

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2014

THÈSE N°

Contribution à la finalisation d'une méthode de dosage et étude de stabilité d'un topique à base de thiosulfate de sodium

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Le 16 mai 2014

Par

Sébastien LABARDE

Né le 14 Juillet 1987, à Limoges (87)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. le Professeur BUXERAUD Jacques Président
Mme RATSIMBAZAFY Voa, Pharmacien Praticien Hospitalier Directeur
M. CAUDRON Eric, Maître de Conférences – Praticien Hospitalier Juge
M. PALAT Sylvain, Docteur en Médecine Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2014

THÈSE N°

Contribution à la finalisation d'une méthode de dosage et étude de stabilité d'un topique à base de thiosulfate de sodium

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Le 16 mai 2014

Par

Sébastien LABARDE

Né le 14 Juillet 1987, à Limoges (87)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. le Professeur BUXERAUD Jacques Président
Mme RATSIMBAZAFY Voa, Pharmacien Praticien Hospitalier Directeur
M. CAUDRON Eric, Maître de Conférences – Praticien Hospitalier Juge
M. PALAT Sylvain, Docteur en Médecine Juge

DOYEN DE LA FACULTÉ : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**

1^{er} VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNÈRE**, Maître de Conférences

2^{ème} VICE-DOYEN : Monsieur le Professeur Serge **BATTU**

PROFESSEURS DES UNIVERSITES :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GÉNÉRALE ET MINÉRALE
DESMOULIÈRE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES
PHARMACEUTIQUES :**

LACHÂTRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIÈNE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
ROGEZ Sylvie	BACTÉRIOLOGIE ET VIROLOGIE

MAÎTRE DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS – PRATICIEN HOSPITALIER DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES : (en détachement)

PICARD Nicolas PHARMACOLOGIE

MAÎTRES DE CONFÉRENCES :

BASLY Jean-Philippe CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

BEAUBRUN-GIRY Karine PHARMACOTECHNIE

BILLET Fabrice PHYSIOLOGIE

CALLISTE Claude BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE

CLEDAT Dominique CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

COMBY Francis CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE

COURTIOUX Bertrand PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE

DELEBASSÉE Sylvie MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE

DEMIOT Claire-Elise PHARMACOLOGIE

FAGNÈRE Catherine CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE

FROISSARD Didier BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

JAMBUT Anne-Catherine CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE

LABROUSSE Pascal BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

LÉGER David BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

LIAGRE Bertrand BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

MARION-THORE Sandrine CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE

MARRE-FOURNIER Françoise BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

MILLOT Marion PHARMACOGNOSIE

MOREAU Jeanne MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE

PASCAUD Patricia PHARMACIE GALÉNIQUE

POUGET Christelle CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE

SIMON Alain CHIMIE GÉNÉRALE ET MINÉRALE

TROUILLAS Patrick BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE

VIGNOLES Philippe BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE

PROFESSEUR DU SECOND DEGRE :

ROUMIEUX Gwenhaël ANGLAIS

ATTACHÉ TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

MAMMARI Nour MICROBIOLOGIE
(1/10/13 au 31/08/14)

VEDRENNE Nicolas CHIMIE ANALYTIQUE
(1/11/13 au 31/08/14)

REMERCIEMENTS

A Monsieur Jacques Buxeraud,

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites d'avoir accepté d'être président de mon jury de thèse.

Pour votre savoir et votre gentillesse tout au long de mes études.

Soyez assuré de mes sentiments dévoués.

A Madame Voahirana Ratsimbazafy,

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant la direction de ma thèse.

Pour la diversité des tâches que j'ai effectuées sous votre direction et votre accompagnement tout au long de ce travail.

Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude et mon profond respect.

A Monsieur Eric Caudron,

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de juger ma thèse.

Pour votre accueil à l'HEGP, votre encadrement et votre disponibilité tout au long de ce travail.

Sincèrement, merci.

A Monsieur Sylvain Palat,

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites d'avoir accepté de participer au jury de ma thèse.

Soyez assuré de ma plus profonde gratitude et de mes sentiments respectueux.

A mes parents, Claudine et Gilbert

Pour l'amour et la confiance que vous m'accordez.

Pour votre soutien et votre compréhension.

Avec tout mon amour.

A ma sœur et mon frère, Géraldine et Olivier

Parce que c'est vous et que rien n'est plus important.

A toute ma famille,

Avec tout mon amour.

A mes amis,

Pour votre présence et tous les moments que je peux passer avec vous.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION

1. Calcinose des tissus mous et pathologies potentiellement concernées

- 1.1. Définition/Présentation
- 1.2. Calcification/Ossification
- 1.3. Clinique/Histologie
- 1.4. Calcinoses cutanées
- 1.5. Historique
- 1.6. Classification

2. Le thiosulfate de sodium (TSS)

- 2.1. Propriétés physico-chimiques
- 2.2. Utilisations médicales
- 2.3. Intérêt du TSS dans notre cas

3. Revue de cas d'utilisation du TSS

- 3.1. Effets cliniques
- 3.2. Posologies
- 3.3. Effets indésirables

4. Etude de stabilité (Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris)

- 4.1. Préalable : mise en forme pharmaceutique du TSS
- 4.2. Pourquoi cette collaboration ?

- 4.3. Chromatographie : généralités
- 4.4. Rappel des techniques utilisées pour doser le TSS
- 4.5. Sélection de la méthode
- 4.6. Développement de la méthode
- 4.7. Validation de méthode
- 4.8. Dosage des préparations utilisées expérimentalement
- 4.9. Etudes de stabilité (dégradation forcée, accélérée et en condition standard de la préparation)

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

TABLE DES MATIERES

TABLES DES ANNEXES

TABLE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

SERMENT DE GALIEN

Liste des abréviations

AUC : artériopathie urémique calcifiante
CAC : calcification des artères coronaires
CAPD : dialyse péritonéale ambulatoire continue
CVVH : hémofiltration veino-veineuse continue
DM : dermatomyosite
DMJ : dermatomyosite juvénile
DP : dialyse péritonéale
EI : effet indésirable
F : femme
FR : facteur de risque
FSN : fibrose systémique néphrogénique
H : homme
HBO : oxygénothérapie hyperbare
HBPM : héparine de bas poids moléculaire
HD : hémodialyse
HPLC : chromatographie liquide haute pression
H/L : phase hydrophile dans phase lipophile
HS : hypersensibilité
HTA : hypertension artérielle
IR : insuffisance rénale
IRT : insuffisance rénale terminale
IV : intraveineuse
IVL : intraveineuse lente
LED : lupus érythémateux disséminé
L/H : phase lipophile dans phase hydrophile
LLA : leucémie lymphoblastique aiguë
N : efficacité
PTH : parathormone
TBME : tert butyl méthyl éther
tr : temps de rétention
TSS : thiosulfate de sodium

UV : ultraviolet

VO : voie orale

Introduction

L'organisme humain est sujet à de nombreuses transformations physiologiques ou pathologiques. Ainsi, on peut observer chez certaines personnes l'apparition de calcifications au sein de tissus mous. Ces calcifications étant souvent invalidantes, le corps médical cherche à les traiter. Toutefois à ce jour, aucun traitement n'est jugé comme efficace de façon optimale.

Cette thèse est la conséquence d'un travail effectué au CHRU de Limoges pour un patient. Il s'agit d'un enfant atteint de dermatomyosite juvénile, présentant des douleurs et une mobilité articulaire réduite, dues à la présence de calcifications sous-cutanées.

Un traitement pour résorber ces calcifications a été entrepris. Le médicament utilisé est une préparation topique à base de thiosulfate de sodium.

Le but de ce travail est d'expliquer l'utilité du thiosulfate de sodium dans ce type de pathologie et d'étudier la stabilité de la préparation afin de pouvoir l'utiliser à plus grande échelle si le rapport bénéfice/risque est jugé favorable chez ce patient.

La première partie de cet ouvrage correspond à une présentation des calcinoses des tissus mous en expliquant le phénomène, le mécanisme en cause ainsi que les différentes pathologies dans lesquelles une calcification peut s'observer.

La deuxième partie est une présentation d'un médicament dont l'utilisation est croissante ces dernières années : le thiosulfate de sodium. Ses propriétés physico-chimiques, ses diverses utilisations et son mécanisme probable d'action sur les calcifications y sont décrits.

La troisième partie correspond à une revue des cas d'utilisation du thiosulfate de sodium, seul ou en association, dans le traitement des calcinoses. Ce travail permet de dégager les effets cliniques et indésirables fréquemment observés, ainsi que la posologie généralement utilisée.

La quatrième partie est l'étude de la préparation topique à base de thiosulfate de sodium. Pour ce faire, une méthode de dosage chromatographique a été sélectionnée puis développée. Une fois le dosage effectué, une étude de stabilité est réalisée afin d'obtenir des informations sur la conservation du médicament.

1. Calcinose des tissus mous et pathologies potentiellement concernées

1.1. Définition/Présentation

La calcinose est la formation de **dépôts de phosphate de calcium** qui peuvent apparaître dans différents tissus mous. Elle est également appelée **calcification**. Un tissu mou est un tissu servant à supporter les structures et les organes du corps comme les muscles, les vaisseaux sanguins ou les tissus adipeux.

Ce type d'affection apparaît dans des conditions systémiques et/ou locales très variables. La présence de macro ou de micro calcifications des tissus mous favorise la fixation des composés phosphatés.

Une définition plus précise des calcifications cutanées (ou calcinoses cutanées), servant de base pour le reste de cet exposé, est donc nécessaire. Ce sont des dépôts anormaux de cristaux de phosphate de calcium, d'**hydroxyapatite de calcium** en particulier, dans la peau [80].

La composition des calcinoses cutanées, outre l'hydroxyapatite de calcium qui est de loin majoritaire, peut également comporter des cristaux d'oxalate de calcium, d'urate et des protéines telles que l'ostéopontine, l'ostéonectine et la sialoprotéine. Ces dépôts forment des masses dures, sous forme de nodules ou de plaques, localisées dans le derme, l'épiderme ou l'hypoderme, avec ou sans altération visible de la surface de la peau [16].

La calcification est un phénomène aux implications pathologiques multiples en médecine. Il peut s'agir du **mécanisme** physiopathologique **principal** de l'affection comme par exemple dans l'artériopathie calcique, la fibrodysplasie osseuse progressive, la chondrocalcinose ou encore la myosite ossifiante. Ce peut être un **phénomène satellite** mais ayant une action délétère conjuguée comme dans le syndrome de CREST, l'athérosclérose, l'hypertension artérielle, le diabète, l'hyperparathyroïdie ou la dermatomyosite.

1.2. Calcification/Ossification

Il est nécessaire de faire la différence entre ossifications cutanées et calcinose [89].

Elles sont le résultats de deux processus successifs : la **nucléation** ou fixation du calcium sur la trame organique puis la **croissance** de ce cristal calcique.

Dans les deux cas, la nucléation correspond à la cristallisation des ions calcium et phosphore sous forme d'hydroxyapatite. Ensuite, la croissance du cristal entraîne la formation de l'**os** au cours de l'ossification cutanée ou de **dépôts calciques** lors de la calcinose.

Les ossifications cutanées sont un groupe d'affections différent du groupe des calcinose car les cristaux d'hydroxyapatite de calcium se déposent et s'organisent pour former un os lamellaire de type haversien. Ce tissu osseux hétérotopique cutané est donc très organisé et dur. Il est soumis à des processus dynamiques de formation/destruction avec présence locale d'ostéoblastes et d'ostéoclastes.

La calcinose est le dépôt de sels calciques insolubles. Il s'agit de masses dures mais mal organisées. Elle nécessite une trame organique capable de fixer le calcium, ainsi qu'un équilibre phosphocalcique et des facteurs locaux favorisant.

1.3. Clinique/Histologie

L'examen radiologique ne permet pas de différencier calcification et ossification : dans les deux cas on observe une structure radio-opaque. Seul l'examen histopathologique permet cette distinction.

Cliniquement, la calcinose se traduit par la présence d'une ou de plusieurs masses **péri-articulaires**. Ces papules, plaques ou nodules infiltrés, sont durs à la palpation. Ils sont de couleur blanc-jaunâtre. Les lésions peuvent être **asymptomatiques** ou devenir **douloureuses**, limiter la mobilité d'une articulation voisine, ou comprimer une structure neuronale adjacente et ainsi provoquer des contractures musculaires [20]. Une ulcération et secondairement une infection peuvent apparaître [16].

Les dépôts d'hydroxyapatite sont parfois silencieux. Ils peuvent être découverts à l'examen clinique ou fortuitement dans les tissus mous ou la peau sur des radiographies

réalisées pour d'autres raisons. Ils peuvent être également découverts à l'histologie, lorsqu'ils sont peu abondants ou non cliniquement suspectés.

Sous le microscope, les dépôts calcifiés sont facilement reconnaissables en coloration standard. Ils sont de forme et taille variées, anhistes, basophiles, de couleur bleu-violet. Une réaction granulomateuse résorptive à corps étranger ou une fibrose cicatricielle périphérique sont souvent associées. La coloration de Von Kossa souligne les dépôts calciques en noir, et permet la détection de dépôts de très petites tailles, parfois indétectables en coloration standard [17].

Les calcinoses cutanées peuvent être spontanément éliminées à travers l'épiderme. Cette élimination transépidermique se manifeste par l'extrusion d'un matériel crayeux, blanchâtre, plus ou moins liquide, par une ulcération cutanée. La plupart des calcinoses ont un développement progressif et sont asymptomatiques. La répartition des calcinoses sur le tégument varie en fonction de la maladie causale.

1.4. Calcinoses cutanées

1.4.1. Mécanismes en cause

Schématiquement, deux mécanismes sont impliqués dans le développement des calcinoses cutanées (ou calcifications cutanées) chez l'homme [17] : premièrement, une **anomalie du métabolisme phosphocalcique** impliquant des taux sériques anormaux de calcium, de phosphore ou de vitamine D [33] ; deuxièmement, des **altérations tissulaires** cutanées permettant l'initiation de la **crystallisation** des sels calciques dans la peau [16].

1.4.2. Régulation

Les taux sanguins de calcium, de phosphore et de la forme active de la vitamine D (1,25-dihydroxyvitamine D₃) sont régulés par un réseau complexe d'**hormones**, d'**enzymes** et de **facteurs environnementaux externes** (rayonnement UV). De nombreux dysfonctionnements au sein de ce réseau, par atteinte d'un organe (parathyroïde, os, rein, foie, tube digestif), par défaut enzymatique ou par endocrinopathie spécifique peuvent entraîner une hypercalcémie, une hyperphosphorémie ou une hypervitaminose D, pouvant être responsables de calcifications cutanées [17].

La cristallisation de l'hydroxyapatite de calcium débute au niveau cellulaire dans les mitochondries ou dans des vésicules intracytoplasmiques dérivées de la membrane plasmique. Ce phénomène est finement régulé à l'échelon cellulaire par un équilibre entre des **facteurs promoteurs** de la cristallisation (produit phosphocalcique extracellulaire élevé, pH alcalin, enzymes mastocytaires, altérations des fibres collagènes ou élastiques), et des **facteurs inhibiteurs** de la cristallisation (polyphosphates organiques ou analogues pyrophosphates synthétiques comme les bisphosphonates) [17].

1.5. Historique

La calcinose cutanée a été décrite pour la première fois par Virchow en 1855 [88].

En 1975, Greenfield [47] a été le premier à décrire trois types de calcifications des tissus mous : les calcifications métastatiques ; les calcifications dystrophiques ; et les calcinoses généralisées, qui incluent les calcifications par trouble du collagène vasculaire, les calcinoses idiopathiques tumorales et les calcinoses idiopathiques universelles.

En 1985, Black et Kanat [19] ont également classé les calcinoses des tissus mous en trois catégories similaires selon l'équilibre phospho-calcique et les tissus affectés : les calcifications métastatiques, les calcifications dystrophiques et les calcinoses.

Ce n'est qu'en 1999 que Marzano *et al.* [69] ont élargi cette classification en quatre types cliniques : dystrophique (incluant les calcinoses), idiopathique, tumoral et métastatique.

En 2002, Wilmer *et al.* [116] ont proposé d'ajouter un nouveau type de calcification appelé calciphylaxie. Mais elle est aujourd'hui plutôt considérée comme faisant partie des calcifications métastatiques.

1.6. Classification

Les calcinoses apparaissent à la suite d'évènements nombreux et variés. Elles désignent donc un large spectre d'affections sans relation entre elles autre que la calcification pathologique. Aujourd'hui, la classification des calcifications pathologiques, basée sur

l'**étiologie**, est divisée en quatre catégories : **dystrophique**, **métastatique**, **idiopathique** ou **iatrogène** [80, 88].

1.6.1. Calcifications dystrophiques

La calcification dystrophique est la calcification pathologique **la plus fréquemment rencontrée** chez l'Homme [88]. Elle est **habituellement localisée** au niveau du tissu endommagé, bien qu'elle puisse se généraliser.

La plupart du temps, aucun trouble du métabolisme phosphocalcique n'est détecté (taux sériques normaux de calcium et de phosphates), par conséquent les dommages tissulaires proviennent d'une autre affection à l'origine de la calcification (problème mécanique, chimique, infectieux, ...). La première anomalie est une peau endommagée, enflammée, néoplasique ou nécrotique [80].

Ce sont les **dommages tissulaires** qui sont, du moins en partie, responsables du phénomène de calcification. Ces dommages entraînent l'augmentation de l'influx calcique intracellulaire. L'existence de fibres de collagène ou de fibres élastiques altérées favorise la cristallisation. Les fibres modifiées servent alors de matrice, les cristaux eux-mêmes vont altérer les fibres lors de leur formation, et favoriser la fixation de nouveaux cristaux. Il s'installe alors un cercle vicieux [89].

La calcification dystrophique est donc le résultat de blessures locales tissulaires ou de maladies lésant les tissus.

1.6.1.1. Dommages tissulaires localisés au niveau du tissu lésé

Une calcification extra-osseuse peut apparaître dans le cadre de différents processus locaux et destructifs, incluant :

- des traumatismes tels que des brûlures ;
- des processus inflammatoires tels que des morsures d'arthropodes ou des lésions dues à l'acné ;
- des anomalies vasculaires (l'insuffisance veineuse est probablement la plus grande cause de calcification cutanée [16]) ;
- une rhabdomyolyse ;
- des infections. Le tissu nécrotique produit par des processus infectieux peut par la suite se

calcifier. Certains granulomes infectieux produisent de la 1,25-dihydroxyvitamine D. Les infections pouvant produire une calcification sont l'onchocercose, la cysticercose, l'histoplasmosse, la cryptococcose et la virose à herpes simplex virus (HSV) ;

-des tumeurs bénignes ou malignes, et kystes. Le pilomatricome ou épithélioma momifié de Malherbe est la plus fréquente tumeur se calcifiant. On observe une localisation évocatrice comme le talon du nouveau-né. Les kystes épithéliaux et les syringomes ont aussi une tendance significative à se calcifier. Des foyers de calcifications sont généralement observés dans des coupes histologiques de cellules basales de carcinomes. D'autres types de tumeurs peuvent dans de plus rares cas montrer des foyers de calcifications.

1.6.1.2. Dommages tissulaires généralisés

De nombreuses pathologies affectant les tissus sont responsables de calcinose dystrophiques, telles que les maladies du tissu conjonctif, les panniculites ou certains troubles héréditaires.

- Les **maladies du tissu conjonctif** peuvent entraîner des calcifications comme par exemple la dermatomyosite ; le lupus érythémateux ; la sclérose systémique ; ou le syndrome de CREST, pathologie associant calcinose cutanée, syndrome de Raynaud, dysfonctionnement de l'œsophage, sclérodactylie et télangiectasies.

Dans la **dermatomyosite**, les calcifications apparaissent trois fois plus dans la forme juvénile que dans la forme débutant chez un adulte, ce qui équivaut à environ 2/3 des formes juvéniles et 20 % des formes adultes [16]. Entre 50 et 70 % des enfants atteints d'une dermatomyosite développent par la suite des calcifications cutanées [85].

Les calcifications sont plus grandes et plus diffuses que dans les sclérodermies. Elles peuvent toucher la peau et le tissu sous-cutané, les muscles, les tendons et entraîner alors une baisse de la mobilité au niveau articulaire. Elles sont donc souvent symptomatiques, surtout chez le patient jeune, ce qui peut entraîner un retentissement fonctionnel majeur. Les zones typiquement concernées sont les articulations, les cuisses, les bras et le tronc. Les extrémités sont généralement épargnées [20].

Ces calcinose sont souvent compliquées de réactions inflammatoires douloureuses. Les formes les plus sévères sont appelées « calcinose universelles ». Ce terme peut être trompeur

car il est utilisé dans la littérature pour décrire les calcinose diffuses sans dermatomyosite (cf. 1.6.3.) [17].

Dans le **lupus érythémateux**, les calcifications sont moins fréquentes que dans la dermatomyosite ou la sclérodermie systémique [17]. Elles sont habituellement asymptomatiques. Elles peuvent parfois être de grande taille et cliniquement apparentes. Dans ce cas, certains auteurs ont utilisé le terme de calcinose tumorale, ce qui peut créer une confusion. En effet, le terme de calcinose tumorale devrait être réservé à la calcinose tumorale de Teutschländer (cf. 1.6.2.) et non à la calcinose lupique.

La **sclérodermie**, la **sclérodermie systémique** et le **syndrome de CREST** sont des affections pour lesquelles on peut observer un développement tardif d'une calcification tissulaire. Elle affecte principalement la pulpe des doigts, mais aussi des zones périarticulaires par exemple. Ces calcifications sont de petite taille et asymptomatiques, et sont souvent associées à une réaction inflammatoire très limitée. Elles n'ont dans ce cas pas tendance à régresser spontanément. Il a été démontré que les tissus de patients sclérodermiques contiennent cinq à vingt fois plus de calcium que des tissus de sujets sains [16].

- Dans les **panniculites**, qui sont des inflammations du tissu adipeux sous-cutané, on observe une nécrose des tissus sous-cutanés. Cette nécrose prédomine aux niveaux des épaules et des fesses et donne des nodules et des plaques pouvant se calcifier. La cause est inconnue. Elle pourrait être un traumatisme obstétrical, une pré-éclampsie, un diabète, une hypothermie néonatale ou une hypoxie. La combinaison du calcium avec les acides gras libérés par les cellules graisseuses endommagées peut mener à la cristallisation calcique.

- Des **troubles héréditaires** peuvent provoquer des calcinose, comme par exemple le syndrome d'Ehlers-Danlos, le syndrome de Werner, le pseudoxanthome élastique et le syndrome de Rothmund-Thomson [80].

Le **syndrome d'Ehlers-Danlos** concerne les troubles métaboliques du collagène. Les individus peuvent développer des calcifications lors de la guérison de nodules sous-cutanés ou de cicatrisations chirurgicales.

Le **syndrome de Werner** est un vieillissement prématuré. Les calcifications peuvent se situer au niveau des ligaments, des tendons, de la synovie, ou encore des tissus sous-cutanés.

Le **pseudoxanthome élastique** concerne les fibres élastiques. Les calcifications peuvent apparaître au niveau des fibres élastiques et causer une rupture. Plus tard, les fibres de collagène peuvent se calcifier. Des calcifications similaires sont retrouvées dans la média et l'intima des vaisseaux sanguins. Ces calcifications vasculaires avec altération du tissu élastique entraînent des manifestations cliniques macroscopiques. Les papules sont localisées dans les grands plis (faces latérales du cou, plis axillaires notamment).

Le **syndrome de Rothmund-Thomson** consiste en de nombreuses calcifications petites et jaunes au niveau des extrémités.

1.6.2. Calcifications métastatiques

Ces calcifications sont des dépôts calciques **fréquemment étendus**, qui se produisent dans le cadre d'un métabolisme anormal du calcium ou du phosphate, et sont généralement associées à une hypercalcémie et/ou une hyperphosphatémie [16]. Les **tissus ne sont pas endommagés**, contrairement aux calcifications dystrophiques.

Ces dépôts sont fréquemment trouvés aux alentours des grandes articulations, telles que les genoux, les coudes et les épaules, avec une distribution symétrique. Des dépôts de calcium au niveau des poumons, des reins, des vaisseaux sanguins et de l'estomac apparaissent plus fréquemment que ceux dans la peau ou les muscles.

La calcification métastatique est souvent liée à une **maladie systémique multi-organique**, pouvant occasionnellement entraîner une calcinose cutanée :

-Hyperparathyroïdie primaire ou secondaire

Dans l'hyperparathyroïdie primaire, les glandes parathyroïdes deviennent hyperplasiques et produisent un excès d'hormone parathyroïdienne (PTH), ce qui augmente la calcémie. Cependant, bien que l'hypercalcémie induite puisse être très élevée, les calcifications cutanées sont rares dans ce cas. Ceci s'explique par le fait que dans un contexte de perturbation phosphocalcique, le développement des calcifications cutanées est généralement dû à l'hyperphosphorémie indépendamment du taux de calcium sanguin [17].

L'hyperparathyroïdie secondaire, plus fréquente, est une réponse fonctionnelle à l'hypocalcémie. Les causes de l'hypocalcémie sont nombreuses, mais la cause la plus

fréquente est l'insuffisance rénale chronique.

-Hypercalcémie paranéoplasique

Le syndrome malin dû aux métastases osseuses ou à la production d'une hormone anormale affectant directement le calcium et le métabolisme osseux peut expliquer l'hypercalcémie.

-Insuffisance rénale chronique

C'est le cadre le plus commun pour lequel les calcifications métastatiques apparaissent. L'insuffisance rénale chronique affecte plusieurs facteurs du métabolisme phosphocalcique. L'hyperphosphatémie due à la diminution de la clairance rénale apparaît relativement tôt. L'hypocalcémie est le résultat direct de cette hyperphosphatémie et est aggravée par le déficit en vitamine D dû à l'insuffisance rénale. Un excès d'hormone parathyroïdienne est alors produit pour compenser, ce qui, par augmentation de la résorption osseuse, provoque une élévation de la mobilisation du calcium et du phosphate : ceci normalise la calcémie mais aggrave l'hyperphosphatémie. Il y a par la suite formation et précipitation de sels de calcium.

-Calciphylaxie

Le terme de calciphylaxie (ou artériolopathie calcique) a été initialement employé pour décrire un mécanisme physiopathologique expérimental démontré chez des animaux de laboratoire. Ce processus a été décrit pour la première fois par Selye en 1961 [100].

Le terme de calciphylaxie est souvent employé à tort pour décrire l'ensemble des situations de calcinose cutanée. Parmi l'ensemble des affections avec calcifications cutanées, ce terme devrait être restreint à un tableau particulier qui est une nécrose ischémique cutanée, et parfois systémique, due à l'oblitération des artérioles d'abord par des dépôts calciques sous-intimaux, puis par la thrombose [37]. Les calcifications, qui touchent la paroi des vaisseaux de petit calibre de la peau, apparaissent au niveau de l'intima (tunique interne) des vaisseaux sanguins et des tissus sous-cutanés. On trouve fréquemment la formation de micro-thrombi.

Ce phénomène extrêmement morbide affecte plus communément, mais non exclusivement les patients en insuffisance rénale terminale [46, 61].

Les troubles les plus communs sont donc l'insuffisance rénale, mais aussi l'hypercalcémie, l'hyperphosphatémie et l'hyperparathyroïdie.

-D'autres affections, moins fréquentes, peuvent être dues à une hypercalcémie et être responsables de ce type de calcifications comme la **sarcoïdose** (il y a augmentation de la production de 1,25-dihydroxyvitamine D ce qui accroît l'absorption de calcium), ou encore une maladie provoquant une destruction osseuse (par exemple des métastases osseuses entraînant une ostéolyse).

L'excès de vitamine D (intoxication) et le syndrome du lait et alcalins peuvent provoquer également des calcifications. Elles sont plus souvent situées aux niveaux des muscles, des yeux et des viscères qu'au niveau de la peau. [80].

-Calcinose tumorale

Elle peut être causée par un trouble métabolique rénal du phosphate entraînant une hyperphosphatémie. La calcémie et l'exploration fonctionnelle rénale sont normales. Elle est séparée des autres formes métastatiques car aucun organe interne n'est atteint. Les caractéristiques générales du nodule calcifié sont une grande taille, situé proche d'une articulation, s'agrandissant progressivement, tendant à réapparaître après une ablation chirurgicale et une capacité à recouvrir les structures adjacentes normales. Les dépôts de phosphate de calcium s'accumulent progressivement dans les tissus périarticulaires et les tissus mous. Ils sont habituellement localisés au niveau des hanches, des coudes, de la scapula, des pieds, des jambes, des genoux et des mains. Elle est généralement héréditaire. Le sex ratio est de deux hommes pour une femme, et elle surviendrait plus particulièrement chez les personnes à peau noire. Les étiologies de la calcinose tumorale sont nombreuses [17].

1.6.3. Calcifications idiopathiques

La calcification idiopathique est généralement localisée au niveau **d'un seul endroit**, et se produit **sans identification possible** d'une altération tissulaire sous-jacente, ou d'un trouble du métabolisme [114]. Par sa qualification, on comprend que son mécanisme d'apparition reste obscur [80].

-Calcinose génitale :

Les calcifications idiopathiques au niveau du scrotum sont les plus fréquentes. Il en existe aussi aux niveaux du pénis ou de la vulve [25]. Elles sont souvent asymptomatiques et apparaissent après un traumatisme ou en l'absence de blessure connue du tissu. La

calcification au niveau du pénis peut aussi résulter d'un kyste épidermique. Les individus atteints sont de jeunes adolescents en bonne santé. L'aspect est particulier puisqu'il montre de grandes masses calcifiées dermiques entourées d'une réaction inflammatoire granulomateuse contenant des cellules géantes à corps étranger. Il ne faut pas les confondre avec des kystes épidermiques.

-Calcinose mammaire :

Elle est localisée profondément dans le parenchyme mammaire. Elle apparaît rarement comme une lésion cutanée et est découverte fortuitement lors d'une mammographie.

-Calcinose miliaire idiopathique :

De nombreux cas ont été associés au syndrome de Down (trisomie 21) et/ou à la formation de syringome (très petite tumeur) [18]. Les lésions sont habituellement multiples et apparaissent sur le tronc, les membres et la tête. L'étiologie est discutée, mais il y a la présence évidente de dépôts calciques dans les glandes sudoripares.

-Nodule subépidermique calcifié :

Les lésions se développent généralement tôt dans l'enfance (surtout au niveau de la face et du cou mais possible partout) et sont typiquement isolées, bien que des lésions multiples puissent exister.

-D'autres formes rares de calcifications existent comme la calcinose circonscrite et la calcinose universelle.

La calcinose cutanée circonscrite (ou calcinose idiopathique des extrémités) apparaît généralement tôt dans la vie et se localise au niveau des paumes de la main et des plantes du pied de façon multiple, alors que la calcinose universelle (ou calcinose idiopathique extensive) apparaît plus tard et est généralement plus étendue. En effet, on observe une calcification diffuse de la peau, des tendons et des aponévroses. Les deux formes sont vraisemblablement associées à un traumatisme ou à une réaction à un corps étranger. Il n'y a pas d'association avec la sclérodémie.

Le terme de calcinose universelle devrait être réservé à la calcinose diffuse de la dermatomyosite. Il est préférable d'employer le terme calcinose idiopathique extensive [17].

1.6.4. Calcifications iatrogènes

Ce type de calcification est généralement localisé au niveau d'un site, bien qu'un dépôt diffus puisse apparaître. Elle se produit secondairement à un traitement ou une procédure.

Par exemple, l'administration parentérale de calcium ou de phosphate peut causer la précipitation de sels de calcium et mener à une calcification. La chimiothérapie anticancéreuse peut également provoquer des dommages tissulaires, ce qui entraîne une calcification cutanée associée à un syndrome de lyse tumorale [80].

Des expositions multiples à des produits de contraste à base de gadolinium (Gadovist[®], Magnevist[®], ...) peuvent entraîner une fibrose systémique néphrogénique (FSN, ou dermatopathie néphrogénique fibrosante, DNF). La FSN, également observée chez des patients sous dialyse, peut provoquer une fibrose systémique mortelle ou débilante [103]. Dans de tels cas, la fibrose cutanée s'étend au-delà du derme pour atteindre les tissus sous-cutanés, les muscles et les organes internes [32, 109]. La maladie a été décrite pour la première fois au début des années 2000 [32].

Les papules, plaques, ou nodules observés sont généralement multiples et peuvent être associés à un érythème, une nécrose ou une ulcération [16].

2. Le thiosulfate de sodium (TSS)

Le thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), noté TSS (ou STS en anglais), est également appelé hyposulfite de sodium.

C'est une molécule utilisée comme antidote des intoxications au cyanure. L'effet chélateur du TSS pour les calcifications a été décrit au cours des complications souvent fatales du diabète sucré ou de l'insuffisance rénale chronique, la calciphylaxie [97].

Cependant, il n'est pas encore validé officiellement en tant que traitement des calcifications [72].

2.1. Propriétés physico-chimiques

Le thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) est un composé cristallin incolore plus fréquemment trouvé sous forme pentahydratée ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). La masse moléculaire du sel pentahydraté est de 248,2 g/mol. Il se présente sous la forme de cristaux ou granules, incolores ou blancs, inodores.

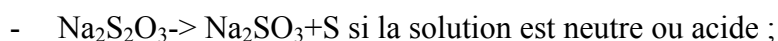
C'est un faible agent réducteur. Il est non inflammable mais peut exploser au contact d'oxydants forts tels que nitrate de potassium, permanganate de potassium, chlorate de potassium.

Il présente des incompatibilités avec les acides (décomposition du TSS avec émission d'un gaz toxique : le dioxyde de soufre), les agents forts, les iodures, les sels de plomb, d'argent, et de mercure.

Le TSS est une matière première décrite dans la Pharmacopée Européenne [84].

Une solution aqueuse saturée en TSS a un pH de 8,1 tandis que le pH d'une solution aqueuse à 10% de TSS varie entre 6,0 et 8,4. Il est très soluble dans l'eau (780 g/L à 20°C). Concernant sa stabilité, la matière première est légèrement déliquescente à l'air humide. Lors d'une décomposition thermique, il perd son eau de cristallisation à 100 °C puis se décompose à plus de 100 °C en dégageant des oxydes de soufre et de l'oxyde de sodium.

Les solutions aqueuses de TSS ont tendance à se décomposer lentement :



- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 + \text{H}_2\text{S}$ si elle est basique [57].

Une étude de la National Corporation of Swedish Pharmacies n'a pas montré, en 3 ans, de changement significatif de composition des préparations injectables de TSS (0,15g/mL) en ampoules [57].

Le TSS est également utilisé dans divers domaines tels que le développement des photographies (car il dissout les sels argentiques), le tannage du cuir, l'industrie chimique, l'industrie du papier ou encore dans le domaine alimentaire ou médical [40]. La Food and Drug Administration (FDA) le répertorie parmi les substances « généralement considérées comme sans danger » (GRAS) [38].

2.2. Utilisations médicales

2.2.1. Intoxication aux cyanures

Depuis de nombreuses années, le TSS est utilisé dans l'intoxication aux cyanures. Le cyanure est un agent cytotoxique inhibant la cytochrome oxydase (COX) mitochondriale (transporteuse d'électrons). Quand on en ingère, l'organisme réagit immédiatement par mécanisme de détoxification transformant les **cyanures** en composés moins toxiques, les **thiocyanates**. La voie principale de cette détoxification des cyanures est catalysée par une enzyme, la rhodanèse.

Le TSS est donc indiqué comme antidote dans le traitement de l'intoxication aux cyanures car il réagit comme un **donneur de soufre** en convertissant les cyanures en thiocyanates [15]. La distribution du thiosulfate est presque exclusivement extracellulaire [22], alors que son action d'antidote était pensée comme intracellulaire [57].

Le thiosulfate est un **constituant physiologique de l'organisme** mais présent dans le corps en **petites quantités**, et dérive principalement de la cystine et d'autres composés mercapto. Les protéines alimentaires contenant des acides aminés soufrés sont une source de la réserve endogène en TS. Les réserves physiologiques disponibles pour détoxifier les cyanures sont donc limitées [98].

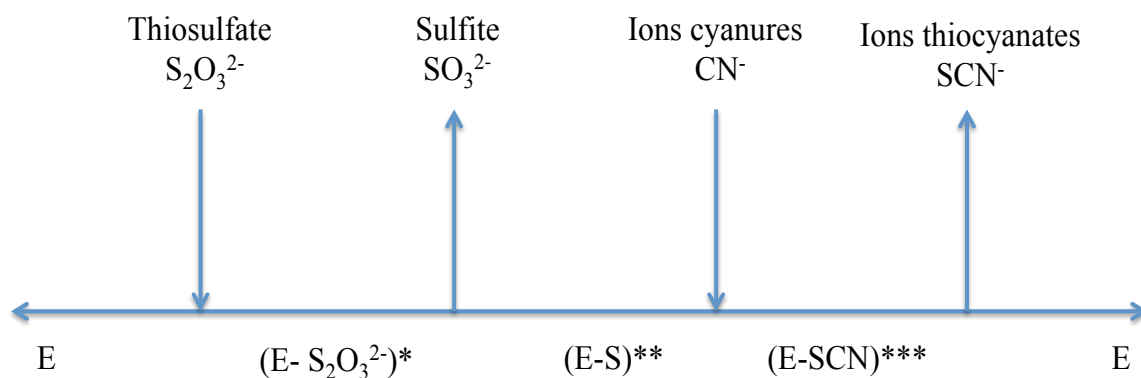
Le thiosulfate de sodium est reconnu non-toxique intrinsèquement, mais le produit de détoxification formé à partir des cyanures, le thiocyanate, pourrait être toxique chez les patients insuffisants rénaux [57].

L'intoxication aux cyanures est un processus intramitochondrial. Le traitement par une injection intraveineuse de soufre ne ferait pénétrer ce soufre que lentement dans les mitochondries [57].

Cette réaction de détoxification est donc catalysée par une **sulfurtransférase** : la **rhodanèse**.

Il s'agit d'une enzyme mitochondriale présente dans la plupart des tissus. Ses plus hautes concentrations se trouvent dans le foie et elle est située au niveau de la matrice mitochondriale [115]. La rhodanèse disponible dans l'organisme est relativement en excès. Par conséquent, le facteur limitant de la détoxification des cyanures est le taux limité de soufre. C'est la justification thérapeutique du TSS lors de l'intoxication aux cyanures.

La rhodanèse catalyse cette détoxification par un mécanisme de double déplacement de soufre ou **mécanisme « ping-pong »** [93].



E = Rhodanèse // * = Complexe rhodanèse-thiosulfate // ** = Complexe rhodanèse-sulfate // *** = Complexe rhodanèse-thiocyanate

Figure 1 : Mécanisme « ping-pong » de détoxification par le TSS et la rhodanèse

Le thiosulfate réagit avec la rhodanèse pour donner un complexe (rhodanèse-thiosulfate) qui, en libérant du sulfite, donne un nouveau complexe (rhodanèse-sulfate). Celui-ci se lie alors avec l'ion cyanure pour former un troisième complexe (rhodanèse-

thiocyanate) qui à son tour, libère du thiocyanate et l'enzyme initiale. On a donc observé la formation progressive de deux produits : le sulfite puis l'ion thiocyanate ; tandis que la rhodanèse est régénérée à la fin de la réaction [113].

Le thiocyanate formé est excrété par le rein.

Le TSS paraît donc suffisant pour soigner les intoxications légères à modérées [42]. Pour les intoxications sévères, il doit être administré avec d'autres antidotes. Le TSS est également l'antidote de choix quand le diagnostic d'intoxication aux cyanures n'est pas certain [57].

2.2.2. Chimiothérapie anticancéreuse

Le TSS est utilisé dans la prévention de la neurotoxicité et de l'ototoxicité du cisplatine et du carboplatine utilisés dans le traitement de cancers du cou et de la tête [52].

L'administration concomitante de cisplatine et de TSS permet d'utiliser de fortes doses de cisplatine sur des régions ciblées de l'organisme. Ces doses sont alors supérieures aux doses de cisplatine données seules. Pour ce faire, le TSS, qui joue son rôle de cytoprotecteur neutralisant la toxicité systémique du cisplatine, est administré par voie IV en bolus [91].

Il est également utilisé en oncologie pédiatrique pour la prévention de la toxicité du carboplatine [78] et comme antidote des extravasations du méchlorétamine et du cisplatine [45].

2.2.3. Autres

Le TSS est le principe actif de certaines spécialités indiquées comme « modificateur de terrain » au cours d'affections rhumatologiques et de la sphère ORL :

- Oligosol Soufre[®] qui contient 300µg de TSS par ampoule de 2 mL ;
- Oligostim Soufre[®] qui contient 58µg de TSS par comprimé ;
- Granions[®] de Soufre qui est une solution buvable contenant 75,6mg de TSS /2 mL.

Il est également présent en association dans d'autres spécialités :

- Rhino-sulfuryl[®] qui est une solution pour pulvérisation nasale contenant 100mg de TSS et 1g de chlorhydrate d'éphédrine / 100 mL ;

- Désintex[®], utilisé dans le traitement d'appoint de la digestion difficile ou d'affections ORL, qui contient 250mg de TSS par comprimé ou 350mg de TSS par ampoule buvable et du thiosulfate de magnésium 50mg par comprimé ou 150mg par ampoule buvable.

Le TSS fait également partie des composés de la formulation de certaines lotions utilisées pour traiter l'acné [38].

Aux Etats-Unis, une lotion à base de TSS est disponible : Versiclear[®] (25% de TSS, 1% d'acide salicylique). Cet antifongique à action kératolytique est utilisé dans le traitement ou la prévention des infections à levures (Pityriasis versicolor), uniquement en application cutanée (application d'une fine couche sur la zone affectée, et massage doux). C'est un vieux traitement peu toxique puisque le principal effet indésirable déploré est une irritation cutanée [75].

2.3. Intérêt du TSS dans notre cas

2.3.1. Sa place parmi les différents traitements des calcinoses

Il n'y a pas de consensus pour le traitement médical des calcinoses, car il est globalement décevant. Par exemple, la warfarine, la colchicine, les bisphosphonates, le probénécide et le diltiazem ont été utilisés avec plus ou moins de succès selon les cas. Bien que de nombreuses thérapies aient été décrites comme relativement efficaces, aucune n'a eu un succès systématique [17].

Il existe aussi un traitement chirurgical. Son indication concernant la calcinose cutanée inclut les formes localisées, les masses douloureuses, associées à des infections récurrentes, des ulcérations, des troubles fonctionnels, ou pour un aspect inesthétique. Cependant la chirurgie présente certains risques, tels que des dommages tissulaires (danger pour les faisceaux neurovasculaires à proximité des lésions), la récurrence de masses, des complications de plaie, dont des infections et des hématomes.

2.3.2. Historique

Yatzidis [118] est le premier à démontrer le rôle bénéfique du TSS dans le traitement

d'une urolithiase calcique récurrente. Il met alors en avant la solubilisation des sels de calcium.

Deux ans plus tard en collaboration avec Agroyannis [119], Yatzidis démontre le succès du TSS dans le traitement des calcifications tumorales des tissus mous, chez cinq patients insuffisants rénaux terminaux.

Bien plus tard, en 2004, Cicone *et al.* [24] sont les premiers à publier une calciphylaxie traitée avec succès par du TSS. Ils observent alors cliniquement un soulagement de la douleur due à la calciphylaxie et formulent l'hypothèse que le TSS était responsable de cette amélioration. La douleur était même soulagée dès les premiers traitements. De plus, le TSS, par voie intraveineuse, semblait favoriser la guérison des ulcérations cutanées, d'autant plus qu'il était associé à un traitement par oxygène hyperbare.

Depuis, plusieurs cas concernant l'utilisation du TSS dans les calcifications ont été publiés, montrant l'intérêt croissant pour son utilisation. Le TSS est également décrit comme traitement des calcifications des tissus mous chez les patients atteints de calciphylaxie [9, 21, 24, 48, 64, 70].

Plus récemment, en 2007, le TSS a été utilisé dans le traitement d'une autre affection : la fibrose systémique néphrogénique (fibrose étendue des tissus) [120], probablement due à un agent de contraste à base de gadolinium. D'autres cas de fibrose systémique néphrogénique ont été publiés depuis [60, 68].

Des cas de DMJ traitée avec succès ont même été rapportés [7, 14].

Bien que l'utilisation du TSS ait fortement augmentée, des études prospectives sont nécessaires pour évaluer sa toxicité et son efficacité afin de déterminer sa place dans la prise en charge des calcifications sous-cutanées [10].

2.3.3. Double action

La proposition originale de l'utilisation du TSS est basée sur le fait que cette petite molécule (normalement excrétée par le rein) se complexe au calcium et augmente la solubilité des dépôts calciques [118].

Récemment, l'accent a été également mis sur l'activité antioxydante du TSS. Ce phénomène se déroule au niveau des cellules endothéliales. Les cellules endommagées ou dysfonctionnantes sont alors restaurées [53].

Même si le mécanisme d'action du TSS n'est pas complètement élucidé encore aujourd'hui [39, 104], ce composé présente donc une double action intéressante : c'est à la fois un puissant antioxydant et un chélateur du calcium. Son rôle **antioxydant** est associé à la diminution rapide de la douleur et ses propriétés **chélatrices** plus lentes sont associées à une régression des calcifications sous-cutanées [54].

2.3.3.1. Duplications de l'endothélium

L'endothélium est responsable de la régulation du degré de vasoconstriction, de l'inflammation, du métabolisme lipidique, de la croissance vasculaire (angiogenèse, artériogenèse), de la paroi sub-capillaire du vaisseau artériel remodelant la matrice endothéliale, de la modulation de la coagulation et de la fibrinolyse.

Un système enzymatique particulier semble jouer un rôle prépondérant dans le fonctionnement normal des cellules endothéliales et de la paroi des vaisseaux artériels: l'eNOS (endothelial nitric oxide synthase) et son produit métabolique l'eNO (endothelial nitric oxide) [56].

Quand ce système enzymatique est dépareillé (enzyme eNOS découplée), l'endothélium devient un gros producteur d'anion superoxide et de ROS (espèces réactives de l'oxygène) au lieu de donner de l'eNO qui a des propriétés antioxydantes (protecteur endothélial).

Ainsi par exemple, un processus avancé d'athérosclérose et de calcifications de la média associé à une ischémie entraîne un dysfonctionnement important des cellules endothéliales et un découplage de l'enzyme eNO.

La production de ROS a un effet néfaste pour l'organisme [54]. Les ROS en excès activent un facteur de transcription nucléaire (NF κ B) et les cytokines en aval, causant une inflammation pouvant entraîner une dérégulation de la synthèse des protéines hépatiques.

L'**inflammation** active donc la synthèse des réactifs de cette phase aiguë pendant que simultanément elle inhibe la synthèse de fétuine A (inhibiteur de la calcification extra-osseuse) et d'albumine (pouvoir antioxydant).

De plus, les ROS diminueraient localement la synthèse des protéines Gla, qui sont des protéines inhibitrices de la calcification.

Cette combinaison contribuerait à augmenter les calcifications vasculaires et sous-cutanées.

De nombreuses causes de ce découplage existent telles que l'insulinorésistance, le stress oxydatif, les ROS, ou le syndrome métabolique.

Aujourd'hui, les syndromes métaboliques, incluant l'obésité et le diabète de type 2, sont de plus en plus répandus [9]. Leurs dégâts sur le système vasculaire sont nombreux. Le nombre d'insuffisants rénaux risque donc d'augmenter ainsi que les patients attendant une transplantation rénale (la balance calcique est perturbée et ceci est potentiellement accentué par diverses thérapies). Il ne faut pas oublier que ces sujets sont susceptibles de développer des calcifications des tissus mous. Araya a démontré le succès d'une utilisation de TSS dans ce cas-là [9].

2.3.3.2. Propriétés du TSS

2.3.3.2.1. Action antioxydante

Le TSS semble être un **réducteur** et un agent **antioxydant** efficace.

Par ses effets antioxydants, il semble permettre les cofacteurs oxydés BH_3 et BH_2 à subir une restauration (réduction complète en BH_4). Le cofacteur BH_4 , essentiel à la formation de NO (monoxyde d'azote ou oxyde nitrique), est épuisé lors d'une ischémie chronique du tissu sous-cutané car il y a de nombreuses toxicités métaboliques.

L'effet antioxydant du TSS, semble **restaurer le fonctionnement des cellules endothéliales** [39] et commencer à restaurer la tendance naturelle de l'endothélium à produire de l'eNO (promoteur de la vasodilatation) [31]. Cette génération de eNO entraîne donc une **vasodilatation** puis une vascularisation des tissus mous et de l'unité neuronale périphérique impliquée dans les calcifications.

Cet effet positif sur le découplage de l'eNOS peut avoir lieu car le TSS donne des électrons pour le réappariement. Il est capable de céder des électrons afin de réappairer les électrons endommagés dépareillés. Ce **recouplage de l'eNOS** se fait donc par la capacité du TSS à donner deux électrons dépareillés pour récupérer les ROS dépareillées pendant qu'il génère le GSH et le H₂S.

Cette action antioxydante est démontrée par la réaction : $GSSG + 2Na_2S_2O_3 \rightarrow 4NaHSO_4 + 2GSH + 2H_2O$ (sous l'action du peroxyde, de l'anion superoxide et de la glutathion réductase) [56].

Il est par ailleurs possible que le TSS soit capable de générer du sulfure d'hydrogène **H₂S** par diverses réactions. Le sulfure d'hydrogène est un important régulateur de la vasodilatation endogène capable d'exercer un effet antalgique et d'induire des actions anti-inflammatoires. Le TSS serait donc **vasodilatateur** via le sulfure d'hydrogène.

Il tient un rôle cardioprotecteur dans l'insuffisance cardiaque chronique : il préviendrait le déclin de la fonction cardiaque en générant une augmentation ventriculaire de H₂S [101].

De plus, le TSS pourrait fonctionner dans deux lits vasculaires différents dans le tissu sous-cutané, comme l'unité neuronale périphérique aussi impliqué dans l'ossification-calcification dystrophique : la vasa nervorum et l'endoneurium de l'unité neuronale périphérique, ainsi que les petites artérioles pré-capillaires distales.

Ceci expliquerait **l'amélioration rapide** de ce type de douleur névralgique, tandis que les propriétés **chélatrices** du TSS mettraient **plus longtemps** (quelques mois au lieu d'heures ou jours) à restaurer les capacités des lits vasculaires neuro-circulatoires.

2.3.3.2.2. Action chélatrice

Le TSS améliore la solubilité du calcium [39]. Le mécanisme d'action probable est la dissolution, dans les tissus mous ou vasculaires, de dépôts calciques insolubles en **formant des complexes** de thiosulfate de calcium. Ce thiosulfate de calcium formé est extrêmement **soluble** [31]. Les calcifications diminuent alors en taille et deviennent plus molles.

L'amélioration de la solubilité aqueuse du thiosulfate de calcium autorise une bonne mobilisation et une bonne clairance des dépôts calciques vasculaires et des tissus mous [9, 118].

En plus de la dissolution de ces dépôts calciques, il semble **inhiber la précipitation** des sels de calcium en interférant avec la cristallisation de phosphate de calcium au niveau des tissus [27, 81]. Il bloquerait alors la formation d'hydroxyapatite [63, 118]. La disparition des calcifications sous-cutanées (nodules ou plaques douloureux) prend plusieurs mois. Elle est observée à l'imagerie ou à la palpation [24, 55, 56].

Ce double effet semble donc donner un résultat positif dans la guérison de l'ulcération de la peau (cf. partie 3), réduisant les complications de type septique.

Le nombre de cas étudiés est non négligeable. Le fait que ce ne soit que des cas observés, car il n'y a pas d'essais randomisés, constitue tout de même une limite [71, 92, 97].

3. Revue de cas d'utilisation du TSS

La preuve de l'efficacité du TSS est limitée aux cas publiés (cf. tableau en annexe 1). Ce tableau est une revue de la littérature concernant les cas de calcifications traitées par le **TSS seul ou associé à d'autres médicaments**. Il ne prétend pas être exhaustif mais permet de dégager certaines observations.

En premier lieu, une **utilisation croissante** du TSS dans le traitement des calcifications est observée. Ce nombre augmente de façon importante ces dernières années.

On observe bien que les calcinoses des tissus mous sont variées (FSN, calcinose tumorale, LED, DM et DMJ, ...) mais la majorité des cas décrits concerne l'artériolopathie urémique calcifiante (AUC ou calciphylaxie) avec des lésions situées principalement sur les membres inférieurs.

3.1. Effets cliniques

Un des premiers indicateurs d'une bonne réponse au traitement est la diminution de la **douleur** dans les jours suivant l'initiation du traitement. Cet effet antalgique est généralement suivi d'une réduction des indurations permettant une amélioration fonctionnelle des articulations et/ou la guérison des **lésions** en quelques mois.

Ceci représente la majorité des cas, mais il existe des patients pour lesquels le TSS a été insuffisant [68, 70, 110, 111]. De plus, certains patients décèdent souvent à cause de l'importance des différentes maladies associées malgré une guérison clinique observée des lésions ulcéreuses [95].

3.2. Posologie

Le TSS est utilisé par voie orale (VO), intraveineuse, intra péritonéale ou topique. La voie intraveineuse (IV) représente la majorité des cas publiés.

Il existe une grande variation de la **dose** entre les différents cas. On remarque qu'elle augmente en fonction de la gravité de l'affection et de la comorbidité. Par conséquent, il n'y a pas de posologie standard établie même si une dose type revient fréquemment : **25 g par voie IV** lente (30-60 minutes), **3 fois par semaine** généralement après chaque hémodialyse. De façon similaire, la posologie est de **25 g / 1,73 m²**, 3 fois par semaine chez l'enfant (même si la littérature décrit beaucoup plus de cas d'adultes). La VO est généralement utilisée en prévention secondaire des calciphylaxies, à raison de 7,5 g par semaine (possible fractionnement en 3 prises hebdomadaires). Concernant la voie topique, la préparation contient le plus souvent **10 % de TSS**, et l'application se fait **chaque jour** au niveau des calcifications.

Bien que la durée du traitement ne soit pas rapportée dans tous les cas, elle varie de 6 semaines à plus d'un an. Ceci s'explique car la guérison s'obtient en plusieurs mois. Lorsque des améliorations sont observées, il est parfois possible de diminuer les doses et fréquence d'administration par paliers en fonction de la clinique. Une fois la guérison obtenue, le traitement est généralement arrêté.

3.3. Effets indésirables

La **toxicité aiguë** du TSS entraîne une irritation possible de la peau, des yeux et des voies respiratoires ainsi que des diarrhées (notamment en cas d'ingestion de fortes doses) [29]. Mais il ne présente pas d'effet indésirable respiratoire ou hémodynamique quand il est donné en bolus ou en perfusion [57]. Il est donc généralement considéré comme **peu toxique** [40]. Aucun effet mutagène n'a été rapporté [38].

Comme on peut le voir à l'aide du tableau annexe, les effets indésirable décrits sous TSS semblent **habituellement légers** [57]. On en note trois plus fréquents que les autres : **acidose métabolique, nausées, vomissements** [27].

Alors que les cas rapportés ont une bonne tolérance au traitement (probablement liée aux doses utilisées), une **acidose métabolique** [9, 21, 108], due à une augmentation du trou anionique, a été observée. Elle paraît être due à la rétention de sulfate (accumulation d'acide thiosulfurique produit à partir du TSS). L'utilisation d'un dialysat à teneur élevée en

bicarbonates pourrait résoudre l'acidose métabolique induite par le TSS. Elle n'est donc pas considérée comme problématique et est régressive à l'arrêt du traitement.

On observe également des **nausées** et **vomissements** surtout si l'injection est rapide. L'utilisation d'une IV lente se justifie ainsi. On note tout de même la nécessité d'arrêter le traitement à cause de l'importance des vomissements [70]. Cependant, l'importance des vomissements n'est pas obligatoirement imputable au TSS du fait de la polymédication de certains cas.

Il suffit généralement de diminuer la dose de TSS pour observer l'arrêt des vomissements ou d'utiliser une prémédication à base de sétrons [87].

D'autres effets indésirables ont été observés mais moins fréquemment.

Ainsi, il pourrait entraîner une **hypotension** probablement due à la formation de thiocyanates (propriétés hypotensives [36]). On ne sait pas si ce problème cardiovasculaire est dû au TSS lui-même ou à l'acidose induite, car une fois l'acidose traitée, l'effet cardiovasculaire disparaît.

De rares cas d'effets indésirables plus sévères ont quelquefois été observés : effet diurétique et perturbations osmotiques (exemple d'une hypovolémie [90]), des arthralgies, des crampes, ou encore des effets sur le SNC (céphalées, vision floue, confusion, hallucinations, désorientation).

De plus, une hypernatrémie et une crise d'épilepsie ont été observées à doses très élevées [95].

Il existe aussi une question sur des effets indésirables osseux potentiels, compte tenu des données publiées sur les essais chez les animaux [66, 83] où il a été observé une activation des ostéoclastes. Mais, il n'y a pas d'évidence clinique chez l'Homme concernant une possible déminéralisation osseuse due au TSS ou une augmentation du nombre de fractures dans l'état actuel de la littérature [95].

Les effets indésirables peuvent varier en intensité ou fréquence selon la voie d'administration. D'après les cas publiés, une **meilleure tolérance digestive est observée par voie IV que par voie orale.**

La voie topique, bien que peu décrite, semble une alternative intéressante avec encore moins d'effets indésirables que par voie systémique [111] puisqu'aucun effet indésirable n'est rapporté [105]. Ceci est à mesurer par le faible nombre de cas observés [7, 12, 86, 117]. En effet, la spécialité Versiclear[®], commercialisée au Etats-Unis et utilisée par voie topique, rapporte dans ses effets indésirables potentiels une irritation de la peau. (cf. 2.2.3.)

Il n'y a **pas de contre-indication** car le TSS est bien toléré. Sa toxicité est faible et ses effets toxiques ne sont attendus que si les doses sont bien au-dessus des doses recommandées [57]. Plus la quantité de TSS administrée est élevée, plus les risques et les importances des effets indésirables augmentent. Lorsque ceux-ci apparaissent, on diminue les doses ce qui permet généralement leur disparition [95].

Il est important aussi de considérer la **polymédication** de certains cas, car les effets indésirables peuvent également être aggravés par des doses élevées de médicaments pris de façon concomitante (exemple du cinacalcet) [95].

Bien que l'utilisation du TSS dans le traitement des calcifications ait augmenté ces dernières années, une de ses principales limites vient du fait qu'il n'est pas utilisé seul. On ne peut donc pas savoir la part du TSS dans les améliorations constatées. De plus, certaines évolutions favorables des calcifications peuvent être spontanées, il faudrait donc réaliser des essais cliniques pour pouvoir conclure de façon certaine.

Cependant, des éléments cliniques paraissent prouver l'activité du TSS : suite à l'arrêt de TSS (une fois une amélioration obtenue), il peut y avoir réapparition des douleurs. Ces douleurs disparaissent à nouveau après la reprise du médicament [77, 108].

4. Etude de stabilité (Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris)

4.1. Préalable : mise en forme pharmaceutique du TSS

L'objectif était de mettre au point une forme galénique en application cutanée chez un enfant de 11 ans, à base de TSS pour une action sous-cutanée.

Cette mise au point devait donc tenir compte en particulier de :

- la compatibilité du véhicule avec le TSS ;
- la tolérance générale et des effets cutanés du véhicule, notamment chez un enfant de cet âge ;
- la pénétration cutanée (perméation) du TSS, afin d'atteindre les sites d'action sous-cutanés.

Une préparation pharmaceutique à usage humain peut faire appel à des matières premières originales à condition de produire une monographie complète et d'apporter les preuves de leur innocuité et de leur bonne tolérance. Ceci n'étant pas envisageable, il a été décidé de recourir à des matières premières répondant à la réglementation en vigueur, inscrites aux Pharmacopées et soumises à des contrôles adaptés.

Quatre formes pharmaceutiques pour application cutanée les plus courantes [84] ont été passées en revue : pommades, crèmes, pâtes et gels.

Les **pommades** hydrophobes sont difficilement envisageables étant donné la forte hydrosolubilité du TSS. Les pommades hydrophiles n'ont pas d'intérêt pour un principe actif hydrosoluble, à visée sous-cutanée. Les pommades absorbant l'eau dans lesquelles peuvent être incorporés des émulsionnants de type lipophile peuvent, quant à elles, être envisagées.

Les deux types de **crèmes**, hydrophobes contenant des émulsionnants H/L et hydrophiles contenant des émulsionnants L/H sont tous les deux à tester même si, au regard des caractéristiques du principe actif déterminantes pour la perméation, celle majoritairement lipophile serait plus intéressante.

Les cérats, définis par la Pharmacopée française comme étant des « pommades » ayant pour base un mélange de cire et d'huile, considérés par la Pharmacopée européenne comme étant des crèmes puisque contenant une certaine quantité d'eau, donc majoritairement lipophiles sont à tester.

Les **pâtes** - préparations semi-solides contenant une forte proportion de poudres finement dispersées dans l'excipient - sont à considérer.

Les **liquides gélifiés** à l'aide d'agents appropriés, reconnus pour leur pouvoir apaisant, sont également à envisager pour le traitement de ces lésions douloureuses.

La revue de la littérature ayant mis en exergue l'intérêt thérapeutique potentiel du produit ainsi que la nécessité de confirmer cet intérêt au sein d'une population plus importante, la perspective d'un usage à plus large échelle, dans le cadre d'un essai thérapeutique par exemple, a été d'emblée envisagée. Aussi, décision a été prise de **tester en première intention des formulations pharmaceutiques classiques** figurant dans les Pharmacopées ou le Formulaire national, ou encore des formulations éprouvées comme bases en cosmétologie, avant d'envisager une mise au point *de novo*. Le principal avantage d'un tel choix était la sécurité de l'utilisation de produits éprouvés, le patient concerné étant un enfant. L'autre intérêt en cas de résultat favorable (devant conduire à la réalisation d'essai thérapeutique) résidait dans la bonne reproductibilité des préparations, en réduisant la fabrication à une opération de mélange, ou de dispersion du principe actif dans la base, selon le type de formulations retenu.

Il avait été décidé de tester une base pharmaceutique par type galénique lorsqu'il y avait une justification :

- des bases majoritairement lipophiles pour contrebalancer l'importante hydrosolubilité du TSS ;
- des bases majoritairement hydrophiles si :
 - elles contiennent un promoteur d'absorption ou un excipient à propriété tensio-active qui peuvent contribuer à favoriser la perméation du TSS ;
 - elle appartiennent à une gamme comportant par ailleurs un représentant lipophile, permettant de faire des comparaisons.

Un représentant de chaque type des quatre bases suivantes a par conséquent été testé : excipients anhydres hydrophiles, excipients émulsionnés L/H, excipients émulsionnés H/L, excipients gélifiés.

Les tests ont été menés sur huit semaines pour orienter le choix selon quatre critères :

- l'absence d'émanation évoquant du H₂S (odeur caractéristique) ;
- le maintien d'une homogénéité visuelle ;
- le toucher et l'aspect à l'étalement cutané ;
- la stabilité de la teneur en thiosulfate de sodium.

A l'issue, le choix s'est porté sur la formule objet de cette étude.

4.2. Pourquoi cette collaboration ?

Le patient, de 11 ans, souffrait d'une dermatomyosite. Son traitement a consisté en une préparation hydrophobe contenant du thiosulfate de sodium à 10% (m/m) [86].

La teneur en TSS avait été contrôlée par un titrage iodométrique. Toutefois, il s'agit d'une technique fastidieuse qui nécessite l'extraction du principe actif de la matrice et ne donne pas d'information sur sa stabilité.

Dans ce contexte, il a été envisagé de contrôler la teneur en thiosulfate de sodium et d'étudier la stabilité du principe actif par une technique en chromatographie liquide haute performance (pour déceler l'apparition de potentiels produits de dégradation) avec une détection dans l'UV à 217nm (le TSS présentant un maximum d'absorbance à cette longueur d'onde).

4.3. Chromatographie : généralités [23]

La **chromatographie** est un mode de séparation par différence de distribution des composés entre deux phases non miscibles (phase stationnaire et phase mobile) grâce à la mise en jeu d'interactions diverses.

La **phase stationnaire**, située dans la colonne, est traversée en permanence par un flux de phase mobile. Cette phase mobile entraîne les espèces à séparer dans son mouvement, et traverse la colonne entre les particules de la phase stationnaire.

Le transport des composés se fait par translation et diffusion dans la phase mobile. Il est régi par la vitesse d'écoulement de la phase mobile ainsi que sa composition. Il faut optimiser la composition de la phase mobile en jouant sur la force éluante et la sélectivité (combinaison de solvants miscibles). La rétention sélective résulte des affinités particulières de chaque soluté pour ces deux phases. L'efficacité de la séparation, évaluée par le nombre de plateaux théoriques N , augmente lorsque la taille des grains de la phase stationnaire diminue. En effet, le flux de la phase mobile entre les grains est alors plus uniforme, la diffusion turbulente minimisée, d'où des pics plus fins et une surface d'échange supérieure. L'efficacité augmente également lorsque le facteur de résolution R augmente. Ce facteur R permet d'apprécier la qualité de séparation entre deux pics consécutifs. Il est satisfaisant dès qu'il est supérieur à 1,5.

On injecte de très petites quantités d'échantillons. Pour être détecté, un composé doit être totalement élué du système chromatographique puisque le détecteur est situé en sortie de colonne associé à un enregistreur de signal. A chaque composé correspond un signal électrique tracé sous forme de pic chromatographique avec un temps de rétention particulier. Ce pic gaussien a une aire proportionnelle à la quantité injectée. (cf. figure 2)

L'**HPLC** (chromatographie liquide haute performance) permet un gain en efficacité (N). On augmente la pression (donc le débit de la phase mobile) pour élever la vitesse de transfert et diminuer le temps de rétention (sinon la résistance au flux du solvant et le temps de rétention augmenteraient).

Elle est utilisée car il n'y a pas de dégradation thermique du produit (au contraire de la chromatographie en phase gazeuse) puisqu'on travaille à température ambiante ou très proche. L'HPLC permet d'étudier la composition chimique sans pratiquer de réaction de dérivatisation (silylation, acétylation) des composés semi-volatils.

La **polarité de phase inversée** est le mode de séparation le plus fréquent en HPLC. La séparation des solutés se fait par partage entre la phase stationnaire non polaire et la phase mobile polaire. Elle sert à séparer les composés peu polaires ou apolaires : les solutés polaires sont élués avant les composés apolaires qui sont plus retenus par la phase stationnaire apolaire (inverse de la chromatographie d'adsorption).

Pour détecter certains composés, un agent d'appariement d'ions peut être nécessaire.

Les **agents d'appariement d'ions** sont des composés qui ont un groupement ionique (tête polaire), de charge opposée à celle des composés à séparer, attaché à une chaîne carbonée hydrophobe grâce à laquelle ils interagissent avec la colonne (phase stationnaire) apolaire.

On considère trois mécanismes de rétention dans la chromatographie d'appariement d'ions :

-partage : formation d'une paire d'ions dans la phase mobile, entre l'analyte chargée et l'agent d'appariement d'ion de charge opposée, qui est ensuite adsorbée dans la phase stationnaire ;

-échange d'ions : adsorption de l'agent d'appariement d'ions sur la phase stationnaire qui par la suite se comporte comme un échangeur d'ions ;

-interactions d'ions avec formation d'une double couche électrique à l'interface solide/liquide : l'agent d'appariement d'ions s'adsorbe sur la phase stationnaire et entraîne l'apparition d'une différence de potentiel entre la surface du solide et la solution. Les solutés ionisés se concentrent dans la couche liquide au voisinage de la surface et forment une « couche diffuse » où les ions de même signe que l'agent d'appariement d'ions sont repoussés de la couche diffuse alors que les ions de signe opposé y sont attirés.

Exemple d'un agent d'appariement d'ions : le tétrabutylammonium hydrogène sulfate (TBAHS).

Il permet la formation de paires d'ions en phase aqueuse. C'est la phase mobile qui contient le TBAHS. Ce contre-ion, présent de façon permanente dans la phase éluante, se fixe sur les chaînes alkyles de la phase stationnaire de sorte que la phase stationnaire effective comporte des greffons recouverts par le contre-ion. De plus, le TBAHS se combine avec le composé de l'échantillon pour former une paire d'ions qui est alors retenue dans la phase stationnaire.

La sélectivité est contrôlée en faisant varier le pH de la phase mobile ou en changeant sa polarité c'est-à-dire en faisant varier les concentrations relatives en eau et en modificateur organique. Dans la phase mobile, pour une concentration en contre-ion fixée, le facteur de rétention (k') diminue quand la teneur en méthanol augmente (donc k' augmente avec la teneur en eau).

La colonne (**phase stationnaire**) est un tube en inox résistant aux fortes pressions. Elle doit supporter jusqu'à 300 bars de pression. La perte de charge est généralement comprise entre 50 et 150 bars.

La diffusion est cent fois plus lente en phase liquide qu'en phase gazeuse. La colonne a une longueur qui varie de 5 à 30 cm : elle est plus courte qu'en chromatographie à phase gazeuse car il faut éviter une pression trop élevée et maintenir la phase mobile à même vitesse. Le diamètre intérieur des particules varie en fonction des besoins analytiques.

Elle est généralement composée :

-de silice greffée par groupement alkyle (hydrophobe)

->octyl (C8)

->octadécyl (C18)

- ou de copolymère styrène-divinylbenzène (PS-DVB), la surface spécifique est élevée ce qui augmente le pouvoir adsorbant.

La **phase mobile** est un réservoir de solvants. Elle est généralement binaire (parfois ternaire). On prépare généralement un volume réduit pour éviter toute variation de composition de la phase mobile pendant l'analyse. Afin de minimiser l'évaporation et la contamination par des vapeurs d'eau, on utilise des réservoirs étanches. Ceci permet de diminuer la variation de polarité pouvant entraîner une variation de température. Les solvants doivent être filtrés et dégazés. La distribution de la phase mobile se fait selon le mode isocratique (même composition de la phase mobile) ou selon un gradient de solvants (variation de composition au cours du temps).

Ensuite, le détecteur permet de capter un signal. Un exemple de détecteur est le **spectromètre UV-visible** (UV : 190-400 nm ; visible : 400-800 nm). Le détecteur UV-visible est non destructif. Il ne détecte que les molécules avec au moins un chromophore (noyau aromatique, fonction ou groupe d'atomes modifiant la fréquence de l'onde UV ainsi que l'intensité d'adsorption). Lorsque le composé n'absorbe pas dans l'UV ou dans le visible, il est nécessaire de faire une réaction de dérivation pré ou post-colonne.

La longueur d'onde est sélectionnée en fonction du chromophore de la molécule à traiter. La plupart des solvants utilisés en chromatographie en phase liquide absorbent à des longueurs d'onde comprise entre 170 et 230 nm. Il est donc préférable de choisir une longueur d'onde supérieure à 230 nm pour limiter les interférences et la faible sensibilité liée à l'absorbance de la phase mobile.

Le détecteur mesure l'absorption des solutés par rapport à la phase mobile qui absorbe pas ou très peu. L'absorption suit la loi de Beer-Lambert :

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon lc$$

A : absorbance ou densité optique à une longueur d'onde donnée (sans unité)

I_0/I : transmittance de la solution (sans unité)

ϵ : coefficient d'extinction molaire (L/mol/cm), qui dépend de la longueur d'onde, la nature chimique de l'entité et la température

l : longueur du trajet optique, ce qui correspond à l'épaisseur de la cuve utilisée (cm)

c : concentration de la solution (mol/L)

Le spectre obtenu est une empreinte digitale de l'élément analysé.

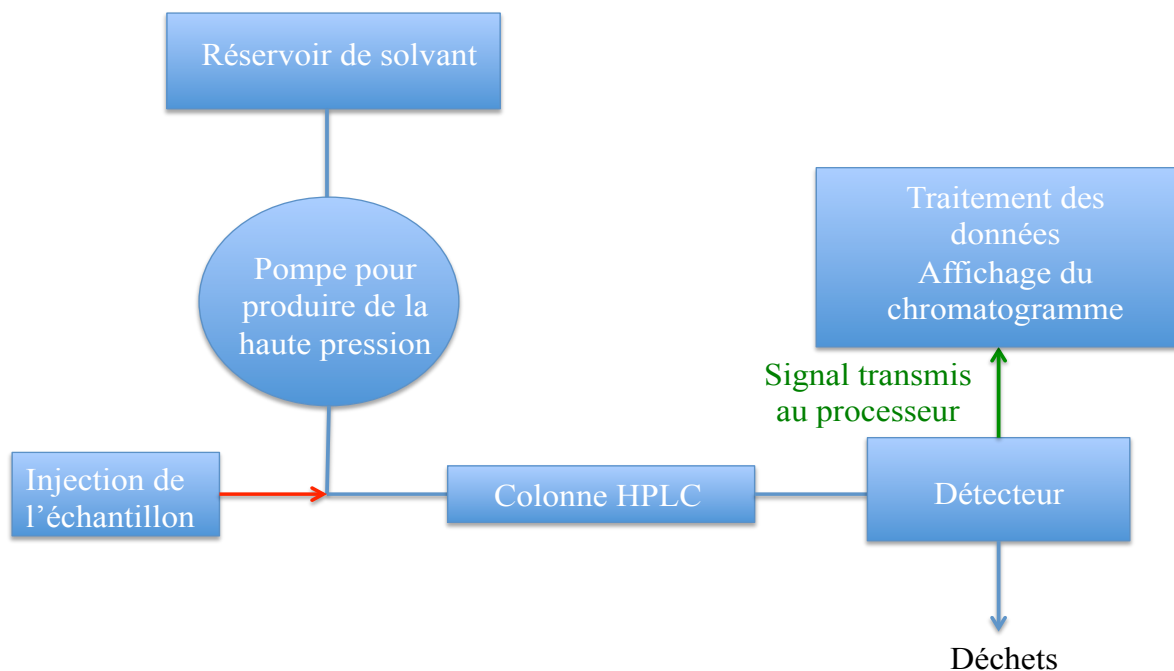


Figure 2 : Schéma HPLC

La phase mobile passe dans la colonne grâce à une pompe contrôlant le débit. L'injection de l'échantillon est effectuée par une vanne et les solutés sont injectés dans un système équilibré. Le processus chromatographique se déroule mais est non visible par l'opérateur. Les solutés séparés sortent de la colonne, sont élués et détectés en continu, puis sont éliminés dans une poubelle.

4.4. Rappel des techniques utilisées pour doser le TSS

4.4.1 Historique (anciennes méthodes)

Une revue des différentes méthodes utilisées est utile pour envisager la méthode de dosage à utiliser.

Des méthodes basées sur une réduction d'iodures ont été décrites par Gast *et al* en 1952 [44] et Dixon en 1962 [35], mais elles manquent de spécificité.

Sörbo et Ohman [107] quant à eux ont proposé, en 1978, une méthode de quantification urinaire qui faisait intervenir un échange d'ions destiné à éliminer les impuretés, suivi d'une conversion du thiosulfate en thiocyanate en présence de cyanures et d'ions cupriques. Le thiocyanate formé était à son tour concentré par échange d'ions, avant d'être élué avec une solution de fer ferrique. Puis le thiocyanate ferrique était dosé par colorimétrie.

Newton *et al* [79] décrivaient en 1981 une méthode capable de détecter les thiols présents dans les milieux biologiques, à des concentrations de l'ordre du picomole. Les thiols étaient préalablement convertis en dérivés fluorés après réaction avec du monobromobimane et séparation par HPLC en phase inversée.

Cette méthode avait été modifiée par Shea *et al* [102] en 1984 pour permettre le dosage à la fois dans les urines et le plasma.

La méthode proposée par Ivankovich [58] en 1983 avait été considérée comme spécifique et sensible (concentrations de l'ordre du microgramme par millilitre). Les prélèvements plasmatiques et urinaires étaient alors réalisés sur tubes héparinés. De l'iode de potassium, du bromure de potassium et du monohydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4) étaient ensuite rajoutés. Puis du tétrahydroborate de potassium (H_6BK), dans de l'hydroxyde de sodium, et de l'acétone étaient introduits, sous agitation, suivis d'une solution de sulfate ferrique et du sulfate de N,N-diméthyl-p-phénylènediamine dans de l'acide sulfurique. Il se développait alors une coloration bleue dont l'absorbance était mesurée à la longueur d'onde de 665 nm.

4.4.2. Résumé du travail effectué avant les analyses à l'HEGP

Dans un premier temps, la séparation du thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) de ses impuretés potentielles est réalisée sur une colonne échangeuse d'ion ionoSpher A. Les résultats de cette

première série de manipulations n'ont pas permis d'obtenir des pics chromatographiques corrects. Etant donné que la détection UV n'est pas sensible et afin d'écartier un phénomène de saturation des capacités de rétention de la colonne chromatographique, des essais sur cette même colonne ont été réalisés avec un détecteur classiquement utilisé pour la détection des ions inorganiques : le réfractomètre. Ces essais ont été réalisés au laboratoire de chimie analytique à la faculté de pharmacie de ParisSud (EA 4041) mais n'ont pas permis de résoudre le problème chromatographique.

4.5. Sélection de la méthode

Le choix de la méthode d'analyse se fait en effectuant une revue des publications dans lesquelles le TSS a été dosé.

En 2010, Schulz *et al* ont étudié la stabilité d'un mélange nitroprussiate de sodium et thiosulfate de sodium IV dans les proportions 1 : 10 [99].

Pour cette raison ainsi que celles décrites dans la partie 4.3., nous nous orientons vers un autre support chromatographique à polarité de phases inversée en utilisant dans la phase mobile un agent d'appariement d'ions, le tetrabutylamoniumhydrogen sulfate (TBAHS) avec une détection UV, et ce d'après la publication de Schulz *et al.* [99]

Dans cette publication, une technique HPLC est décrite. Le TSS est détecté par UV à 210 nm. Le volume d'injection est de 1 microlitre et le débit, de 1,0 mL/minute. La séparation des composés s'effectue à 25°C. On utilise une colonne C8 de longueur 15 cm, de diamètre interne 4,6 mm et le diamètre des particules est de 5 micromètres [99].

La phase mobile est à pH neutre (environ 7,1). L'agent d'appariement d'ions (TBAHS) est à une concentration de 0,005M dissout dans une phase mobile composée d'un mélange méthanol – tampon phosphate (15 : 85 - v/v). Le tampon phosphate est à 10 mM de dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄).

4.6. Développement de la méthode

Le développement correspond à une mise au point de la méthode sélectionnée. C'est une adaptation de la référence bibliographique en fonction des équipements disponibles au laboratoire. Elle a lieu dans le but d'optimiser le dosage du TSS.

La surface du pic chromatographique est la réponse instrumentale qui nous sert à évaluer la concentration en TSS. La méthode de quantification se fait grâce à une gamme d'étalonnage.

4.6.1. Résumé du travail effectué à l'HEGP

Des essais ont été effectués sur une colonne C18 en respectant ces conditions. Lors d'une injection d'une solution de TSS à la concentration de 2 mg/mL, on observe un pic chromatographique à un temps de rétention de 10,75 min.

On décide de modifier les proportions de la phase mobile à 20 : 80 - v/v afin d'avoir une phase mobile plus éluante. Le temps de rétention diminue mais le pic est dédoublé et donc inexploitable. On refait alors une phase mobile dans les proportions 15 : 85 - v/v. On observe à nouveau un pic. On injecte l'ancien échantillon pour avoir des données sur la conservation et seul le pic de TSS est observé.

On réalise ensuite une gamme d'étalonnage de TSS à des concentrations allant de 0,1 à 2 mg/mL. Le maximum correspond à la concentration en TSS de la préparation galénique au départ.

On veut savoir si on détecte aussi les produits de dégradation potentiels du TSS. On prépare alors des solutions à 2 mg/mL de disulfite de sodium, sulfite de sodium et sulfate de sodium qui sont les produits de dégradation susceptibles de se former. On fait trois injections différentes. On observe uniquement un pic correspondant au disulfite de sodium, mais son temps de rétention est très inférieur au temps de rétention du TSS. Il n'y a pas de confusion possible lors de la détection du thiosulfate de sodium.

On décide alors de passer à l'examen de la préparation galénique. Mais il faut arriver à extraire le TSS de la préparation dans une phase limpide que l'on pourra ensuite injecter en HPLC. On mélange 1g de cérat avec 5 mL de phase mobile 15 : 85 - v/v. Après agitation au vortex, il n'y a aucun mélange. L'injection étant impossible pour l'instant, on n'a aucune idée

de la teneur en TSS de la préparation topique.

4.6.2. Mise au point de la méthode de dosage après les premiers essais

4.6.2.1. Vérification de la détection du TSS

La dernière méthode HPLC utilisée est conservée, ainsi que le choix du TBAHS. On refait le tampon phosphate (K_2HPO_4) 10 mM et le pH est voisin de 7,1. La partie organique de la phase mobile est également préparée. Ensuite la colonne chromatographique est équilibrée avec la phase mobile qui est composée du tampon phosphate 0,01 M et de méthanol (85 :15 - v/v), ainsi que de TBAHS 0,005 M. Ceci est nécessaire car les tubulures contenaient d'autres produits, ce qui fait que l'appareil doit être conditionné avec les phases d'intérêt.

Puis, une gamme de TSS est réalisée à l'aide de pipettes automatiques ($m_{TSS} = 20$ mg qsp 10 mL, ce qui donne $c_{TSS} = 2$ mg/mL).

C TSS (mg/mL)	0,1	0,5	1	1,5	2	Blanc
V TSS (2mg/mL) en μ L	50	250	500	750	1000	0
H ₂ O stérile en μ L	950	750	500	250	0	1000

Tableau 1 : Réalisation de la gamme d'étalonnage

Les cinq points de la gamme sont injectés.

On obtient une droite d'étalonnage $y = 117,89x + 1,6391$ (où y = aire sous la courbe en mAU.min, et x = concentration en TSS en mg/mL).

Le temps de rétention est similaire pour toutes les injections et $R^2 = 0,9998$, donc conforme car supérieur à 0,995. La gamme d'étalonnage est donc conforme.

4.6.2.2. Réflexion à propos de l'extraction

En plus des limites de la gamme d'étalonnage qui dépendent de la concentration de la préparation, il faut mettre au point une méthode permettant de séparer le TSS des excipients. En effet, lors des précédents travaux, l'injection à partir de la préparation s'était révélée impossible.

Afin de pouvoir doser le médicament par HPLC, il faut être capable de réaliser cette séparation du principe actif des excipients. On veut voir si un solvant organique non miscible à l'eau est capable de solubiliser et extraire les excipients lipophiles de la préparation.

On choisit comme solvant le TBME (tert butyl méthyl éther) de formule $\text{CH}_3\text{OC}(\text{CH}_3)_3$. C'est un éther liquide, incolore, volatil et inflammable qui est non miscible à l'eau.

4.6.2.2.1. Mélange solution/solvant

On réalise un mélange volume à volume, c'est-à-dire qu'on prend 2,5 mL de tampon phosphate et 2,5 mL de TBME. Ce solvant est moins dense que l'eau et représentera donc la partie supérieure de la préparation. Avant mélange avec la phase organique, on ajoute du TSS dans le tampon pour que les 2,5 mL de tampon contiennent du TSS à concentration 2mg/mL (soit 5mg de TSS qsp 2,5 mL de tampon). Après agitation au vortex et dissolution complète du TSS, on observe deux phases distinctes (aqueuse et organique). Le TSS, très polaire et chargé, doit théoriquement rester au sein de la phase aqueuse. On récupère donc la phase aqueuse que l'on injecte dans l'appareil.

Le temps de rétention observé est similaire (9,64 min) à celui observé avec la gamme de TSS (entre 9,68 et 9,76 min). On compare ensuite l'aire du pic chromatographique obtenu lors de l'extraction avec celle obtenue dans la gamme à 2 mg/mL. On obtient un rendement supérieur à 99% : il n'y a pas d'interférence du TBME avec le dosage. Ce solvant est donc utilisé pour l'extraction des excipients de la base hydrophobe.

4.6.2.2.2. Extraction du TSS de la préparation galénique

On veut solubiliser la base hydrophobe contenant le TSS, dans le but prochain de

pouvoir observer la teneur en TSS de la préparation, en l'injectant dans la colonne chromatographique. On va donc observer si le solvant permet de dissoudre complètement la préparation et d'extraire le TSS (initialement dans la préparation galénique) dans la partie aqueuse.

Pour ce faire, on fonctionne en deux étapes :

- On réalise d'abord un **mélange sans principe actif**. On utilise 100 mg de base hydrophobe. Ceci permet de voir si des impuretés passent dans la phase aqueuse, si elles sont ensuite détectées et si elles risquent de fausser la future détection du TSS. Après passage au vortex, la distinction des deux phases, et l'injection de la phase aqueuse dans la colonne chromatographique, quelques impuretés sont observées. On compare avec le tracé obtenu lors de la gamme de TSS : les temps de rétention des impuretés ainsi que leurs concentrations sont très nettement inférieurs à ceux du TSS. Les impuretés de la base galénique ne sont même plus visibles sur le tracé correspondant à une concentration de TSS de 2 mg/mL, c'est-à-dire la concentration théorique initiale de la préparation. On ne retrouve pas de substances qui interfèrent avec le dosage du TSS. Ceci confirme l'utilisation du TBME pour le dosage du TSS contenu dans la préparation.

- Ensuite, dans le cadre de l'extraction proprement dite, on incorpore le **TSS à une concentration de 10% à la base hydrophobe**, afin d'obtenir une préparation similaire à la préparation déjà utilisée. On comparera ensuite les pics obtenus avec la préparation à 10% et la gamme d'étalonnage de TSS. On réalise donc une préparation à 10% de TSS. On en prélève une masse proche de 500 mg, pesée avec précision (509,2 mg). On ajoute 2,5 mL de tampon phosphate et 2,5 mL de TBME. On mélange jusqu'à dissolution complète de la préparation. En laissant reposer quelques minutes, on observe deux phases distinctes. Comme la préparation est à 10 % de TSS, on doit avoir, si le rendement est de 100 %, environ 50 mg de TSS dans les 2,5 mL de tampon phosphate. La concentration en TSS dans la phase aqueuse devant être d'environ 20 mg/mL, il faut diluer l'extrait aqueux au dixième pour pouvoir être dans la gamme d'étalonnage (2mg/mL). Un pic chromatographique au temps de rétention habituel du TSS (9,63 min) est bien observé. Son aire sous la courbe (250,30 mAU.min) est similaire à celle correspondante au point de gamme du TSS à 2 mg/mL (235,83 mAU.min). L'intégralité du TSS semble donc être présente dans la phase aqueuse. On ne retrouve pas de substances qui interfèrent avec le dosage du TSS. En effet, le TBME dissout la base

galénique : les excipients de celle-ci (plutôt de nature apolaire) passent majoritairement dans la phase organique non miscible.

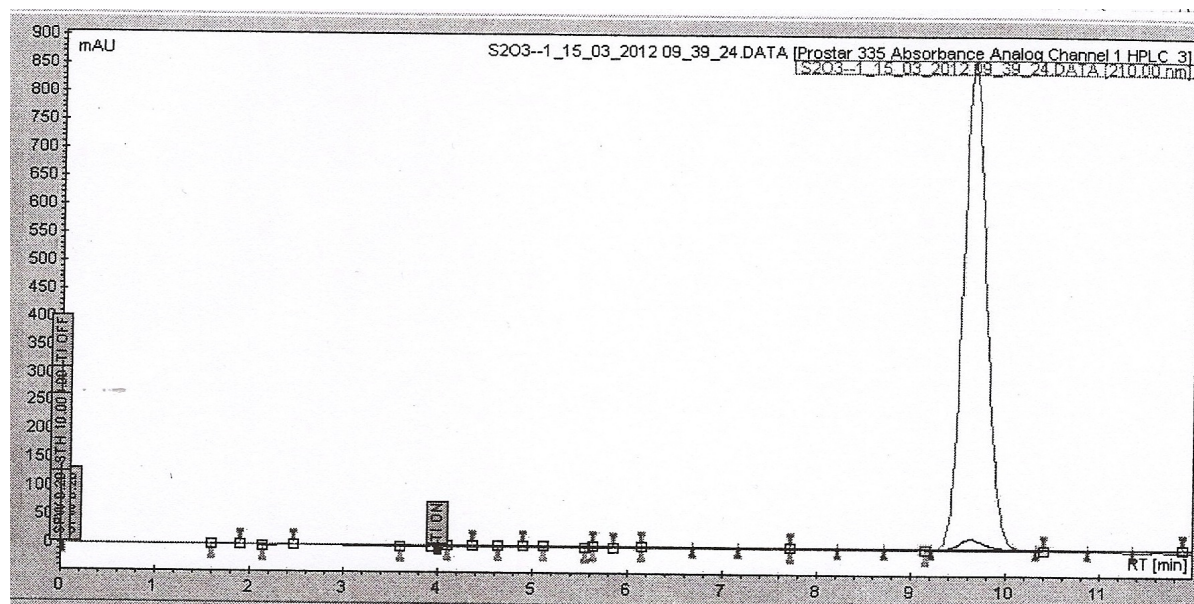


Figure 3 : Exemple d'un chromatogramme obtenu après injection de TSS issu de la préparation médicamenteuse

On décide alors d'établir un protocole visant à doser le TSS contenu dans la préparation.

4.6.3. Mise au point d'un protocole pour valider la méthode

Il correspond à la dernière étape du développement de méthode.

4.6.3.1. Tests réalisés au préalable

Auparavant, une optimisation du protocole est réalisée.

Une dilution au centième de l'extrait aqueux est réalisée. Le pic obtenu a une aire de 25,46 mAU.min et un temps de rétention de 9,64 min. Le point de gamme correspondant (0,2 mg/mL) a un temps de rétention de 9,75 min et une aire de 25,22 mAU.min (aire obtenue grâce à l'équation de la droite d'étalonnage : $y=117,89x + 1,6391$). Les deux valeurs obtenues pour une même concentration sont donc similaires.

Le mélange des phases aqueuses et organiques est réalisé avant le passage dans les tubulures de l'appareil. Ceci permet d'utiliser **une seule voie** et d'avoir un dégazage préalable de la phase mobile avant utilisation.

Nous voulons aussi **adapter les quantités de phosphate** pour la réalisation du tampon 10 mM. Lors de la préparation du tampon phosphate, nous avons utilisé jusqu'ici le dihydrogénophosphate de sodium monohydraté et le l'hydrogénophosphate de sodium dihydraté. Après l'ajout du TBAHS, le pH mesuré est de 6,32. Le pKa du couple $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ étant de 7,21, nous sommes toujours dans l'intervalle $[\text{pKa}-1 ; \text{pKa}+1]$, mais le pouvoir tampon n'est pas idéal. En changeant les proportions du tampon, nous espérons avoir un **pH environ égal à 7,1**. L'agent d'appariement d'ions présente un caractère acide et son ajout dans la phase mobile fait diminuer le pH. Nous décidons alors de préparer un tampon avec l'agent d'appariement d'ions (acide fort) et la forme H_2PO_4^- (base faible). Ainsi 10 mmol d' H_2PO_4^- , puis 5 mmol de TBAHS sont ajoutés QSP un litre d'eau ultra pure. Le pH du tampon phosphate préparé est de 7,04. Cette valeur est plus intéressante et nous refaisons une gamme d'étalonnage. Les **aires** obtenus par chromatographie sont **similaires** à celle obtenues avec le tampon au pH 6,32, mais le **temps de rétention** du TSS **a diminué** de presque 2 minutes (tr entre 7,64 et 7,77 min). Les extraits de TSS préparés les jours précédents sont réanalysés et nous avons pu constater que les aires sont conservées tout en ayant un temps de rétention de l'ordre de 7,70 min.

On effectue des **essais sur les proportions de la phase mobile**. Elles sont modifiées sur deux points de gamme (0,1 et 2 mg/mL) : tampon phosphate à 80 % et méthanol à 20 %. Les temps de rétention observés diminuent (6,25 min) et le pic chromatographique est déformé avec une diminution du nombre de plateau théorique N. Dans notre cas, la diminution du temps de rétention n'est pas recherchée car l'objectif de la méthode est de détecter les impuretés ou les produits de dégradations du TSS. Ces nouvelles proportions de tampon phosphate et de méthanol ne sont donc pas conservées.

Dans le but de **détecter les impuretés ou les produits de dégradation** potentiels, l'extrait non dilué de la base (concentration théorique de 20 mg/mL) est injecté. Ceci s'avère non concluant car il n'y a aucun autre produit à concentration élevée. A noter que le pic de TSS obtenu est dédoublé car la capacité de rétention de la colonne est saturée.

Comme précédemment, on injecte les trois produits de dégradation connus du TSS à une concentration de 2 mg/mL : disulfite, sulfite et sulfate de sodium. Contrairement à avant (cf. 4.6.1.), on obtient un pic pour le disulfite (aire de 152,40 mAU.min) et un autre un peu moins important pour le sulfite (119,0 mAU.min). Les temps de rétention des deux composés sont identiques (4,56 min) et ils sont inférieurs à celui du TSS.

On décide alors d'incorporer les produits de dégradation potentiels à la base galénique pour se mettre en conditions réelles. A noter que pour le sulfate, on détecte quelque chose, mais la concentration est si faible qu'on décide de ne pas l'intégrer à une préparation. Deux préparations différentes sont réalisées selon la formule utilisée avec le TSS. On a donc une préparation à 10 % de disulfite et une à 10 % de sulfite. Les dissolutions sont réalisées à l'aide du TBME de la même façon qu'avec la préparation contenant le TSS. Les temps de rétention (4,47 min pour le disulfite et 4,55 min pour le sulfite) et les pics observés des deux composés sont quasi identiques (92,67 mAU.min pour le disulfite et 98,33 mAU.min pour le sulfite), et même inversés par rapport à ceux observés en solution aqueuse où le pic de disulfite est bien plus important que celui du sulfite. Même si les rendements observés sont nettement inférieurs à celui obtenu avec le TSS (rendement disulfite = 61%, rendement sulfite = 83%), on est bien en mesure de détecter les produits de dégradation s'ils se forment.

4.6.3.2. Protocole de validation de la méthode

Pour réaliser une procédure de validation de méthode, il faut un **domaine de validation**. Ce domaine correspond aux concentrations de la **gamme d'étalonnage**. En dehors de cette gamme, on ne sait pas si la linéarité est observée. On ne peut alors plus calculer la concentration de l'échantillon correspondant à l'aire du pic chromatographique observée.

La gamme d'étalonnage est réalisée avec cinq concentrations différentes. Le point à 2 mg/mL correspond à une préparation concentrée à 10 % en TSS. C'est celle qui est utilisée par le malade. La limite inférieure (0,8 mg/mL) correspond donc à une préparation concentrée à 4 % en TSS soit une perte de 60 % de principe actif par rapport à la préparation initiale.

De même, la limite supérieure de la gamme d'étalonnage (2,4 mg/mL) correspond à une préparation concentrée à 12 % en TSS soit un surdosage de 20 % par rapport à la préparation théorique.

Il faut alors définir un intervalle d'acceptabilité compris dans ce domaine de validation.

Il faut penser aussi au nombre de séries (jours), au nombre de répétitions (mesurage) par série et au nombre de niveau de concentration.

Elle se fait au minimum sur trois séries. Plus ce nombre de séries augmente, plus l'estimation de l'écart-type de fidélité intermédiaire est bonne. Nous effectuons donc une validation sur **trois jours** consécutifs (trois séries).

Le nombre de répétitions par série a une influence pour la répétabilité (cf. 4.7.2.2.). Il est possible de n'en choisir que trois.

Quant aux niveaux de concentration, il en faut au minimum trois devant être répartis sur le domaine de validation. Nous choisissons donc **trois niveaux de concentration** dans deux situations différentes :

- directement dans le tampon phosphate, c'est-à-dire sans extraction (concentrations à 1 ; 1,8 et 2,2 mg/mL) ;
- après extraction de la préparation galénique contenant le TSS (concentrations à 5 %, 9% et 11 %).

Les contrôles qualité sans extraction sont effectués trois fois chacun. Neuf injections sont donc réalisées. Concernant la préparation, même si elle est la même pour une concentration donnée, il y a trois extractions différentes réalisées et donc trois injections pour chaque niveau de concentration. Ceci permet de comparer les pics obtenus avec et sans extraction. Les solutions, préparations galéniques et extractions sont réalisées chaque jour de la validation, ceci permet d'intégrer les incertitudes dues à ces opérations.

Nous pourrions alors conclure quant à la validité de l'extraction également.

Dans l'idéal, on devrait faire une gamme avec la matrice pour pouvoir effectuer le dosage. Pour s'affranchir de la gamme et des contrôles qualité avec matrice, une gamme sans matrice est réalisée. La validation doit montrer que les deux sont équivalents (même réponse, même pente, même ordonnée à l'origine, même valeur de répétabilité, etc...). Si c'est le cas, la gamme et les contrôles sans matrice peuvent être utilisés pour faire les dosages.

De plus, on veut avoir une notion sur la stabilité du TSS en solution. Nous décidons d'injecter les préparations extraites de J₁ lors des deux jours suivants. Ceci permet d'avoir une notion sur l'évolution de l'échantillon analysé ainsi que des réactifs utilisés.

Pour ce faire, on respecte le protocole de l'annexe 3.

4.7. Validation de méthode

4.7.1. Description générale

Ce n'est qu'après la rédaction d'un mode opératoire précis que l'on peut valider la méthode d'analyse. La validation n'a lieu que sur une méthode complètement mise au point. Son but est de démontrer que la méthode employée correspond à l'usage pour lequel elle est prévue. Elle doit permettre d'atteindre les objectifs exigés, à savoir de fournir des garanties que chaque résultat obtenu est suffisamment proche de la valeur vraie de l'échantillon traité [41].

L'objectif est de montrer que la méthode permet d'étudier la stabilité du TSS incorporé dans une base hydrophobe, et donc de conclure quant à la durée d'utilisation de cette préparation.

La validation est l'ensemble des opérations nécessaires (études expérimentales, calculs de critères de validation) pour prouver que le protocole est suffisamment exact et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé.

Il existe deux types de validation : la validation interne et la validation externe.

La validation externe, ou inter laboratoire, concerne une méthode utilisée par plusieurs laboratoires, souvent dans le cadre d'échanges. Notre objectif étant de doser un médicament uniquement préparé à Limoges pour l'instant, nous ne sommes donc pas concernés par ce type de validation.

La validation interne, ou intra laboratoire, est conduite dans un seul laboratoire. C'est notre cas ici.

4.7.2. Critères possibles

Les critères pouvant être choisis pour une validation de méthode sont nombreux. Le but de ce paragraphe n'est pas de répertorier tous les critères possibles, mais plutôt de présenter les critères indispensables au dosage du principe actif dans la forme pharmaceutique, à savoir la justesse, la fidélité et l'exactitude.

4.7.2.1. Justesse

La justesse est un critère qui fait intervenir une valeur de référence (ou valeur vraie, ou valeur cible). Elle caractérise donc un décalage entre le résultat (moyenne) et la valeur de référence.

Lors de l'appréciation de la justesse, on calcule par exemple :

- l'erreur relative,
- le taux de recouvrement,
- la variance de la concentration mesurée pour un niveau de concentration et un jour donnés,
- la variance du taux du recouvrement pour un niveau de concentration et un jour donnés,
- les limites inférieure et supérieure du taux de recouvrement.

4.7.2.2. Fidélité

La fidélité quantifie la dispersion moyenne des mesurages sans faire intervenir de valeur de référence. Elle est évaluée au moyen d'écart-types.

On s'intéresse à la répétabilité et à la fidélité intermédiaire.

La répétabilité est examinée lorsque les analyses sont effectuées dans les mêmes conditions (procédure, opérateur, système de mesure, lieu, objets) pendant une période de temps courte (au cours de la même série d'analyses).

Le concept de fidélité intermédiaire est très utile pour la validation interne des méthodes. Ainsi, au sein d'un même laboratoire, dès qu'on fait des analyses en faisant par exemple varier les jours, les opérateurs ou les paramètres instrumentaux, on est en condition de fidélité intermédiaire [41].

Nous prévoyons donc de répéter les analyses sur trois jours par le même opérateur. Ceci constitue une limite (il nous est impossible de faire autrement) qui sera affranchie par le fait que ce même opérateur effectuera le dosage une fois la validation de méthode réalisée.

Lors de l'appréciation de la fidélité, on calcule par exemple :

- la variance de la répétabilité (notée $s^2_{rés}$) qui est la moyenne des différentes variances observées pour un jour donné de validation et pour un niveau donné de concentration.
- la répétabilité qui est égale à l'écart-type de répétabilité à une concentration donnée (racine carrée de $s^2_{rés}$), que l'on divise par la concentration théorique. On peut multiplier par 100 ensuite pour obtenir un pourcentage.

- l'écart-type de répétabilité, qui est la racine carré de la variance de répétabilité.
- la variance inter-jour qui est la moyenne des différentes variances pour un niveau donné de concentration sur les différents jours de validation.
- l'écart-type de fidélité intermédiaire qui est la racine carré de la somme des variances de répétabilité et inter-jour.
- la fidélité intermédiaire qui est la division de l'écart-type de fidélité intermédiaire par la concentration théorique. On multiplie ensuite par 100 pour obtenir un pourcentage.
- le ratio variance inter-jour sur variance de répétabilité.

4.7.2.3. Exactitude

Elle est souvent définie comme la combinaison de la justesse et de la fidélité. Elle correspond à l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée individuellement et une valeur vraie de la valeur que l'on veut mesurer.

Son intérêt est de représenter simultanément justesse et fidélité, donc d'éviter les conclusions ambiguës si un de ces deux critères n'est pas satisfaisant. On utilise généralement une représentation graphique appelée profil d'exactitude, qui grâce à sa plus grande lisibilité, permet une interprétation facile.

4.7.2.4. Autres

La limite de quantification est la plus petite concentration de l'analyte pouvant être quantifié dans les conditions de la méthode. La limite de détection, elle, est encore plus faible. Ces deux notions de limites sont inutiles dans notre cas, car l'objectif de cette étude est le dosage d'une préparation concentrée à 10 %. Savoir que l'on peut détecter une concentration de 1 % ou 0,1 % de TSS n'a pas d'importance puisque la préparation n'est pas utilisée à une telle concentration.

4.7.3. Résultats et interprétation

Sur les chromatogrammes obtenus, on n'observe aucun pic au même temps de rétention que celui du TSS. De plus, le signal détecté est bien plus faible. Il n'y a donc pas d'interférence avec la détection du TSS.

Suite aux cinq points de la gamme d'étalonnage, on regarde si la méthode est linéaire. Ceci correspond à la capacité d'obtenir des résultats de dosage directement proportionnels à la concentration ou à la quantité d'analyte dans l'échantillon. A chaque fois qu'une gamme d'étalonnage est réalisée, l'équation obtenue est celle d'une droite et le coefficient de corrélation R^2 est supérieur à 0,995. On peut conclure que la méthode est linéaire, ce qui nous sert de base pour les calculs.

La gamme d'étalonnage permet d'obtenir une droite d'étalonnage d'équation :

Aire du pic = pente P x concentration mesurée + ordonnée à l'origine OO.

Ceci permet de calculer la concentration mesurée : $C_{\text{mesurée}} = (\text{Aire du pic} - \text{OO}) / P$

Ensuite, grâce à la concentration théorique obtenue *via* la pesée de l'échantillon, on peut calculer l'erreur relative et le taux de recouvrement.

Erreur relative (%) = ((concentration mesurée – concentration théorique) / concentration théorique) x 100

Taux de recouvrement (%) = (concentration mesurée / concentration théorique) x 100.

Ensuite, on peut calculer tous les critères expliqués dans la partie 4.7.2.

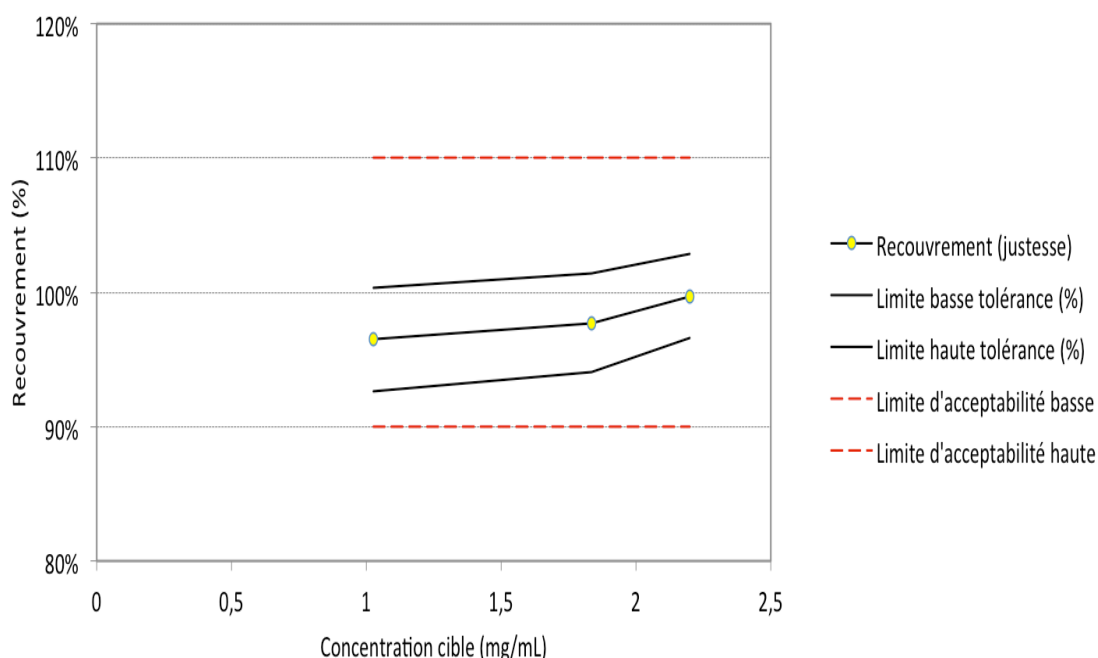


Figure 4 : Profil d'exactitude obtenue lors de la validation de méthode

La figure 4 montre que le taux de recouvrement observé est toujours compris dans l'intervalle d'acceptabilité pour des concentrations comprises dans la gamme d'étalonnage. Ce profil prouve l'exactitude de la méthode utilisée pour la gamme de concentration considérée.

D'après les données récoltées, on peut conclure que pour chaque jour de validation pris séparément, c'est-à-dire pour chaque série (J_1 , J_2 , J_3) : les droites obtenues, les erreurs relatives et les différents critères calculés sont conformes, ce qui permet de dire que la méthode de dosage est valide (dans le tampon phosphate). L'étude de stabilité de l'extrait montre que le TSS extrait n'est pas dégradé dans les trois jours de la validation de méthode.

En plus d'une conclusion pour chaque jour pris séparément, il est indispensable de relier ces trois jours de validation. Ainsi, on utilise les cinq points de gamme de chaque jour pour tracer une droite d'étalonnage en quinze points prenant en compte ces trois jours de validation.

La droite obtenue a une équation : $y = 176 x + 1,4637$ et $R^2 = 0,9996$.

On observe là aussi une conformité, ce qui permet de conclure que la méthode de dosage est fidèle.

4.8. Dosage des préparations utilisées expérimentalement

On observe fréquemment, lors de l'ouverture des tubes conservés à température ambiante, la présence d'une phase aqueuse d'un volume variable. C'est une séparation de phases, on veut donc analyser ces phases aqueuses supposées riches en TSS puisqu'il est hydrophile. L'injection en HPLC de ces phases diluées au dixième entraîne une saturation de la colonne (pic dédoublé, très large). Ce n'est qu'avec une dilution de ces phases au centième que les pics chromatographiques obtenus ne sont plus saturés. On effectue donc des dosages de toutes les préparations utilisées ainsi que des phases aqueuses selon le protocole de l'annexe 2. De plus, une préparation à 10% de TSS est effectuée à Paris (=J₀).

Concernant les extraits, la teneur en TSS observée varie de 6,29 à 11,98 %. Il n'y a pas de lien observé entre la teneur en TSS et l'ancienneté de la préparation (la teneur à J₀ est 9,32 %). Pour la phase aqueuse, toutes les concentrations observées correspondent à des points hors gamme. Il n'y a pas non plus de lien observé entre la teneur en TSS et l'ancienneté de la préparation.

Date de la préparation	Durée de conservation	Teneur observée en TSS de la préparation le 12/04/12 (%)	Teneur observée en TSS de la phase aqueuse le 12/04/12 (%)
12/04/2011	52 semaines	9,17	/
01/07/2011	40 semaines	6,84	29,04
09/08/2011	35 semaines	6,29	22,99
01/09/2011	32 semaines	8,21	26,70
03/10/2011	27 semaines	10,22	24,56
09/11/2011	22 semaines	11,98	38,00
19/12/2011	16 semaines	8,04	24,93
13/02/2012	8 semaines	8,55	24,17
08/04/2012	4 jours	9,46	/
12/04/2012	1 heure	9,32	/

Tableau 2 : Teneur observée en TSS des préparations et des phases aqueuses du médicament utilisé (%)

Les préparations de TSS ont été faites chaque mois pour le patient. Au vu des résultats et à ce stade de l'analyse, il paraît impossible de tirer des conclusions concernant la dégradation du TSS au fil du temps. De plus, on possède un tube que l'on vient de réaliser le 12/04/2012, un du 08/04/2012 et le suivant le plus récent date du 13/02/2012. On ne peut avoir aucune donnée dans cet intervalle de deux mois.

La teneur en TSS de la phase aqueuse est bien supérieure à la teneur en TSS dans la base hydrophobe. On ne connaît pas le volume exact de phase aqueuse avec les tubes réalisés à Limoges, car il en reste une partie dans la base hydrophobe (on suppose qu'une partie de la

phase aqueuse est encore emprisonnée dans la base pharmaceutique) et quelques gouttes ont été perdues lors de l'ouverture du tube. Il est donc impossible d'avoir une notion précise de dégradation du TSS. Une estimation de la teneur totale du TSS en tenant compte des teneurs en TSS respectives de la préparation (sans phase aqueuse) et de la phase aqueuse issue de la préparation peut être réalisée.

Date de la préparation	m TSS (base hydrophobe) en g	m TSS total (base hydrophobe + phase aqueuse) en g	Teneur totale estimée en %
12/04/2011	2,2191	> 2,2191	9,17
01/07/2011	1,2373	1,8504	9,16
09/08/2011	1,3265	1,8121	7,81
01/09/2011	1,6613	1,9724	9,22
03/10/2011	2,0762	2,3182	10,88
09/11/2011	2,5765	3,5619	14,78
19/12/2011	1,7303	2,1489	9,26
13/02/2012	2,6059	2,7562	8,86
08/04/2012	8,9113	> 8,9113	9,46
12/04/2012 (J ₀)	/	/	9,32

Tableau 3 : Teneur totale en TSS du médicament utilisé (%)

Nous remarquons que six tubes sur dix ont une teneur comprise entre 9 et 11 %, bien qu'aucun ne soit dans l'intervalle [9,5 % ; 10,5 %]. Mais, même lorsque la préparation date de moins de deux semaines, la teneur en TSS n'est pas comprise dans l'intervalle [9,5 % ; 10,5

%]. Ce qui nous fait penser que le TSS se conserve peut-être aussi longtemps qu'espéré. De plus, la teneur en TSS n'étant pas décroissante au fil du temps, il est **difficile de** se satisfaire de ces données pour **conclure** quant à la conservation du TSS dans cette préparation.

L'information voulue ici est partielle : il paraît nécessaire de trouver un conditionnement pour lequel il n'y a aucune perte. La mise en pot paraît la plus appropriée. La limite du choix du conditionnement en pot est qu'il n'est pas le même que celui utilisé. Mais les informations sur la dégradation ont des chances d'être quand même obtenues.

De plus, on observe pour certains tubes, et ce malgré la perte d'une partie de la phase aqueuse lors de la première ouverture du tube, un volume d'eau total supérieur au volume d'eau utilisé pour dissoudre le TSS. On envisage le fait que l'eau contenue dans la base hydrophobe ait également fini par se séparer de la base pour se mélanger avec l'eau ajoutée pour dissoudre le TSS.

Comme l'ancienneté des échantillons ne permet en rien de conclure quant à la stabilité du TSS sur les premiers mois, une **étude de stabilité** paraît essentielle pour avoir des données plus fiables et conclure quant à la stabilité de la préparation contenant le TSS.

4.9. Etudes de stabilité (dégradation forcée, accélérée et en condition standard de la préparation)

4.9.1. Mise en place de l'étude

Pour cette étude, on utilise un **conditionnement en pot**. On utilise du **TSS pentahydraté**. Une seule et même préparation est réalisée puis répartie dans les différents pots.

On réalise quatre pots, d'environ 30 g de préparation à 10 % en TSS pentahydraté, qui sont placés dans quatre conditions différentes :

-pot n°1 : essai de conservation au froid soit à +4°C, masse = 43,2689 g,

-pot n°2 : conservation dans des conditions normales soit à +22,5°C, masse = 42,0277 g,

-pot n°3 : dégradation accélérée soit à +32,5°C, masse = 42,1903 g,

-pot n°4 : dégradation forcée soit à +60°C, masse = 41,8787 g.

Les températures sont données à plus ou moins 1°C près.

De plus, afin de confirmer la teneur de 10 % en TSS de la préparation utilisée tout au long de l'étude, on réalise trois extractions à J_0 de cette préparation. Les masses sont prélevées à différents endroits dans le mortier pour confirmer l'homogénéité de la préparation.

Les trois extraits réalisés à partir de la préparation ont une teneur relativement **homogène** (entre **9,17 et 9,34 %**), mais elle est significativement inférieure à la teneur minimale tolérée (entre 9,5 et 10,5 %). Ceci n'est pas primordial car nous nous baserons sur la teneur observée à J_0 pour voir s'il y a une diminution de la teneur en TSS au cours du temps.

4.9.2. Planning de l'étude

Il nous paraît nécessaire de suivre l'évolution de la teneur des préparations en TSS au cours du temps. Un planning avec les différents jours de dosage est donc effectué : J_0 , J_{13} , J_{26} , J_{46} , J_{60} , J_{75} , J_{90} , J_{105} , J_{119} , J_{133} , J_{151} , J_{165} , J_{180} , J_{188} .

Un protocole est rédigé afin de pouvoir doser les préparations de façon identique au cours du temps. (cf. annexe 4)

4.9.3. Résultats

4.9.3.1. Evolution macroscopique de la préparation

L'aspect de la préparation est inchangé pour les quatre conditionnements les 13 premiers jours.

A J_{26} , la préparation conditionnée à +60°C devient jaune.

A J_{46} , on commence à observer une séparation de phases pour la préparation conditionnée à +32°C. Pour celle à +60°C, elle continue à jaunir. Ce jaune apparaît essentiellement en surface.

A J_{60} , ces observations sont identiques.

A J₇₄, c'est toujours le cas sauf qu'en plus la préparation placée à +22°C commence à jaunir en surface.

A J₉₀, on observe une intensification des phénomènes ainsi qu'une odeur rance pour la préparation à +60°C, certes déjà un peu présente, mais cette fois nettement perceptible.

On remarque que jusqu'à J₁₈₀, les observations sont identiques pour toutes les préparations, sauf pour celle à +60°C qui évolue encore.

A J₁₈₀, on commence à observer une légère odeur pour la préparation placée à +22°C. A noter qu'il n'y a toujours aucune modification perceptible pour la préparation à +4°C.

A la fin de l'étude de stabilité, c'est-à-dire J₁₉₀, on observe les mêmes choses qu'à J₁₈₀.

Ceci peut se résumer ainsi :

	+4°C	+22°C	+32°C	+60°C
J ₂₆				Devient jaune (en surface)
J ₄₆			Début de démélange	
J ₇₄		Jaunit en surface		Jaune plus intense
J ₉₀				Jaune et odeur plus intenses
J ₁₂₁ -J ₁₆₁				Evolue encore
J ₁₈₀	Pas d'odeur	Légère odeur		Evolue encore
J ₁₉₀				Evolue encore

Tableau 4 : Dégradation observée des préparations au cours du temps

4.9.3.2. Dosage

Pour la validation, la technique de dosage ne présente pas d'effet matrice (les gammes de principe actif seul et reconstitué sont équivalentes). En routine, lors de l'étude de stabilité, nous avons donc réalisé des gammes PA seul. En cas de séparation de phases, les dosages sont effectués sur la partie non aqueuse.

Voici un tableau et une figure résumant les résultats obtenus lors de cette étude :

	+4°C	+22°C	+32°C	+60°C
J₀	100,00	100,00	100,00	100,00
J₁₃	99,56	104,42	102,67	97,12
J₂₆	107,83	109,26	107,61	106,79
J₄₆	97,22	108,13	100,93	96,91
J₆₀	98,05	102,26	98,77	92,59
J₇₄	103,09	98,35	93,83	89,40
J₉₀	93,62	91,56	97,53	83,13
J₁₀₅	99,79	91,87	90,74	76,03
J₁₂₁	92,70	93,52	86,63	62,45
J₁₃₆	97,94	97,94	85,19	60,49
J₁₅₀	93,11	89,30	70,47	67,08
J₁₆₁	99,79	97,53	73,05	67,18
J₁₈₀	90,33	94,44	/	/
J₁₉₀	96,30	94,34	/	/

Tableau 5 : Pourcentage moyen de TSS dans la préparation par rapport à la teneur à J₀ (9,72% à J₀)

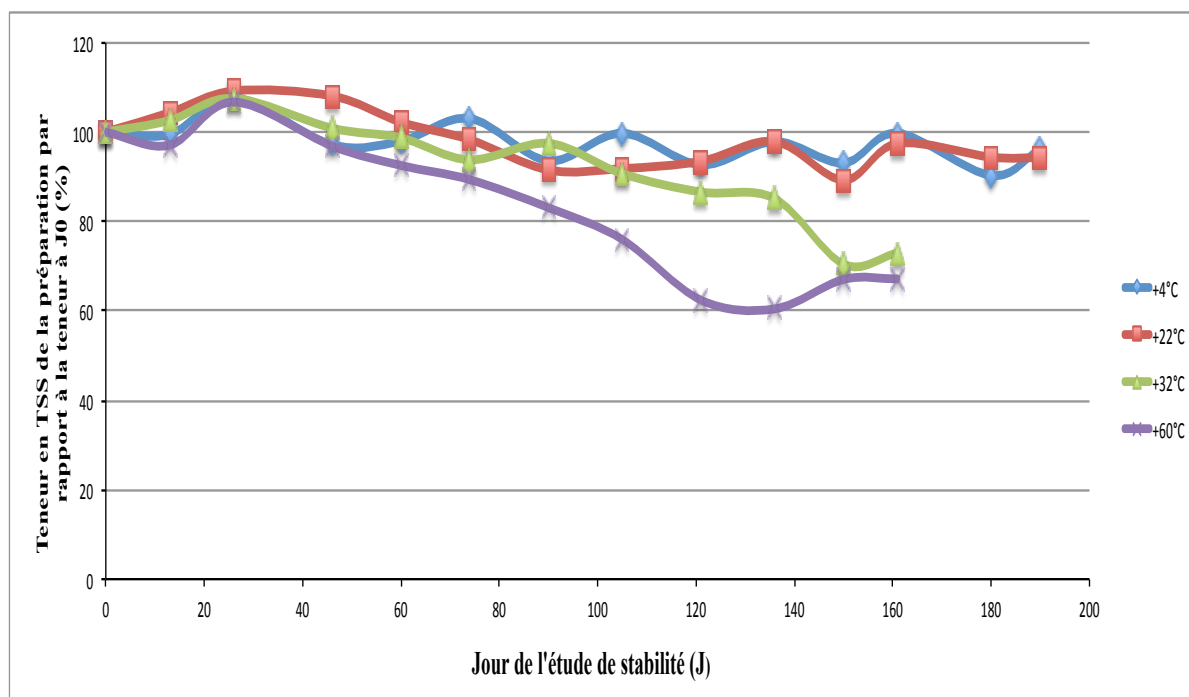


Figure 5 : Teneur en TSS dans la préparation par rapport à la teneur à J_0 (9,72% à J_0)

On s'intéresse aux concentrations observées dans les phases solide et aqueuse du démélange. A J_{90} , pour la préparation à +60°C, la teneur est de 9,20% dans la partie solide et 17,65% dans la phase liquide. A J_{105} , elle est de 6,90% dans la partie solide et 19,87% dans la phase liquide.

Les prélèvements faits sur les démélanges montrent donc une concentration importante en TSS dans la phase aqueuse et plus faible dans la base pharmaceutique (ceci confirme bien ce qui a été observé lors de l'analyse des préparations utilisées par le patient).

D'un point de vue chromatographique, il n'y a pas d'apparition de pics supplémentaires (quelle que soit la température). Le principe actif est donc stable dans cette formulation.

Comme à +4°C et +22°C, il n'y a qu'un seul point pour lequel la teneur en TSS est inférieure à 90% (89,30%) par rapport à la teneur à J_0 , on peut conclure que la préparation est stable 6 mois à +4°C et +22°C. Il y a cependant une légère instabilité galénique indépendante de la stabilité physicochimique du TSS. En effet, la dégradation observée à l'œil nu pour la préparation à +22°C (couleur brune et odeur rance) correspond à une oxydation des lipides du cérat en surface.

Conclusion

Le TSS utilisé de façon topique est une alternative qui apparaît pertinente dans le traitement des calcifications. La difficulté dans ce cas, est de formuler un médicament qui puisse être stable pendant un temps suffisamment long permettant son utilisation.

D'après les résultats de cette étude, cette préparation présente une stabilité physico-chimique du TSS dans la formulation proposée. Toutefois, la stabilité galénique de la préparation est moindre, avec l'apparition d'une coloration et surtout d'une phase aqueuse. Le thiosulfate de sodium étant un principe actif hydrophile, la concentration en TSS dans la phase aqueuse est importante tandis que la concentration en TSS de la base hydrophobe diminue. La forme galénique utilisée étant un système non figé thermodynamiquement, il est important de signaler au patient la possibilité de séparation de phases et la nécessité de faire attention lors de l'ouverture du tube pour éviter la perte de phase aqueuse. Ce phénomène est lié à la température et il est donc conseillé de conserver la préparation à une température de +4°C ou n'excédant pas 25°C. Dans ces conditions, cette étude a permis de montrer que la préparation est stable 6 mois à une température ne dépassant pas 25°C.

La voie topique constitue une option thérapeutique intéressante par rapport à une voie générale, notamment au regard du rapport bénéfice/risque des principes actifs. L'intérêt thérapeutique de notre préparation reste à évaluer sur un plus grand nombre de patients et selon une méthode comparative.

Références bibliographiques

1. Ackermann F, Levy A, Daugas E, Schartz N, Riaux A, Derancourt C, Urena P, Lebbé C. Sodium thiosulfate as first-line treatment for calciphylaxis. *Arch Dermatol* 2007;143(10):13367.
2. Adirekkiat S, Sumethkul V, Ingsathit A, Domrongkitchaiporn S, Phakdeekitcharoen B, Kantachuvesiri S, Kitiyakara C, Klypyoyong P, Disthabanchong S. Sodium thiosulfate delays the progression of coronary artery calcification in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25(6):1923-9.
3. Agroyannis BJ, Koutsikos D, Tzanatos E, Yatzidis H. Erythrocytosis in type I renal tubular acidosis with nephrocalcinosis. *Nephrol Dial Transplant* 1992;7:1071.
4. Agroyannis BJ, Koutsikos DK, Tzanatos HA, Konstadinidou IK. Sodium thiosulphate in the treatment of renal tubular acidosis I with nephrocalcinosis. *Scand J Urol and Nephrol* 1994;28(1):107-8.
5. Agroyannis BJ, Agroyannis B, Tzanatos H, Vlahakos DV, Mallas E. Does long-term administration of STS inhibit progression to renal failure in nephrocalcinosis? *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(12):2443-4.
6. Amin N, Gonzalez E, Lieber M, Salusky IB, Zaritsky JJ. Successful treatment of calcific uremic arteriopathy in a pediatric dialysis patient. *Pediatr Nephrol* 2010;25:357-62.
7. Arabshahi B, Silverman RA, Jones OY, Rider LG. Abatacept and sodium thiosulfate for treatment of recalcitrant juvenile dermatomyositis complicated by ulceration and calcinosis. *The Journal of Pediatrics* 2012;160(3):520-2.
8. Arakaki R, Kroshinsky D. Treatment of cutaneous dystrophic calcification with intralesional sodium thiosulfate. *J Am Acad Dermatol*. April 2013;68(4):AB73.

9. Araya CE, Fennell RS, Neiberger RE, Dharnidharka VR. Sodium thiosulfate treatment for calcic uremic arteriolopathy in children and young adults. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1(6):1161-6.
10. Asplin JR, Donahue SE, Lindeman C, Michalenka A, Sturtz KL, Bushinsky A. Thiosulfate reduces calcium phosphate nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(6):1246-53.
11. Auriemma M, Carbone A, Di Liberato L, Cupaiolo A, Caponio C, De Simone C, Tulli A, Bonomini M, Amerio P. Treatment of cutaneous calciphylaxis with sodium thiosulfate: two case reports and a review of the literature. *Am J Clin Dermatol* 2011 Oct 1;12(5):339-46. (abstract)
12. Bair B, Fivenson D. A novel treatment for ulcerative calcinosis cutis. *J Drugs Dermatol* 2011 Sep;10(9):1042-4. (abstract)
13. Baker BL, Fitzgibbons CA, Buescher LS. Calciphylaxis responding to sodium thiosulfate therapy. *Arch Dermatol* 2007;143(2):269-70.
14. Baldwin C, Farah M, Leung M, Taylor P, Werb R, Kiaii M, Levin A. Multi-intervention management of calciphylaxis : a report of 7 cases. *Am J Kidney Dis* 2011 Dec;58(6):988-91.
15. Baskin SI, Horowitz AM, Nealley EW. The antidotal action of sodium nitrite and sodium thiosulfate against cyanide poisoning. *J Clin Pharmacol.* 1992 Apr;32(4):368-75.
16. Battistella M, Cribier B. Calcification and ossification. Clinical and pathological aspects of skin diseases in endocrine, metabolic, nutritional and deposition disease 2010. Rongioletty F and Smoller BR (eds). Chap 21:161-9. Springer Science+Business Media, LLC 2010.
17. Battistella M, Cribier B. Les calcinoses cutanées. *Revue du rhumatisme monographies* 78(2011)178–186.

18. Bécuwe C, Roth B, Villedieu MH, Chouvet B, Kanitakis J, Claudy A. Milia-like idiopathic calcinosis cutis. *Pediatr Dermatol* 2004 Jul-Aug;21(4):483-485.
19. Black AS, Kanat IO. A review of soft tissue calcifications. *J Foot Surg* 1985;24:243-5.
20. Boulman N, Slobodin G, Rozenbaum M, Rosner I. Calcinosis in rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 2005 Jun;34(6):805-812.
21. Brucculeri M, Cheigh J, Bauer G, Serur D. Long-term intravenous sodium thiosulfate in the treatment of a patient with calciphylaxis. *Semin Dial* 2005;18(5):431-4.
22. Cardozo RH, Edelman IS. The volume of distribution of sodium thiosulfate as a measure of extracellular fluid space. *J Clin Invest* 1952;31:280-90.
23. Caude M, Jardy A. Méthodes chromatographiques-introduction. *Techniques de l'Ingénieur Avr* 1996.
24. Cicone JS, Petronis JB, Embert CD, Spector DA. Successful treatment of calciphylaxis with intravenous sodium thiosulfate. *Am J Kidney Dis* 2004;43(6):1104-8.
25. Cohen PR and Tschen JA. Idiopathic calcinosis cutis of the penis. *J Clin Aesthet Dermatol* 2012 Dec;5(12):23-30.
26. Cohen GF, Vyas NS. Sodium thiosulfate in the treatment of calciphylaxis. *J Clin Aesthet Dermatol* 2013 May;6(5):41-4.
27. College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago. What is the available evidence for the use of STS for calciphylaxis? Disponible sur : <
http://dig.pharm.uic.edu/search_dig/search_results.aspx?q=sodium+thiosulfate&sa.x=-277&sa.y=-536&sa=GO> [Consulté le 5 septembre 2013].

28. Colombatti R, Calo A, Iacopetti T, Rosolen A, Lombardi G, Cesaro S. Successful treatment of severe iatrogenic calcinosis cutis with intravenous sodium thiosulfate in a child affected by T-acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Dermatol* 2009 May-Jun;26(3):311-5.
29. Commission de la santé et de la sécurité du travail. Thiosulfate de sodium pentahydraté. Disponible sur : <http://www.csst.qc.ca/prevention/reptox/Pages/fiche-complète.aspx?no_produit=234666&no_seq=11> [Consulté le 15 janvier 2014].
30. Conde Rivera O, Camba Caride M, Novoa Fernandez E, Borrajo Prol M, Santos Nores J, Iglesias Lamas E, Lopez Alarcon W. Multidisciplinary treatment. A therapeutic option to treat calciphylaxis. *Nefrologia* 2011;31(5):614-6.
31. Courtney MJ, Pannu N. Calcific uremic arteriolopathy should be treated conservatively. *Semin Dial* 2010 Jan-Feb;23(1):34-7.
32. Cowper SE, Su LD, Bhawan J, Robin HS, LeBoit PE. Nephrogenic fibrosing dermopathy. *Am J Dermatopathol* 2001 Oct;23(5):383-93.
33. Cribier B, Grosshans E. Cutaneous calcinosis. *Ann Dermatol Venereol* 1992;119(2):151-68.
34. Dethloff SB. Calcific uremic arteriolopathy: treatment with intraperitoneal sodium thiosulfate in a patient on peritoneal dialysis. *Nephrol Nurs J* 2012 Jul-Aug;39(4):323-5, 347.
35. Dixon K. Spectrophotometric determination of sodium thiosulphate in body fluids by use of an iodine-amylose complex. *Clin Chim Acta* 1962 Jul;7:453-8.
36. Done AK. Cyanide antidotes. In *clinical pharmacology of systemic antidotes*. *Clin Pharmacol Ther* 1961;2: 765-768.

37. Duval A, Moranne O, Vanhille P, Hachulla E, Delaporte E. Artériolopathie calcique (Calciphylaxie). *La Revue de médecine interne* 2006 Mar;27(3):184–95.
38. Environmental protection agency. Sodium sulfate exemption from the requirement of a Tolerance 12/01. 40 CFR Part 180. [OPP-301196; FRL-6811-6]. RIN 2070-AB78. 12 pages.
39. Farese S, Stauffer E, Kalicki R, Hildebrandt T, Frey BM, Frey FJ, Uehlinger DE, Pasch A. Sodium thiosulfate pharmacokinetics in hemodialysis patients and healthy volunteers. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011 Jun;6(6):1447-55.
40. FDA Evaluation of STS 1975. Title 21—Food and Drugs. US Food and Drug Administration. Disponible sur :
<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184>>
[Consulté le 20 septembre 2013].
41. Feinberg M. Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude. *Technique de l'Ingénieur* Dec 2012.
42. Frankenberg L. Enzyme therapy in cyanide poisoning: Effect of rhodanese and sulfur compounds. *Arch Toxicol* 1980;45(4):315-23.
43. Garcia CP, Roson E, Peon G, Abalde MT, De La Torre C. Calciphylaxis treated with sodium thiosulfate: report of two cases. *Dermatol Online J* 2013 Sep 14;19(9):19616.
44. Gast JH, Arai K, Aldrich FL. Quantitative studies on urinary thiosulfate excretion by healthy human subjects. *J Biol Chem* 1952;196:875-84.
45. Goolsby TV, Lombardo FA. Extravasation of chemotherapeutic agents: prevention and treatment. *Semin Oncol* 2006;33:139-43.
46. Goyal S, Huhn KM, Provost TT. Calciphylaxis in a patient without renal failure or elevated parathyroid hormone: possible aetiological role of chemotherapy. *Br J Dermatology* 2000; 143: 1087-90.

47. Greenfield GB. Radiology of Bone Disease. 2nd ed. Philadelphia, JB Lippincott, 1975;491.
48. Guerra G, Shah RC, Ross EA. Rapid resolution of calciphylaxis with intravenous sodium thiosulfate and continuous venovenous hemofiltration using low calcium replacement fluid: case report. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20(6):1260-2.
49. Gupta DR, Sangha H, Khanna R. Chemical peritonitis after intraperitoneal sodium thiosulfate. *Perit Dial* 2012 Mar-Apr;32(2):220-2.
50. Hackett BC, McAleer MA, Sheehan G, Powell FC, O'Donnell BF. Calciphylaxis in a patient with normal renal function: response to treatment with sodium thiosulfate. *Clin Exp Dermatol* 2009;34(1):39-42.
51. Hammadah M, Chaturvedi S, Jue J, Buletko AB, Qintar M, Madmani ME, Sharma P. Acral gangrene as a presentation of non-uremic calciphylaxis. *Avicenna J Med* 2013 Oct;3(4): 109-11.
52. Harned TM, Kalous O, NeuweltA, Loera J, Ji L, Iovine P, Sposto R, Neuwelt EA, Reynolds CP. Sodium thiosulfate administered six hours after cisplatin does not compromise antineuroblastoma activity. *Clin Cancer Res* 2008 Jan 15;14(2):533-40.
53. Hayden MR, Goldsmith D, Sowers JR, Khanna R. Calciphylaxis: calcific uremic arteriopathy and the emerging role of sodium thiosulfate. *Int Urol Nephrol* 2008;40(2):443-51.
54. Hayden MR, Goldsmith DJ. Sodium thiosulfate: new hope for the treatment of calciphylaxis. *Semin Dial* 2010 May-Jun;23(3):258-62.
55. Hayden MR, Kolb LG, Khanna R. Calciphylaxis and the cardiometabolic syndrome. *J Cardiometab Syndr* 2006 Winter;1(1):76-79.

56. Hayden MR, Tyagi SC, Kolb L, Sowers FR, Khanna R. Vascular ossification-calcification in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, chronic kidney disease, and calciphylaxis-calcific uremic arteriopathy: the emerging role of sodium thiosulfate. *Cardiovasc Diabetol* 2005 Mar 18;4(1):4.
57. International Programme on Chemical Safety /Commission of the European Communities Evaluation of antidotes series. Vol 2, Antidotes for poisoning by cyanide. Meredith TJ, Jacobsen D, Haines JA, Berger JC 1993; Cambridge University Press. Publication N°. EUR 14280 EN. ISBN 0 521 45458 1.
58. Ivankovitch AD, Braverman B, Stephens TS, Shulman M, Heyman HJ. Sodium thiosulfate disposition in humans: relation to sodium nitroprusside toxicity. *Anesthesiology* 1983 Jan;58(1):11-7.
59. Kacso I, Racasan S, Anghel D, Macarie C, Moldovan R, Caprioara MG. Effective sodium thiosulphate therapy in calciphylaxis. *Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology* 2009 Sep;13(3):320-3.
60. Kadiyala D, Roer DA, Perazella MA. Nephrogenic systemic fibrosis associated with gadoversetamide exposure : treatment with sodium thiosulfate. *Am J Kidney Dis* 2009 Jan;53(1):133-7.
61. Kalajian AH, Malhotra PS, Callen JP, Parker LP. Calciphylaxis with normal renal and parathyroid function, *Arch Dermatol* 2009 Apr;145(4):451-8.
62. Kalisiak M, Courtney M, Lin A, Brassard A. Calcific uremic arteriopathy (calciphylaxis): successful treatment with sodium thiosulfate in spite of elevated serum phosphate. *J Cutan Med Surg* 2009 May-Jun;13 Suppl 1:S29-34.
63. Kyriakopoulos G, Kontogianni K. Sodium thiosulfate treatment of tumoral calcinosis in patient with end-stage renal disease. *Ren Fail* 1990;12(4):213-9.
64. Landau D, Krymko H, Shalev H, Agronovich S. Transient severe metastatic calcification in acute renal failure. *Pediatr Nephrol* 2007 Apr;22(4):607-11.

65. Li JY, Yong TY, Choudhry M, Rao N, Milton C, Juneja R, Barbara JA, Passaris G. Successful treatment of calcific uremic arteriolopathy with sodium thiosulfate in a renal transplant recipient. *Ren Fail* 2012;34(5):645-8.
66. Llach F, Goldblatt M, Freundlich RE, et al. The evolving pattern of calcific uremic arteriolopathy (calciphylaxis). *J Am Soc Nephrol* 2000;11:685A.
67. Lo Monte AI, Bellavia M, Damiano G, Gioviale MC, Maione C, Palumbo VD, Spinelli G, Tripodo C, Cacciabauda F, Sammartano A, Buscemi S, De Luca S, Di Ganci S, Buscemi G. A complex case of fatal calciphylaxis in a female patient with hyperparathyroidism secondary to end stage renal disease of graft and coexistence of haemolytic uremic syndrome. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2012 Sep;156(3):262-5.
68. Marckmann P, Nielsen AH, Sloth JJ. Possibly enhanced Gd excretion in dialysate, but no major beneficial benefit of 3-5 months of treatment with sodium thiosulfate in late stages of nephrogenic systemic fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2008 Oct;23(10):3280-2.
69. Marzano AV, Kolesnikova LV, Gasparini G, Alessi E. Dystrophic calcinosis cutis in subacute lupus. *Dermatology* 1999;198(1):90-2.
70. Mataic D, Bastani B. Intraperitoneal sodium thiosulfate for the treatment of calciphylaxis. *Ren Fail* 2006;28(4):361-3.
71. Mathews SJ, de la Fuentes L, Podaralla P, Cabellon A, Zheng S, Bierhals A, Spence K, Slatopolsky E, Davila-Roman VG, Delmez JA. Effects of sodium thiosulfate on vascular calcification in end-stage renal disease: a pilot study of feasibility, safety and efficacy. *Am J Nephrol* 2011;33(2):131-8.
72. Meissner M, Kaufmann R, Gille J. Sodium thiosulfate: a new way of treatment for calciphylaxis? *Dermatology* 2007;214(4):278-82.

73. Meissner M, Bauer R, Beier C, Wolter M, Kaufmann R, Gille J. Sodium thiosulfate as a promising therapeutic option to treat calciphylaxis. *Dermatology* 2006;212(4):373-6.
74. Miceli S, Milio G, La Placa S, Di Raimondo D, Tuttolomondo A, Li Vecchi M, Licata G, Pinto A. Sodium thiosulfate not always resolves calciphylaxis: an ambiguous response, *Ren Fail* 2011;33(1):84-7.
75. Mitchell JC. Drugs for superficial fungous infections of the skin. *Can Med Assoc J* 1965 Aug 28;93:411-2.
76. Musso CG, Enz P, Vidal F, Gelman R, Lizarraga A, Giuseppe LD, Kowalczyk A, Garfi L, Galimberti R, Algranati L. Use of sodium thiosulfate in the treatment of calciphylaxis. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2009 Nov;20(6):1065-8.
77. Musso CG, Enz P, Vidal F, Gelman R, Di Giuseppe L, Bevione P, Garfi L, Galimberti R, Algranati PB. Oral sodium thiosulfate solution as a secondary preventive treatment for calciphylaxis in dialysis patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2008 Sep;19(5):820-1.
78. Neuwelt EA, Gilmer-Knight K, Lacy C, Nicholson HS, Kraemer DF, Doolittle ND, Hornig GW, Muldoon LL. Toxicity profile of delayed high dose sodium thiosulfate in children treated with carboplatin in conjunction with blood-brain-barrier disruption. *Pediatr Blood Cancer* 2006 Aug;47(2):174-82.
79. Newton GL, Dorian R, Fahey RC. Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1981 Jul 1;114(2):383-7.
80. Nunley JR and al. Calcinosis cutis, 2011. Disponible sur : www.eMedicine.medscape.com [Consulté le 10 janvier 2014].
81. O'Neill WC. Treatment of vascular calcification. *Kidney Int* 2008 Dec ;74(11):1376-8.

82. Papadakis JT, Patrikarea A, Digenis GE, Stamatelou K, Ntaountaki I, Athanasopoulos V, Tamvakis N. Sodium thiosulfate in the treatment of tumoral calcifications in a hemodialysis patient without hyperparathyroidism. *Nephron* 1996;72(2):308-12.
83. Pasch A, Schaffner T, Huynh-Do U, Frey BM, Frey FJ, Farese S. Sodium thiosulfate prevents vascular calcifications in uremic rats. *Kidney Int* 2008 Dec;74(11):1444-53.
84. Pharmacopée Européenne, 8^e Edition, 2014, Conseil de l'Europe, Strasbourg, France.
85. Raffaella C, Annapaola C, Tullio I, Angelo R, Giuseppe L, Simone C. Successful treatment of severe iatrogenic calcinosis cutis with intravenous sodium thiosulfate in a child affected by T-acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Dermatol* 2009 May-Jun;26(3):311-5.
86. Ratsimbazafy V, Bahans C, Guignonis V. Dramatic diminution of a large calcification treated with topical sodium thiosulfate. *Arthritis Rheum* 2012 Nov;64(11):3826.
87. Raymond CB, Wazny LD. Sodium thiosulfate, bisphosphonates and cinacalcet for treatment of calciphylaxis. *Am J Health Syst Pharm* 2008 Aug 1;65(15):1419-29.
88. Reiter N, El-Shabrawi L, Leinweber B, Berghold A, Aberer E. Calcinosis cutis: part I. Diagnostic pathway. *J Am Acad Dermatol* 2011 Jul;65(1):1-12.
89. Renard Virginie Anne. La calcinose cutanée : étude bibliographique chez l'animal (thèse). Faculté de médecine de Créteil, 2009.
90. Reynolds JEF, ed. Martindale: the extra pharmacopoeia, 29th ed. London : Pharmaceutical Press, 1989, p855.
91. Robbins K.T, Pellitteri PK, Harris JP, Hanchett C, Kerber C, Vicario D. Highly selective infusions of supradose cisplatin for cranial base malignancies. *Skull Base Surgery* 1994;4(3):122-6.

92. Robinson MR, Augustine JJ, Korman NJ. Sodium thiosulfate as first-line treatment for calciphylaxis-Reply. *Arch Dermatol* 2007;143(10):1338.
93. Saidu Y. Physicochemical features of rhodanese: a review. *African J Biotech* 2004;3(8):370-4.
94. Salanova Villanueva L, Sanchez Gonzalez MC, Sanchez Tomero JA, Sanz P. Successful treatment with sodium thiosulfate for calcific uraemic arteriopathy. *Nefrologia* 2011;31(3):366-8.
95. Salmhofer H, Franzen M, Hitzl W, Koller J, Kreyman B, Fend F, Hauser-Kronberger C, Heemann U, Berr F, Schmaderer C. Multi-modal treatment of calciphylaxis with sodium-thiosulfate, cinacalcet and sevelamer including long-term data. *Kidney Blood Press Res* 2013;37(4-5):346-359.
96. Sandhu G, Gini MB, Ranade A, Djebali D, Smith S. Penile calciphylaxis: a life-threatening condition successfully treated with sodium thiosulfate. *Am J Ther* 2012 Jan;19(1):e66-8.
97. Schlieper G, Brandenburg V, Ketteler M, Floege J. Sodium thiosulfate in the treatment of calcific uremic arteriopathy. *Nat Rev Nephrol* 2009 Sep;5(9):539-43.
98. Schulz V, Bonn R, Kammerer H, Kriegel R, Ecker N. Counteraction of cyanide poisoning by thiosulphate when administering sodium nitroprusside as a hypotensive treatment. *Klin Wochenschr* 1979 Sep 3;57(17):905-7.
99. Schulz LT, Elder EJ Jr, Jones KJ, Vijayan A, Johnson BD, Medow JE, Vermeulen L. Stability of sodium nitroprusside and sodium thiosulfate 1:10 intravenous admixture. *Hosp Pharm* 2010 Oct 1;45(10):779-84.
100. Selye H, Gentile G, Prioireschi P. Cutaneous molt induced by calciphylaxis in the rat. *Science* 1961 Dec 8;134(3493):1876-7.

101. Sen U, Vacek TP, Hughes WM, Kumar M, Moshal KS, Tyagi N, Metreveli N, Hayden MR, Tyagi SC. Cardioprotective role of sodium thiosulfate on chronic heart failure by modulating endogenous H₂S generation. *Pharmacology* 2008;82(3):201-13.
102. Shea M, Koziol JA, Howell SB. Kinetics of sodium thiosulfate, a cisplatin neutralizer. *Clin Pharmacol Ther* 1984 Mar;35(3):419-25.
103. Shetty A. Intradialytic administration of STS: US Patent application publication Dec 2009. Pub n°US2009/0304600 A1:1-8.
104. Singh RP, Derendorf H, Ross EA. Simulation-based sodium thiosulfate dosing strategies for the treatment of calciphylaxis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011 May; 6(5):1155-9.
105. Smith GP. Intra dermal sodium thiosulfate for exophytic calcinosis cutis of connective tissue disease. *J Am Acad Dermatol* 2013 Sep;69(3):e146-7.
106. Smith VM, Oliphant T, Shareef M, Merchant W, Wilkinson SM. Calciphylaxis with normal renal function: treated with intravenous sodium thiosulfate. *Clin Exp Dermatol* 2012 Dec;37(8):874-8.
107. Sörbo B, Ohman S. Determination of thiosulphate in urine. *Scand J Clin Lab Invest* 1978 Oct;38(6):521-7.
108. Subramaniam K, Wallace H, Sinniah R, Saker B. Complete resolution of recurrent calciphylaxis with long-term intravenous sodium thiosulfate. *Australas J Dermatol* 2008 Feb;49(1):30-4.
109. Swartz RD, Crofford LJ, Phan SH, Ike RW, Su LD. Nephrogenic fibrosing dermopathy: a novel cutaneous fibrosing disorder in patients with renal failure. *Am J Med* 2003 May;114(7):563-72.

110. Thang OH, Jaspars EH, ter Wee PM. Necrotizing mastitis caused by calciphylaxis. *Nephrol Dial Transplant* 2006 Jul;21(7):2020-1.
111. Tindni A, Gaurav K, Panda M. Non-healing painful ulcers in a patient with chronic kidney disease and role of sodium thiosulfate: a case report. *Cases J* 2008 Sep;1(1):178.
112. Tokashiki K, Ishida A, Kouchi M, Ishihara S, Tomiyama N, Kohagura K, Iseki K, Takishita S. Successful management of critical limb ischemia with intravenous sodium thiosulfate in a chronic hemodialysis patient. *Clin Nephrol* 2006 Aug;66(2):140-3.
113. Vazquez E, Buzaleh AM, Wider E, Battle AM. Red blood cell rhodanese: its possible role in modulating delta-aminolaevulinate synthetase activity in mammals. *Int J Biochem* 1987;19(2):217-9.
114. Venkatesh Gupta SK, Balaga RR, Banik SK. Idiopathic Calcinosis Cutis over Elbow in a 12-Year Old Child. *Case Reports in Orthopedics*. Hindawi Publishing Corporation Volume 2013, Article ID 241891, 4 pages.
115. Westley J, Adler H, Westley L, Nishida C. The sulfurtransferases. *Fundam Appl Toxicol* 1983 Sep-Oct;3(5):377-82.
116. Wilmer WA, Magro CM. Calciphylaxis: emerging concepts in prevention, diagnosis, and treatment. *Semin Dial* 2002 May-Jun;15(3):172-86.
117. Wolf EK, Smidt AC, Laumann AE. Topical sodium thiosulfate therapy for leg ulcers with dystrophic calcification. *Arch Dermatol* 2008 Dec;144(12):1560-2.
118. Yatzidis H. Successful sodium thiosulphate treatment for recurrent calcium urolithiasis. *Clin Nephrol* 1985 Feb;23(2):63-7. (abstract)
119. Yatzidis H, Agroyannis B. Sodium thiosulfate treatment of soft-tissue calcifications in patients with end-stage renal disease. *Perit Dial Int* 1987 Oct-Dec;7(4):250-2.

120. Yerram P, Saab G, Karuparthi PR, Hayden MR, Khanna R. Nephrogenic systemic fibrosis: a mysterious disease in patients with renal failure – role of gadolinium-based contrast media in causation and the beneficial effect of intravenous sodium thiosulfate. Clin J Am Soc Nephrol 2007 Mar;2(2):258-63.

TABLE DES MATIERES

<u>Remerciements</u>	7
<u>Liste des abréviations</u>	11
<u>Introduction</u>	13
<u>1. Calcinose des tissus mous et pathologies potentiellement concernées</u>	14
1.1. Définition/Présentation	14
1.2. Calcification/Ossification	15
1.3. Clinique/Histologie	15
1.4. Calcinoses cutanées	16
1.4.1. Mécanismes en cause	16
1.4.2. Régulation	16
1.5. Historique	17
1.6. Classification	17
1.6.1. Calcifications dystrophiques	18
1.6.1.1. Dommages tissulaires localisés au niveau du tissu lésé	18
1.6.1.2. Dommages tissulaires généralisés	19
1.6.2. Calcifications métastatiques	21
1.6.3. Calcifications idiopathiques	23
1.6.4. Calcifications iatrogènes	25
<u>2. Le thiosulfate de sodium (TSS)</u>	26
2.1. Propriétés physico-chimiques	26
2.2. Utilisations médicales	27
2.2.1. Intoxication aux cyanures	27
2.2.2. Chimiothérapie anticancéreuse	29
2.2.3. Autres	29
2.3. Intérêt du TSS dans notre cas	30
2.3.1. Sa place parmi les différents traitements des calcinoses	30
2.3.2. Historique	30
2.3.3. Double action	31
2.3.3.1. Duplications de l'endothélium	32
2.3.3.2. Propriétés du TSS	33
2.3.3.2.1. Action antioxydante	33
2.3.3.2.2. Action chélatrice	34
<u>3. Revue de cas d'utilisation du TSS</u>	36
3.1. Effets cliniques	36
3.2. Posologies	36
3.3. Effets indésirables	37

4. Etude de stabilité (Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris)	40
4.1. Préalable : mise en forme pharmaceutique du TSS	40
4.2. Pourquoi cette collaboration ?	42
4.3. Chromatographie : généralités	42
4.4. Rappel des techniques utilisées pour doser le TSS	47
4.4.1. Historique (anciennes méthodes)	47
4.4.2. Résumé du travail effectué avant les analyses à l'HEGP	47
4.5. Sélection de la méthode	48
4.6. Développement de la méthode	49
4.6.1. Résumé du travail effectué à l'HEGP	49
4.6.2. Mise au point de la méthode de dosage après les premiers essais	50
4.6.2.1. Vérification de la détection du TSS	50
4.6.2.2. Réflexions à propos de l'extraction	51
4.6.2.2.1. Mélange solution/solvant	51
4.6.2.2.2. Extraction du TSS de la préparation galénique	51
4.6.3. Mise au point d'un protocole pour valider la méthode	53
4.6.3.1. Tests réalisés au préalable	53
4.6.3.2. Protocole de validation de la méthode	55
4.7. Validation de méthode	57
4.7.1. Description générale	57
4.7.2. Critères possibles	57
4.7.2.1. Justesse	58
4.7.2.2. Fidélité	58
4.7.2.3. Exactitude	59
4.7.2.4. Autres	59
4.7.3. Résultats et interprétation	59
4.8. Dosage des préparations utilisées expérimentalement	61
4.9. Etudes de stabilité (dégradation forcée, accélérée et en condition standard de la préparation)	64
4.9.1. Mise en place de l'étude	64
4.9.2. Planning de l'étude	65
4.9.3. Résultats	65
4.9.3.1. Evolution macroscopique de la préparation	65
4.9.3.2. Dosage	66
 Conclusion	 69
 Références bibliographiques	 70

<u>Table des annexes</u>	87
<u>Tables des figures</u>	115
<u>Liste des tableaux</u>	116

Table des annexes

<u>Annexe 1 : Revue des cas d'utilisation du TSS pour les calcinoses des tissus mous (non exhaustive)</u>	88
<u>Annexe 2 : Protocole d'extraction du TSS de la base galénique</u>	104
<u>Annexe 3 : Protocole pour valider la méthode</u>	105
<u>Annexe 4 : Protocole pour l'étude de stabilité</u>	111

Annexe 1 : Revue des cas d'utilisation du TSS pour les calcinoses des tissus mous (non exhaustive)

Cas	Patients	Niveau d'IR	Calcifactions et symptômes	Autres traitements et résultats associés	Dose de TSS	Résultats
Yatzidis 1985 [118]	H (24), F (10), de 20 à 60 ans	Bonne fonction rénale	Urolithiase calcique récurrente		20 mmol STS /jour pdt 4 ans	Réduction des calcifications : bénéfices dus à formation thiosulfate Ca dans urine
Yatzidis <i>et al.</i> 1987 [119]	H (4), F (1)	HD depuis 5 ans	Calcinose tumorales : tissus mous et périarticulaires (4) ; pénienne (1)		VO 20 mmol /jour + 2 sujets avec IV 10-20 mmol à la fin de chaque dialyse	Pas de nouvelle Ca, amélioration mobilité articulations proches
Kyriakopoulou <i>et al.</i> 1990 [63]	H(2), F(1)					Réduction des calcifications, amélioration clinique par mobilité des articulations (2 cas sur 3)
Agroyannis <i>et al.</i> 1992 [3]	Adulte	Pas d'IRC. Traité pour acidose tubulaire distale avec néphrocalcinose.			7 mmol/m ² pendant 18 ans.	Effets secondaires : aucun rapportés.
Agroyannis <i>et al.</i> 1994 [4]	37 ans	IR légère	Néphrocalcinose étendue due à acidose tubulaire rénale	Bicarbonate sodium et gluconate potassium	TSS oral	Pas de dégradation

<p>Papadakis <i>et al.</i> 1996 [82]</p>	<p>F, 58 ans</p> <p>HD</p>	<p>Calcinoses tumorales périarticulaires (dues à intox Al et autres facteurs)</p>	<p>Diminution considérable des calcifications, guérison clinique (douleur et mouvement articulaire)</p>
<p>Agroyan <i>et al.</i> 2001 [5]</p>	<p>1 cas</p> <p>IR légère</p>	<p>Néphrocalcinose étendue</p>	<p>Bicarbonate sodium et gluconate potassium</p> <p>TSS oral pendant 18 ans</p> <p>Semble prévenir dépôt Ca²⁺ et stabiliser fonction rénale</p>
<p>Cicone <i>et al.</i> 2004 [24]</p>	<p>F, 69 ans</p> <p>CAPD (AUC, IRT)</p>	<p>Calciphylaxies. Lésions sous-cutanées douloureuses au niveau de la jambe douloureuse.</p>	<p>Acétate de calcium et calcitriol interrompus. Sevelamer commencé. Prednisonne 40 mg chaque autre jour commencée. Le soulagement de la douleur a été mineur et temporaire.</p> <p>25g IVL plus de 30-60 min 3 fois par semaine pendant 8 mois</p> <p>Amélioration de la douleur en 2 semaines. En 8 semaines, douleur disparaît et lésions plus petites (réduction des indurations). Effets secondaires : rhinite, sinusite, vomissements, durant les perfusions, acidoose métabolique. Concentrations sériques en bicarbonates de calcium diminuées.</p>
<p>Bruculeri <i>et al.</i> 2005 [21]</p>	<p>F, 48 ans</p> <p>IRT anuriqueHD depuis 5 ans (5h 4x/semaine).</p>	<p>Calciphylaxie. Ulcérations cutanées douloureuses sur l'abdomen, poitrine, hanche et cuisses. PTH élevée.</p>	<p>5g IVL plus de 10', après chaque dialyse soit 4x par semaine. Durée d'utilisation : 34 mois.</p> <p>Amélioration des lésions de la peau avec guérison des plaies au bout de 6 mois. Effets secondaires : acidoose métabolique à trou anionique augmenté, nausées, quelques rares vomissements. Concentrations diminuées en bicarbonates.</p>

F, 46 ans	IRT, HD.	Calciophylaxie. Lésions cutanées multiples et douloureuses au niveau des jambes.	Sevelamer et HD. Les lésions cutanées et la douleur s'aggravent.	25g IVL 60' 3 fois /semaine après chaque HD avec CVVH concomitant. Durée d'utilisation : 6 mois.	Amélioration de la douleur et des symptômes au bout de 2 jours de STS et CVVH, résolution des ulcères de la peau quasi complète en un mois. Pas d'effets secondaires.
H, 21 ans	HD, IRT	AUC	AUC	IV 25g/1,73 m ² 3x /semaine pendant 11 semaines (après chaque HD). Pour le 3 ^e cas : CVVH + TSS car progression rapide symptômes concomitants	Réduction douleur et calcifications, guérison ulcères Réduction douleur, amélioration fonctionnelle avec réduction des indurations Soulagement douleur, amélioration peau.
H, 12 ans	HD, IRT	AUC	AUC		
F, 21 ans	HD, IRT	AUC	AUC		
F, 60 ans					Baisse de la douleur immédiate, guérison blessures en 8 semaines, pas de réapparition en 3 ans.

Guerra et al. 2005 [48]

Araya et al. 2006 [9]

Hayden et al. 2006 [55]

F, 26 ans	IRT, DP.	AUC, calciphylaxie. Ulcérations douloureuses sur le bras gauche et les cuisses.	Cycles continus de dialyse péritonéale depuis 4 ans avec dialysat pauvre en calcium, sevelamer, soins plaie, antibiotiques et STS IV, puis STS IP.	IV 3 fois /semaine pendant 2 mois. 25g IP (ajouté à 2L de dialysat faible en Ca) 3 fois /semaine (chaque jour pendant 3 mois)	Bien toléré, guérison blessures les 2 premiers mois, puis malgré TSS IP, pas de guérison des ulcérations, sepsis et décès. Effets secondaires : vomissements (arrêt TSS).	Mataic et al. 2006 [70]
F 35 ans	IRT, HD	Calciphylaxie. Ulcères douloureux et nécrosés sur cuisses, fesses et abdomen. Calcium, phosphate et PTH élevés.	Antibiotiques, soins plaie avec aucune amélioration dans la douleur ou cicatrisation. Acétate de calcium, calcidiol et warfarine arrêtés.	25g IVL 60', après chaque dialyse (3 fois /semaine), pendant 6 semaines	Réduction douleur rapide (2 semaines), ulcères guéris (12 semaines), succès transplantation rénale (4 mois après).	Meissner et al. 2006 [73]
F, 53 ans	DP depuis 3 ans	Calciphylaxie. Sensibilité, inflammation et rougeur de la poitrine qui progressent en ulcération et douleur intolérable. Nécrose à l'extrémité des doigts.	Parathyroïdectomie, mamectomie bilatérale. Normalisation calcium et phosphore. Progression symptômes aux niveaux des hanches et jambes.	TSS IV 3 fois / semaine.	Pas d'amélioration des ulcères. Sepsis puis décès.	Thang et al. 2006 [110]

H, 57 ans	IRT, HD depuis 30 ans	Calciphylaxie. Ulcères douloureux et multiples sur les orteils et les mains.	Agents vasodilatateurs, soins au niveau des lésions. Oxygène hyperbare : progression des ulcères et pas de résolution de la douleur.	20g puis 10g 3 fois par semaine après chaque HD (réduction à 10g car effets secondaires). Durée d'utilisation : chaque palier 3 semaines, arrêté du fait des effets secondaires.	Disparition rapide douleur en 5 semaines (soulagement en 1 semaine). Reprise de la marche en 2 semaines. Effets secondaires avec les plus fortes doses : nausées, vomissements, perte d'appétit, HS aux odeurs durant la perfusion.
Tokashiki et al. 2006 [112]					
F, 45 ans	Allogreffe rénale	Ulcérations douloureuses de la jambe gauche puis de la droite. Ca ²⁺ et phosphate élevés.	Soins locaux, analgésiques, antibiotiques (échec) : amputation de la jambe gauche. Lésions apparaissent sur la jambe droite. Cinacalcet, Calcium free phosphate binders, HD 3 fois /semaine : aucune amélioration.	25g IV 3fois /semaine pendant 8 semaines ainsi que HD quotidienne avec dialysat faible en calcium.	Réduction douleur en 2 semaines, normalisation Ca ²⁺ et phosphate, guérison de la plupart des ulcérations en 6 semaines.
Ackermann et al. 2007 [1]					
F, 68 ans	Taux de filtration glomérulaire = 60-89 mL/min.	Douloureux, induré, plaques nécrosées sur l'extérieur des cuisses et calcification artériolaire. Ca ²⁺ , P et PTH normaux.	Pas d'autre thérapeutique rapportée.	25 g IV 3fois /semaine puis 2 fois /semaine une fois que les lésions sont guéries	Amélioration douleur (3-4 semaines), ulcérations réépthalisées (10 semaines), guérison des lésions (9 mois).
Baker et al. 2007 [13]					

Yerram n et al 2007 [120]	F, 26 ans HD	FSN (exposition à de multiples produits contraste à base Gadolinium)	IV 12,5g 3 fois /semaine	Décoloration peau, amélioration douleur et raideurs articulaires.
Marckma n et al 2008 [68]	4 sujets : 54, 35, 47 et 49 ans HD	NSF sévère (exposition au Gadolinium) depuis plus d'un an	IV 12g en perf IV après chaque séance d'HD.	Pas de bénéfice majeur dans les 4 cas (améliorations légères pour 1 seul cas). TSS bien toléré. Tendance à l'acidose modérée chez quelques patients.
Musso et al 2008 [77]	F, 59 ans HD + nombreux facteurs de risques (diabète type II, HTA, obésité, ...)	Calciphylaxie (prévention secondaire)	VO 7,5g / semaine en prévention secondaire de la calciphylaxie pendant 1 an + TSS IV à dose réduite 2,6g 3 fois /semaine	Pas nouvelle lésion ou d'effet indésirable. De plus, arrêt TSS pendant 1 mois car indisponible : douleur intradialytique sur cicatrices de l'abdomen qui disparaissent à la reprise du TSS.
Subramaniam et al 2008 [108]	F, 55 ans IRT, HD	Calciphylaxie. Nodules sous-cutanés sur abdomen, fesses et hanche	25g IV 3 fois par semaine après HD. Durée d'utilisation : 11 mois.	Soulagement rapide douleur (2 semaines), guérison complète plaies (12 semaines). Les symptômes réapparaissent 1 mois après l'arrêt du traitement. TSS recommencé : amélioration à nouveau. Aucun effet secondaire.

F, 60 ans	Taux de filtration glomérulaire = 12 mL/min	Calcifications vasculaires et douleur au niveau de la cuisse qui progresse en nécrose.	HD et analgésiques suivis d'une parathyroïdectomie. Lésions et douleur non contrôlées.	25 g IV 3 fois / semaine (30-60 minutes)	Soulagement douleur en 2 semaines mais progression des lésions. Patient transféré dans un hospice.
F, 41 ans	Lupus érythémateux systémique		Topique pour calcinose cutanée dystrophique	STS topique 10%	Réduction des calcifications. Amélioration plaies et douleur.
H, 5 ans	LLA à cellules T (développement d'une calcinose cutanée iatrogène sévère : extravasation due au gluconate de Ca) -> mobilité déficiente		Chimiothérapie. Même si traitement et chirurgie intenses, amélioration qu'après introduction du TSS : contribution significative. Assouplissement tissus mous et régénération tissulaire au niveau des escarres.	IV 10g 3 fois /semaine (100j après début extravasation) EI : nausées mais bien contrôlées par ondansétron	Amélioration progressive lésions, régénération tissus, réduction escarre. En 3 mois, escarre quasiment guéri complètement avec réduction massive des calcifications des tissus mous, et membre fonctionnel à nouveau complètement.
F, 44 ans	Fonction rénale normale	Calciphylaxie. Nodules sous-cutanés douloureux sur abdomen et cuisses.	Arrêt warfarine et calcium. Soins quotidiens des blessures. Fortes doses d'opiacés et pamidronate. Ulcères progressent et douleur non contrôlée.	STS IV 3 fois /semaine (30-60 minutes)	Besoin réduit en opiacés en 2 mois. Résolution complète ulcères en 42 semaines.

Tindni *et al* 2008 [111]

Wolf *et al* 2008 [117]

Colombatti *et al* 2009 [28]

Hackett *et al* 2009 [50]

Kadryala <i>et al.</i> 2009 [60]	F, 22 ans, H, 64 ans, F, 62 ans.	HD	FSN (exposition au Gd)	Ici : 2 1 ^{er} = gadoversetamide, 3 ^e = gadodiamide	IV Nausées, vomissements	1 décès au 2 ^e mois sinon amélioration peau, mobilité articulaire et douleur
Kalisiak <i>et al.</i> 2009 [62]	F, 61 ans	HD	Calcification palpable du tissu sous-cutané. Douleur sévère des jambes, ulcères sur les deux mollets et la cuisse droite.	HD quotidienne, opiacés, sevelamer. Ca ²⁺ et P normalisés mais ulcères non guéris et douleur non contrôlée.	25g IV 3 fois semaine pendant 4 semaines, puis réduit à 12,5g 3 fois / semaine avec amélioration continue des lésions. Diminue doses STS car acidose métabolique.	Soulagement douleur dans les 4 premières semaines (opiacés arrêtés après 6 semaines), réduction des ulcères évidente en 10 semaines avec guérison complète en 30 semaines.
Kacso <i>et al.</i> 2009 [59]	F, 54 ans	HD depuis 9 ans	Calciphylaxie typique au sein (parathyroïdectomie)	Autres traitements mais amélioration que lors de l'introduction de TSS IV.	TSS IV 12,5g 3 à 5 fois puis 25g 3 fois /semaine après dialyse sur 1h (dilué dans 250 mL de NaCl à 9%)	Soulagement douleur en 1 semaine, puis cicatrisation progressive de la plaie. Pas d'EI sauf légères nausées dans 3 ^e mois calmé par antiémétique.

F, 57 ans	HD	Nodules sous-cutanés douloureux dans la région inguinale, jambes, cuisses et abdomen.	Parathyroïdectomie qui aide à normaliser le produit phosphocalcique. Analgésiques. Calciphylaxie progresse, douleur non contrôlée.	STS IV 3 fois /semaine immédiatement après dialyse puis baisse à 12,5g.	Blessures s'améliorent continuellement sur 6 mois (à partir semaine 12), résolution complète lésions en 10 mois Hypotension observée donc diminution de la dose de TSS.	Musso et al. 2009 [76]
2 groupes : 16 (traitement), 16 (contrôle)	HD	Pas de modification du score CAC dans groupe traité (25%), augmentation du score chez groupe contrôle (60%).	Nécessité de déterminer fenêtre thérapeutique pour éviter déminéralisation osseuse	TSS IV EI : anorexie persistante, acidoose métabolique	TSS=facteur protecteur (retarde progression CAC)	Adirekkiat et al. 2010 [2]
H, 17 ans	HD	AUC sévère	Soulagement rapide douleur mais pas d'arrêt du processus AUC (extension nécrose des métatarses) après dialyse péritonéale. Amputation métatarses et décoloration bleue mains.	TSS IV 25g/1,73m2 3 fois /semaine. Inefficace donc passe à plus agressif. Dialyse péritonéale inefficace (+TSS et HBO). HD quotidienne (+ TSS 3 fois /semaine HBO 3 à 5 fois/semaine) après amputation.	Résolution complète AUC (au scanner osseux) après HD (on a sauvé mains même si amputation métatarses) = reperfusion des mains.	Amin et al. 2010 [6]

	2 cas	Calciophylaxie	Bonnes réponses
Aurtemberg et al. 2011 [11]	2 cas	Calcinose cutanée avec ulcères	Réponse excellente : recommandé comme traitement alternatif calcinose cutanées dystrophiques
Bair et al. 2011 [12]	F 83 ans, H 42 ans, F 64 ans, F 68 ans, F 63 ans, F 69 ans, F 67ans	AUC	STS topique 25% composé d'oxyde de zinc
Baldwin et al. 2011 [14]	HD	Réfractaire à divers traitements topiques	TSS IV 12,5-25g 3 fois / semaine. 1 des 7 patients où TSS remplacé par deferoxamine (chélateur) car nausées
Conde Rivera et al. 2011 [30]	H, 55 ans	Calciophylaxie	5 bons résultats sur 6 : agent chélateur important, utile mais ne permet pas de dire la part du TSS dans guérison ou si ce sont les associations
Lo Monte et al. 2011 [67]	F, 60 ans	HD	IV 25% Nausées, vomissements mais antiémétiques
		Parathyroïdectomie : pas d'amélioration clinique	Guérison complète des lésions en 9 mois
			Amélioration lésions cutanées uniquement après utilisation TSS mais inefficace sur tableau clinique déjà très mauvais qui s'aggrave et entraîne décès (dû à sepsis)

<p>1 cas</p> <p>Micelli et al. 2011 [74]</p>	<p>Calciophylaxie sévère</p>	<p>Ambigu : amélioration symptomatologie, lésion peau et paramètres sanguins mais dégradation des conditions générales, conscience jusqu'au décès</p>
<p>H, 78 ans</p> <p>Salanova et al. 2011 [94]</p>	<p>AUC (ici lésions mais pas de nécrose)</p>	<p>Amélioration lésions au bout de 2 mois</p> <p>IV 25% (20g) 3 fois / semaine</p>
<p>F, 14 ans</p> <p>Arabsahhi et al. 2012 [7]</p>	<p>DMJ compliquée (peau ulcérée et calcinose extensive)</p>	<p>Vasodilatation et vascularisation des unités neuronales périphériques : soulagement rapide douleur. Régénération tissulaire, adoucissement peau, guérison ulcération (TSS seul ou association des 2 ?)</p> <p>Pas de réponse aux thérapies conventionnelles. Corticoïdes+ abatacept : diminution corticoïdes dans les 3 mois, diminution douleur et calcifications</p> <p>IV 10g 3 fois /semaine(2 semaines) puis 15g 2 fois /semaine les 3 mois suivants + Topique 3% jusqu'à 10% (appliqué sur les parties nécrosées 1 fois /jour)</p>
<p>2012 [34]</p> <p>Dethloff</p>	<p>AUC</p>	<p>TSS intrapéritonéal</p>

Gupta et al 2012 [49]	F, 82 ans	IRT, DP.	AUC. Douleur extrémité membre inférieur gauche.	Calcitriol, allopurinol, atenolol, hydroxychloroquine, tiotropium.	TSS IP 25g/2L de dialysat, 3 fois	Péritonite due à l'administration de TSS. Pas d'amélioration clinique. Décès.
Hammadah et al 2012 [51]	F, 55 ans	Pas d'IR.	Calciophylaxie. Obèse. Polyarthrite rhumatoïde. Lésions douloureuses, noires et évolutives au niveau des doigts et des orteils depuis 3 semaines.	Arrêt des immunosuppresseurs car infection abdominale sévère dans les mois précédents. Utilisation de méthylprednisolone et rituximab.	TSS	Amélioration progressive des lésions cutanées nécrosées.
Li et al 2012 [65]	H, 63 ans	AUC			TSS IV pendant 8 mois	Résolution complète AUC et lésions peau
Ratsimbazafy et al 2012 [86]	H, 12 ans		DMJ prise en charge depuis l'âge de 2 ans. Douleur abdomen et membres, calcifications aux membres. Grande calcifications sous-cutanées. Peau non lésée mais mobilité articulaire réduite.	Successivement ou en combinaison : corticoïdes, immunoglobulines IV, méthotrexate, ciclosporine, rituximab, mycophénolate mofétyl. Inhibiteurs calciques, bisphosphonates pour calcifications mais échec. TSS IV puis VO.	TSS topique 10%. 1,5g chaque soir pendant 6 mois. (Aucun traitement associé)	Régression de la masse calcifiée. Confirmé par radiographie. Pas d'EI donc alternative intéressante avec moins d'EI que le TSS par voie systémique. Mais l'évolution peut être spontanée : à tester par essais cliniques.

Sandhu <i>et al.</i> 2012 [96]	H, 58 ans	Pas d'IR	Calciphylaxie péniennne (1 ^{er} cas d'utilisation TSS)	Traitement médical habituel + chirurgie	2 mois après chirurgie, blessures complètement guéries, pas de nouvelles lésions dans les 11 mois du suivi.
Smith <i>et al.</i> 2012 [106]	H, 72 ans	Pas d'IR	Calciphylaxie (pas d'IR, parathyroïde N)	Prednisolone orale, supplémentation Ca ²⁺	Amélioration progressive des plaies ulcérées
Arakaki <i>et al.</i> 2013 [8]	H, 72 ans		DM, nodules calcifiés sous-cutanés, bilatéraux, douloureux au-dessus du sacrum	TSS en injection intralésionnelle, 3 séries à 250 mg/mL, seulement d'un côté	Régression de la quantité de nodules et de la douleur au bout de 3 semaines seulement du côté traité. Diminution de l'étendue des calcifications confirmée par le suivi radiographique.
Cohen <i>et al.</i> 2013 [26]	F, 35 ans	IR terminale suite à HIV	Calciphylaxie urémique avancée : nodules et ulcères nécrotiques des cuisses.	Débridement chirurgical des plaies.	Détérioration rénale progressive menant à déficience de plusieurs organes puis décès.
	F, 57 ans	IR terminale (dialyse depuis plusieurs années)	Calciphylaxie urémique avancée : ulcérations bilatérales douloureuses aux cuisses depuis 5 mois. Ulcère nécrotique profond sur la cuisse gauche.	Ciprofloxacine 500 mg 2 fois/semaine en prophylaxie + excision chirurgicale (biopsie). Aggravation en 2 semaines. Passage de DP à HD. Débridement chirurgical après 10 semaines de TSS.	Amélioration des conditions du malade en 10 semaines. Facilite la guérison des plaies 4 semaines après le débridement chirurgical (14 semaines). Pas d'EI rapportés.

F, 73 ans	IRC légère	<p>Calcifications vasculaires sous les lésions cutanées (ulcères aux jambes douloureux et nécrosants), purpura.</p> <p>PTH légèrement augmentée en raison d'une déficience en vitamine D)</p>	<p>Supplémentation en vitamine D + HBPM (après acénocoumarol) mais continue à s'aggraver</p>	<p>TSS IV 12,5g 3 fois/ semaine (+ soin des plaies) pendant 4 mois</p>	<p>Guérison quasi complète des lésions</p> <p>Pas d'EI (Décès non lié au TSS : choc septique suite à infection urinaire)</p>
-----------	------------	---	--	--	--

H, 58 ans	IR (dialyse)	<p>Calciphylaxie abdominale mais pas de nécrose.</p> <p>Apparition de nécroses douloureuses aux mollets lors de la réduction de la posologie de STS (ulcères guéris en 4 semaines).</p> <p>Diabète type 2.</p> <p>Complications infectieuses contrôlées.</p>	<p>Antibiotiques (10 jours).</p> <p>Héparine IV, analgésiques, calcitonine et ibandronate IV.</p> <p>Association STS + Cinacalcet VO (300 mg/j) et sevelamer VO (4800 mg/j) pendant 3 semaines.</p> <p>Pause de 3 semaines puis cinacalcet (60 mg/j).</p> <p>Parathyroïdectomie et arrêt du cinacalcet.</p>	<p>STS IV(80 g/j) pendant 4 semaines.</p> <p>Puis STS diminué à 30 g 4 fois /semaine pendant 2 ans.</p> <p>STS IV 30 g 3 fois/ semaine puis 15 g 3 fois/ semaine.</p> <p>Repasse à STS IV 30 g 3 fois/ semaine car apparition de nécroses.</p>	<p>Diminution rapide des indurations, et des marqueurs de l'inflammation et de la douleur.</p> <p>Disparition des indurations sous-cutanées en 1 an.</p> <p>Décès par arrêt cardiaque.</p> <p>EI : hypernatrémie, acidose métabolique, ulcère gastrique hémorragique, crise d'épilepsie (car dose initiale élevée de TSS)</p>
-----------	--------------	--	---	--	---

H, 61 ans	IR (dialyse)	Calciphylaxie aux mollets. Nécrose douloureuse et enflammée de la peau. Parathyroïdectomie Angioplastie percutanée. Hypertension.	Cinacalcet et héparine (à la place de la coumadine) pendant 2 mois : non satisfaisant. Cinacalcet + coumadine + TSS + sevelamer (2400mg/j) + analgésiques. Antibiotiques pour les infections nécrotiques. Soin des plaies.	TSS IV (40g /j) de façon continue pendant 6 mois. Puis TSS IV réduit à 25g 3 fois / semaine après la sortie de l'hôpital (3 mois). STS IV 10 g 2 fois/ semaine (2 mois).	Amélioration continue de la nécrose. Guérison complète de la plaie en 6 mois. Décès pour raisons cardiaques mais sans calciphylaxie active. EI : anorexie et vomissements.
F, 60 ans	IR (dialyse)	Ulcères aux mollets. Douleur intolérable, infection et nécrose cutanée. Indurations sous-cutanées.	Dialysat pauvre en Ca ²⁺ , cinacalcet (30mg/j) associés au TSS. Antibiotiques. Parathyroïdectomie au bout de 8 semaines (et arrêt cinacalcet).	STS 40 g /j pendant 16 mois.	Aggravation de la taille et de la douleur de la nécrose en quelques jours. Puis amélioration continue. Guérison des ulcères et amélioration générale en 6 mois. Décès cardiaque 6 mois après arrêt TSS mais pas de récurrence de la maladie.
H, 66 ans	IR terminale	Calciphylaxie, ulcères aux mollets (multiples, douloureux, infectés).	Antibiotiques pendant 4 semaines. Cinacalcet (seulement quelques semaines car nausées importantes). Sevelamer. Bicarbonates VO pour l'acidose.	STS IV 25 g 3 fois/ semaine, pendant 14 mois. Réduction progressive de la posologie au bout de 10 mois.	Amélioration continue en 3 semaines. Guérison des ulcères en 6 mois. Décès par arrêt cardiaque (et cancer colon). EI : acidose métabolique. Les œdèmes aux mollets et prise de poids entre les dialyses ne sont pas imputables au STS directement.

H, 61 ans	IR (dialyse)	Calciphylaxie. Ulcère douloureux au mollet. Hypercalcémie. Hypertension.	Arrêt de coumadine, calcitriol et phosphates binders contenant du calcium. Furosémide + calcitonine (5 jours) pour l'hypercalcémie. Cinacalcet (60 mg/j) + sevelamer.	TSS IV 25 g 3 fois/ semaine. Au bout de 5 mois, diminution de la posologie de TSS pendant 6 mois.	Diminution rapide de la douleur, et guérison complète de l'ulcère en 5 mois. Pas de récurrence, mais mort 1 an après arrêt TSS car problème cardiaque. EI : nausée (facilement contrôlée par métoclopramide).
F, 37 ans	Pas d'IR.	DM depuis 4 ans. Syndrome de Raynaud. Nodule croissant et douloureux à l'extrémité du doigt depuis 3 mois.	Prednisone, methotrexate, nifedipine.	TSS topique à 10% pendant 3 semaines. Puis TSS (0,1 mL à 0,025%) en intradermique (à la base du nodule) : 3 injections en 3 semaines.	Echec du TSS topique. Après TT en intradermique : disparition de la calcinose et guérison complète au niveau de la peau. Pas d'EI.

Salmhofer et al. 2013 [95]

Smith 2013 [105]

Annexe 2 : Protocole d'extraction du TSS de la base galénique

Tarer un tube.

Peser directement dans ce tube, et « à peu près exactement », 500 mg de la préparation.

Imprimer la pesée sur un ticket.

Ajouter 2,5 mL de tampon phosphate 10 mM (phase aqueuse). Boucher le tube puis vortexer.

Ajouter 2,5 mL de TBME (phase organique). Boucher le tube puis vortexer jusqu'à dissolution complète de la préparation.

Laisser décanter une quinzaine de minutes.

(500 mg de préparation à 10% doit contenir 50 mg de TSS. Elle se trouve dans 2,5 mL de phase aqueuse. La concentration de TSS est donc de 20 mg/mL.)

Puis prélever 1 mL de phase aqueuse (=extrait) à l'aide d'une pipette que l'on verse dans un nouveau tube.

Dilution au 1/10 : prélever 100 µL de l'extrait, les verser dans un vial, auquel on ajoute 900 µL de tampon phase aqueuse (de tampon phosphate 10 mM) à l'aide d'une pipette. Vortexer pour homogénéiser.

La concentration théorique de TSS est alors de 2 mg/mL.

Annexe 3 : Protocole pour valider la méthode

Colonne utilisée : Atlantis[®] C18 - 5 μ m, 4,6x150 mm

Débit : 1mL/min

Méthode : Cérat STS

Réactifs utilisés :

- di-sodium hydrogène phosphate dihydraté (réactif n°11)
- tétrabutylammonium hydrogène sulfate (TBAHS = réactif n°128)
- méthanol
- eau ultrapure
- thiosulfate de sodium pentahydraté (TSS pentahydraté)
- blanc (préparation conditionnée en tube)
- tert-butyl méthyl éther (TBME)

Résumé des étapes :

- Préparation de la phase mobile
- Equilibrage de la colonne chromatographique
- Gamme d'étalonnage (5 points)
- Réalisation d'un blanc extrait
- Contrôles qualité dans le tampon (x9)
- Contrôles qualité extrait (x9)
- Injections chromatographiques (x23 + 4 blancs extraits)

Matériel nécessaire pour effectuer la préparation galénique :

- Mortier
- Pilon
- Papier sulfurisé
- Carte à jouer

Phase mobile :

1. Réalisation du **tampon phosphate 10 mM**, pH compris entre pKa+1 et pKa-1 (pKa=7,21)

On utilise la forme basique du couple $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ pour pouvoir augmenter le pH, car l'ajout de l'agent d'appariement d'ions (tétrabutylammonium hydrogène sulfate = TBAHS) entraîne une diminution du pH.

$n_{\text{HPO}_4^{2-}} = 10 \text{ mmol}$ (**réactif n°11**)

donc $m_{\text{HPO}_4^{2-}} = n \times \text{MM} = 0,01 \times 177,99 = 1,7799 \text{ g}$

On veut : $c_{\text{TBAHS}} = 0,005 \text{ M}$, donc on ajoute **1,698g de TBAHS** dans une fiole jaugée de 1L.

On ajuste avec de l'**eau ultrapure qsp 1L**.

Agiter, puis **mesurer le pH**. Il doit être aux alentours de 7,1.

2. Réalisation de la **partie organique de la phase mobile**

$C_{\text{TBAHS}} = 0,005 \text{ M}$ donc peser **1,698g de TBAHS**

Remplir la fiole avec du **méthanol** jusqu'au trait de jauge **qsp 1L**.

Filtrer les phases avant de les mélanger pour obtenir la phase mobile.

La phase mobile est réalisée dans les proportions **85%/15 %**.

Pour **1L de phase mobile**, on a **850 mL de tampon phosphate + 150 mL de phase organique**.

Gamme d'étalonnage :

La concentration cible en TSS de la gamme d'étalonnage est **2 mg/mL**.

On effectue 5 points de gamme avec 5 pesées indépendantes, ainsi qu'un blanc.

-verser 1 mL de blanc extrait dans un vial puis réaliser une injection HPLC

(Réalisation d'un blanc extrait :

Peser 100 mg de base. Ajouter 2,5 mL de tampon phosphate. Vortexer. Ajouter 2,5 mL de TBME. Vortexer. Puis prélever 1 mL de la phase aqueuse que l'on verse dans un vial.)

-40% : $c = 0,8 \text{ mg/mL}$

Peser «à peu près exactement» **16 mg de TSS**, puis ajuster avec du **tampon phosphate** jusqu'au trait de jauge de la **fiole de 20 mL**.

Prélever 1 mL que l'on verse dans un vial. Vortexer.

Faire 1 injection HPLC à partir de ce vial.

-60% : $c=1,2$ mg/mL

Peser «à peu près exactement» **24 mg de TSS**, puis ajuster avec du **tampon phosphate** jusqu'au trait de jauge de la **fiole de 20 mL**.

Prélever 1 mL que l'on verse dans un vial. Vortexer.

Faire 1 injection HPLC à partir de ce vial.

-80% : $c=1,6$ mg/mL

Peser «à peu près exactement» **32 mg de TSS**, puis ajuster avec du **tampon phosphate** jusqu'au trait de jauge de la **fiole de 20 mL**.

Prélever 1 mL que l'on verse dans un vial. Vortexer.

Faire 1 injection HPLC à partir de ce vial.

-100% : $c=2$ mg/mL

Peser «à peu près exactement» **40 mg de TSS**, puis ajuster avec du **tampon phosphate** jusqu'au trait de jauge de la **fiole de 20 mL**.

Prélever 1 mL que l'on verse dans un vial. Vortexer.

Faire 1 injection HPLC à partir de ce vial.

-120% : $c=2,4$ mg/mL

Peser «à peu près exactement» **48 mg de TSS**, puis ajuster avec du **tampon phosphate** jusqu'au trait de jauge de la **fiole de 20 mL**.

Prélever 1 mL que l'on verse dans un vial. Vortexer.

Faire 1 injection HPLC à partir de ce vial.

Tracer la droite d'étalonnage : $y=ax+b$, avec $y= Aire$ et $x= c_{TSS}$

Contrôles qualité dans le tampon

-réaliser une injection HPLC de blanc extrait

-50% : c=1 mg/mL

Peser «à peu près exactement» 20 mg de TSS, puis ajuster avec du tampon phosphate jusqu'au trait de jauge de la fiole de 20 mL.

Prélever 1 mL que l'on verse dans un vial.

Faire 1 injection HPLC à partir de ce vial.

Répéter le protocole (peser, ajuster, prélever, injecter) 2 nouvelles fois.

-90% : c=1,8 mg/mL

Peser «à peu près exactement» 36 mg de TSS, puis ajuster avec du tampon phosphate jusqu'au trait de jauge de la fiole de 20 mL.

Prélever 1 mL que l'on verse dans un vial.

Faire 1 injection HPLC à partir de ce vial.

Répéter le protocole (peser, ajuster, prélever, injecter) 2 nouvelles fois.

-110% : c=2,2 mg/mL

Peser «à peu près exactement» 22 mg de TSS, puis ajuster avec du tampon phosphate jusqu'au trait de jauge de la fiole de 10 mL.

Prélever 1 mL que l'on verse dans un vial.

Faire 1 injection HPLC à partir de ce vial.

Répéter le protocole (peser, ajuster, prélever, injecter) 2 nouvelles fois.

Pour chaque injection, on observe une aire, à laquelle correspond une concentration d'après la droite d'étalonnage. C'est la concentration calculée.

La concentration théorique est la concentration que l'on devrait obtenir selon la masse de TSS utilisée.

On calcule : $\text{Ecart relatif} = [(c_{\text{théorique}} - c_{\text{calculée}})/c_{\text{théorique}}] \times 100$

Contrôle qualité extrait (sur la préparation)

-réaliser une injection HPLC de blanc extrait

-préparation à **5% de TSS**

Réaliser une préparation à 5% de TSS. (cf. protocole préparation galénique)

m_{préparation totale} =3g

m_{TSS} =150 mg

m_{eau} =200,1 mg (ou µL)

m_{base} =2649,9 mg

Puis réaliser une extraction de cette préparation. (cf. protocole d'extraction du TSS).

Verser 1 mL de l'extrait dilué dans un vial.

Faire 1 injection HPLC à partir de ce vial.

De la même façon refaire 2 extractions supplémentaires de la même préparation à 5%. Pour chaque extraction, verser 1 mL de l'extrait dilué dans un vial. Injecter.

-préparation à 9% de TSS

Réaliser une préparation à 9% de TSS. (cf. protocole préparation galénique)

m_{préparation totale} =3g

m_{TSS} =270 mg

m_{eau} =200,1 mg (ou µL)

m_{base} =2529,9 mg

Puis réaliser une extraction de cette préparation. (cf. protocole d'extraction du TSS).

Verser 1 mL de l'extrait dilué dans un vial.

Faire 1 injection HPLC à partir de ce vial.

De la même façon refaire 2 extractions supplémentaires de la même préparation à 9%. Pour chaque extraction, verser 1 mL de l'extrait dilué dans un vial. Injecter.

-préparation à 11% de TSS

Réaliser une préparation à 11% de TSS. (cf. protocole préparation galénique)

m_{préparation totale} =3g

m_{TSS} =330 mg

m_{eau} =200,1 mg (ou µL)

m_{base} =2469,9 mg

Puis réaliser une extraction de cette préparation. (cf. protocole d'extraction du TSS).

Verser 1 mL de l'extrait dilué dans un vial.

Faire 1 injection HPLC à partir de ce vial.

De la même façon refaire 2 extractions supplémentaires de la même préparation à 11%. Pour chaque extraction, verser 1 mL de l'extrait dilué dans un vial. Injecter.

-réaliser une injection HPLC de blanc extrait

Tout ceci est effectué à **J1** (23 injections + 4 injections de blanc extrait).

A **J2**, refaire la même chose qu'à J1 (27 injections) +10 injections supplémentaires (1 blanc extrait, et les 9 vials de J1 contenant l'extrait, pour pouvoir étudier la stabilité de l'extrait).

A **J3**, refaire la même chose qu'à J1 (27 injections) +10 injections supplémentaires (1 blanc extrait, et les 9 vials de J1 contenant l'extrait, pour pouvoir étudier la stabilité de l'extrait).

Annexe 4 : Protocole pour l'étude de stabilité

Colonne utilisée : Atlantis[®] C18 - 5µm, 4,6x150 mm

Débit : 1mL/min

Méthode : Cérat STS

Réactifs utilisés :

- di-sodium hydrogène phosphate dihydraté (réactif n°11)
- tétrabutylammonium hydrogène sulfate (TBAHS = réactif n°128)
- méthanol
- eau ultrapure
- thiosulfate de sodium pentahydraté (TSS pentahydraté)
- blanc (préparation conditionnée en tube)
- tert-butyl méthyl éther (TBME)

Résumé des étapes :

- Préparation de la phase mobile
- Equilibrage de la colonne chromatographique
- Contrôles qualité dans le tampon (x1)
- Réalisation d'un blanc extrait
- Contrôles qualité extrait (x3)
- Extraction des 4 préparations (x12)
- Injections chromatographiques

Matériel nécessaire pour effectuer la préparation galénique :

- Mortier
- Pilon
- Papier sulfurisé
- Carte à jouer

Protocole de la préparation galénique :

Pour **3g de préparation (10% de TSS pentahydraté) :**

- peser **300 mg de TSS pentahydraté**, les verser dans le mortier
- ajouter **200 mg (ou µL) d'eau stérile versable** dans le mortier

Dissoudre, dans le mortier, le STS dans l'eau.

-peser **2500 mg de base** sur du papier sulfurisé

Disperser le (TSS+eau) dans la base à l'intérieur du mortier de façon homogène.

Phase mobile :

1. Réalisation du **tampon phosphate 10 mM**, avec ajout d'agent d'appariement d'ions, pH compris entre pK_a+1 et pK_a-1 ($pK_a=7,21$)

On utilise la forme basique du couple $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ pour pouvoir augmenter le pH, car l'ajout de l'agent d'appariement d'ions (tétrabutylammonium hydrogène sulfate=TBAHS) entraîne une diminution du pH.

$n_{HPO_4^{2-}} = 10 \text{ mmol}$ (**réactif n°11**)

donc $m_{HPO_4^{2-}} = n \times MM = 0,01 \times 177,99 = 1,7799 \text{ g}$

On veut : $c_{TBAHS} = 0,005 \text{ M}$, donc on ajoute **1,698g de TBAHS** dans une fiole jaugée de 1L.

Verser les deux produits pesés dans une fiole d'1 litre. Puis remplir la fiole avec de l'eau ultrapure jusqu'au trait de jauge.

Agiter, puis **mesurer le pH**. Il doit être aux alentours de $7,1 \pm 0,2$.

2. Réalisation de la **partie organique de la phase mobile (200 mL)**

$c_{TBAHS} = 0,005 \text{ M}$ donc peser **1,698g de TBAHS**

Remplir la fiole avec du **méthanol** jusqu'au trait de jauge **qsp 1L**.

3. **Mélange** des parties aqueuse et organique

Filtrer les phases avant de les mélanger pour obtenir la phase mobile.

La phase mobile est réalisée dans les proportions **85%/15 %**.

Pour **1L de phase mobile**, on a : **850 mL de tampon phosphate 10 mM + 150 mL de phase organique**.

Il reste environ 150 mL de tampon phosphate 10 mM que l'on utilise pour les manipulations.

Equilibrer la colonne chromatographique

Disposer le flacon de phase mobile au niveau de la voie 1 que l'on sélectionne sur Galaxie® (P1). Sélectionner la colonne en position P3. Ouvrir le robinet pour réaliser une purge jusqu'à disparition des bulles dans la tubulure.

Fermer le robinet et mettre à équilibrer à un débit de 1 mL/min.

Contrôles qualité dans le tampon

La valeur cible de TSS pentahydraté est 2 mg/mL.

On réalise un contrôle à 90% : $c=1,8$ mg/mL

Peser «à peu près exactement» 36 mg de TSS pentahydraté, puis ajuster avec du tampon phosphate 10mM jusqu'au trait de jauge de la fiole de 20 mL. Imprimer le ticket de pesée pour avoir la concentration exacte en TSS pentahydraté.

Prélever 1 mL que l'on verse dans un vial.

Pour chaque injection, on observe une aire, à laquelle correspond une concentration d'après la droite d'étalonnage. C'est la concentration calculée. ($y=ax+b$, avec $y=Aire$ et $x=c_{STS}$)

Réalisation d'un blanc extrait

Peser 100 mg de blanc. Ajouter 2,5 mL de tampon phosphate 10 mM. Ajouter 2,5 mL de TBME. Vortexer. Laisser reposer une quinzaine de minutes.

Puis prélever à l'aide d'une pipette 1 mL de la phase aqueuse que l'on verse dans un vial.

Contrôle qualité extrait

Faire une préparation à **10% de TSS pentahydraté** (**cf. protocole préparation galénique**)

$m_{\text{préparation totale}} = 3\text{g}$

$m_{\text{STS}} = 300\text{ mg}$

$m_{\text{eau}} = 200\text{ mg (ou } \mu\text{L)}$

$m_{\text{base}} = 2500\text{ mg}$

Puis réaliser une extraction de cette préparation. (**cf. protocole d'extraction du TSS**).

Verser 1 mL de l'extrait dilué dans un vial.

De la même façon refaire 2 extractions supplémentaires de la même préparation à 10%.

Pour chaque extraction, verser 1 mL de l'extrait dilué dans un vial.

Extractions sur les préparations

-préparation conservée à +4°C (réfrigérateur)

Réaliser 3 extractions de la préparation à 3 endroits différents (**cf. protocole d'extraction du TSS**)

-préparation conservée à l'étuve à +22,5°C

Réaliser 3 extractions de la préparation à 3 endroits différents (**cf. protocole d'extraction du TSS**).

-préparation conservée à l'étuve à +32°C

Réaliser 3 extractions de la préparation à 3 endroits différents (**cf. protocole d'extraction du TSS**).

-préparation conservée à l'étuve à +60°C

Réaliser 3 extractions de la préparation à 3 endroits différents (**cf. protocole d'extraction du TSS**).

Injections HPLC

-blanc extrait

-1 contrôle qualité dans le tampon

-3 contrôles qualité extrait sur la préparation à 10% réalisée le jour-même

-3 extractions de la préparation initiale conservée à +4°C

-3 extractions de la préparation initiale conservée à +22,5°C

-3 extractions de la préparation initiale conservée à +32°C

-3 extractions de la préparation initiale conservée à +60°C

NB : Si les résultats des contrôles ne sont pas cohérents, il est nécessaire de refaire une gamme d'étalonnage. (**cf. Protocole pour la validation de méthode**)

Table des figures

<u>Figure 1 : Mécanisme « ping-pong » de détoxification par le TSS et la rhodanèse</u>	28
<u>Figure 2 : Schéma HPLC</u>	46
<u>Figure 3 : Exemple d'un chromatogramme obtenu après injection de TSS issu de la préparation médicamenteuse</u>	53
<u>Figure 4 : Profil d'exactitude obtenue lors de la validation de méthode</u>	60
<u>Figure 5 : Teneur en TSS dans la préparation par rapport à la teneur à J_0 (9,72% à J_0)</u>	68

Liste des tableaux

<u>Tableau 1 : Réalisation de la gamme d'étalonnage</u>	50
<u>Tableau 2 : Teneur observée en TSS des préparations et des phases aqueuses du médicament utilisé (%)</u>	62
<u>Tableau 3 : Teneur totale en TSS du médicament utilisé (%)</u>	63
<u>Tableau 4 : Dégradation observée des préparations au cours du temps</u>	66
<u>Tableau 5 : Pourcentage moyen de TSS dans la préparation par rapport à la teneur à J_0 (9,72% à J_0)</u>	67

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.

LABARDE Sébastien. Contribution à la finalisation d'une méthode de dosage et étude de stabilité d'un topique à base de thiosulfate de sodium. 2014.

L'apparition de calcifications au sein de tissus mous peut être observée chez certaines personnes. Toutefois jusqu'ici, aucun traitement n'a été jugé comme efficace de façon optimale. Cette thèse est la conséquence d'un travail effectué au CHRU de Limoges pour un patient. Il s'agit d'un enfant atteint de dermatomyosite juvénile présentant des douleurs et une mobilité articulaire réduite, dues à la présence de calcifications sous-cutanées. Un traitement pour résorber ces calcifications a été entrepris. Le médicament utilisé est une préparation topique à base de thiosulfate de sodium.

Le but de ce travail est d'expliquer l'utilité du thiosulfate de sodium dans ce type de pathologie et d'étudier la stabilité de la préparation afin de pouvoir l'utiliser à plus grande échelle si le rapport bénéfice/risque est jugé favorable chez ce patient.

La première partie de cette thèse correspond à une présentation des calcinose ainsi que des différentes pathologies pour lesquelles ce phénomène peut s'observer. La deuxième partie est une présentation du thiosulfate de sodium et de son mécanisme probable d'action sur les calcifications. La troisième partie correspond à une revue des cas d'utilisation du thiosulfate de sodium, seul ou en association, dans le traitement des calcinose. La quatrième partie est l'étude de la préparation topique à base de thiosulfate de sodium. Pour ce faire, une méthode de dosage chromatographique a été sélectionnée puis développée. Une fois le dosage effectué, une étude de stabilité a été réalisée afin d'obtenir des informations sur la conservation du médicament et sa durée d'utilisation.

Pharmacie

Mots-clés : thiosulfate de sodium, calcinose cutanées, chromatographie, HPLC

Université de LIMOGES
Faculté de Pharmacie
2 rue du Docteur Marcland 87 025 LIMOGES CEDEX