

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE



ANNEE 2005

SCD UNIV.LIMOGES



THESE N° 334/11

**REDISTRIBUTION *POST-MORTEM*  
DES ANTIÉPILEPTIQUES CHEZ LE LAPIN  
(influence du pKa sur les phénomènes de  
redistribution *post-mortem*)**

**THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN  
PHARMACIE**

*présentée et soutenue publiquement le vendredi 9 décembre 2005*

par

**Vanessa RULIERE**

née le 02/03/1980 à Limoges

**EXAMINATEURS DE LA THESE**

Monsieur le Professeur Gérard LACHÂTRE.....PRESIDENT  
Madame Marie-Françoise DREYFUSS, Maître de Conférences.....JUGE  
Monsieur Jean-Michel GAULIER, Pharmacien Biologiste.....JUGE

# UNIVERSITE DE LIMOGES

## FACULTE DE PHARMACIE

---

### DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur le Professeur **HABRIOUX** Gérard

### ASSESEURS

Madame le Professeur **CHULIA** Dominique

Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

### PROFESSEURS

**BENEYTOUT** Jean-Louis

BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE

**BOTINEAU** Michel

BOTANIQUE - CRYPTOLOGAMIE

**BROSSARD** Claude

PHARMACIE GALENIQUE

**BUXERAUD** Jacques

CHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE THERAPEUTIQUE

**CARDOT** Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

**CHULIA** Albert

PHARMACOGNOSIE

**CHULIA** Dominique

PHARMACIE GALENIQUE

**DELAGE** Christiane

CHIMIE GENERALE - CHIMIE MINERALE

**DREYFUSS** Gilles

PARASITOLOGIE

**DUROUX** Jean-Luc

PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE

**GHESTEM** Axel

BOTANIQUE - CRYPTOLOGAMIE

**HABRIOUX** Gérard

BIOCHIMIE FONDAMENTALE

**LACHATRE** Gérard

TOXICOLOGIE

**MOESCH** Christian

HYGIENE – HYDROLOGIE - ENVIRONNEMENT

**ODART** Nicole

PHARMACODYNAMIE

**ROGEZ** Sylvie

BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE

## **MAITRES DE CONFERENCES**

<b>ALLAIS</b> Daovy	PHARMACOGNOSIE
<b>BASLY</b> Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
<b>BATTU</b> Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>CALLISTE</b> Claude	BIOPHYSIQUE
<b>CARDI</b> Patrice	PHYSIOLOGIE
<b>CLEDAT</b> Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
<b>COMBY</b> Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
<b>DELEBASSE</b> Sylvie	BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE
<b>DREYFUSS</b> Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>EA KIM</b> Leng	PHARMACODYNAMIE
<b>FAGNERE</b> Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
<b>FROISSARD</b> Didier	BOTANIQUE - CRYPTOLOGIE
<b>FOURNIER</b> Françoise	BIOCHIMIE
<b>JAMBUT</b> Anne Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
<b>LARTIGUE</b> Martine	PHARMACODYNAMIE
<b>LIAGRE</b> Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
<b>LOTFI</b> Hayat	TOXICOLOGIE
<b>MARION-THORE</b> Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
<b>MOREAU</b> Jeanne	IMMUNOLOGIE
<b>PARTOUCHE</b> Christian	PHYSIOLOGIE
<b>POUGET</b> Christelle	PHARMACIE GALENIQUE
<b>ROUSSEAU</b> Annick	BIOMATHEMATIQUES
<b>SIMON</b> Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
<b>TROUILLAS</b> Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>VIANA</b> Marylène	PHARMACIE GALENIQUE
<b>VIGNOLES</b> Philippe	INFORMATIQUE

## **PROFESSEUR ASSOCIE**

**BAMBA** Moriféré

## **PROFESSEUR CERTIFIE**

**MARBOUYT** Jean-Michel ANGLAIS

Je remercie,

**Monsieur le Professeur Gérard LACHÂTRE**, Chef du service de Pharmacologie et Toxicologie du CHU Dupuytren de Limoges, de me faire l'honneur de présider cette thèse, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire qu'il dirige et d'avoir toujours été d'excellent conseil,

**Madame le Docteur Marie-Françoise DREYFUSS**, Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Limoges, d'avoir accepté d'être membre de ce jury, de m'avoir soutenue et encouragée dans ce projet et d'avoir toujours été présente dans les moments difficiles,

**Monsieur le Docteur Jean-Michel GAULIER**, Praticien Hospitalier du service de Pharmacologie et Toxicologie du CHU Dupuytren de Limoges, Directeur de thèse, pour son accueil bienveillant, le temps qu'il m'a accordé et son aide précieuse dans l'élaboration de ce travail,

**Monsieur le Professeur Pierre MARQUET**, PU-PH du service de Pharmacologie et Toxicologie du CHU Dupuytren de Limoges, pour le temps qu'il a bien voulu me consacrer et les conseils qu'il m'a prodigués tout au long de cette étude,

**Madame le Docteur Anne-Laure PELISSIER**, Docteur en Médecine à la Faculté de Médecine de Marseille, pour son accueil chaleureux au sein de son équipe, sa bonne humeur, son dévouement et toute l'aide qu'elle m'a apportée,

**Tout le personnel** du Service de Pharmacologie et Toxicologie du CHU Dupuytren de Limoges pour leur disponibilité et la gentillesse avec laquelle ils ont bien voulu répondre à toutes mes questions et m'aider dans l'élaboration de ce travail.

Je remercie,

**Mes parents** pour leurs encouragements, leur soutien et leur réconfort tout au long de l'élaboration de cette thèse,

**Ma famille** pour toute l'attention qu'elle a pu m'apporter,

**Mes amis** pour leur patience, leurs conseils avisés et leur soutien en toute circonstance,

**Sam**, mon chien, pour son affection et ses bêtises qui ont été de grands moments de distraction.

# **PLAN**

## **INTRODUCTION**

### **A GENERALITES**

#### **I. LA REDISTRIBUTION POST-MORTEM**

##### **I.1. Définition**

##### **I.2. Origines des variations de concentration post-mortem**

###### **I.2.1. Redistribution depuis les organes "réservoirs"**

###### **I.2.2. Phénomènes agoniques et cadavériques**

###### **I.2.3. Propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques des xéno-biotiques**

#### **II. HYPOTHESE DE TRAVAIL ET LES TRAVAUX ANTERIEURS**

#### **III. ANTIPILEPTIQUES**

#### **IV. QUELQUES DONNEES SUR LE TYPE DE SPECTROMETRE DE MASSE UTILISE**

### **B MATERIELS ET METHODES**

#### **I. PROTOCOLE D'EXPERIMENTATION ANIMALE**

##### **I.1. Modèle animal et conditions expérimentales**

##### **I.2. Conditions d'administration des antiépileptiques**

- I.2.1. Préparation de la solution de lamotrigine**
  - I.2.1.1 Problèmes rencontrés**
  - I.2.1.2 Résolution des problèmes**
- I.2.2. Préparation de la solution d'éthotoïne**
  - I.2.2.1 Problèmes rencontrés**
  - I.2.2.2 Résolution des problèmes**
- I.2.3. Préparation de la solution de phénobarbital**
- I.2.4. Préparation des solutions injectables finales**
- I.2.5. Administration de la solution**
- I.2.6. Euthanasie**

### **I.3. Protocole expérimental**

### **I.4. Dissections**

## **II. METHODES ANALYTIQUES**

### **II.1. Essais et contrôles des solutions pures**

### **II.2. Dosages dans les prélèvements biologiques**

#### **II.2.1. Extraction**

#### **II.2.2. Appareillage de LC-ES-MS et conditions expérimentales**

### **II.3. Validation analytique**

## **III. METHODOLOGIE STATISTIQUE**

# **C RESULTATS ET DISCUSSION**

## **I. LAMOTRIGINE**

## **II. ETHOTOINE**

### **III. PHENOBARBITAL**

### **IV. COMPARAISON DES 3 SUBSTANCES : INFLUENCE DU pKa**

### **V. INFLUENCE DU pKa/INFLUENCE Kp**

### **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

### **BIBLIOGRAPHIE**

## LISTE DES ABREVIATIONS

½ vie :	demi-vie d'élimination sanguine
APD :	apex pulmonaire droit
APG :	apex pulmonaire gauche
ATP :	adénosine triphosphate
B :	biais
Biodisp :	biodisponibilité
BL :	bile
BPD :	base pulmonaire droite
BPF :	bonnes pratiques de fabrication
BPG :	base pulmonaire gauche
CE :	cerveau
CG :	contenu gastrique
Cl plasm :	clairance plasmatique
CLHP/UV-BD :	chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur UV a barrette de diodes
CL-ES-SM :	chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse par l'intermédiaire d'une source de type electrospray
CL-SM :	chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse
Cmax :	concentration sanguine maximale
cp :	comprimé
CV :	coefficient de variation
DIA :	diaphragme
DL 50 :	dose létale 50 (dose entraînant 50% de décès au sein d'une population)
EI :	étalon interne
ESI :	electrospray ionization
GABA :	acide gamma-aminobutyrique
HCl :	acide chlorhydrique
HV :	humeur vitrée
IPL :	iliopsoas
IVL :	intraveineuse lente
Kp :	coefficient de partage
LDD :	limite de détection
LDQ :	limite de quantification
LG :	liquide gastrique

LHD :	lobe hépatique droit
LHG :	lobe hépatique gauche
Lpp :	liaison aux protéines plasmatiques
pKa :	constante de dissociation
m/z :	rapport masse/charge électrique
MYD :	myocarde droit
MYG :	myocarde gauche
NS :	non significatif
RD :	rein droit
Rdt ext :	rendement d'extraction
RG :	rein gauche
SCD :	sang cardiaque droit
SCG :	sang cardiaque gauche
SP :	sang périphérique
SPE :	solid phase extraction
Tmax :	temps auquel les concentrations sanguines sont maximales
UR :	urines
Vd :	volume de distribution

## INTRODUCTION

Une des missions de l'expertise toxicologique en médecine légale est de déterminer la nature du ou des xénobiotique(s) éventuellement présent(s) dans l'organisme au moment du décès et d'évaluer, le cas échéant, leur part de responsabilité dans la survenue du décès. Cette évaluation s'effectue par l'intermédiaire des concentrations mesurées ; concentrations qui sont comparées aux valeurs des concentrations thérapeutiques, toxiques ou létales établies chez le vivant.

Cependant, les concentrations des xénobiotiques mesurées dans des échantillons autopsiques ne sont pas forcément le reflet des concentrations réelles dans ces mêmes milieux biologiques au moment du décès. Il apparaît effectivement que ces concentrations varient en fonction des sites de prélèvement et/ou du délai écoulé entre la survenue du décès et le moment de la réalisation des prélèvements *post-mortem*.

Ces différences de concentrations sont dues à divers processus se produisant dans le cadavre au cours de la période *post-mortem*, regroupés sous le terme de « **phénomènes de redistribution *post-mortem*** » et dont les mécanismes demeurent complexes et imparfaitement connus. Aussi, dans la mesure où tout xénobiotique peut être impliqué dans la survenue d'un processus léthal, il paraît essentiel de connaître l'existence d'un tel phénomène de redistribution, et si possible son intensité, afin de pouvoir interpréter correctement les concentrations mesurées.

Dans une telle démarche, deux approches semblent possibles et complémentaires :

- la constitution de banques de données à l'aide d'analyses répétées dans le temps, à partir de cas réels d'analyses toxicologiques *post-mortem* chez l'homme ou de modèles animaux,
- la recherche de lois générales gouvernant ces phénomènes de redistribution *post-mortem*, permettant de l'évoquer, ou non, devant toute molécule.

Cette étude se situe dans cette seconde optique puisqu'elle s'inscrit dans un objectif général d'étude des phénomènes de redistribution *post-mortem* sous l'angle physico-chimique des molécules.

Une étude préliminaire a permis d'aborder l'influence d'un premier paramètre physico-chimique, le coefficient de partage  $K_p$ , à travers la classe des bêtabloquants. L'objectif du présent travail est d'étudier l'influence d'un autre paramètre physico-chimique, la constante de dissociation  $pK_a$ , dans la survenue des phénomènes de redistribution *post-mortem*, à l'aide d'une série de substances de  $pK_a$  variables et de  $K_p$  similaires.

Après avoir rappelé les éléments essentiels de la redistribution *post-mortem*, discuté du choix des substances utilisées lors de l'étude et décrit l'appareillage de spectrométrie de masse utilisé (API 100 équipé d'une interface de type electrospray), nous présenterons le protocole d'expérimentation animale puis la mise en place et l'optimisation de la méthode analytique. Ensuite, nous exposerons la méthodologie statistique utilisée avant de présenter et de discuter des premiers résultats obtenus.

# **A. GENERALITES**

## **I. REDISTRIBUTION POST-MORTEM**

### **I.1. Définition**

Ainsi que nous l'avons développé dans l'introduction, il apparaît que les concentrations *post-mortem* peuvent varier en fonction des sites de prélèvement et/ou du délai écoulé entre le décès et les prélèvements [18]. Ces phénomènes sont regroupés sous le terme générique de redistribution *post-mortem*. Ces phénomènes de redistribution sont liés :

- au relargage des molécules, en période *post-mortem* précoce, depuis des organes qualifiés de réservoirs (tractus gastro-intestinal, foie, poumons et myocarde), vers les structures anatomiques de voisinage ;
- aux phénomènes cadavériques, en particulier, à la lyse cellulaire et à la putréfaction ;
- aux propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques des xénobiotiques.

### **I.2. Origines des variations de concentration *post-mortem***

#### **I.2.1. Redistribution depuis les organes "réservoirs"**

Chez le vivant, les xénobiotiques se concentrent dans certains organes dits « réservoirs » (tractus gastro-intestinal, poumons, foie, myocarde). Après le décès, les substances stockées dans ces organes vont diffuser vers les structures anatomiques de voisinage. La redistribution à partir de ces différents organes s'effectue selon deux mécanismes distincts : diffusion anatomique par l'intermédiaire des vaisseaux de l'organe considéré (même en l'absence de tout flux sanguin) et/ou diffusion de contiguïté, transpariétale [18].

- Le tractus digestif, l'estomac en particulier, peut relarguer des molécules vers le myocarde, les cavités cardiaques, les poumons et le foie. Cette redistribution peut s'effectuer par les 2 mécanismes précédemment cités, par exemple par l'intermédiaire des vaisseaux abdominaux (aorte abdominale, veine cave inférieure, veine porte) ou par contiguïté [8]. Ce relargage est un phénomène très précoce puisqu'il peut débuter dès la 2<sup>ème</sup> heure après le décès.

Il est favorisé par le temps de contact du xénobiotique avec la muqueuse digestive et ralenti par la conservation des cadavres à 4°C [21].

Enfin, la régurgitation du contenu gastrique dans les voies aériennes, fréquente lors des phénomènes agoniques et cadavériques, entraîne une élévation des concentrations dans les gros vaisseaux thoraciques [22].

- Les poumons : *in vivo*, les poumons reçoivent tout le flux sanguin issu du ventricule droit. Un certain nombre de molécules, plus particulièrement les molécules basiques et lipophiles, ont tendance à s'accumuler dans le parenchyme pulmonaire. En période *post-mortem* précoce, la redistribution de ces molécules depuis les sites d'accumulation intra-pulmonaires vers la circulation pulmonaire et les organes de voisinage est rapide et intense. Ce phénomène entraîne une augmentation des concentrations dans le sang cardiaque et les vaisseaux thoraciques [10]. D'après Fuke et al. [8], ces phénomènes de redistribution seraient plus intenses que ceux observés à partir de l'estomac.
- Le foie représente une autre source majeure de redistribution faisant intervenir des mécanismes multiples. Les xénobiotiques concentrés dans le parenchyme hépatique au moment du décès peuvent passer dans la veine cave inférieure via le système porte. De là, ils peuvent diffuser de proche en proche vers les cavités cardiaques droites et les vaisseaux pulmonaires. Ce phénomène de diffusion serait cependant plus long et moins intense que la redistribution à partir des poumons [20]. D'autre part, la redistribution des xénobiotiques concentrés dans le parenchyme hépatique avant le décès peut s'effectuer par diffusion de contiguïté vers les organes de voisinage (estomac et vésicule biliaire). Le foie peut lui-même faire l'objet d'une redistribution, en particulier depuis l'estomac (cf. supra). Enfin, certains xénobiotiques présents dans la circulation générale lors du décès peuvent être redistribués secondairement vers certains tissus et organes tels que le foie, entraînant une diminution des concentrations sanguines.
- Le myocarde est un « organe réservoir » capable de stocker certaines molécules (digitaliques, inhibiteurs calciques et autres molécules à visée cardiologique...). Lors du décès, ces molécules sont relarguées dans le sang cardiaque où leur concentration s'élève alors considérablement.

Le sang cardiaque peut donc faire l'objet d'une redistribution de molécules provenant de l'estomac, du parenchyme pulmonaire, du parenchyme hépatique et enfin du myocarde lui-même.

### **I.2.2. Phénomènes agoniques et cadavériques**

- **La lyse cellulaire** : la lyse cellulaire est un phénomène complexe. L'hypoxie contemporaine des phénomènes agoniques entraîne un épuisement de la production d'ATP, à l'origine d'une cascade d'évènements qui vont conduire à la lyse de la cellule et à la libération dans le milieu extra-cellulaire des xénobiotiques contenus dans la cellule [2]. Les molécules basiques et lipophiles, fortement concentrées à l'intérieur des cellules, sont donc plus affectées par ce phénomène que des molécules plus acides.
- **La putréfaction** : les bactéries normalement présentes dans le tube digestif au moment du décès envahissent les lymphatiques intestinaux et le système veineux portal. Ce phénomène débute précocement, d'autant plus rapidement d'ailleurs que le cadavre est placé dans une atmosphère dont la température est élevée [1]. La prolifération microbienne associée à la rupture des membranes anatomiques généralise ce processus qui gagne les différents organes et tissus. Ces bactéries (*Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, etc...) peuvent, en présence de substrats glucidiques ou protidiques, dégrader et/ou synthétiser certaines molécules. Ce phénomène a été largement décrit pour l'éthanol [17] et les nitrobenzodiazépines [23].
- **Les phénomènes de coagulation et d'hypostase sanguine**, très variables d'un site anatomique à l'autre en fonction notamment de la position du cadavre, sont susceptibles d'affecter les concentrations des molécules présentant une fixation érythrocytaire importante [20]. Ces phénomènes sont cependant mineurs par rapport à ceux précédemment décrits. Enfin, l'hypothèse de mouvements entre les différents compartiments sanguins, susceptibles d'entraîner des variations de concentration entre ces compartiments, a été évoquée dans un article très ancien [7], mais jamais confirmée depuis.

### I.2.3. Propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques des xénobiotiques

Parallèlement aux phénomènes précédemment cités, les caractéristiques physico-chimiques et pharmacocinétiques des xénobiotiques interviennent également. Ces mécanismes sont moins bien connus.

Les principaux travaux publiés à ce jour tendent à démontrer que les molécules à large volume de distribution (Vd) sont celles qui subissent les phénomènes de redistribution les plus intenses du fait de leur stockage tissulaire [11].

Il s'agit généralement de bases faibles lipophiles pour lesquelles intervient un phénomène de piégeage d'ions [4]. Ceci a été très largement démontré pour des molécules fréquemment rencontrées en toxicologie médico-légale, telles que les amphétamines [13] ou les antidépresseurs tricycliques [9]. Néanmoins, il existe des exceptions à la règle. Ainsi, le paracétamol, à faible Vd, présente un phénomène de redistribution important, alors que la mirtazapine, à large Vd, semble moins concernée par ce phénomène [26].

La poursuite du métabolisme de certaines molécules en période *post-mortem* a également été envisagée. Il semblerait en effet que l'activité de certains enzymes puisse persister quelques heures après le décès.

Cette hypothèse a été émise pour expliquer la diminution des concentrations de cocaïne en période *post-mortem* [18], et Yamazaki et al. [25] ont démontré la persistance de l'activité de certains enzymes en période *post-mortem* immédiate chez le rat, laissant subsister des possibilités métaboliques durant cette période.

## II. HYPOTHESE DE TRAVAIL ET TRAVAUX ANTERIEURS

Dans la mesure où tout médicament ou toxique peut être impliqué dans le processus létal, il paraît essentiel de connaître l'existence d'un tel phénomène de redistribution et, si possible, d'évaluer son importance pour pouvoir interpréter les concentrations mesurées (thérapeutiques, toxiques ou létales).

Dans ce but, deux approches sont possibles et complémentaires :

- La constitution de banques de données à l'aide d'analyses répétées dans le temps, à partir de cas réels d'analyses toxicologiques *post-mortem* chez l'homme ou sur des modèles animaux,
- la recherche de lois générales gouvernant ces phénomènes de redistribution *post-mortem*.

Ce sujet se situe dans cette seconde optique et s'intègre dans l'étude de l'influence des caractéristiques physico-chimiques des molécules sur leur éventuelle redistribution *post-mortem*.

Ce travail s'est appuyé sur les acquis méthodologiques et les résultats obtenus au cours du DEA de Mademoiselle Carine DUPUIS (2001-2002). Cette première étude a permis d'évaluer l'influence du coefficient de partage  $K_p$  sur la redistribution *post-mortem* des molécules, en utilisant 3 bêtabloquants de pKa similaires et de  $K_p$  croissants.

Ce travail a donné lieu à deux publications [6, 19]. Le modèle animal a été mis au point dans le Service de Médecine Légale de la Faculté de Médecine de Marseille, avec la collaboration du Centre d'Etudes et de Recherches Expérimentales de cette même Faculté.

Le modèle animal choisi est le lapin car cet animal possède une vésicule biliaire, et que la bile présente un intérêt certain en toxicologie médico-légale, en particulier pour les molécules présentant un cycle entéro-hépatique. La seconde raison est que l'humeur vitrée du lapin présente des caractéristiques chimiques comparables à celles de l'homme [5].

Les résultats des dosages réalisés dans le Service de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges, indiquent un rôle probable du Kp [19]. Ce paramètre n'est toutefois pas en mesure d'expliquer, à lui seul, l'ensemble des variations de concentration observé. De fait, il s'agit dorénavant d'explorer l'influence des autres paramètres physico-chimiques et notamment du pKa. Après constitution d'une base de données comprenant 107 molécules avec des Kp et pKa identifiés et pouvant être dosées dans des prélèvements *post-mortem*, il ressort que seule la classe des antiépileptiques permet de regrouper 3 substances de Kp proches et de pKa variables (acide, neutre et basique) [Tableau 1].

**Tableau 1 : Choix de molécules de Kp similaires et pKa variables**

Molécule	Dosage O/N	Classe thérapeutique	pKa	Kp	Milieu	Référence
Sufentanil	O	Analgésique	8,01	1,75	oct/eau	Thérapeutic Drugs
Méphénytoïne		Antiépileptique	8,1	1,74		Comprehensive med chem
Methotexital		Anesthésique	8,3	1,7		Comprehensive med chem
Trimipramine	O	Antiépresseur	7,67	1,69	oct/eau	Thérapeutic Drugs
Prilocaine		Anesthésique	7,89	1,65		Comprehensive med chem
Oxprenolol	O	Bêtabloquant	9,5	1,6	oct/eau	Thérapeutic Drugs
Hexobarbital		Anesthésique	8,2	1,57		Comprehensive med chem
Dihydrocodéïne	O	Antalgique	8,8	1,5	oct/eau	Thérapeutic Drugs
Sulfaméthoxazole		Antibiotique	5,6	1,47	oct/eau	publi. Schmutz et thormann
Tenoxicam		Anti-inflammatoire	5,4	1,44	oct/eau	publi. Schmutz et thormann
<b>Phénobarbital</b>	O	Antiépileptique	7,2	1,4	oct/eau	fabric.
Perphénazine	O <sup>e</sup>	Neuroleptique	7,8	1,26	oct/eau	Thérapeutic Drugs
Mimoxidil	N	Antihypertenseur	4,6	1,24	oct/eau	Thérapeutic Drugs
<b>Ethotoïne</b>	N	Antiépileptique	8,5	1,22		Comprehensive med chem
<b>Lamotrigine</b>	O	Antiépileptique	5,5	1,19	oct/eau	Thérapeutic Drugs
Métronidazole	N	Antifongique	2,62	1,18	oct/eau	Thérapeutic Drugs
Métharbital		Antiépileptique	8,3	1,15		Comprehensive med chem
Zidovudine	O	Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse	9,68	1	oct/eau	Thérapeutic Drugs
Warfarine	O	Antivitaminique K	5	1	oct/eau	Thérapeutic Drugs
Kétoprophène	O	Anti-inflammatoire	4,55	1	oct/eau	Thérapeutic Drugs
Aminophylline	N	Bronchodilatateur	5	0,95	oct/eau	Thérapeutic Drugs
Ether		Anesthésique	3,6	0,87		Comprehensive med chem
Caféine	O	Bronchodilatateur	13,9	0,85	oct/eau	Thérapeutic Drugs

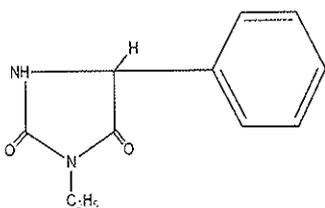
### III. ANTIÉPILEPTIQUES

L'épilepsie correspond à un ensemble de pathologies qui résultent d'un déséquilibre entre des neuromédiateurs excitateurs et inhibiteurs. Les antiépileptiques agissent selon 3 mécanismes distincts :

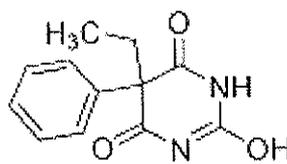
- En modulant certains canaux ioniques potentiels-dépendants :  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  ;
- En augmentant l'inhibition de la neurotransmission médiée par l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) ;
- En inhibant les effets excitateurs de la neurotransmission glutamatergique.

On distingue les antiépileptiques conventionnels ou de « première génération » regroupant, entre autres, le phénobarbital et la phénytoïne ; et les nouveaux antiépileptiques dits de « deuxième génération » comprenant, entre autres, la lamotrigine.

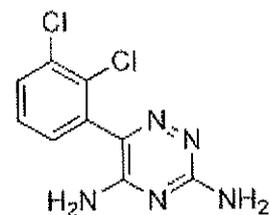
Ces 3 molécules, phénobarbital (Gardéna<sup>®</sup>), éthotoïne (Péganone<sup>®</sup>, commercialisée exclusivement aux Etats-Unis et de structure très proche de celle de la phénytoïne) et lamotrigine (Lamictal<sup>®</sup>), ont été choisies du fait de leurs pKa différents (acide, neutre et basique) et de leurs Kp similaires. Les caractéristiques pharmacocinétiques de ces trois molécules sont présentées dans le tableau 2.



**Ethotoïne (Péganone<sup>®</sup>)**



**Phénobarbital (Gardéna<sup>®</sup>)**



**Lamotrigine (Lamictal<sup>®</sup>)**

**Tableau 2 : Caractéristiques pharmacocinétiques des antiépileptiques**

Molécule	pKa	Biodisp. (%)	Doses therap (mg/kg) quotidienne	Concentrations thérapeutiques mg/L	Cmax mg/L	Tmax (h)	Vd (L/kg)	Lpp (%)	Métabolisme	½ vie d'élimination (h)	Elimination	Cl plasm. ml/min/kg	Forme injectable	DL50 chez rat (mg/kg)
Lamotrigine (Lamictal®)	5,5	97,6 ± 4,8	50 mg/70 kg soit 0,7 mg/kg en instauration qd asso avec phénobarbital	1 à 4 mg/L Toxicité : > 15 mg/L Toxicité sévère : > 30 mg/L	2,5 ± 0,4	2,2 ± 1,2	0,87 à 1,2	55	Dérivés glucuronoo-conjugués	24 à 36 réduite à 14h si asso avec phénytoïne	Rénale à 98%	0,38 à 0,61	Non	250
Phénobarbital (Gardéna®)	7,2	100 ± 11	1 mg/kg	10 à 35 15	13,1 ± 4,5	2 à 4	0,54 ± 0,03	40 à 60	Inchangé mais aussi dérivés hydroxylés inactifs puis glucuro ou sulfocconjugués	50 à 140	Rénale	0,062 ± 0,013	Oui	162 ± 14
Ethotoïne (Péganone® USA)	8,5		2 à 3 g/70 kg soit 28 à 49 mg/kg	15 à 50 mg/L	50				N-diéthyl et p-hydroxy éthotoïne, 5 phenylhydantoïne	3 à 9	Hépatique		Non	
Phénytoïne® (Dilantin®)	8,3	90 ± 43				3 à 12	0,64 ± 0,04	89 ± 23		6 à 24				

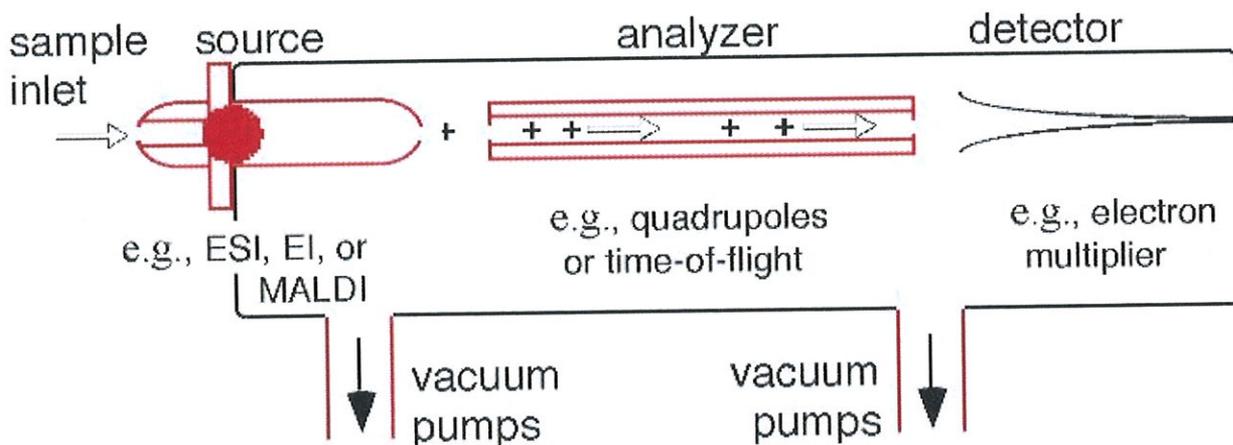
① La phénytoïne et l'éthotoïne sont 2 molécules de structure très proche. Nous nous sommes basés sur les données pharmacocinétiques de la phénytoïne lorsque nous ne disposons pas de celles de l'éthotoïne. Le rapport plasma/sang total n'a pas été présenté dans ce tableau car il n'était disponible pour aucune des 3 molécules présentées.

## IV. QUELQUES DONNEES SUR LE TYPE DE SPECTROMETRE DE MASSE UTILISE

Pour réaliser nos analyses, nous avons choisi la chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse API 100 équipé d'une source de type electrospray (Applied-Biosystems/Sciex, Canada) dont nous allons détailler le fonctionnement et les différentes parties [27].

La nébulisation et l'ionisation de la phase mobile sont effectuées simultanément, par application d'un champ électrique intense entre l'aiguille de nébulisation et le corps de la source [12].

Les ions sont produits dans la source d'ionisation en induisant la perte ou le gain d'une charge (par exemple éjection d'électron, protonation ou déprotonation).



**Figure 1 :** Différents composants d'un spectromètre de masse

L'ionisation electrospray (ESI) est une technique qui a été développée dans le milieu des années 80.

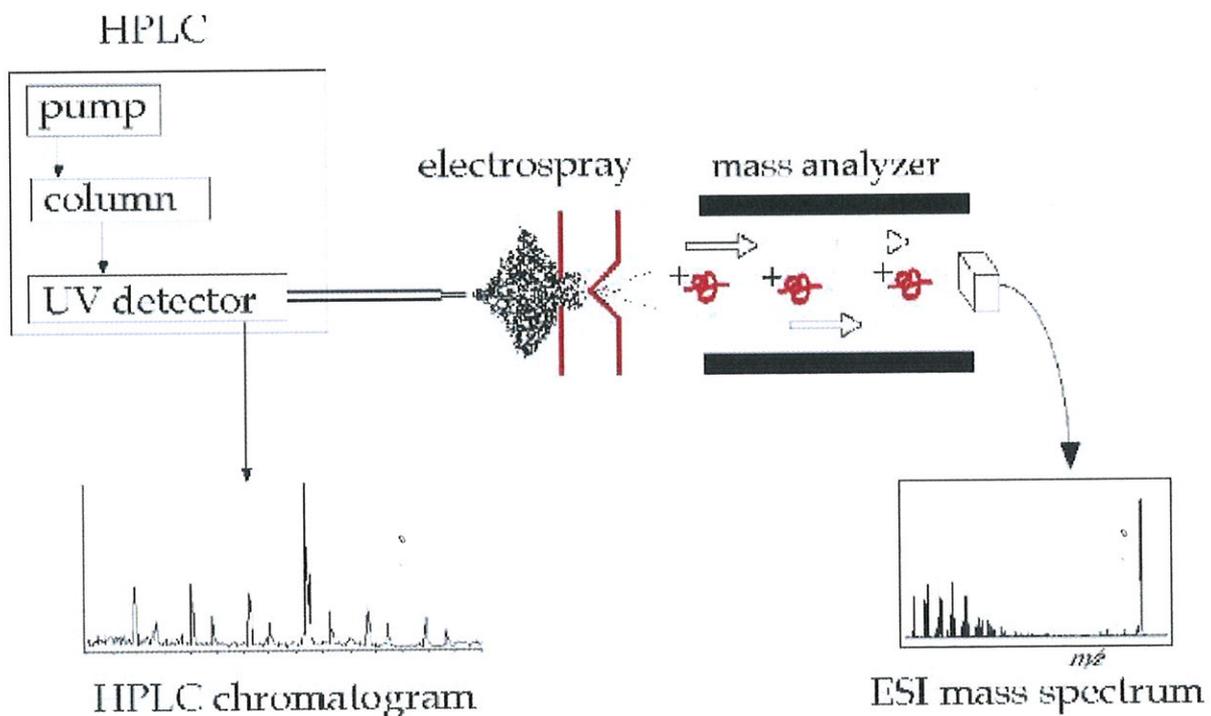
La désolvatation des ions dans la source est assistée par un courant de gaz (air ou azote). Les gouttelettes de phase mobile ionisée s'évaporent progressivement pendant le trajet dans la source, conduisant à une augmentation de la densité des charges à leur surface.

Les forces électrostatiques de surface finissent par les faire exploser. La répulsion mutuelle entre ces gouttelettes chargées est si grande qu'elle excède les forces de tension superficielle et les ions commencent à se décrocher des gouttelettes. Cela a pour conséquence la production d'ions positifs, négatifs ou polyatomiques.

Les ions d'une seule polarité sont extraits du spray et électrostatiquement dirigés dans l'analyseur de masse. Le nombre de charges retenu par un analyte peut dépendre de facteurs tels que la composition et le pH du solvant aussi bien que la nature chimique de l'échantillon. Pour de petites molécules (<2000 Daltons), ESI produit typiquement de simples ions ou des ions doublement chargés alors que pour de grosses molécules (>2000 Daltons), cette technique ESI provoque typiquement une série d'espèces à charges multiples.

Puisque les spectromètres de masse mesurent le rapport masse/charge ( $m/z$ ), le spectre de masse résultant contient des pics multiples correspondant aux différents états de charge.

L'ESI couplée à la spectrométrie de masse génère des ions directement à partir d'une solution (habituellement un solvant aqueux ou aqueux/organique). Par conséquent, ce dispositif peut être utilisé comme détecteur pour la chromatographie liquide haute performance (CLHP).



**Figure 2 :** Chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse équipé d'une source de type electrospray

Juste après l'interface d'ionisation, les ions de la phase gazeuse pénètrent dans l'analyseur de masse composé d'un quadripôle. Ce système permet la séparation des ions en fonction du rapport masse/charge ( $m/z$ ).

Le quadripôle repose sur l'assemblage de quatre barreaux parallèles traversés par un courant continu et un potentiel de radiofréquences superposés. A l'aide d'un champ de radiofréquences pré-sélectionnées l'appareil balaie toute une gamme de masses [24, 3, 16, 12].

Au total, les analyseurs de masse quadripolaires sont les spectromètres de masse les plus communs aujourd'hui. Ils présentent trois avantages par rapport aux anciens systèmes de spectrométrie de masse de type magnétique :

- ils tolèrent des vides relativement faibles ( $\sim 5 \times 10^{-5}$  torr), qui les rendent bien adaptés à l'ionisation electrospray puisque les ions sont produits dans des conditions de pression atmosphérique.
- les quadripôles sont maintenant capables d'analyser des rapports m/z de l'ordre de 3000 ; l'ionisation electrospray des protéines et d'autres biomolécules produit généralement une distribution de charge avec un rapport m/z au-dessous de 3000.
- le prix modéré des spectromètres de masse quadripolaires les rend attrayants en tant qu'analyseurs pour l'ionisation electrospray.

## **B. MATERIELS ET METHODES**

### **I. PROTOCOLE D'EXPERIMENTATION ANIMALE**

#### **I.1. Modèle animal et conditions expérimentales**

18 lapins mâles (Elevage IVALDI, SAINT-MAXIMIN, France), âgés de douze semaines et d'un poids moyen de 2 kg ont été utilisés lors de l'expérimentation. Dès leur arrivée au Centre de Formation et de Recherches Expérimentales Médico-Chirurgicales de la Faculté de Médecine de Marseille, ils ont été répartis de manière aléatoire dans des cages individuelles en inox, dans des conditions de stabulation strictement contrôlées (température de 22 +/- 2°C, hygrométrie de 55 +/- 5%, eau et nourriture *ad libitum*). Ces expérimentations ont été approuvées par la Commission d'Ethique Animale de la Faculté de Médecine de Marseille (n°28/02).

#### **I.2. Conditions d'administration des antiépileptiques**

##### **I.2.1. Préparation de la solution de lamotrigine**

###### ***I.2.1.1 Problèmes rencontrés***

- Le coût de la substance pure (poudre) de lamotrigine est élevé.
- La lamotrigine est peu ou pas soluble dans l'eau.
- Nous avons été également confrontés à un problème de re-précipitation de la substance au bout de quelques heures après sa mise en solution.

###### ***I.2.1.2. Résolution des problèmes***

- Nous avons choisi d'utiliser des comprimés de LAMICTAL® dosés à 100mg (spécialité pharmaceutique de lamotrigine commercialisée en France).
- L'acidification de la solution à pH4 avec de l'acide citrique 1M permet une solubilisation plus importante de la lamotrigine.

- Une fois la solution prête, la laisser reposer pendant 24h (afin que les excipients re-précipitent) puis récupérer le surnageant.

## **I.2.2. Préparation de la solution d'éthotoïne**

### ***I.2.2.1 Problèmes rencontrés***

- L'éthotoïne est une molécule non commercialisée en France, mais qui existe sous le nom de spécialité de PEGANONE® aux Etats Unis.
- L'éthotoïne est peu ou pas soluble dans l'eau.

### ***I.2.2.2. Résolution des problèmes***

- Après plusieurs échanges de courriers avec le laboratoire « Ovation Pharmaceuticals » aux Etats Unis nous avons réussi à nous procurer 80 g de substance pure d'éthotoïne.
- L'acidification de la solution à pH4 avec de l'acide citrique 1M permet une solubilisation plus importante de l'éthotoïne.

## **I.2.3. Préparation de la solution de phénobarbital**

Le phénobarbital est déjà commercialisé en France sous forme injectable sous le nom de spécialité : GARDENAL® dosée à 20 mg/mL.

## **I.2.4. Préparation des solutions injectables finales**

Après avoir rencontré divers problèmes tels que la difficulté de solubiliser la lamotrigine et l'éthotoïne en milieu aqueux ou l'incompatibilité physico-chimique de mise en solution conjointe de la solution injectable de phénobarbital et des deux autres substances, nous avons décidé de faire 2 injections différentes.

Après toute une série d'essais, la solution contenant la lamotrigine et l'éthotoïne a été préparée de la manière suivante :

## Solution de lamotrigine

- 40 cp de LAMICTAL® (lamotrigine) dosés à 100 mg dans 200 mL de sérum physiologique → concentration théorique : 20 g/L
- acidification du milieu → pH4 avec de l'acide citrique pour solubiliser la lamotrigine
- agitation, filtration sur papier et repos pendant 24 h
- centrifugation, récupération du surnageant limpide → obtention de la solution A

## Solution d'éthotoïne

- 2 g de poudre dans 200 mL de sérum physiologique
- filtration sur pores 1 µm → obtention de la solution B

Après mélange des solutions A et B et après filtration stérilisante (sur pores 0,22 µm sous hotte à flux laminaire), nous avons obtenu une préparation injectable titrant 2,2 mg/L de lamotrigine et 1,9 mg/L d'éthotoïne. Toutes ces solutions ont été préparées dans du sérum physiologique, conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF).

Les concentrations ont été déterminées par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un détecteur UV à barrettes de diode (CLHP/UV-BD) et la stabilité de cette solution finale a été vérifiée sur une période de 30 jours à température ambiante par la même méthode analytique.

### 1.2.5. Administration des solutions

Les doses administrées ont été déterminées en fonction des critères suivants :

- nécessité d'utiliser des **doses non létales** afin de pouvoir faire plusieurs injections pour permettre la distribution des antiépileptiques vers les différents tissus et les organes ;
- nécessité d'obtenir des **concentrations mesurables** dans les différents milieux biologiques.

En l'absence de données dans la littérature concernant l'administration d'antiépileptiques chez le lapin, les doses ont été déterminées à partir d'administrations successives de doses-tests chez un lapin, suivies de dosages. Les doses retenues sont les suivantes :

- Phénobarbital : 0,5 mL/kg (soit une concentration de 5 mg/kg) après dissolution dans du sérum physiologique ;
  
- Solution lamotrigine/éthotoïne : 2 mL/kg (soit des concentrations respectives de 4,4 mg/kg et 3,8 mg/kg).

Ces solutions sont administrées par voie intraveineuse lente (IVL) dans la veine de l'oreille. Pour chaque animal, trois injections sont effectuées pour permettre une distribution complète.

#### **1.2.6. Euthanasie**

Les animaux sont euthanasiés 1 heure après la dernière injection par une solution de kétamine et de chlorpromazine aux posologies respectives de 200 et 4 mg/kg en IVL dans la veine de l'oreille controlatérale. Ce mode d'euthanasie entraîne le décès par arrêt respiratoire. Ces deux substances ne présentent pas d'interactions pharmacocinétiques avec les antiépileptiques utilisés.

### I.3. Protocole expérimental :

Le protocole, défini au préalable, prévoyait 3 séries de 6 lapins chacune à raison de 4 jours d'expérimentation par série (J0 à J3). Chaque série a été organisée selon la séquence présentée dans le tableau 3 ci-après :

**Tableau 3** : Plan des expérimentations réalisées chez les lapins

	Injections	Euthanasie	Dissections
J0	8 h 00 et 15 h 00		
J1	8 h 00	9 h 00	T0 : 9 h 00 T2 : 11 h 00 T6 : 15 h 00 T12 : 21 h 00
J2			T24 : 9 h 00
J3			T48 : 9 h 00

Pour chaque temps *post-mortem* (0, 2, 6, 12, 24, 48 heures), 3 lapins sont disséqués (un lors de chaque série). Le tableau 4 présente les différents prélèvements ainsi que leur contenant. Tous ces prélèvements sont immédiatement congelés à -20°C jusqu'à réalisation des analyses.

**Tableau 4 : Différents prélèvements effectués sur les lapins ainsi que leur contenant et leur identification**

	Milieu	Code	Contenant
1	Sang cardiaque droit	SCD	1 tube hépariné
2	Sang cardiaque gauche	SCG	1 tube hépariné
3	Sang périphérique	SP	1 tube hépariné
4	Contenu gastrique	CG	1 tube sec
5	Bile	BL	1 tube sec
6	Urines	UR	1 tube sec
7	Humeur vitrée	HV	2 tubes secs
8	Myocarde droit	MYD	1 tube sec
9	Myocarde gauche	MYG	1 tube sec
10	Apex pulmonaire droit	APD	1 tube sec
11	Base pulmonaire droite	BPD	1 tube sec
12	Apex pulmonaire gauche	APG	1 tube sec
13	Base pulmonaire gauche	BPG	1 tube sec
14	Lobe hépatique droit	LHD	1 tube sec
15	Lobe hépatique gauche	LHG	1 tube sec
16	Cerveau	CE	1 tube sec
17	Rein droit	RD	1 tube sec
18	Rein gauche	RG	1 tube sec
19	Diaphragme	DIA	1 tube sec
20	Iliopsoas	IPL	1 tube sec

\*Les 2 prélèvements droit et gauche sont effectués séparément pour éviter toute contamination éventuelle en cas d'effraction vasculaire.

## I.4. Dissections

Immédiatement après l'euthanasie, la paroi thoraco-abdominale et la nuque de l'animal sont rasées afin d'éviter toute contamination des différents prélèvements par des poils. Le méat urétral est clampé afin d'éviter toute fuite d'urine lors du relâchement *post-mortem* du sphincter urétral.

Les animaux sont ensuite placés en décubitus dorsal dans une boîte en carton et maintenus dans un local dont la température est contrôlée à 20 °C.

Les dissections sont effectuées dans le Service de Médecine Légale de Marseille aux horaires indiqués sur le protocole expérimental [Tableau 3].

Le mode de dissection a été défini de façon à effectuer des prélèvements à visée toxicologique selon des procédures similaires à celles utilisées lors des autopsies médico-légales.

Après avoir incisé la paroi abdominale et récliné les viscères abdominaux, l'urine est prélevée à partir d'une seringue, puis le sang périphérique au niveau de la veine cave inférieure préalablement clampée.

Ensuite, sont prélevés dans l'ordre : les reins, le contenu gastrique, la bile et la vésicule biliaire, le foie (lobes droit et gauche), les poumons (apex et bases droits et gauches), le diaphragme, le sang cardiaque gauche et droit, le myocarde droit et gauche, le muscle de la cuisse droite et gauche (iliopsoas), l'humeur vitrée droite et gauche, puis le cerveau.

Les prélèvements sanguins sont conservés dans des tubes héparinés afin d'éviter tout phénomène de coagulation *in vitro*. A l'issue de l'expérimentation, les carcasses des animaux sont éliminées par incinération.

## **II. METHODES ANALYTIQUES**

Tous les dosages ont été effectués dans le Service de Pharmacologie-Toxicologie du CHU de Limoges.

### **II.1. Essais et contrôles des solutions pures (éthotoïne et lamotrigine) : appareillage de CLHP/UV-BD et conditions expérimentales**



*Photo 1 : Appareillage de CLHP/UV-BD*

Le système est constitué de deux pompes chromatographiques LC-10ADVP, d'un passeur d'échantillon SIL-10AXL, et d'un détecteur à barrette de diodes SPD-M10AVP (Shimadzu, Touzart et Matignon, France). Le système d'acquisition et de traitement des données est constitué d'un ordinateur Optiplex GS (DELL, France) et d'un logiciel Shimadzu CLASS [Photo 1].

Les phases mobiles, constituées d'un mélange de dihydrogénophosphate de potassium 0,025 M à pH 4,6 (phase A) et d'acétonitrile/eau (90/10 ; v/v) (phase B), dégazées à l'hélium, sont délivrées à un débit de 1,3 ml/min, selon le gradient suivant en phase B : 10 % pendant 2 min, de 10 à 45 % en 18 min, de 45 à 60 % en 5 min, 60 % pendant 7 min.

Après ajout d'une quantité connue d'étalon interne (méphénytoïne), un volume de 40 µL de solution à tester est injecté dans le chromatographe.

La séparation chromatographique est réalisée à température ambiante à l'aide d'une colonne Spherisorb® C18, 5 µm, 250 x 4,6 mm (Interchrom, France). Le spectre UV est enregistré de 200 à 400 nm en continu et la longueur d'onde de quantification est de 320 nm. Les quantifications sont réalisées à l'aide de gamme de calibrage pour chacun des 2 antiépileptiques.

## **II.2. Dosages dans les prélèvements biologiques**

### **II.2.1. Extraction**

Après avoir testé 3 méthodes d'extraction (2 liquide/liquide et une solide/liquide) notre choix s'est orienté vers une extraction solide/liquide, technique permettant d'obtenir les meilleurs rendements d'extraction.

Des solutions mères de chaque antiépileptique et de chaque étalon interne (EI) ont été préparées dans du méthanol à une concentration de 1 g/L.

Les dilutions au 1/10 et au 1/100 des solutions mères dans la phase mobile (formiate d'ammonium 0,002 M ajusté à pH 3 + acétonitrile 85/15 v/v) permettent l'obtention de 2 solutions filles aux concentrations de 100 mg/L et 10 mg/L comprenant les 3 antiépileptiques.

Enfin, une dilution au 1/100 des solutions mères d'étalons internes permet d'obtenir un mélange à la concentration de 10 mg/L de méphénytoïne et de phénobarbital D5.

Les antiépileptiques (prise d'essai de 1 mL) sont extraits en milieu acide (HCl 0,1 N) sur des Cartouches SPE (Solid Phase Extraction) OASIS® MCX 3mL (Waters) préalablement conditionnées avec 1 mL de méthanol puis 1 mL d'eau désionisée.

Par la suite, le protocole d'extraction est le suivant [Tableau 5] :

**Tableau 5 : Protocole d'extraction solide/liquide des antiépileptiques en milieu acide**

	Gamme d'étalonnage (mg/L)								Dosage X
	0	0,1	0,5	1	5	10	20	50	
Solution fille d'antiépileptiques à 100 mg/L (µL)					50	100	200	500	
Solution fille d'antiépileptiques à 10 mg/L (µL)		10	50	100					
Matrice vierge (µL)	1000	990	950	900	950	900	800	500	
Solution fille d'EI à 10 mg/L (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Matrice à tester (mL)									1
Eau purifiée (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Les tubes sont bouchés, vortexés puis centrifugés 10 min à 3000 t/min.

Les surnageants sont ensuite déposés sur les Cartouches OASIS® MCX (préalablement conditionnées), rincés par 1 mL d'acide chlorhydrique (HCl) 0,01 N puis séchés sous vide pendant 15 min.

Les molécules retenues sur les cartouches sont éluées à l'aide d'un mélange Méthanol/Ammoniaque 28 % (98/2, v/v). Ces extraits sont ensuite évaporés à sec sur thermostat à bloc métallique avec rampe d'évaporation (Toulemonde).

Enfin, les résidus secs sont repris par 100 µL de phase de reprise (Formiate d'ammonium 0,002 M ajusté à pH 3 + acétonitrile 85/15 v/v).

Après agitation et centrifugation, les extraits sont prélevés et analysés par une technique de chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse API 100 équipé d'une source de type electrospray (LC-ES-MS).

## II.2.2. Appareillage de CL-ES-SM et conditions expérimentales

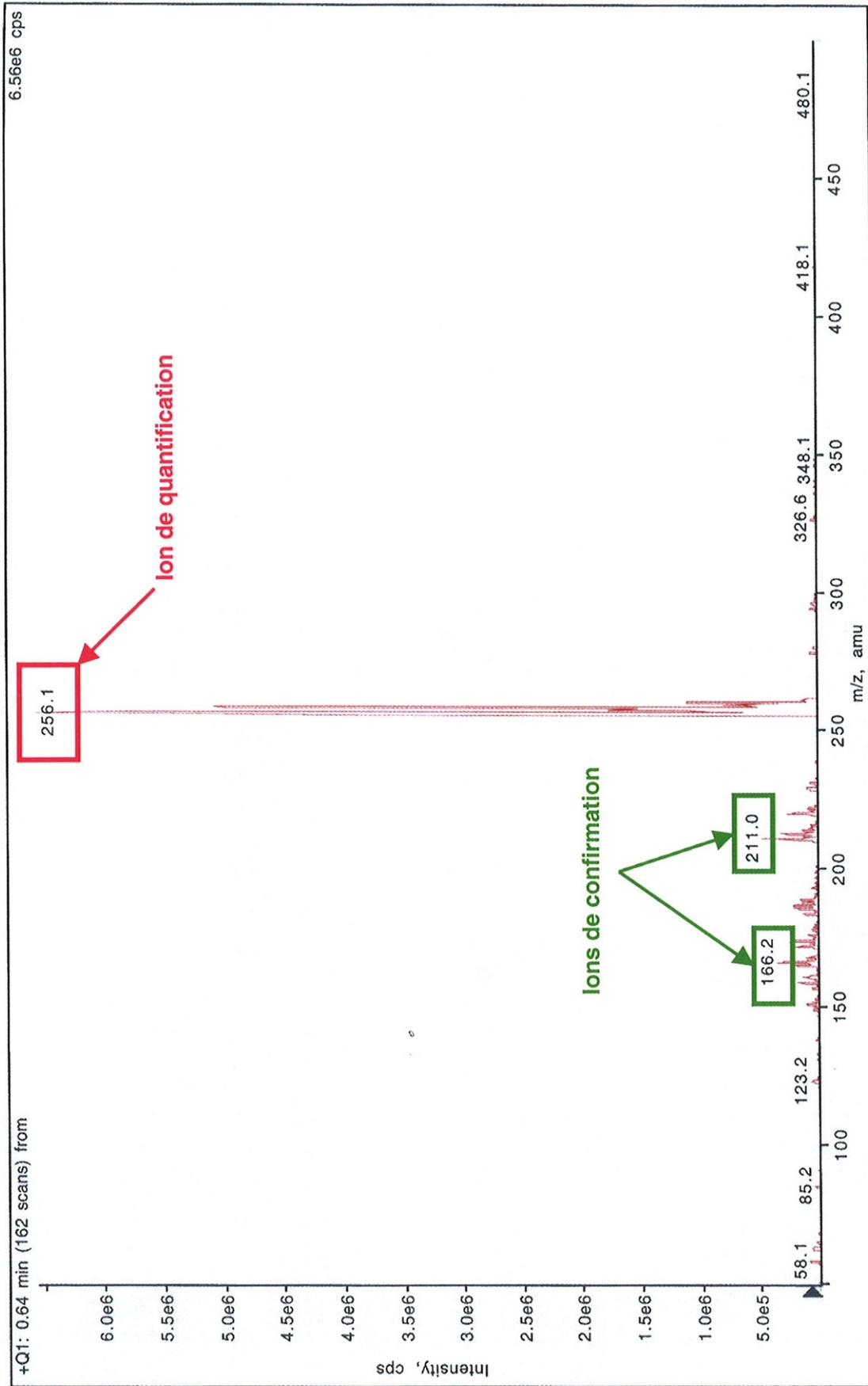


*Photo 2 : Appareillage de CL-ES-SM*

Nous avons choisi la CL-SM pour des raisons de sensibilité et de spécificité. Cette technique permet d'aborder l'analyse dans des matrices dites « difficiles » telles que le sang total et les organes.

Afin de déterminer pour chaque molécule les différents ions de quantification et de confirmation sur lesquels la méthode chromatographique repose, nous avons infusé chaque solution séparément (à la concentration de 10 mg/L) en les injectant directement dans le spectromètre API 100 équipé d'une source de type electrospray (Applied-Biosystems/Sciex, Canada). Chaque solution a été infusée en modes fragmentométriques positif et négatif après dissociation induite dans la source afin de définir celui qui correspond le mieux aux différentes substances.

En finalité, nous avons choisi le mode fragmentométrique positif pour la lamotrigine, l'éthotoïne et leur étalon interne, la méphénytoïne [Figures 3 et 4], et le mode négatif pour le phénobarbital [Figure 5] et son étalon interne, le phénobarbital D5. Pour chaque molécule, un ion de quantification et deux ions de confirmation ont donc été sélectionnés [Tableau 6].



**Figure 3** : Spectre de masse de la lamotrigine en mode fragmentométrique positif

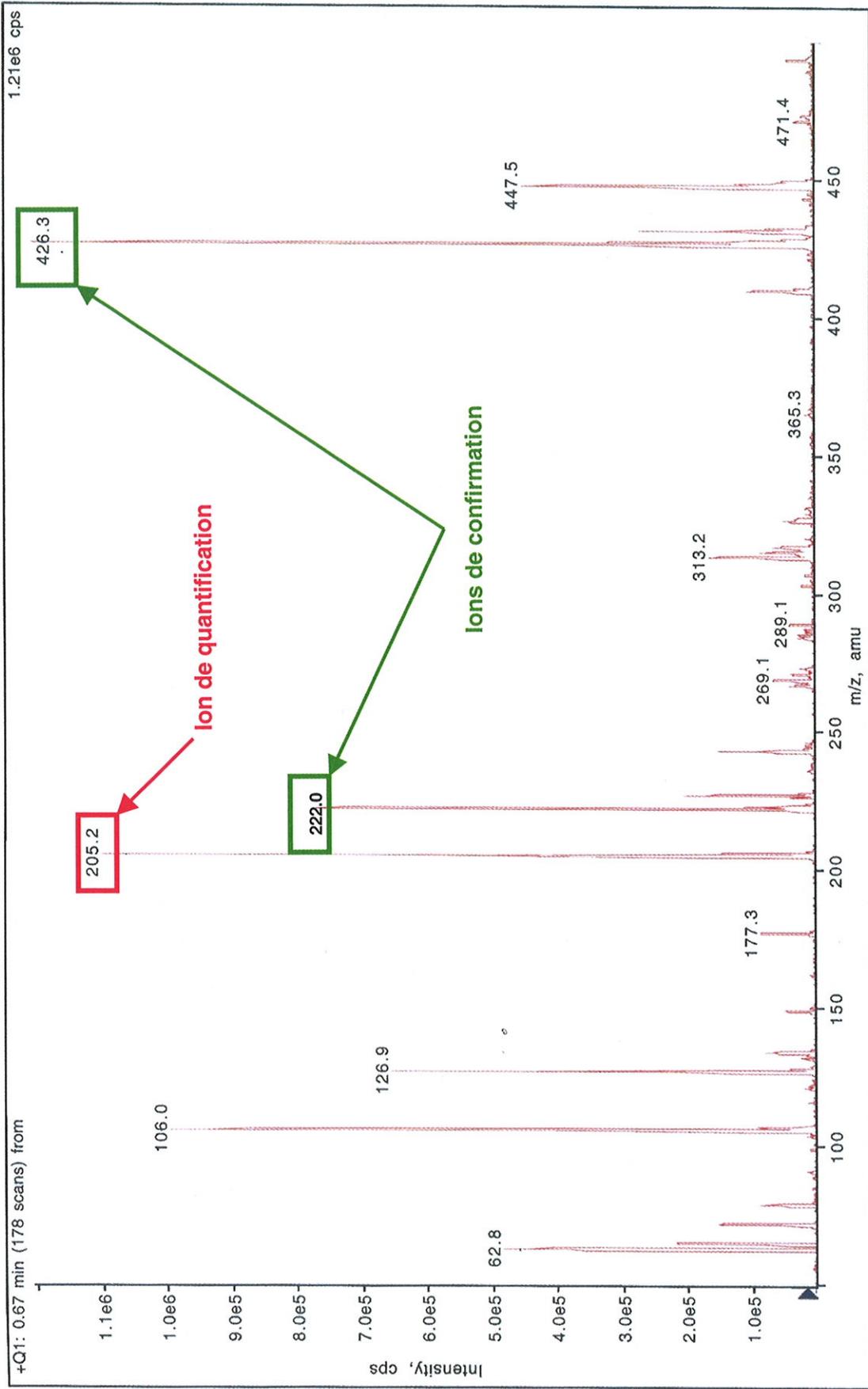
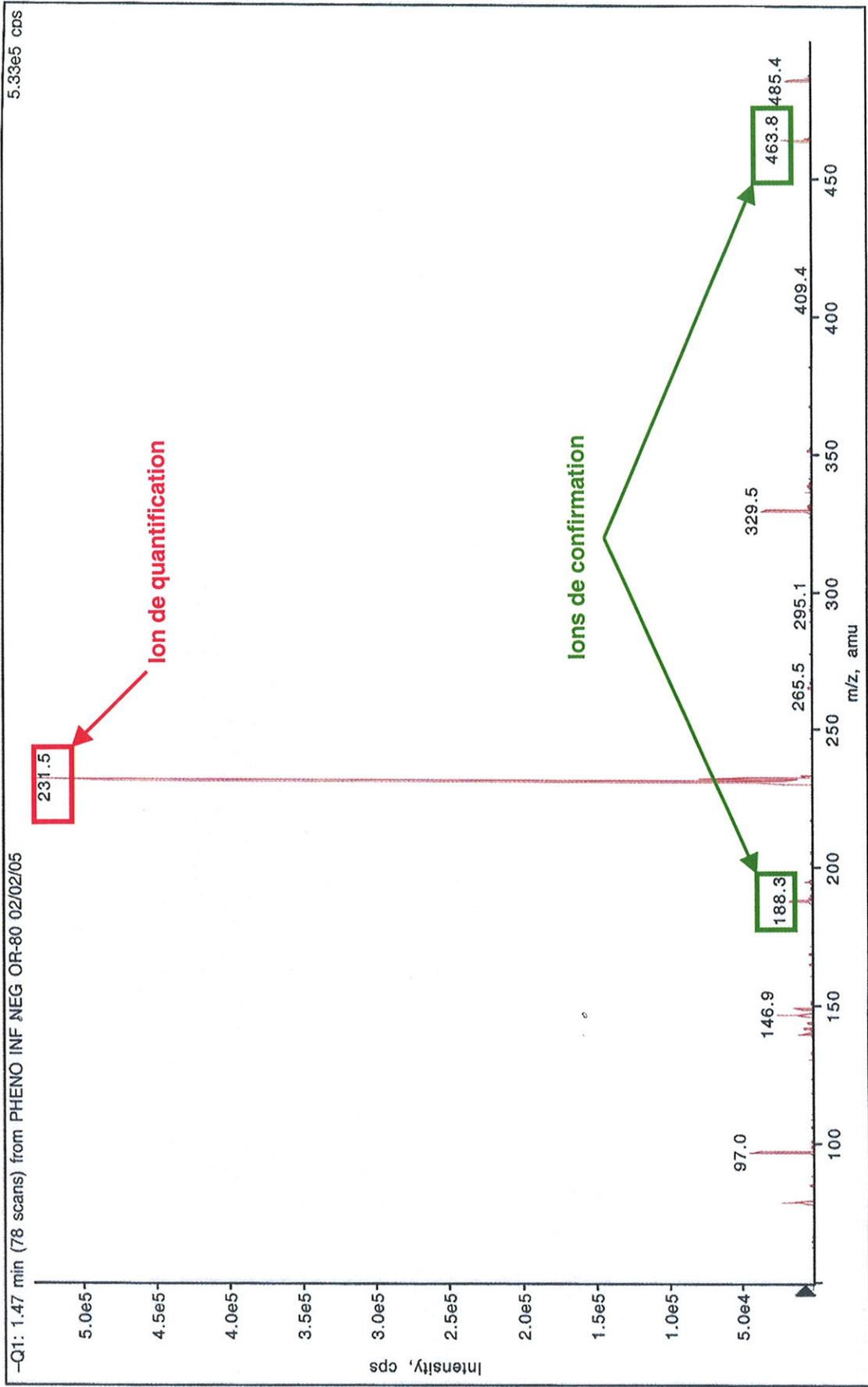


Figure 4 : Spectre de masse de l'éthotoïne en mode fragmentométrique positif



**Figure 5 :** Spectre de masse du phénobarbital en mode fragmentométrique négatif

**Tableau 6 :** Ions de quantification et ions de confirmation sélectionnés pour chacune des molécules, à l'aide d'un spectromètre API 100 équipé d'une source de type electrospray

Produits	Ion de quantification (m/z)	Ion de confirmation (m/z)
- EI : Phénobarbital D5*	236	
- EI : Méphénytoïne	219	
- Phénobarbital	232	188/463
- Lamotrigine	256	166/211
- Ethotoïne	204	222/426

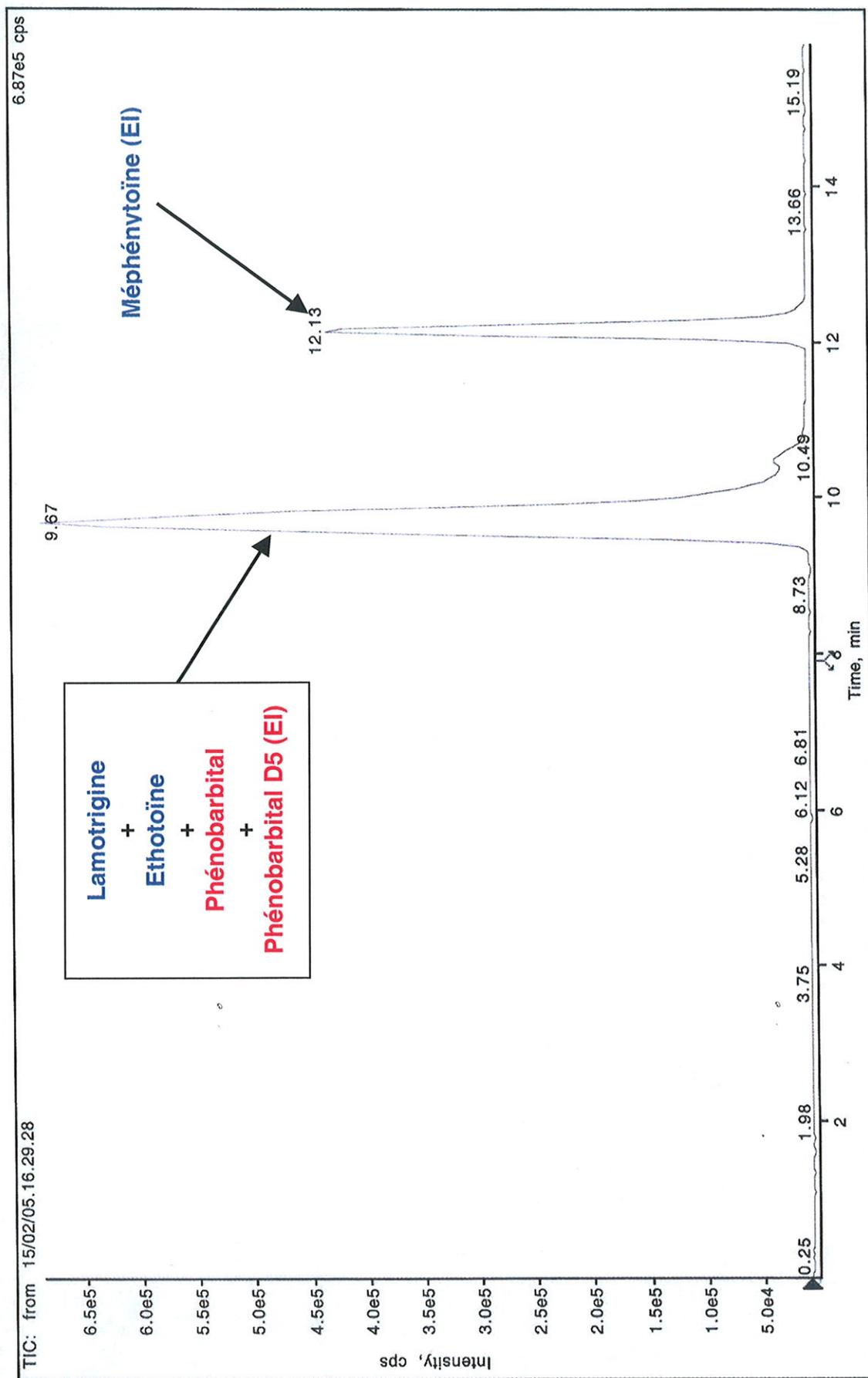
\* phénobarbital dont 5 atomes d'hydrogène ont été remplacés par des atomes de Deutérium.

Ensuite, nous avons optimisé la méthode chromatographique de façon à obtenir une séparation convenable de chaque substance tout en respectant une durée d'analyse acceptable.

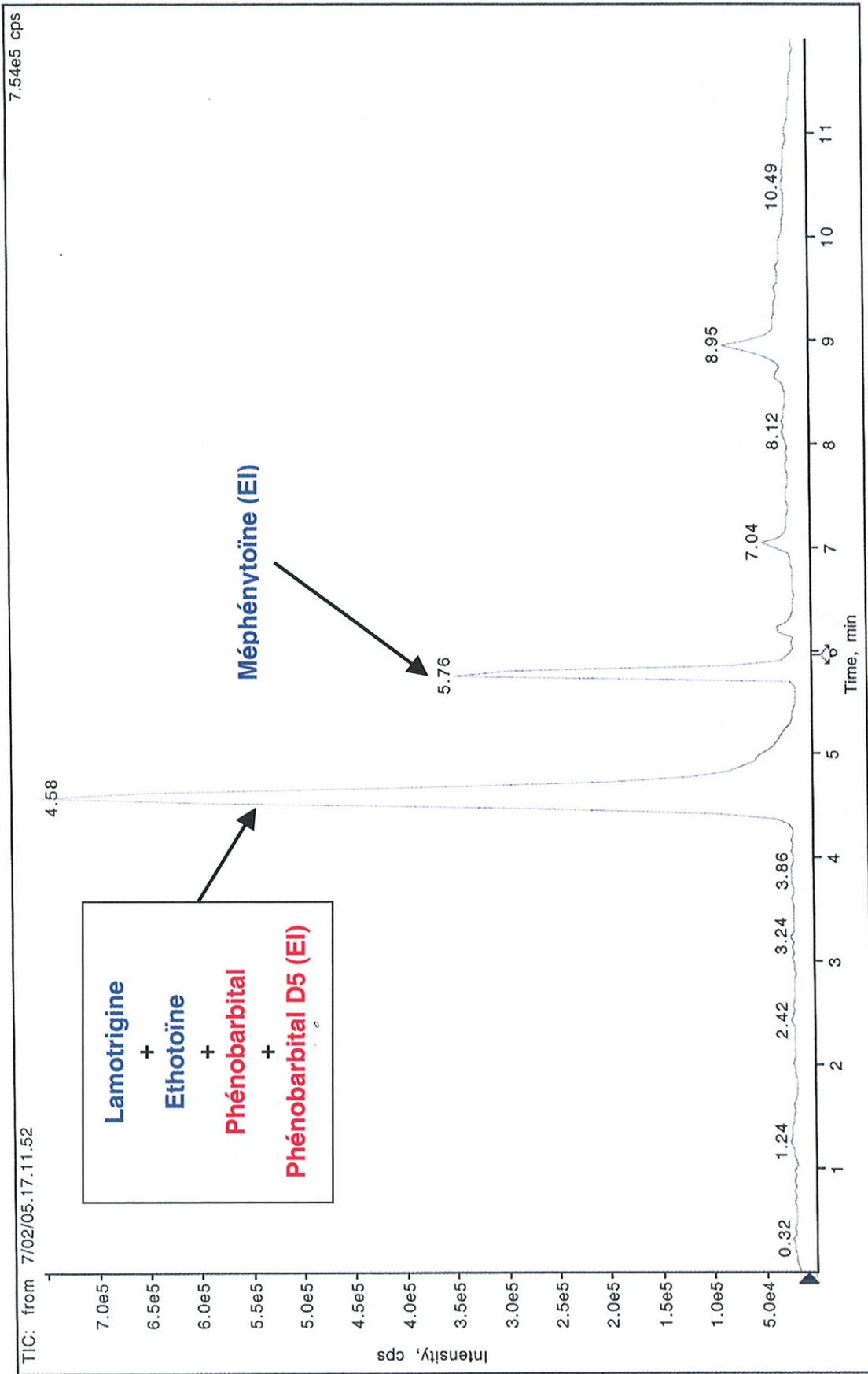
Nous avons tout d'abord cherché les meilleures phases mobiles que nous pouvions utiliser pour séparer les substances dans la colonne. Deux types de phases ont été testés :

- méthanol/formiate d'ammonium 2 mM, pH 3 (90/10 ; v/v) [Figure 6]
- acétonitrile/formiate d'ammonium 2 mM, pH 3 (90/10 ; v/v) [Figure 7]

En parallèle, nous avons également essayé de déterminer le gradient permettant la séparation de tous les composés en un temps minimal d'analyse. Ainsi, après avoir testé 48 gradients différents nous avons pu obtenir une méthode chromatographique convenable nous permettant de séparer tous nos composés.



**Figure 6 :** Chromatogramme obtenu avec une phase mobile composée de méthanol/formiate d'ammonium 2 mM, pH 3 (90/10 ; v/v)



**Figure 7** : Chromatogramme obtenu avec une phase mobile composée d'acétonitrile/formiate d'ammonium 2 mM, pH 3 (90/10 ; v/v)

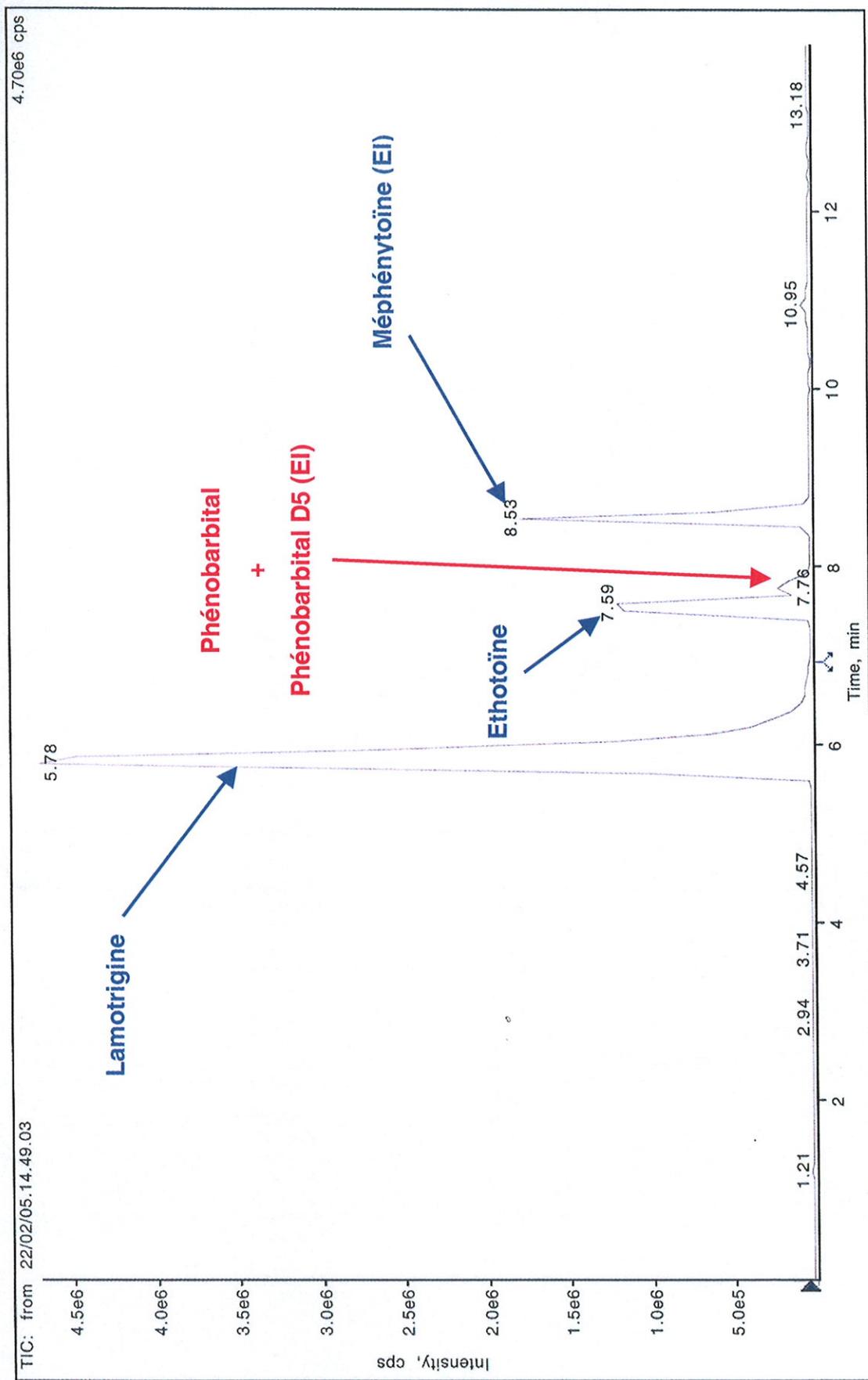
Finally, the definitive chromatographic method [Figure 8] is the following : after injection of 2  $\mu$ L of biological extract by an auto-injector 200 LC (Perkin-Elmer), the chromatographic separation is performed at ambient temperature with the help of a column X terra<sup>®</sup> MS C18 ; 3,5  $\mu$ m, 10x100 mm (Waters) and of mobile phases composed of an ammonium formate buffer 2 mM, pH 3 (phase A) and of acetonitrile/ammonium formate 2 mM, pH 3 (90/10 ; v/v) (phase B) delivered at a flow rate of 50  $\mu$ L/min, with the help of pumps Micro 200 LC (Perkin-Elmer, France) according to the gradient in phase B presented in table 7 below :

**Tableau 7 :** Gradient des phases liquides permettant la séparation chromatographique des 3 antiépileptiques

Start time (min)	Duration time (min)	Flow rate ( $\mu$ L/min)	Gradient profile	Solvant A (%)	Solvant B (%)
-1,00	1,00	50,00	0,00	85,00	15,00
0,00	2,00	50,00	1,00	85,00	15,00
2,00	1,00	50,00	1,00	60,00	40,00
3,00	5,00	50,00	1,00	55,00	45,00
8,00	1,00	50,00	1,00	10,00	90,00
9,00	1,00	50,00	1,00	85,00	15,00
10,00	4,00	50,00	1,00	85,00	15,00

The acquisition and the treatment of the data are performed by a micro-computer Macintosh Power PC 8100 equipped with a software SCIEX-Masschrom<sup>®</sup> 1.1.0.

The quantification was performed after treatment of the calibration points by quadratic regression.



**Figure 8** : Chromatogramme obtenu après optimisation du gradient avec une phase mobile composée d'acétonitrile/formiate d'ammonium 2 mM, pH 3 (90/10 ; v/v)

### II.3. Validation analytique

La méthode de dosage a été validée dans chaque type de matrice [Tableau 8].

**Le domaine de linéarité** a été évalué à l'aide de 5 gammes d'étalonnage préparées par charge de matrices vierges à différents niveaux de concentration, qui ont été extraites et analysées quotidiennement pendant 5 jours. L'équation de régression ainsi que les coefficients de corrélation ( $r^2$ ) ont été déterminés pour chaque droite d'étalonnage.

En dehors d'un blanc, les gammes comprenaient des niveaux de concentration différents en fonction du milieu étudié.

La linéarité a été jugée acceptable pour un coefficient de corrélation supérieur à 0,998.

**La limite de quantification (LDQ)** : c'est la plus petite quantité pouvant être mesurée dans les conditions expérimentales décrites avec une fidélité et une exactitude définies. Ici, imprécision et inexactitude sont inférieures à 20 %.

**La limite de détection (LDD)** : c'est la plus petite quantité pouvant être détectée dans les conditions expérimentales décrites.

**La répétabilité** permet l'expression quantitative de la précision lorsque l'opérateur applique la technique sur le même spécimen, dans le même laboratoire, avec les mêmes appareils et les mêmes réactifs au cours de la même série d'analyses. Elle a été étudiée à 4 niveaux de concentrations par 4 extractions et analyses exécutées dans les mêmes conditions et le même jour.

**La reproductibilité** mesure la variabilité maximale des résultats et permet donc l'expression quantitative de la précision lorsque l'opérateur applique la technique sur le même spécimen, dans le même laboratoire, avec les mêmes appareils et les mêmes réactifs au cours d'analyses différentes. Elle a été réalisée à 4 niveaux de concentrations différents par 4 extractions et analyses exécutées dans les mêmes conditions à 4 jours différents.

La répétabilité et la reproductibilité ont été considérées comme acceptables pour un coefficient de variation (CV) inférieur à 20 %. Le CV est l'écart-type exprimé en pourcentage de la moyenne.

**L'exactitude** exprime l'étroitesse entre la valeur théorique et la valeur de concentration mesurée. Elle a été considérée comme acceptable pour un biais  $B < 15 \%$ .

$$B = [(concentration\ mesurée / concentration\ théorique) - 1] * 100$$

**Les rendements d'extraction** correspondent au rapport des signaux mesurés d'une part, à partir d'un échantillon chargé avec une quantité connue de la substance concernée, puis extrait et, d'autre part, à partir d'un échantillon vierge dont l'extrait est chargé avec une quantité connue et identique. Ces rendements ont été évalués pour 3 niveaux de concentration.

**Tableau 8 : Données de validation des dosages dans les différents milieux biologiques**

	Sang total			Urines, Humeur vitrée, Bile			Liquide gastrique		
	Lamotrigine	Phénobarbital	Ethotoïne	Lamotrigine	Phénobarbital	Ethotoïne	Lamotrigine	Phénobarbital	Ethotoïne
LDD (mg/L)	0,1	0,6	0,1	0,07	0,7	0,07	0,01	0,5	0,03
LDQ (mg/L)	0,5	1	0,5	0,1	1	0,1	0,1	1	0,1
CV LDQ (%)	10,05	6,19	2,16	5,41	8,61	1,88	10,36	12,78	3,19
Biais LDQ (%)	8,53	8,7	0,41	2,46	1,41	1,41	-9,12	2,56	4,54
Cmax de la gamme (mg/L)	20	50	20	10	50	10	5	50	5
CV au Cmax de la gamme (%)	11,54	2,18	7,35	3,88	3,42	2,56	10,11	10,21	0,68
Biais au Cmax de la gamme (%)	7,33	0,77	2,6	-0,53	-0,78	-0,29	-5,97	-3,17	0,38
Domaine de linéarité (mg/L)	0,5 à 20	1 à 50	0,5 à 20	0,1 à 10	1 à 50	0,1 à 10	0,1 à 5	1 à 50	0,1 à 5
Coefficient de corrélation	0,9996	0,9999	0,9998	0,9995	0,9998	0,9992	0,9992	0,9999	1,0000
Rdt ext à la LDQ (%)	57,5	78,7	50,9	99,8	74,4	80,6	80,2	86,8	78,6
Rdt ext au Cmax de la gamme (%)	59,4	87,9	97,5	78,4	90,4	81,5	84,4	66,5	68,5

## **C. RESULTATS ET DISCUSSION**

### **I. LAMOTRIGINE**

Le test de Kruskal-Wallis réalisé pour chaque milieu biologique ne met pas en évidence de variation significative des concentrations de lamotrigine dans le sang cardiaque droit ( $p < 0,24$ ), gauche ( $p < 0,86$ ), le sang périphérique ( $p < 0,86$ ), la bile ( $p < 0,11$ ), le liquide gastrique ( $p < 0,30$ ), les urines ( $p < 0,08$ ), l'humeur vitrée ( $p < 0,23$ ). L'analyse de variance à deux facteurs réalisée dans tous les milieux est en faveur d'une redistribution qui diffère selon la localisation (effet temps  $p < 0,96$  ; effet localisation  $p < 0,0001$  ; interaction milieu\*temps  $p < 0,12$ ). L'effet milieu est confirmé par le test de Friedman ( $p < 0,0001$ ), au contraire de l'effet temps.

A T0, les concentrations de lamotrigine les plus fortes sont relevées dans la bile, le liquide gastrique et les urines, et les plus faibles dans le sang et l'humeur vitrée [Figure 9].

Bien que non significative, la lamotrigine présente une augmentation dans le sang cardiaque droit entre la 24<sup>ème</sup> et la 48<sup>ème</sup> heure. L'hypothèse la plus probable est la redistribution depuis le parenchyme pulmonaire. Toutefois, l'étude de l'évolution des concentrations dans les poumons est nécessaire pour confirmer cette hypothèse. Une redistribution depuis le parenchyme hépatique vers le sang cardiaque droit est également envisageable. Par ailleurs, la diminution des concentrations en lamotrigine dans la bile entre la 24<sup>ème</sup> et la 48<sup>ème</sup> heure évoque une redistribution vers les structures anatomiques de voisinage, foie et veine cave inférieure en particulier. Cependant, ces valeurs de concentrations doivent être interprétées avec prudence, ces résultats n'ayant pas pu être vérifiés compte tenu des faibles volumes recueillis à ces temps tardifs.

Le sang cardiaque droit et la bile constituent les milieux où les concentrations de lamotrigine présentent les variations les plus importantes au cours du temps. L'interprétation des concentrations de lamotrigine dans le sang cardiaque droit est donc à éviter dans les expertises médico-légales quand une intoxication par les antiépileptiques est suspectée.

### **III. METHODOLOGIE STATISTIQUE**

L'évolution des concentrations des antiépileptiques au cours du temps a été analysée, dans un premier temps, séparément, dans chaque milieu biologique et pour chaque molécule, par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

Dans un second temps, afin d'étudier l'effet du temps simultanément dans les différents milieux biologiques, il a été appliqué des analyses de variance à deux facteurs, paramétrique et non paramétrique (test de Friedman), prenant en compte le facteur temps et le facteur milieu. Le test de Friedman étant *a priori* peu puissant compte tenu de la distribution des données (3 lapins par temps et 7 milieux biologiques), l'analyse de variance classique a, en effet, été réalisée de façon complémentaire. En parallèle, l'interaction milieu\*temps a été étudiée par une analyse de variance paramétrique à deux facteurs : un facteur milieu et un facteur temps, afin de voir si l'effet du temps diffère selon les milieux. L'interaction molécule\*temps a également été étudiée par une analyse de variance paramétrique à deux facteurs : un facteur molécule et un facteur temps pour déterminer si l'effet du temps diffère selon les molécules. Pour chacun des tests, le seuil de significativité adopté est :  $p < 0,05$ .

Ces tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Statview (Abacus concept, Berkeley, USA).

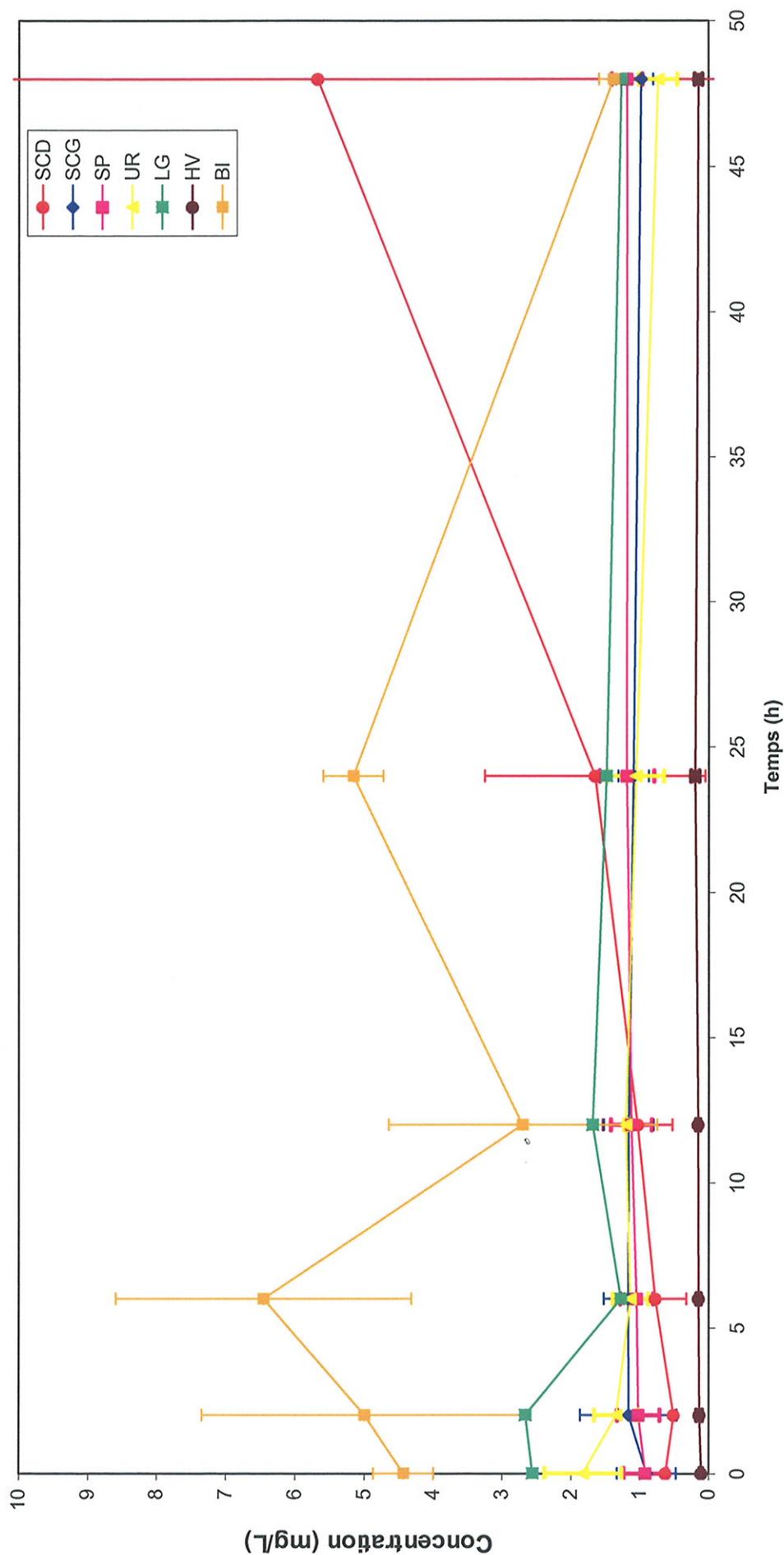


Figure 9 : Concentrations de LAMOTRIGINE dans les différents milieux biologiques

## II. ETHOTOÏNE

Le test de Kruskal-Wallis réalisé pour chaque milieu biologique ne met pas en évidence de variation significative des concentrations dans le sang cardiaque droit ( $p < 0,20$ ), gauche ( $p < 0,90$ ), le sang périphérique ( $p < 0,21$ ), la bile ( $p < 0,37$ ), le liquide gastrique ( $p < 0,34$ ), les urines ( $p < 0,41$ ), l'humeur vitrée ( $p < 0,13$ ). L'analyse de variance à deux facteurs (temps et milieu) conclue à un effet milieu ( $p < 0,0001$ ) significatif alors qu'une interaction milieu\*temps ( $p < 0,48$ ) et un effet temps ( $p < 0,88$ ) ne sont, quant à eux, pas significatifs. Le test de Friedman confirme l'effet milieu ( $p < 0,0001$ ).

A T0, les concentrations d'éthotoïne les plus fortes ont été relevées dans la bile et le sang et les plus faibles dans le liquide gastrique, les urines et l'humeur vitrée [Figure 10].

On observe, comme pour la lamotrigine, une augmentation non significative de la concentration en éthotoïne dans le sang cardiaque droit entre la 24<sup>ème</sup> et la 48<sup>ème</sup> heure, ainsi qu'une diminution non significative des concentrations dans la bile entre la 24<sup>ème</sup> et la 48<sup>ème</sup> heure. Cette augmentation des concentrations dans le sang cardiaque droit correspond très vraisemblablement au classique phénomène de redistribution des molécules basiques depuis le myocarde et/ou le parenchyme pulmonaire et/ou le contenu gastrique vers le sang cardiaque droit [14].

Mais, il se peut qu'il y ait une diffusion anatomique du foie vers le sang cardiaque droit via la veine cave inférieure.

En ce qui concerne la diminution des concentrations biliaires, cela peut s'expliquer de la même manière que pour la lamotrigine, à savoir une redistribution vers les structures anatomiques de voisinage, foie et veine cave inférieure.

Bien que non significative ( $p < 0,41$ ), une tendance à l'augmentation de l'éthotoïne est observée dans les urines entre T0 et T12. En raison de l'acidification des urines au cours de la période *post-mortem*, cette observation pourrait être en partie liée à un phénomène de piégeage d'ions de cette molécule basique [4].

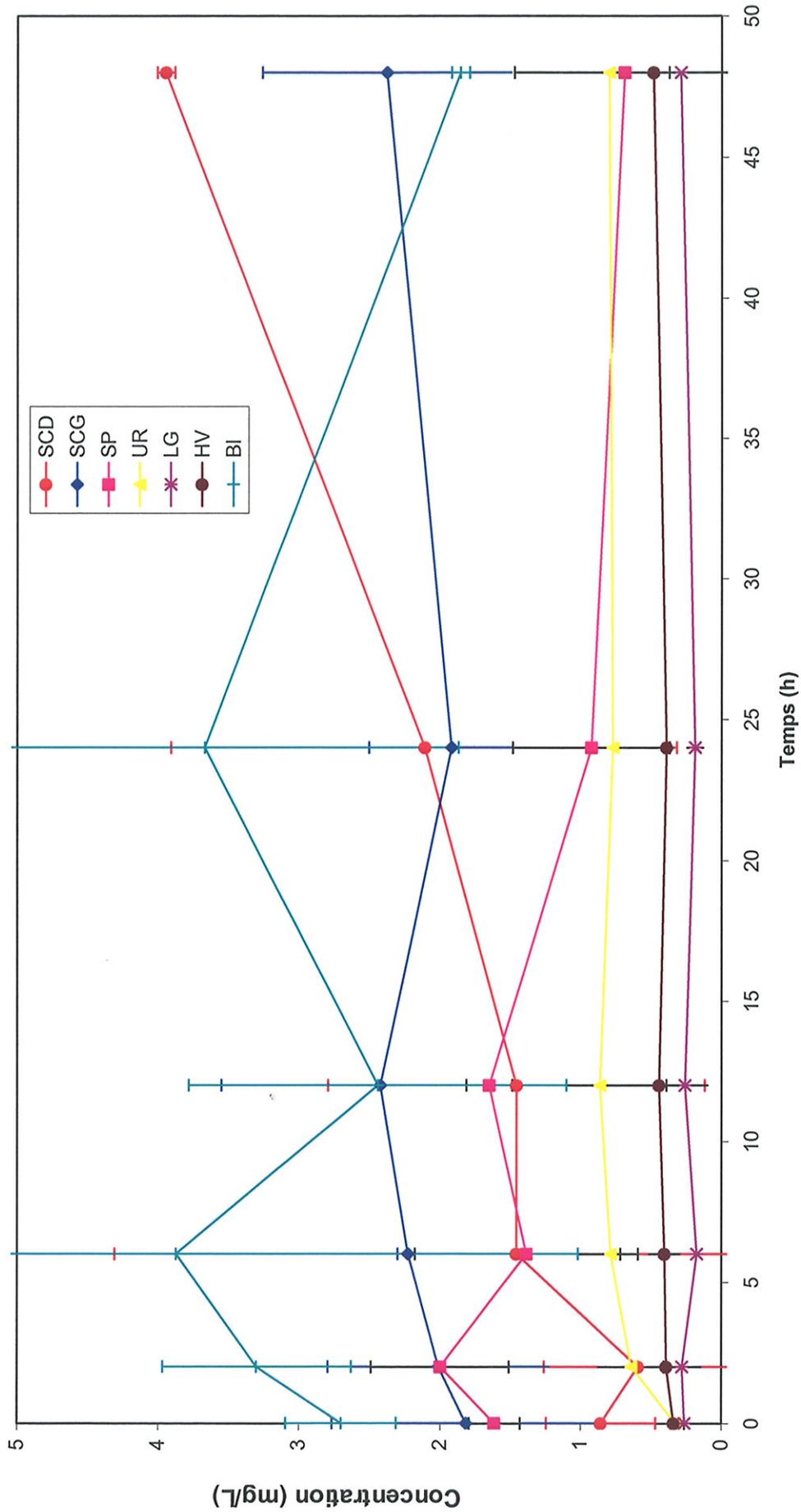


Figure 10 : Concentrations d'ETHOTOINE dans les différents milieux biologiques

### III. PHENOBARBITAL

Le test de Kruskal-Wallis réalisé pour chaque milieu est en faveur d'une redistribution dans les urines ( $p < 0,04$ ) et la bile ( $p < 0,02$ ). En revanche, les variations de concentration dans le sang cardiaque droit ( $p < 0,64$ ), gauche ( $p < 0,69$ ), le sang périphérique ( $p < 0,84$ ), le liquide gastrique ( $p < 0,41$ ) et l'humeur vitrée ( $p < 0,08$ ) ne sont pas significatives.

L'analyse de variance à deux facteurs réalisée dans tous les milieux est en faveur d'une redistribution qui diffère selon la localisation (effet temps  $p = 0,007$  ; effet localisation  $p < 0,0001$  ; interaction localisation\*temps  $p < 0,0001$ ). Bien que le test de Friedman ne soit pas significatif pour l'effet temps (NS) il existe une tendance nette.

Les plus fortes concentrations en phénobarbital à T0 ont été retrouvées au niveau des urines, de la bile et du sang droit, gauche puis périphérique. Les plus faibles concentrations ont été détectées dans le liquide gastrique et l'humeur vitrée [Figure 11].

Une forte diminution des concentrations en phénobarbital s'observe dans les urines au cours des 48 premières heures *post-mortem*. La redistribution de cette substance neutre est certainement favorisée par des phénomènes de lyse cellulaire [4]. Un phénomène similaire pourrait contribuer à la diminution des concentrations dans la bile. Cette redistribution pourrait s'effectuer ici au profit du foie et les valeurs mesurées dans ce milieu contribueraient à infirmer ou confirmer cette hypothèse.

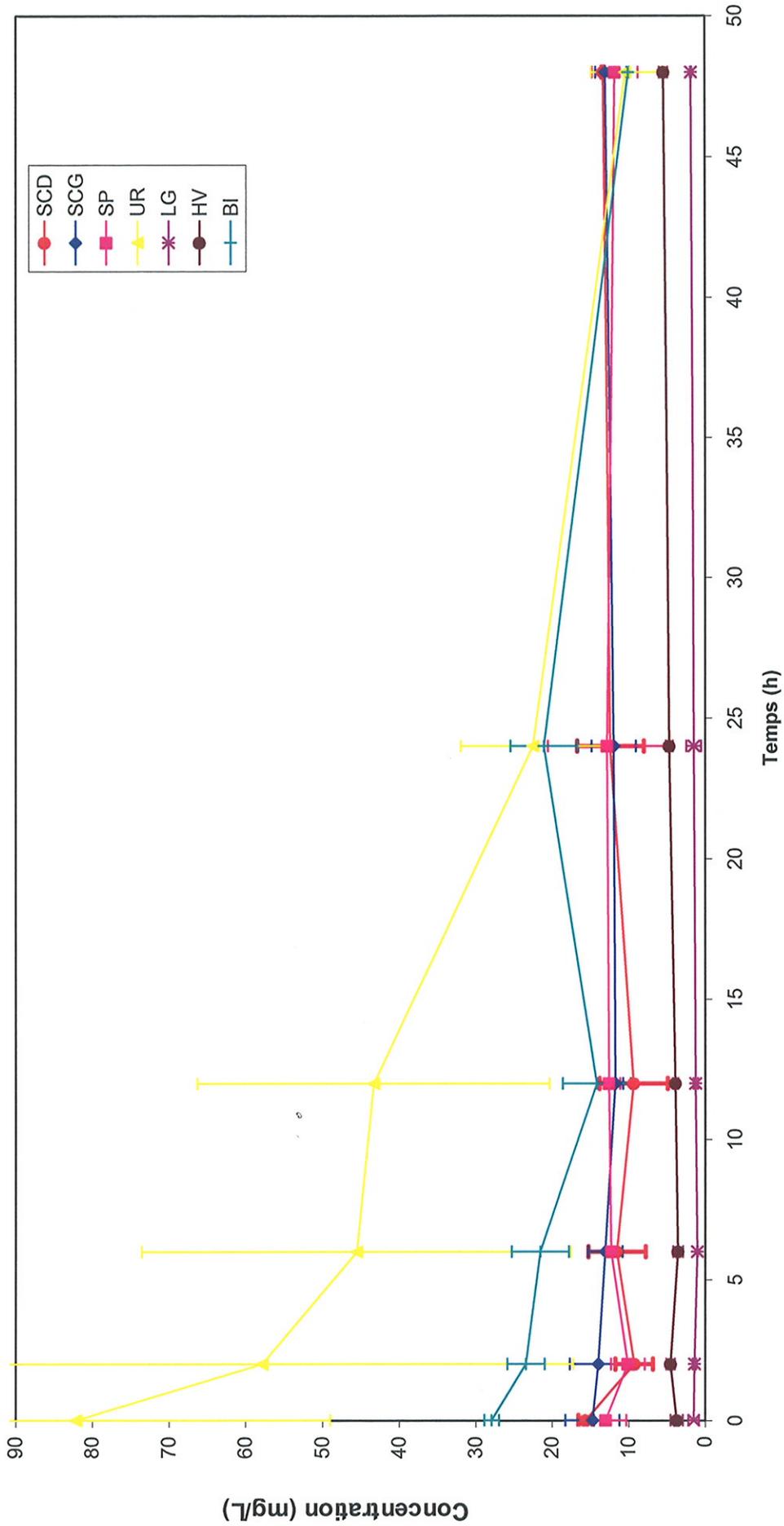


Figure 11 : Concentrations de PHENOBARBITAL dans les différents milieux biologiques

## **IV. COMPARAISON DES 3 SUBSTANCES : INFLUENCE DU**

### **pKa**

Dans certains milieux, nous avons observé des variations de concentration au cours du temps pour lesquelles l'effet de pKa est probable [Figures 12 à 18]. Ainsi dans l'urine, l'influence du pKa pourrait se traduire schématiquement de la manière suivante :

- la substance basique augmente (éthotoïne),
- les substances acide et neutre diminuent (lamotrigine et phénobarbital).

L'analyse de variance est en faveur :

- d'un effet temps (dans l'humeur vitrée  $p < 0,0007$ , les urines  $p < 0,0291$  et la bile :  $p < 0,0001$ ). Par contre l'hypothèse, d'un effet temps n'est pas admissible dans le sang cardiaque droit  $p = 0,42$ , le sang cardiaque gauche  $p = 0,87$ , le sang périphérique  $p = 0,92$  et le liquide gastrique  $p = 0,32$  ;
- d'un effet molécule dans chacun des milieux avec  $p < 0,0001$  ;
- d'une interaction molécule\*temps (dans l'humeur vitrée  $p < 0,0005$ , les urines  $p < 0,0118$  et la bile :  $p < 0,0001$ ). L'interaction molécule\*temps n'est pas admissible dans le sang cardiaque droit  $p = 0,98$ , le sang cardiaque gauche  $p = 0,79$ , le sang périphérique  $p = 0,90$  et le liquide gastrique  $p = 0,49$ .

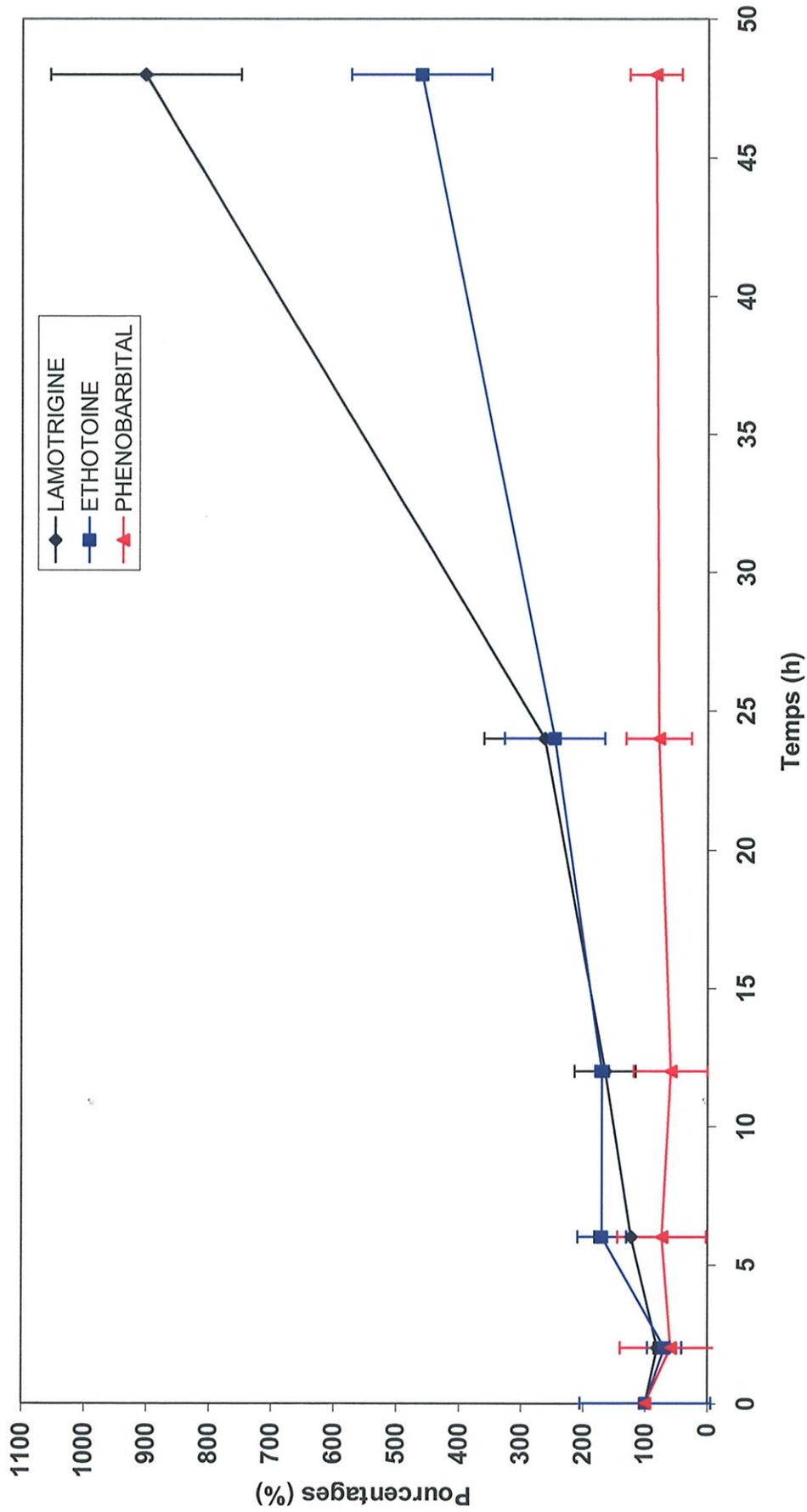


Figure 12 : Evolution des concentrations relatives en antiépileptiques dans le sang cardiaque droit

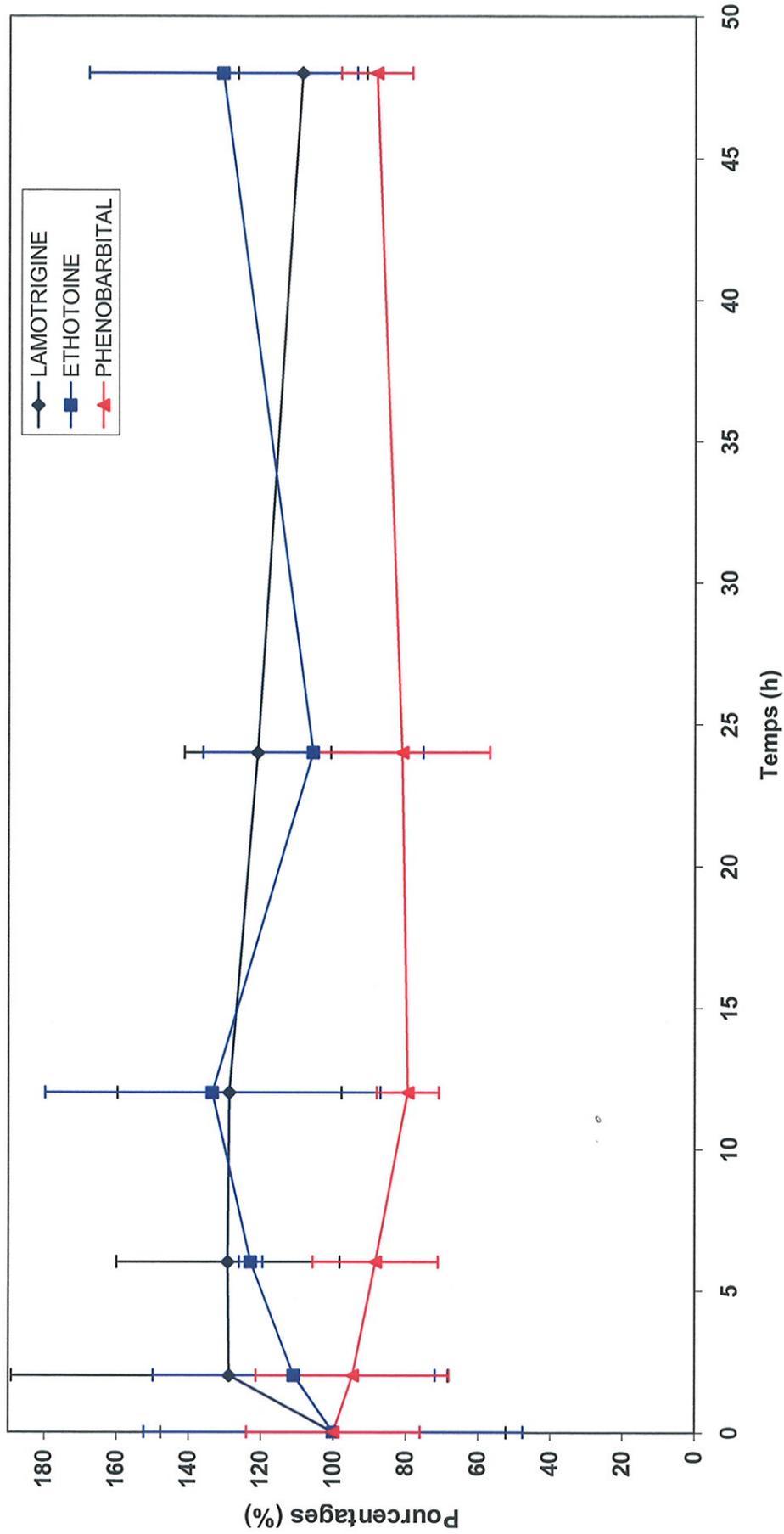


Figure 13 : Evolution des concentrations relatives en antiépileptiques dans le sang cardiaque gauche

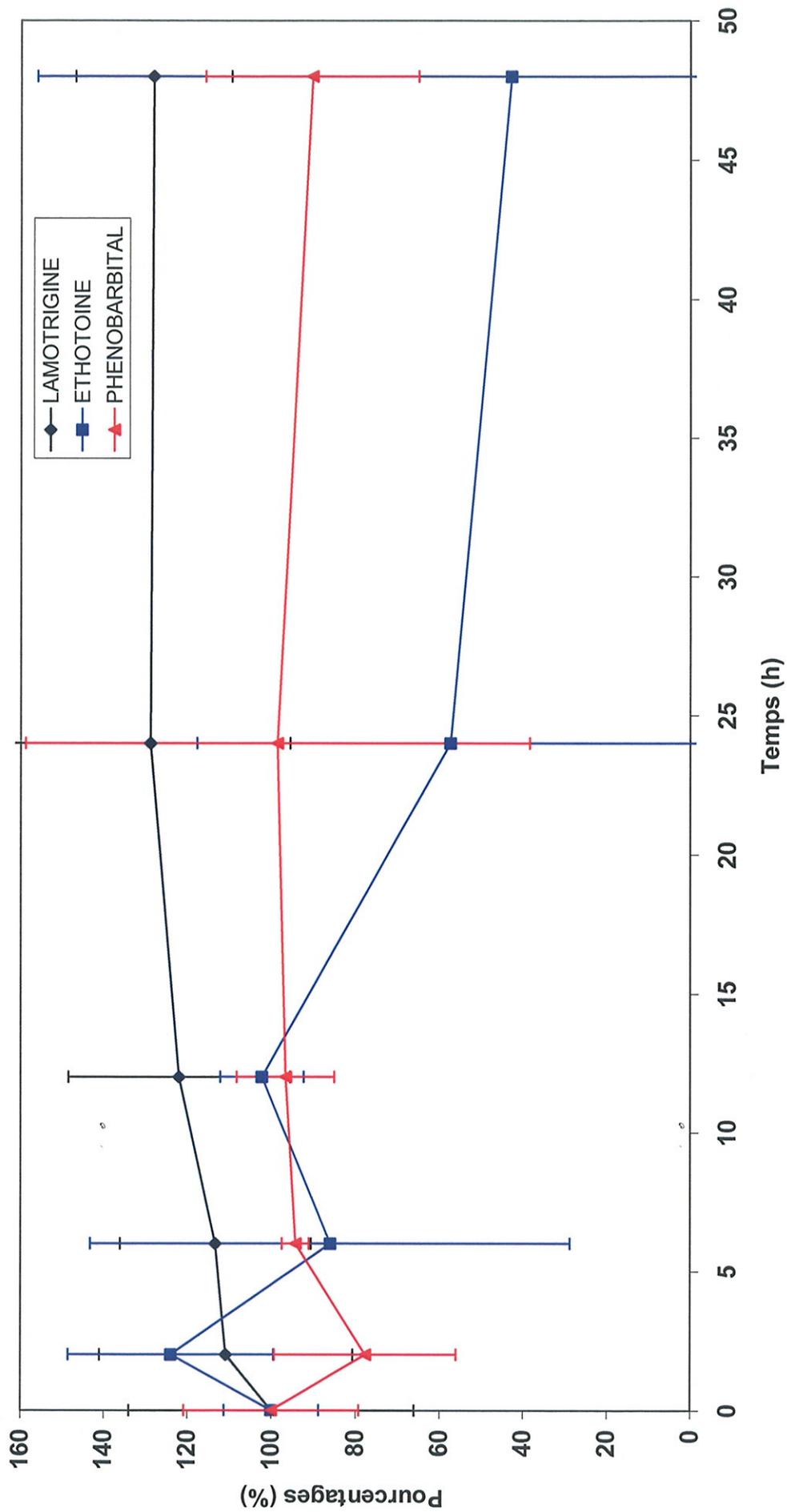


Figure 14 : Evolution des concentrations relatives en antiépileptiques dans le sang périphérique

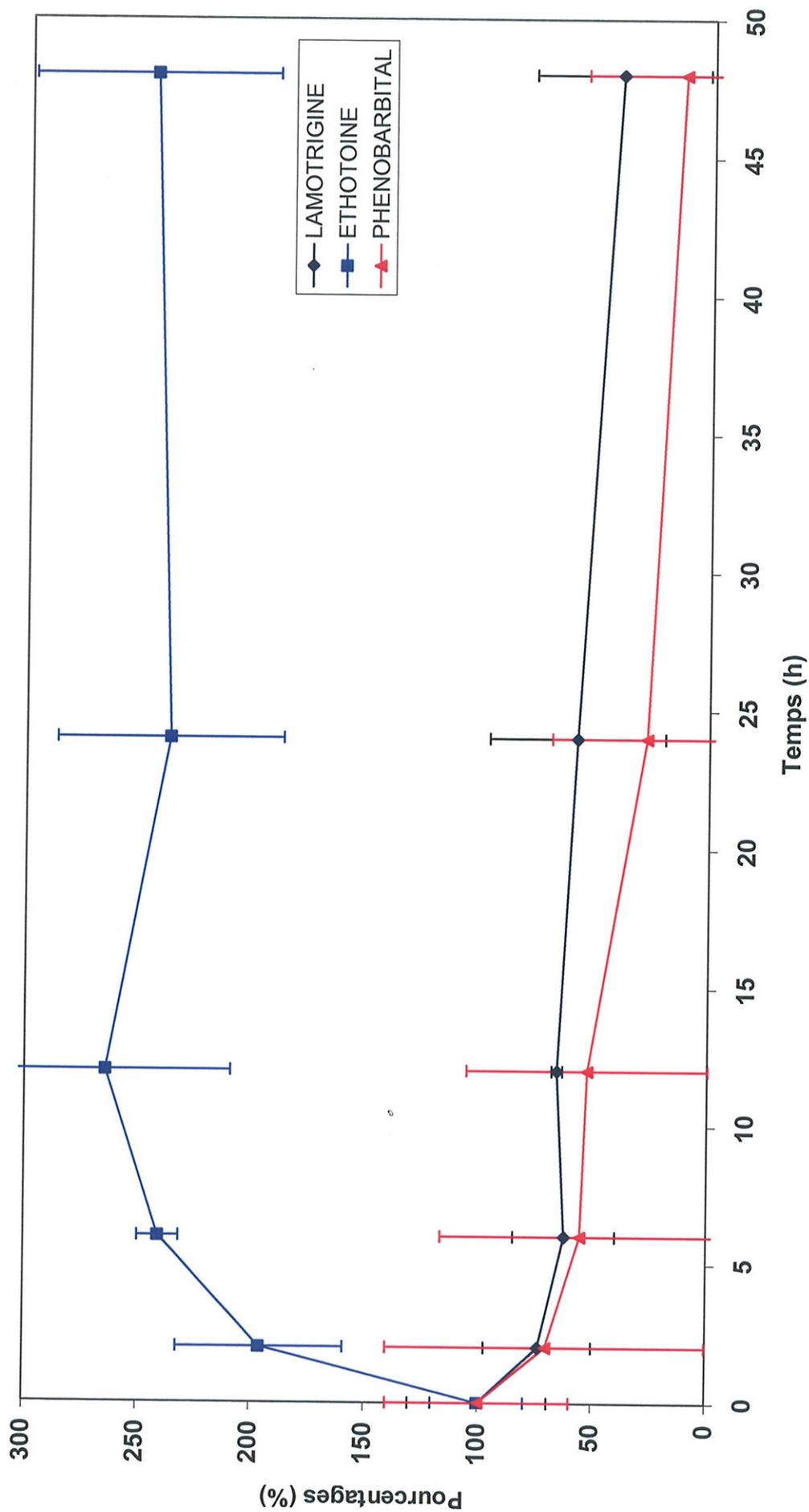


Figure 15 : Evolution des concentrations relatives en antiépileptiques dans les urines

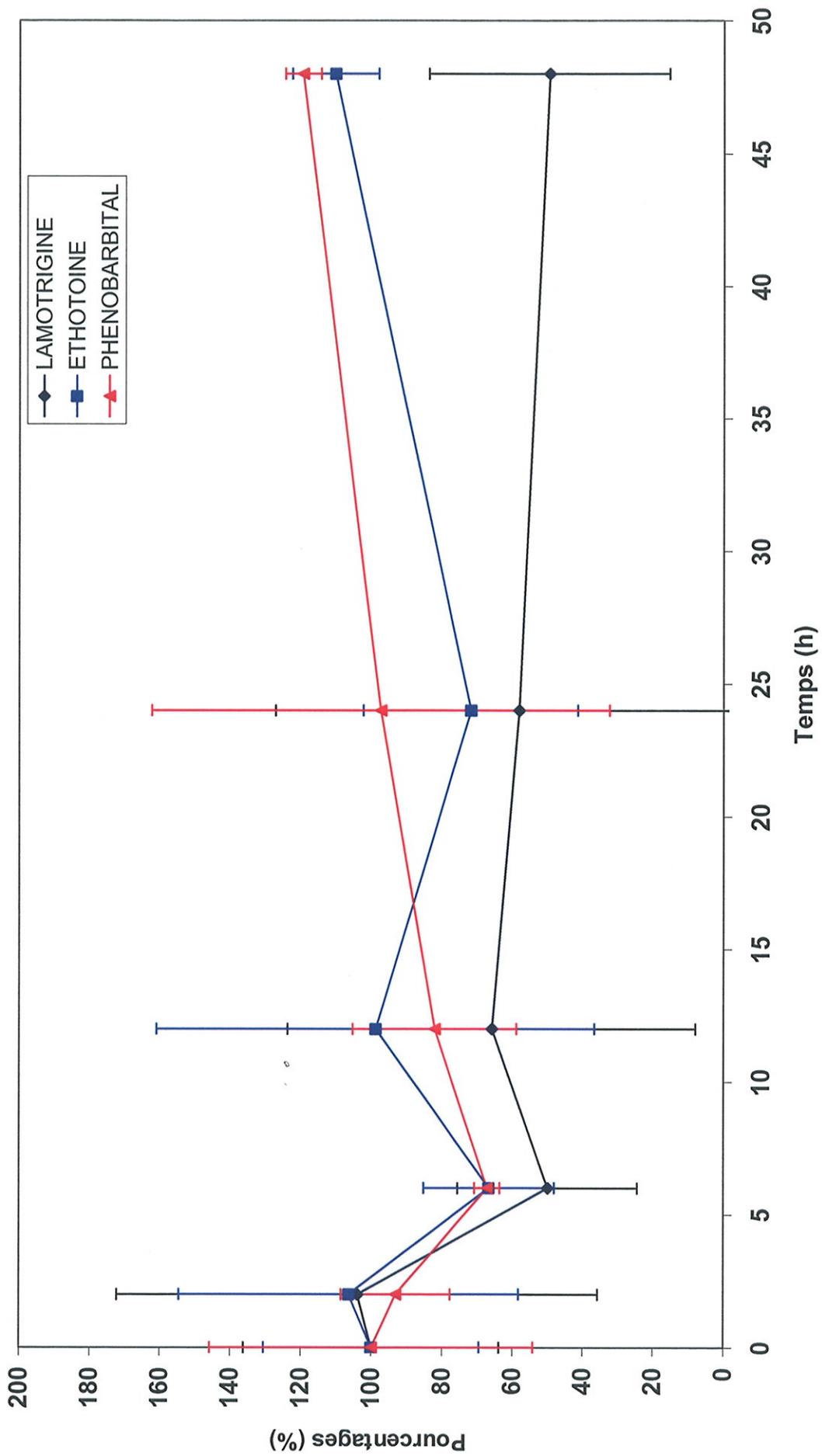


Figure 16 : Evolution des concentrations relatives en antiépileptiques dans le contenu gastrique

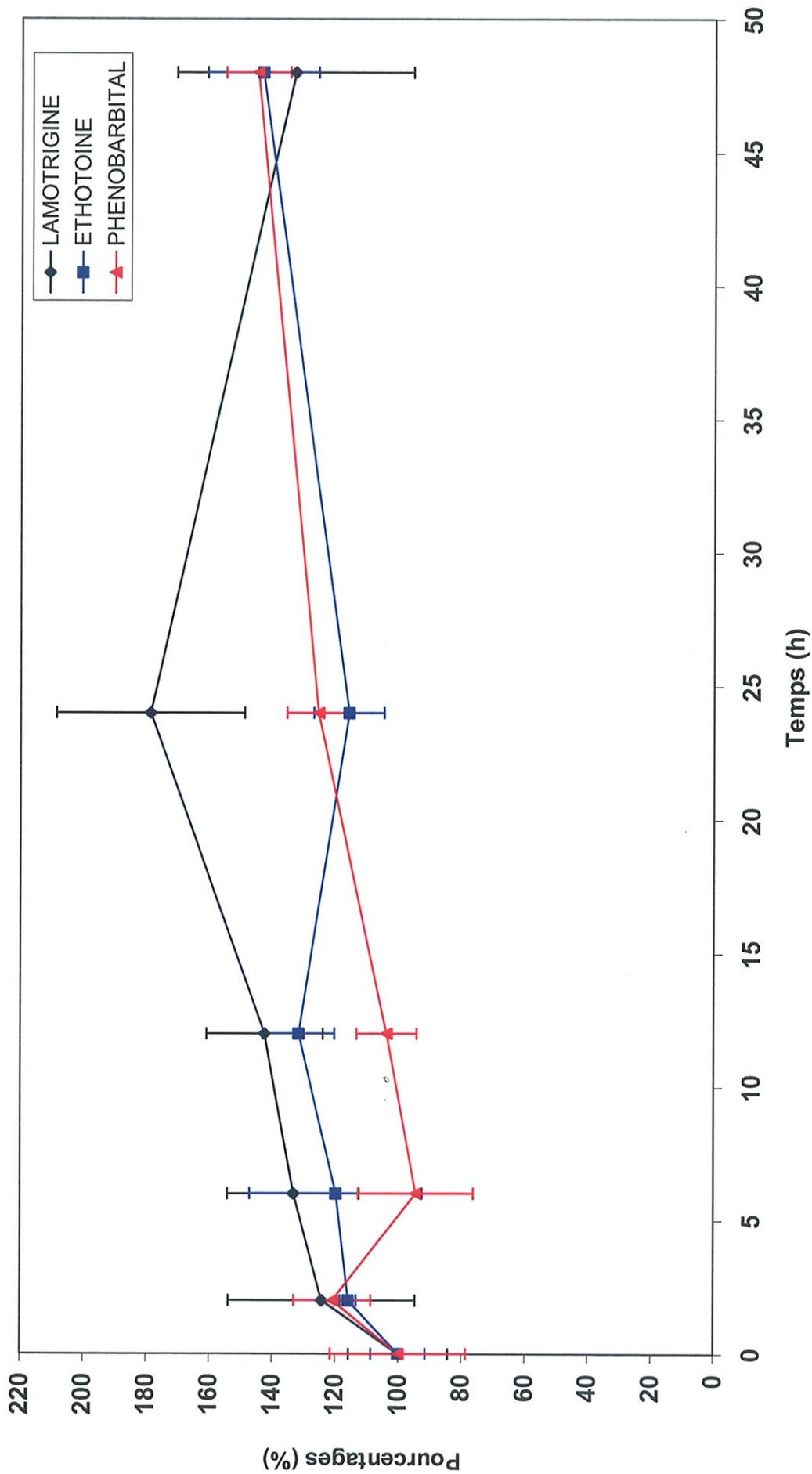


Figure 17 : Evolution des concentrations relatives en antiépileptiques dans l'humeur vitrée

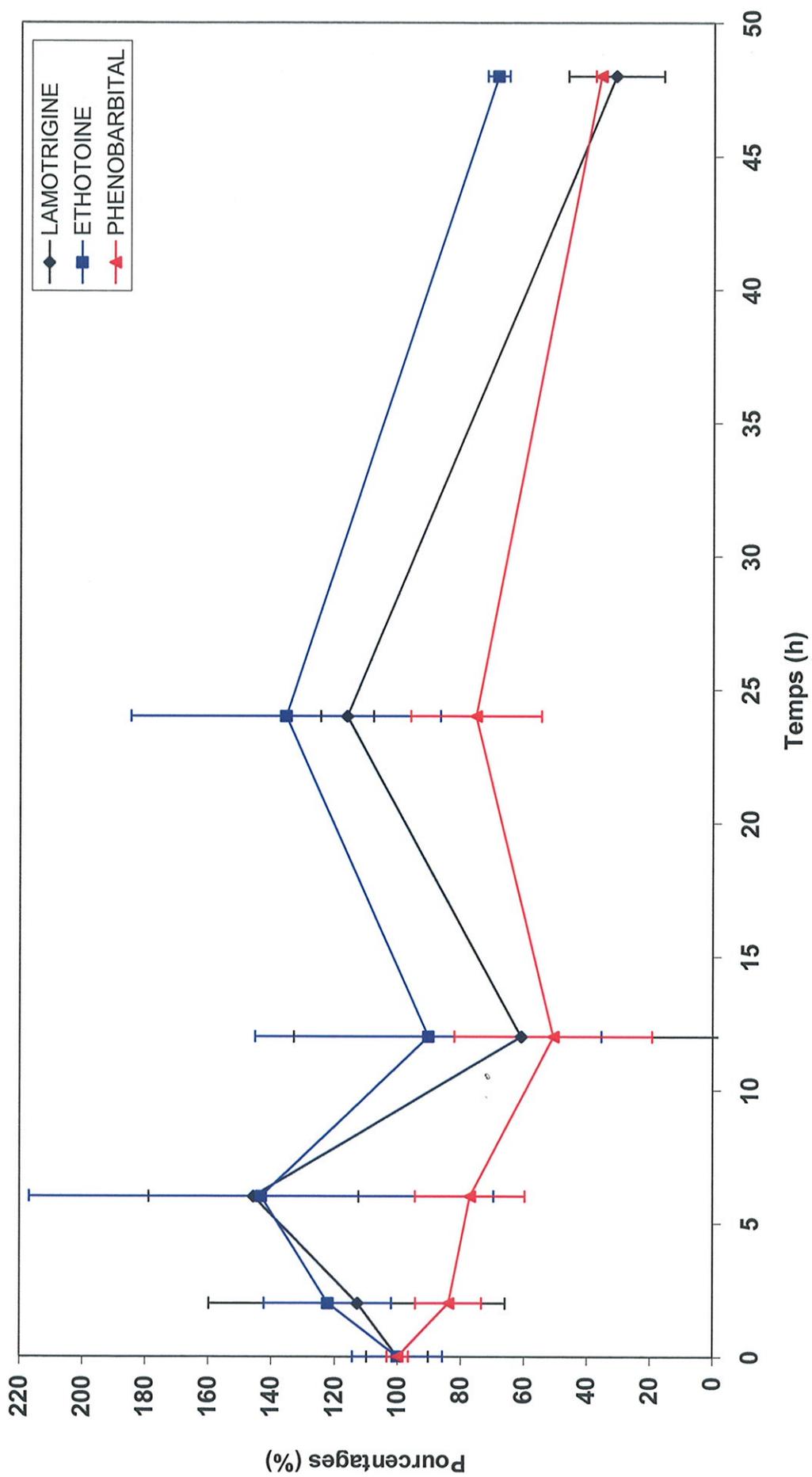


Figure 18 : Evolution des concentrations relatives en antiépileptiques dans la bile

## **V. INFLUENCE DU pKa/INFLUENCE Kp**

En période *post-mortem*, les augmentations des concentrations dans le sang cardiaque droit [Figure 12] étaient également observées lors de l'étude précédente de l'influence du pKa (étude reposant sur l'observation de la redistribution de 3 bêtabloquants). Les phénomènes de redistribution pouvant expliquer ce phénomène (i.e. redistribution à partir du parenchyme pulmonaire ou hépatique) sont, *a priori*, peu dépendants du pKa et du Kp.

Parallèlement, les concentrations observées au cours des 48 premières heures *post-mortem* semblent plus stables dans le sang cardiaque gauche [Figure 13]. Il s'agit là d'une constatation également réalisée lors de l'étude précédente.

Dans le sang périphérique [Figure 14], il faut noter que les prélèvements n'ont pas été effectués au niveau veineux fémoral mais au niveau de la veine cave inférieure (en raison des faibles quantités de sang disponibles), ce qui implique un raisonnement en termes de rapports anatomiques qui n'est pas forcément similaire à celui des études de référence. Toutefois, les concentrations des trois antiépileptiques étudiés semblent être relativement stables au cours des 48 premières heures *post-mortem*. Lors de l'étude précédente de l'influence du pKa (étude reposant sur l'observation de la redistribution de trois bêtabloquants), nous avons observé une augmentation (NS) des concentrations, mais qui n'était pas corrélée à l'importance de la lipophilie des molécules.

Dans l'urine, nous avons observé que l'accumulation dans ce milieu en période *post-mortem précoce* dépendait du Kp : elle est particulièrement intense pour les molécules lipophiles. Les résultats de cette étude complètent donc ces premières observations en confirmant qu'un phénomène de piégeage d'ions participe à l'accumulation des composés basiques dans ce milieu acide au cours des 48 premières heures *post-mortem* [Figure 15].

Dans la bile, l'effet du pKa des substances paraît être prédominant. Effectivement, nous n'avons pas observé de variations notables des concentrations en fonction du Kp des substances.

Ici, nous observons des variations significatives, notamment pour la substance neutre : le phénobarbital [Figure 18]. Il est intéressant de constater que l'éthotoïne, qui est majoritairement éliminée par cette voie, est la substance qui subit relativement le moins de redistribution à partir de ce milieu.

Même si elle peut surprendre, la présence des trois antiépileptiques dans le contenu gastrique à T0, alors que l'administration a été effectuée par voie injectable, s'explique par une distribution *ante-mortem* naturelle de ces substances [Figure 16]. Après l'euthanasie, les concentrations demeurent relativement stables dans ce milieu.

Le contenu gastrique constitue donc également un milieu dans lequel l'effet du Kp est prédominant puisque nous avons observé antérieurement un comportement *post-mortem* différent en fonction de la lipophilie.

Enfin, nous avons observé une stabilité des concentrations dans l'humeur vitrée contrairement aux expérimentations réalisées avec les bêtabloquants [Figure 17]. Dans l'humeur vitrée, nous avons effectivement observé une augmentation significative des concentrations des substances de lipophilie faible et moyenne. A nouveau, dans ce milieu, le pKa ne semble pas être un facteur prédisposant particulièrement aux phénomènes de redistribution.

## CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

D'après les premiers résultats de cette étude (déterminations des concentrations *post-mortem* dans les fluides), il apparaît que le pKa a une influence sur la redistribution *post-mortem* dans certains milieux tels que les urines, le sang cardiaque droit et la bile.

Ainsi, les concentrations en lamotrigine (molécule acide) augmentent dans le sang cardiaque droit au cours des 48 premières heures *post-mortem*, alors qu'elles diminuent dans les urines et sont stables dans la bile. Les concentrations en éthotoïne (molécule basique), quant à elles, augmentent dans les urines et plus modérément dans le sang cardiaque droit alors qu'elles demeurent stables dans la bile. Enfin, les concentrations en phénobarbital (molécule neutre) ont une forte tendance à la baisse dans les urines et la bile, alors qu'elles sont relativement stables dans le sang cardiaque droit.

Cette étude complète celle précédemment réalisée qui évaluait l'influence du Kp sur ces phénomènes de redistribution *post-mortem*. La mise en parallèle des résultats tend à mettre en évidence une influence globalement plus marquée du Kp, par rapport au pKa, sur ces mécanismes.

Un phénomène de redistribution est défini par l'enrichissement d'un milieu en une substance au détriment d'un autre. Des variations de concentration dans le temps ont été observées dans certains milieux lors de notre étude. Mais, les analyses à venir des concentrations tissulaires des antiépileptiques sont indispensables pour compléter ces premiers résultats. Elles permettront, notamment, d'explorer certaines hypothèses de redistribution envisagées pour expliquer les variations observées dans les fluides.

Enfin et ultérieurement, il pourra être envisagé de confirmer les résultats observés et de valider les hypothèses émises au cours de ces deux études en répétant une expérimentation similaire, mais avec des substances de Kp et de pKa différents (étude qui ne pourra pas être réalisée au sein d'une classe thérapeutique unique) : substances de faibles Kp avec des pKa faibles ou élevés, et substances de Kp élevés avec des pKa faibles ou élevés.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- [1] Corry J.E.L. Possible sources of ethanol ante and *post-mortem* : its relationship to the biochemistry and microbiology of decomposition. J. Appl. Bacteriol., 1978, 44, p. 1-56
- [2] Cotran R.S., Kuma V., Robbins S.L. Cellular injury and adaptation. In :S.L. Robbins Ed. Robbin's pathologic basis of disease. Philadelphia : WB Saunders. 1989, p.1-38
- [3] Cotter R. Time-Of-Flight Mass Spectrometry : Instrumentation and Applications in Biological Research (1997) American Chemical Society
- [4] Daniel W.A., Bickel M.H., Honegger, U.E. The contribution of lysosomal trapping in the uptake of desipramine and chloroquine by different tissues. Pharmacol. Toxicol., 1995, 77, p. 402-406
- [5] De Letter E.A., De Paepe P., Clauwaert K.M., Belpaire F.M., Lambert W.E., Van Bocxlaer J.F., Piette M.H. Is vitreous humour useful for the interpretation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) blood levels? Experimental approach with rabbits. Int. J. Legal Med., 2000, 114, p. 29-35
- [6] Dupuis C., Gaulier J.M., Pélissier-Alicot A.L., Marquet P., Lachâtre G. A liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry method for the determination of three betablockers in biofluids and solid tissues by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry (LC-ES-MS). J. Anal. Tox., 2004, 28, p. 674-679
- [7] Falani M. Contributo allo studio della circolazione ematica post-mortale. Minerva Medicoleg., 1961, 81, p. 108-115
- [8] Fuke C., Berry C.L., Pounder D.J. *Post-mortem* diffusion of ingested and aspirated paint thinner. Forensic Sci. Int., 1996, 78, p. 199-207

- [9] Hilberg T., Bugge A., Beylich K.M., Ingum J., Bjorneboe A., Morland J. An animal model of *post-mortem* amitriptyline redistribution. J. Forensic Sci., 1993, 38, p. 81-90
- [10] Hilberg T., Morland J., Bjorneboe A. *Post-mortem* release of amitriptyline from the lungs, mechanism of *post-mortem* drug redistribution. Forensic Sci. Int., 1994, 64, p. 47-55
- [11] Hilberg T., Ripel A., Slordal L., Bjorneboe A., Morland J. The extent of *post-mortem* redistribution in a rat model. J. Forensic Sci., 1999, 44, p. 956-962
- [12] Marquet P. Théorie et instrumentation des techniques de LC-MS et LC-MS/MS applicables à la toxicologie. Annales de Toxicologie Analytique, 2005, 17, 1, p. 5-12
- [13] Miyazaki T., Kojima T., Yashiki M., Wakamoto H., Iwasaki Y., Taniguchi T. Site dependence of methamphetamine concentrations in blood samples collected from cadavers of people who had been methamphetamine abusers. Am. J. Forensic Med. Pathol., 1993, 14, p. 121-124
- [14] Moriya F., Hashimoto Y. Redistribution of basic drugs into cardiac blood from surrounding tissues during early-stages *post-mortem*. J. Forensic Sci., 1999, 44, p. 10-16
- [15] Moriya F., Hashimoto Y. The effect of *post-mortem* interval on the concentrations of cocaine and cocaethylene in blood and tissues : an experiment using rats. J. Forensic Sci., 1996, 41, p. 129-133
- [16] Niessen W.M.A. Current Practice in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Voyksner R. D. Ed. Elsevier Science Ltd, 1998
- [17] O'Neal C.L., Poklis A. *Post-mortem* production of ethanol and factors that influence interpretation : a critical review. Am. J. Forensic Med. Pathol., 1996, 17, p. 8-20

- [18] Pélissier-Alicot A.L., Gaulier J.M., Champsaur P., Marquet P. Mechanisms underlying *post-mortem* redistribution of drugs : a review. J. Anal. Toxicol., 2003, 27, p. 533-544
- [19] Pélissier-Alicot A.L., Gaulier J.M., Dupuis C., Feuerstein M., Léonetti G., Lachâtre G., Marquet P. *Post-mortem* redistribution of three betablockers in the rabbit. Int. J. Legal. Med., 2005, 25, p. 1-7 (publication en ligne)
- [20] Pounder D.J. The nightmare of *post-mortem* drug changes. In : Wecht C.H. Ed. Legal medicine. New Hampshire : Buterworth Legal Publishers, 1994, p. 163-193
- [21] Pounder D.J., Smith D.R.W. *Post-mortem* diffusion of alcohol from the stomach. Am. J. Forensic Med. Pathol., 1996, 16, p. 89-96
- [22] Pounder D.J., Yonemitsu K. *Post-mortem* absorption of drugs and ethanol from aspirated vomitus : an experimental model. Forensic Sci. Int., 1991, 51, p. 189-195
- [23] Robertson M.D., Drummer O.H. *Post-mortem* distribution and redistribution of nitrobenzodiazepines in man. J. Forensic Sci., 1998, 43, p. 9-13
- [24] Wiley J. and Sons. Electrospray Ionization Mass Spectrometry : Fundamentals, Instrumentation, and Applications. R. Cole Ed, 1997.
- [25] Yamazaky M., Wakasugi C. *Post-mortem* changes in drug metabolizing enzymes of rat liver microsome. Forensic Sci. Int., 1994, 67, p. 155-168
- [26] Yonemitsu K., Pounder D.J. *Post-mortem* toxicokinetics of co-proxamol. Int. J. Legal Med., 1992, 104, p. 347-353
- [27] Introduction to mass spectrometry.  
Site disponible sur : <http://masspec.scripps.edu/information/intro/index.html>  
(page consultée le 10/02/05)

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b> .....	11
<b>A. GENERALITES</b> .....	13
I. LA REDISTRIBUTION POST-MORTEM.....	13
I.1. Définition .....	13
I.2. Origines des variations de concentration post-mortem .....	13
I.2.1. Redistribution depuis les organes "réservoirs" .....	13
I.2.2. Phénomènes agoniques et cadavériques .....	15
I.2.3. Propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques des xénobiotiques .....	16
II. HYPOTHESE DE TRAVAIL ET LES TRAVAUX ANTERIEURS .....	17
III. ANTIEPILEPTIQUES.....	20
IV. QUELQUES DONNEES SUR LE TYPE DE SPECTROMETRE DE MASSE UTILISE ....	22
<b>B. MATERIELS ET METHODES</b> .....	25
I. PROTOCOLE D'EXPERIMENTATION ANIMALE .....	25
I.1. Modèle animal et conditions expérimentales.....	25
I.2. Conditions d'administration des antiépileptiques .....	25
I.2.1. Préparation de la solution de lamotrigine .....	25
I.2.1.1 Problèmes rencontrés.....	25
I.2.1.2 Résolution des problèmes .....	25
I.2.2. Préparation de la solution d'éthotoïne .....	26
I.2.2.1 Problèmes rencontrés.....	26
I.2.2.2 Résolution des problèmes .....	26
I.2.3. Préparation de la solution de phénobarbital .....	26
I.2.4. Préparation des solutions injectables finales.....	26
I.2.5. Administration de la solution .....	27
I.2.6. Euthanasie.....	28
I.3. Protocole expérimental .....	29
I.4. Dissections .....	31
II. METHODES ANALYTIQUES .....	32
II.1. Essais et contrôles des solutions pures .....	32
II.2. Dosages dans les prélèvements biologiques .....	33
II.2.1. Extraction.....	33
II.2.2. Appareillage de LC-ES-MS et conditions expérimentales .....	35
II.3. Validation analytique .....	44
III. METHODOLOGIE STATISTIQUE .....	47

<b>C. RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	48
I. LAMOTRIGINE.....	48
II. ETHOTOINE .....	50
III. PHENOBARBITAL .....	52
IV. COMPARAISON DES 3 SUBSTANCES : INFLUENCE DU pKa.....	54
V. INFLUENCE DU pKa/INFLUENCE Kp .....	62
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	64
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	65

# SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

BON A IMPRIMER N° 334

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

---

**RULIERE Vanessa : REDISTRIBUTION *POST-MORTEM* DES ANTIPEPILEPTIQUES CHEZ LE LAPIN (INFLUENCE DU pKa SUR LES PHENOMENES DE REDISTRIBUTION *POST-MORTEM*)**  
**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE – LIMOGES - 2005**

---

**RESUME**

Les phénomènes de redistribution *post-mortem* (existence de variations de concentrations en fonction des sites de prélèvement et du délai écoulé entre le décès et les prélèvements) rendent difficile l'interprétation des résultats des analyses toxicologiques réalisées sur des échantillons autopsiques. En effet, les concentrations mesurées des xénobiotiques ne sont pas forcément le reflet des concentrations réelles au moment du décès.

L'objectif de ce travail est d'appréhender ce phénomène de redistribution *post-mortem* sous l'angle physico-chimique des molécules, une première étude ayant permis d'aborder l'influence du coefficient de partage (Kp) à travers la classe thérapeutique des bêtabloquants. Nous avons ici abordé celle du pKa à travers la classe des antiépileptiques. Les premiers résultats indiquent une influence du pKa qui pourrait toutefois être plus limitée que celle du Kp : influence dans le sang cardiaque droit, la bile et l'urine et intensité moindre (variations souvent non significatives sur un plan statistique).

---

**MOTS CLES**

Antiépileptiques • redistribution *post-mortem* • pKa • lapin

---

**TITLE *POST-MORTEM* REDISTRIBUTION OF ANTICONVULSIVE DRUGS IN RABBIT**

---

**SUMMARY**

In the field of analytical toxicological investigations, *post-mortem* redistribution phenomena (*post-mortem* site- and time-dependent variations in drug concentrations along the *post-mortem* period) lead to difficulties in the results interpretation in *post-mortem* samples. Thus, *post-mortem* measured concentrations are infrequently similar to the *antemortem* concentrations.

The aim of this study is to consider the role of the physicochemical properties of drugs in their *post-mortem* redistribution, as an earlier study had previously investigated the influence of lipophilicity (Kp) by the mean of the study of betablockers. This work investigates the influence of the dissociation constant (pKa) using an anticonvulsive drugs redistribution study in rabbits. The first results point out a pKa responsibility which could be more limited than the Kp's one: there is a pKa influence in right cardiac blood, bile and urine with a lower degree of intensity (statistical non significantly variations).

---

**KEY WORDS**

Anticonvulsive drugs • *Post-mortem* redistribution • pKa • rabbit

---