapamil in the treatment of a manic patient . *Am. J. Psychiatry*, 1982, 139, pp 502-504.

DUBOVSKY S.L., BUZAN R.D. Novel alternatives and supplements to lithium and anticonvulsants for bipolar affective disorders. *J. Clin. Psychiatry*; 1997, 58(5), pp 224-242.

EY H., BERNARD P., BRISSET C. Manuel de psychiatrie 6e édition. Paris: Masson, 1989.-1166p.

FURLONG R., HO L., WALSH C. et al. Analysis and meta-analysis of two serotonin transporter gene polymorphisms in bipolar and unipolar affective disorders. *Am. J. Med. Genetics* 1998, 81(1), pp 58-63.

GELDER M., GATH D. MAYOU R. Oxford Textbook of Psychiatry; 2nd edition, Oxford Medical Publications,1989.-877p.

GERNER R.H., FAIRBANKS L., ANDERSON. et al. CSF neurochemistry in depressed, manic, and schizophrenic patients compared with that of normal controls. *Am. J. Psychiatry*; 1984, 141(12), pp 1533-1540.

GOODWIN G., GEDDES J., PETO R. BALANCE (Bipolar Affective disorder: Lithium/Anti-Convulsant Evaluation) Protocol, Oxford, october 2000.

GRUNZE H., ERFURTH A., AMANN B. et al.; Intravenous valproate loading in acutely manic and depressed bipolar I patients. *Journal of Clin. Psychopharmacology*, 1999,19(4), pp 303-309.

GUTIERREZ B., ARRANZ M.J., COLLIER D.A. et al; Serotonin transporter gene and risk for bipolar affective disorder: an association study in spanish population; *Biol. Psychiatry*, 1998, 43(11), pp 843-847.

HERON S., TCHAPLA A., propriétés et caractérisations des phases stationnaires et phases mobiles de chromatographie liquide à polarité de phases inversée. *Analisis*, 1993, 21, pp 327-347.

HIRSCHFELD R.M., ALLEN M., MacEVOY J. et al. Safety and tolerability of oral loading divalproex sodium in acutely manic bipolar patients. *J. of Clin. Psychiatry*; 1999, 60(12), pp 815-818.

JAMISON Kay, *Manic-Depressive Illness and Creativity*. pp 44-47

In RENNIE J., PRESS M., POPE D. *Mysteries of the Mind*; Scientific American, 1997.

JOHANNESSEN C.U. Mechanism of action of valproate: a commentary. *Neurochemistry-International*, 2000, 37(2-3), pp 103-110.

KARINE A.N., MACRITCHIE A. HUNT N. Does "Rebound Mania" Occur after Stopping Carbamazepine? A Pilot Study. *J. of Psychopharmacology*: 2000, 14(3), pp 266-268.

KILTS C.D. In vivo Imaging of the Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Lithium. *J. Clin. Psychiatry*, 2000, 61(9), pp 41-46.

KOUKOPOULOS A., TONDO L., MINNAI G., *Cycles Rapides*.

In *Les Maladies dépressives* ed. par OLIE J.P., POIRIER M.F., LOO H. Paris: Flammarion médecine sciences, 1995.- 480p.

KUGLER A.R., ANNESLEY T.M, NORDBLOM G.D. et al. Cross-reactivity of fosphenytoin in two human phenytoin immunoassays. *Clin. Chem.*, 44(7), pp 1474-80.

KUNUGI H., HATTORI M., KATO T. et al. Serotonin transporter gene polymorphisms: ethnic difference and possible association with bipolar affective disorder. *Mol. Psychiatry*, 1997, 2(6), pp 457-462.

KUSHIDA K., ISHIKAZI T. Concurrent determination of valproic acid with other antiepileptic drugs by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 1985, 338, pp 131-139.

LAU-CAM C., ROOS R.W. HPLC method with precolumn phenacylation for the assay of valproic acid and its salts in pharmaceutical forms. *J. Liq. Chromatogr. and Related Technologies*, 1997, 20(13), pp 2075-2087.

LENOX R.H., HAHN C-G. Overview of the mechanism of action of lithium in the brain: fifty-year update. *J. Clin. Psychiatry*, 2000, 61(9), pp 5-15.

LEONARD B.E.; *Fundamentals of psychopharmacology*. Chichester: John Wiley & sons, 1992.- 267p.

LIN W.N., KELLY A.R., Determination of valproic acid in plasma or serum by solid-phase column extraction and gas-liquid chromatography. *Ther. Drug. Monit.*, 1985, 7, pp 336-343.

LIU H., MONTOYA J.L., FORMAN L.J. et al. Determination of free valproic acid: evaluation of the centrifree system and comparison between high-performance liquid chromatography and enzyme immunoassay. *Ther. Drug. Monit.*, 1992, 14(6), pp 513-521.

LIU H., MONTOYA J.L., FORMAN L.J. et al. Determination of valproic acid by high-performance liquid chromatography with photodiode-array and fluorescence detection. *J. Chromatogr. Biomed. Applic.*, 1992, 576(1), pp 163-169.

LOVETT L.J., NYGARD G.A., ERDMANN G.R. et al. HPLC determination of valproic acid in human serum using ultraviolet detection. *J. Liq. Chromatogr.*, 1987, 10(4), pp 687-699.

LUCARELLI C., VILLA P., LOMBARADI E. et al. HPLC method for the simultaneous analysis of valproic acid and other common anticonvulsant drugs in human plasma or serum. *Chromatographia*, 1992, 33(1-2), 37-40.

MARIE-CARDINE M. et al; Bilan du traitement par les sels de lithium dans un service hospitalier de psychiatrie adulte. 1992, *Médecine et hygiène* , 1925, pp34-37.

MASSOT O., ROUSSELLE J.C., FILLION M.P. et al. 5-HT_{1B} receptors: A novel target for lithium: possible involvement in mood disorders. *Neuropsychopharmacology*, 1999, 21(4), pp 530-541.

MOFFAT A.C., JACKSON J.V., MOSS M.S., WIDDOP B. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material Second edition, 1986, The Pharmaceutical Press .

MONCRIEFF J. Lithium: evidence reconsidered. Br. J. Psychiatry, 1997, 171, pp 113-19.

MONCRIEFF J. Lithium revisited. A reexamination of the placebo-controlled trials of lithium prophylaxis in manic-depressive disorder. Br. J. Psychiatry, 1995, 167(7), pp 569-73.

MORK A., HOLLUND P.; Mechanisms of lithium in modulation of postreceptor second messenger function in the brain. Biological Psychiatry, 1991, pp 192-93.

NAU H., WITTFOHT W., SCHAFER H. et al. Valproic acid and several metabolites: quantitative determination in serum, urine, breast milk and tissues by gas chromatography-mass spectrometry using selected ion monitoring. J. Chromatogr. 1981, 226(1), pp 69-78.

OSTROW D., HALARIS A., DYSKEN M., State Dependence of Noradrenergic Activity in Rapidly Cycling Bipolar Patient. J. of Clin. Psychiatry, 1984, 45(7), pp 306-309.

PAROT M., PENAT M. Psychose Maniaco-dépressive

In Précis de psychiatrie / ed. par KOUPERNIK C., LOO H., ZARIFIAN E. Paris: Flammarion médecine sciences, 1982.- 478p.

POOLE A.J., JAMES H.D., HUGHES W.C. Treatment Experiences in the Lithium Clinic at St Thomas Hospital. J. R. Soc. Med., 1978, 71, pp 890-894.

POST Robert M., UHDE Thomas W., Clinical Approaches to Treatment-Resistant Bipolar Illness. In American Psychiatric Association Annual Review vol. 6 ed. par HALES R., FRANCES A., 1987, pp125-146.

REES M., NORTON N., JONES I. et al. Association studies of bipolar disorder at the human serotonin transporter gene (hSERT; 5HTT). Mol. Psychiatry, 1997, 2(5), pp 398-402.

REGE A.B., LERTORA J.J.L., WHITE L.E. Rapid analysis of valproic acid by gas chromatography; J. Chromatogr., 1984, 309, pp 397-402.

REYNOLDS J.E.F., PARFITT K., PARSONS A.V., SWEETMAN S.C., MARTINDALE, The Extra Pharmacopeia 27th Edition 1977 The Pharmaceutical Press, p 1244.

RICHARD L., BUGUGNANI M.J., FOUYE H., Acide valproïque, comparaison entre deux méthodes de dosage: immunoenzymologie et chromatographie liquide à haute performance. Ann Biol. Clin., 1985, 43, 279-284.

ROSENTHAL N.E., MAZZANTI C.M., BARNETT R.L. et al. Role of serotonin transporter promoter repeat length polymorphism (5-HTTLPR) in seasonality and seasonal affective disorder. Mol. Psychiatry, 1998, 3(2), pp 175-177.

SCHREIBER Gabriel, AVISSAR Sofia, Lithium Selective Interactions with G-Proteins in the CNS.

In Biological Psychiatry / ed. par RACAGNI G., BRUNELLO N., FUKUDA T. et al. Elsevier Publications vol 1, pp172-75.

SCHUTZ E., SVINAROV D., SHIPKOVA M. et al. Cyclosporine whole blood assays (AxSYM, CEDIA, and EMIT): a critical overview of performance characteristics and comparison with HPLC. Clin. Chem., 1998, 44(10), pp 2158-2164.

SHIPKOVA M., SCHUTZ E., ARMSTRONG V.W. et al. Determination of the acyl glucuronide metabolite of mycophénolic acid in human plasma by HPLC and EMIT. Clin. Chem., 2000, 46(3), pp 365-72.

SOARES J.C., GERSHON S.; The psychopharmacologic specificity of the lithium ion: origins and trajectory; J. Clin. Psychopharmacology, 2000, 61(9), pp 16-22.

SWANN A.C., KOSLOW S.H., KATZ M.M. et al. Lithium Carbonate Treatment in Mania: CSF and Urinary Monoamine Metabolites and Treatment Outcome. Arch. Gen. Psychiatry, 1987, 44(4), pp 345-54.

SWANN A.C., STOKES P., SECUNDA S.K. et al. Depressive Mania versus Agitated Depression: Biogenic Amine and Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Function; Biological Psychiatry, 1994, 35(10), pp 803-813.

TAYLOR M.A., SIERLES F., ABRAMS R. General Hospital Psychiatry, The Free Press Edition pp213-240.

VIALA A. Eléments de toxicologie, 1998, Editions médicales internationales 521p.

VILLENEUVE A., PERON-MAGNAN P. Accès Mélancoliques dans la Psychose Maniaco-dépressive.

In Les Maladies Dépressives /ed. par OLIE J.P., POIRIER M.F., LOO H. Paris: Flammarion médecine sciences, 1995.- 480p.

WOLF J.H., VEENMA-VAN-DER-DUIN L., KORF J., Automated analysis procedure for valproic acid in blood, serum, and brain dialysate by high-performance liquid chromatography with bromomethylmethoxycoumarin as fluorescent label. J. Chromatogr. Biomed. Appl., 1989, 487(2), pp 496-502.

YU P.H., DAVIS B.A., 2-propyl-1-aminopentane, its deamination by monoamine oxidase and semicarbazide-sensitive amine oxidase, conversion to valproic acid and behavioral effects. Neuropharmacology, 1991, 30(5), pp 507-515.

ZORNBERG G.L., POPE H.G., Treatment of Depression in Bipolar Disorder: New Directions for Research; J. of Clin. Psychopharmacology, 1993, 13(6), pp 397-408.

6. ANNEXES

Formules utilisées pour les calculs statistiques

-Moyenne : $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$

-Ecart-type d'un échantillon : $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$

-Coefficient de variation : $CV = (s / \bar{x}) * 100\%$

-Rendement d'extraction : $\frac{x_{observée}}{x_{réelle}} * 100\%$

-Biais : $\frac{\bar{x}_{observée} - \bar{x}_{théorique}}{\bar{x}_{théorique}} * 100\% = 100 - \text{rendement d'extraction}$

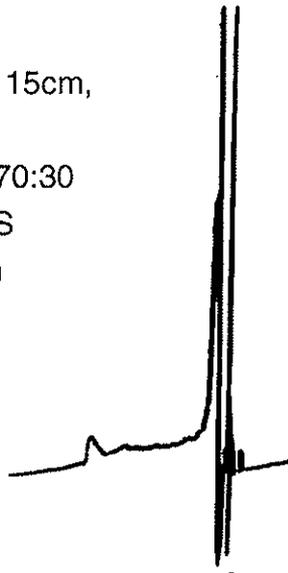
-Coefficient de corrélation : $r = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}}$

Résumé de la mise au point des paramètres chromatographiques

Abbreviations: P.m. = phase mobile; P.st. = phase stationnaire; MeCN = acétonitrile

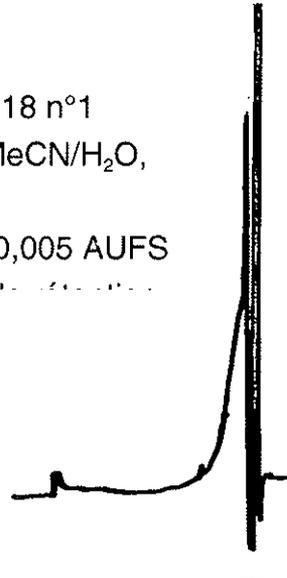
J1: P.st. = C18 n°1 15cm,
4,6mm d.i.
P.m = MeCN/H₂O, 70:30
210nm, 0,005 AUFS
=> Pas de rétention

1



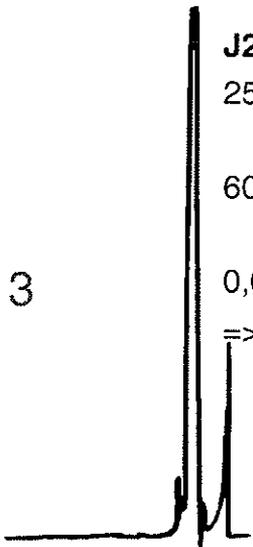
P.st. = C18 n°1
P.m. = MeCN/H₂O,
40:60
210nm, 0,005 AUFS
=> Pas de rétention

2



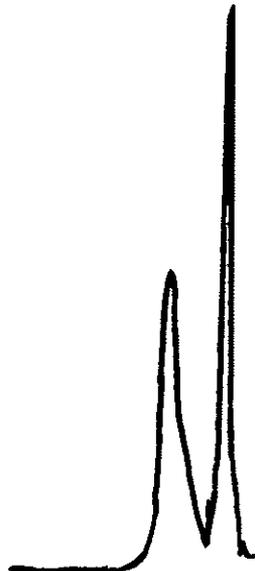
J2: P.st. = C18 n°2,
25cm, 4,6mm d.i.
P.m. = H₂O/MeCN,
60:40
210nm,
0,005AUFS
=> Pas de rétention

3



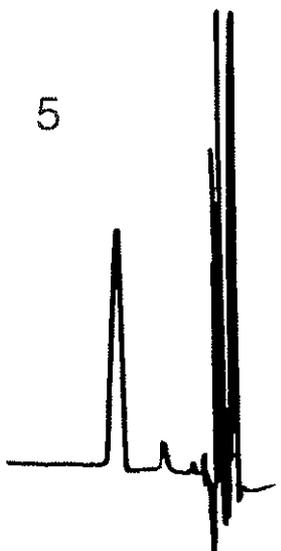
P.st. = C18 n°2, 25cm
P.m. = H₂O/MeCN,90:10
Tr VPA = 4,1min
=>Pic asymétrique

4



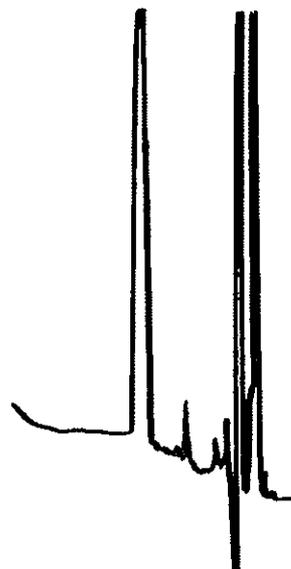
5

J3: P.st. = CN,Hypersil,
15cm
P.m. = MeCN/H₂O,
40:60
210nm, 0,005AUFS



P.st. et P.m. =
idem
Variation de la
l.o.
détection:210nm

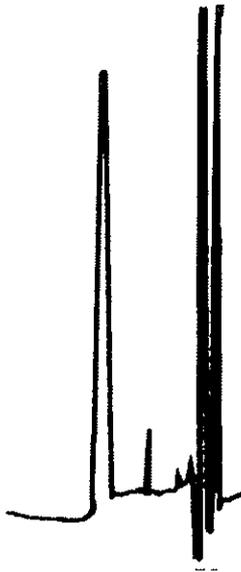
6a



1cm=3,5min

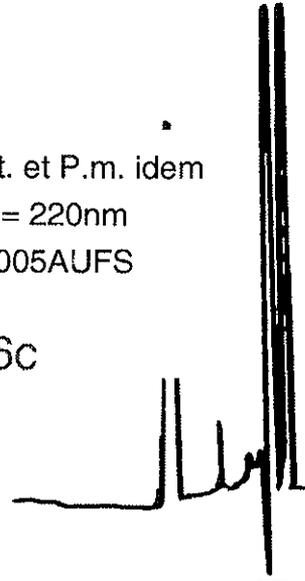
P.st. et P.m.
idem
l.o. = 215nm
0,0005AUFS

6b



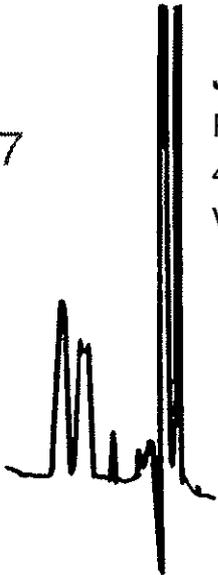
P.st. et P.m. idem
l.o. = 220nm
0,0005AUFS

6c



7

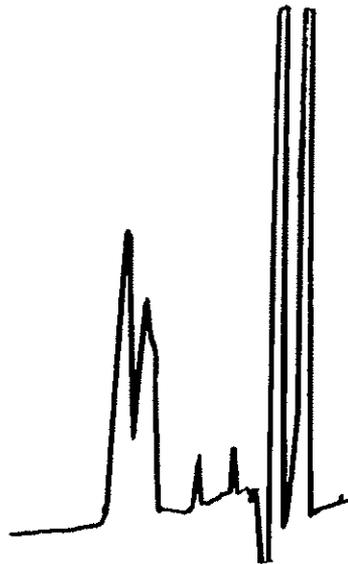
J4: P.st.= CN
P.m.= MeCN/H₂O,
40:60
VPA + étalon interne



P.st.= CN
P.m.=MeCN/H₂O,4
5:55

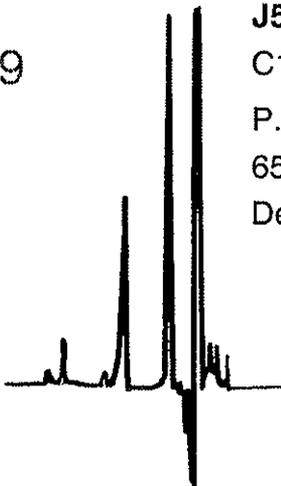
→ pas de différence

8



9

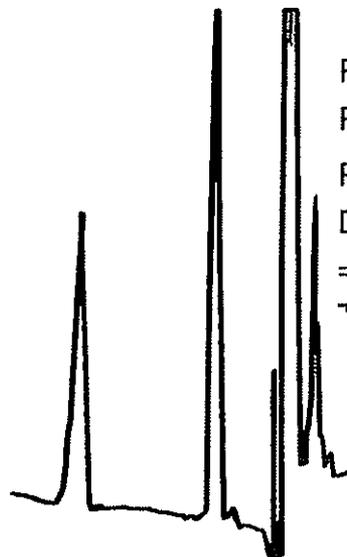
J5: P.st.=
C18/CN, 15cm, 3µm.
P.m.= H₂O/MeCN,
65:35
Débit 1 mL/min



P.st.= C18/CN, 15cm
Part. 3µm

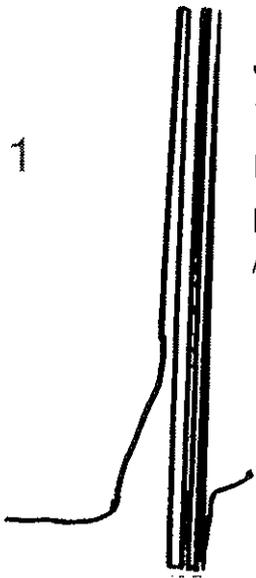
P.m.= H₂O/MeCN,
Débit 0,5 mL/min
=> Tr VPA=14min

10



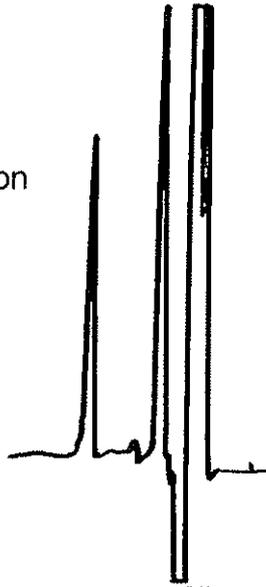
1cm=3,5min

11



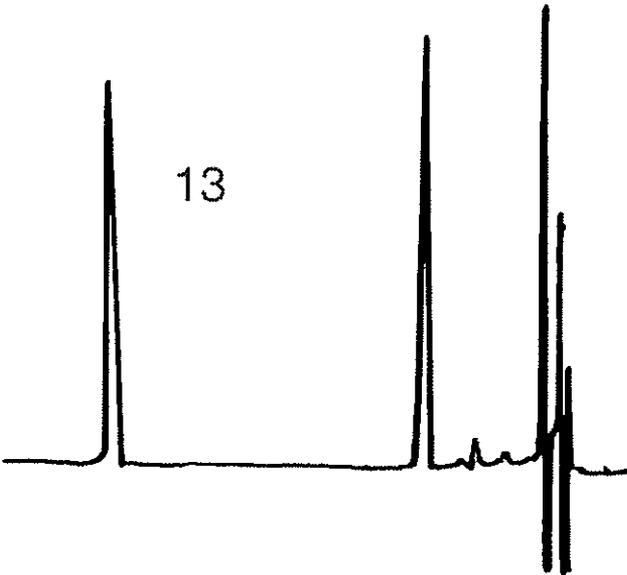
J6: P.st.= C18/CN
 15cm,3 μ m
 P.m.= solution tampon
 phosphate pH7,2
 /MeCN, 65:35

12



P.st.= C18/CN
 15cm,3 μ m
 P.m.= tampon
 phosphate
 pH5,5 /MeCN, 65:35

13



J7: P.st.= C18/CN 25cm,5 μ m
 P.m.= phosphate
 pH5,8/MeCN, 65:35
 =>trop de rétention de l'E.I.
 Temps d'analyse trop
 important:

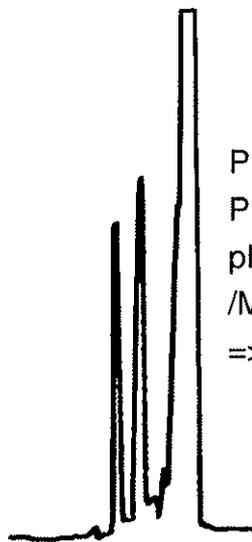
14



J8: P.st.= C18/CN
 P.m.=phosphate
 pH6,2/MeCN, 65:35
 Nouvel E.I.
 (ac.octanoïque)

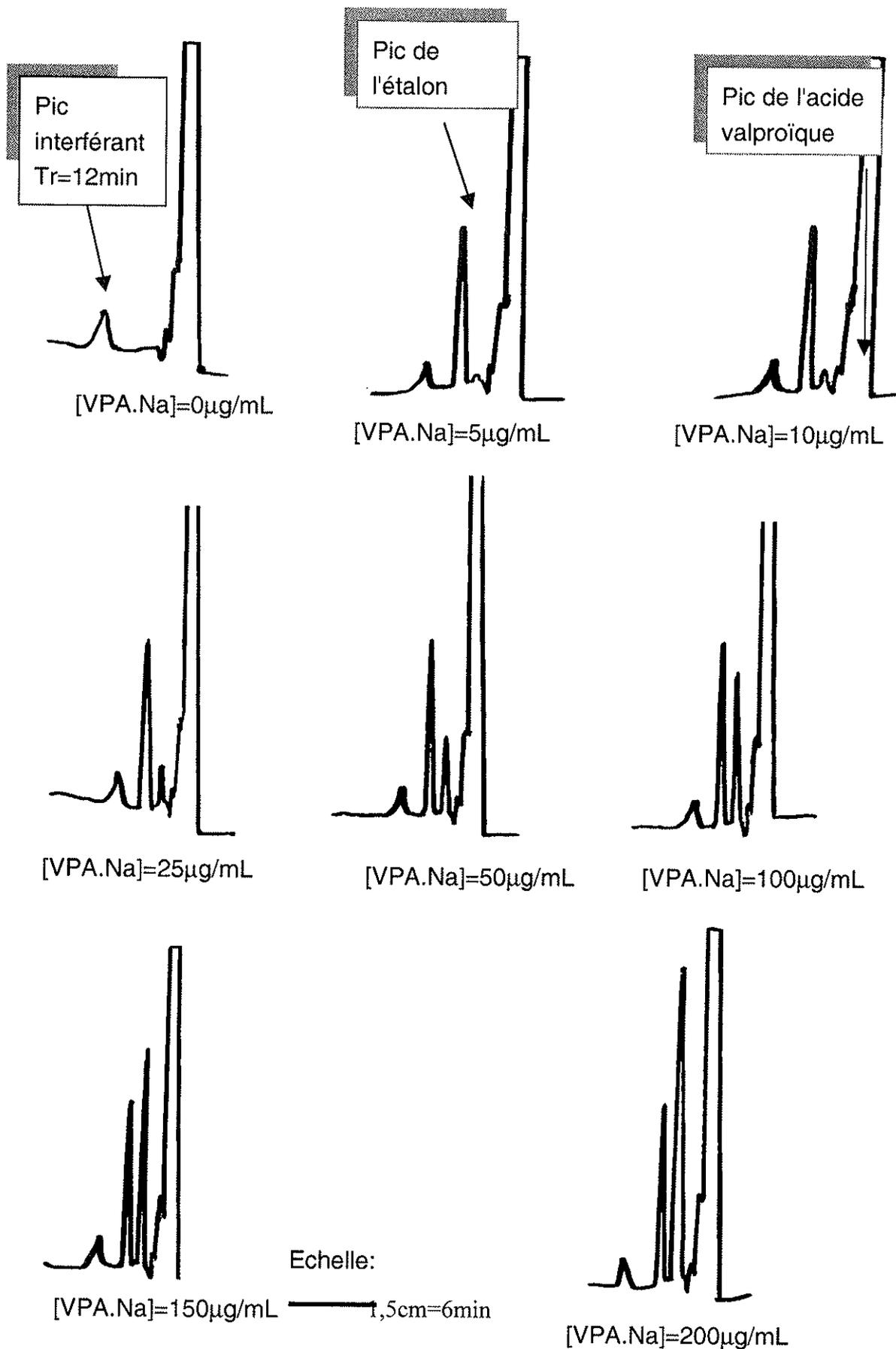
1cm=3,5min

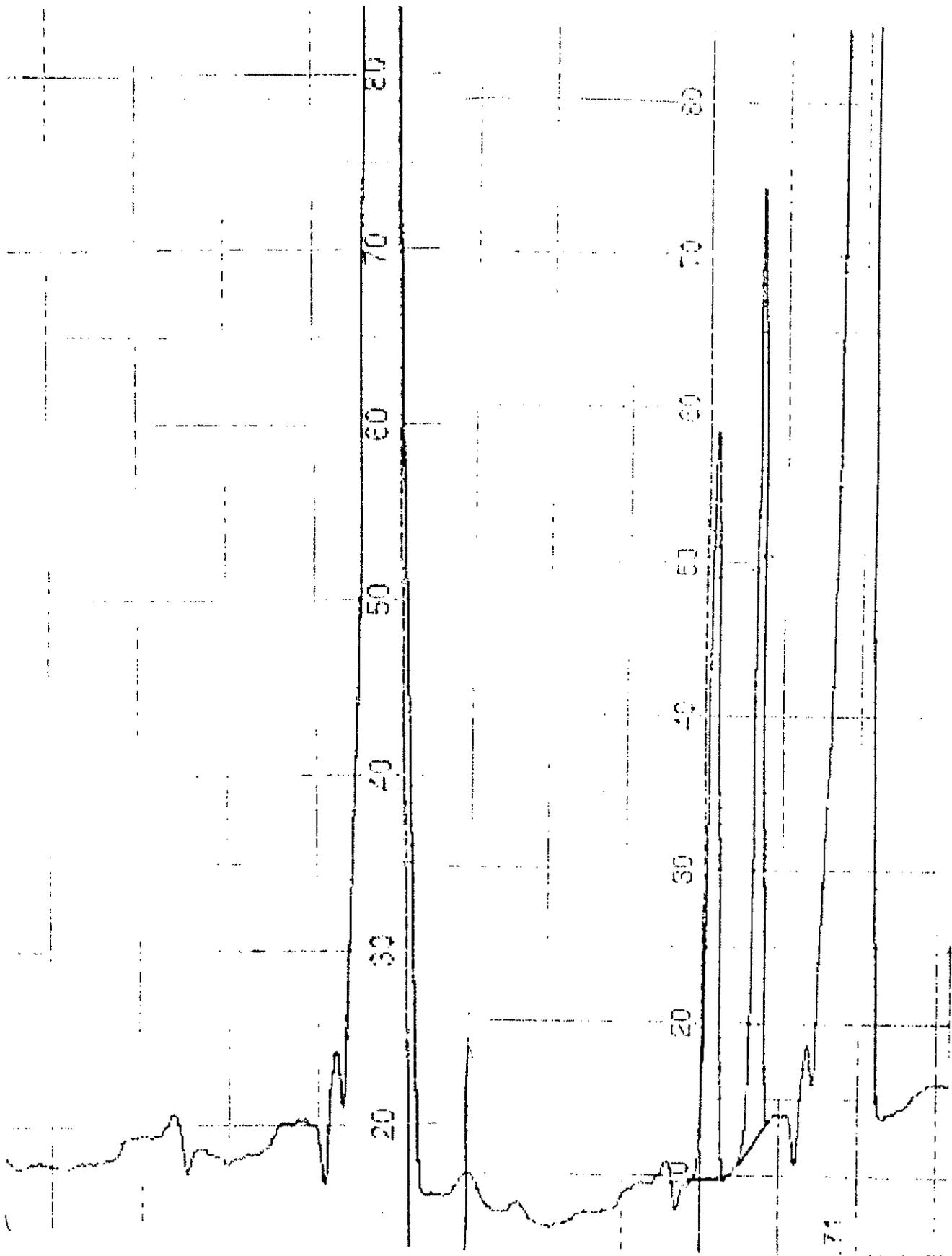
15



P.st.= C18/CN
 P.m.= phosphate
 pH6,35
 /MeCN, 65:35
 =>bonne séparation

Chromatogrammes de la droite étalon





Chromatogramme A: sérum vierge

B: sérum surchargé en VPA (200µg/mL)

BON A IMPRIMER N° 309

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

Vu et autorisés d'impression

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

Mise au point et validation d'une procédure pour le dosage de l'acide valproïque dans le sérum humain par CLHP.

RESUME

Les troubles bipolaires sont caractérisés par une alternance d'épisodes dépressifs et maniaques. Le lithium constitue le composé de référence pour le traitement et la prophylaxie. Quelques médicaments semblent gagner de l'importance en cas d'intolérance ou de non réponse au lithium.

Dans le cadre d'une étude comparant le lithium et le divalproate sodique, une procédure CLHP pour le dosage du valproate a été mise au point. L'extraction à partir du sérum a été réalisée par précipitation des protéines. Une détection UV sans dérivation de l'analyte a été utilisée. La colonne de type mode mixte (C18/CN) fut la plus satisfaisante.

La méthode a été validée selon six critères: linéarité, stabilité, précision (reproductibilité et répétabilité) et fidélité, rendement d'extraction, sensibilité et spécificité. La méthode est linéaire de 5 à 200 µg de VPA sodique/ml de sérum.

La procédure a été comparée à la technique EMIT par le dosage de 16 échantillons. Les valeurs obtenues par la procédure étaient significativement corrélées avec les mesures EMIT. La surestimation d'environ 100% par EMIT observée entre les deux séries s'explique par une réactivité croisée des anticorps pour les métabolites du valproate.

Setting-up and validation of a procedure for the determination of valproic acid in human serum by HPLC.

ABSTRACT

Bipolar mood disorders are characterized by an alternating pattern of depressive and maniac episodes. Lithium is the reference compound in the treatment and prophylaxis of this illness. New medications are becoming very useful when patients do not tolerate or respond to lithium.

For the purpose of a study comparing the efficiency of lithium and sodium divalproex, a new HPLC procedure for the determination of valproate (VPA) in serum was set up. Extraction of analytes consisted of a single protein precipitation step. UV detection without derivatization was utilized. Good separation was obtained with mixed mode column (C18/CN).

The method was validated according to six criterias: stability, linearity, precision (reproductibility and repeatability) and accuracy, recovery rate, selectivity and sensitivity. Measures were linear over the range 5-200 µg of sodium valproate /ml of serum.

The procedure was compared to the EMIT technique; determination of VPA in 16 plasma samples was performed. The two series of results were significantly correlated. However a difference of approximately 100% was observed between the results of the two methods. This overestimation by EMIT has been explained by cross-reactivity of antibodies for metabolites of VPA.

Mots-clés: troubles bipolaires, lithium, valproate de sodium, CLHP, sérum humain, dosage, détection UV.

Key-words: bipolar mood disorders, lithium, sodium valproate, HPLC, human serum, determination, UV detection.

Discipline: Pharmacie

Laboratoire de Chimie Analytique et de Bromatologie
Faculté de Pharmacie
2, rue du Docteur Marcland
87025 LIMOGES CEDEX