

Université de Montréal

**Place des nouvelles technologies pour les études pharmacocinétiques de
la femme enceinte et de l'allaitement**

par :

Marie-Sophie Caubet

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en sciences pharmaceutiques
option pharmacologie

Décembre 2001



Copyright, Marie-Sophie Caubet, 2001

QV
705-
U58
2002
v.012

Université de Montréal

École des nouvelles technologies pour les études pharmaceutiques
la forme exacte et de l'attention

Pharmacie
Montréal-Québec (Canada)

Faculté de Pharmacie

Travaux présentés à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en sciences pharmaceutiques
option pharmacologie



Décembre 2001

Copyright: Monique Gagné-Côté, 2001

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Place des nouvelles technologies pour les études pharmacocinétiques de
la femme enceinte et de l'allaitement**

présentée par :

Marie-Sophie Caubet

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jacques Turgeon

Président rapporteur

Jean louis Brazier

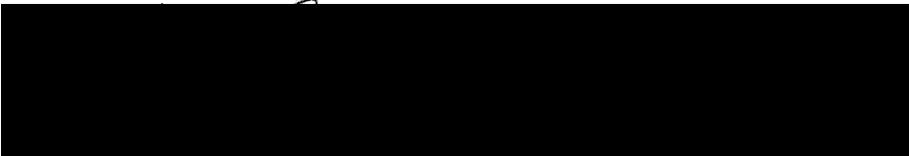
Directeur de recherche

Patrice Hildgen

Membre du jury

Robert Massé

Examineur externe



RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Au cours de la grossesse et de la période d'allaitement, plusieurs fonctions physiologiques varient et entraînent des modifications fonctionnelles au niveau de la pharmacocinétique des médicaments. Certaines pathologies nécessitent un traitement continu et le métabolisme de médicaments prescrits est modifié par des mécanismes qu'il faut connaître pour limiter les risques tant pour la mère que le fœtus. Or, inclure des femmes enceintes ou allaitant dans les protocoles d'étude clinique est difficile pour des raisons d'éthique évidente. Les études fonctionnelles requièrent l'utilisation d'une méthodologie générale adaptée qui inclue des techniques d'analyses non invasives et performantes et des designs d'études adaptés et détaillés, pour permettre la création d'une base de données pertinente pour le corps médical. Dans ce contexte, les isotopes stables et la spectrométrie de masse isotopique présentent un grand intérêt puisque les isotopes stables sont non radioactifs, sans toxicité et d'excellents traceurs biologiques.

L'objectif principal de la thèse est de mettre en place une **méthodologie générale** utilisant **les isotopes stables** pour l'évaluation non invasive de la **fonction métabolique hépatique au cours de la grossesse** et l'étude du **passage des médicaments dans le lait maternel**.

Un **protocole clinique** et une **méthode générale de criblage** par extraction en phase solide et **chromatographie en phase gazeuse** couplée à la spectrométrie de masse ont été mis au point pour les études sur le transfert des médicaments dans le lait maternel et sur les effets pharmacologiques chez le nouveau-né. Le protocole clinique permet de prélever les échantillons de lait de façon contrôlée et de recueillir tous les paramètres importants pour l'interprétation pharmacocinétique. La méthode d'analyse permet de doser de nombreuses substances utilisées pendant l'allaitement et peut facilement et **rapidement être adaptable** à d'autres médicaments et à leurs métabolites. L'utilisation conjointe de ces deux outils garantit une interprétation pharmacocinétique indépendante du contexte de l'étude clinique.

Pour l'étude de la fonction métabolique hépatique, **le test respiratoire à la ^{13}C -caféine et les rapports métaboliques urinaires de la ^{13}C -caféine** ont été validés comme **marqueurs des variations d'activités des CYP1A2**. L'utilisation de la ^{13}C -caféine dans la mesure des rapports urinaires a permis d'être très **spécifique** vis à vis du substrat, et de ne pas tenir compte de la présence systématique de métabolites de la caféine provenant de l'alimentation. Le test respiratoire est indicateur du métabolisme global de la caféine par les CYP1A2 alors que les rapports métaboliques sont associés à certaines voies du métabolisme et permettent de tenir compte et éventuellement de mesurer les activités d'autres enzymes. Pour **les études longitudinales** au cours de la grossesse, ces deux tests sont des outils de choix pour évaluer de façon sensible et non invasive les variations d'activités des CYP1A2 *in vivo* et pour potentiellement détecter et anticiper les dommages dus aux pathologies. Pour évaluer les activités d'autres CYP450, ces deux tests peuvent être utiliser avec d'autres substrats.

En conclusion, **l'analyse isotopique et les technologies utilisant les isotopes stables** permettent d'augmenter l'efficacité des protocoles cliniques et d'accéder à des populations protégées comme les femmes enceintes et allaitant.

Mots clés

Isotopes stables, tests respiratoires, caféine, rapports métaboliques, chromatographie en phase liquide, spectrométrie de masse, extraction en phase solide, CYP450, lait maternel, grossesse.

RÉSUMÉ EN ANGLAIS

Modifications in various physiological functions occur during pregnancy and lactation period. These alterations induce variations of the pharmacokinetic parameters of drugs. The safety rule is to avoid prescription during pregnancy. Nevertheless, several diseases require continuous treatment. Modifications of drug metabolism need to be investigated in order to limit the risks for both the mother and the newborn. Today, it is difficult to include pregnant or nursing women into clinical trials for evident ethical reasons. Functional and pharmacological studies require a general and adapted methodology, which include non-invasive methods and detailed protocols, for the production of a large data base for clinicians and investigators. In this context, stable isotopes and isotopic mass spectrometry are of interest. Actually, stable isotopes are excellent biological tracers, free of any radioactivity and toxicity.

The main goal of the thesis is to develop a **general and non-invasive methodology** using **stable isotopes and mass spectrometry** for the evaluation of **hepatic drug metabolizing enzymes during pregnancy** and for the study of **drugs transfer into breast milk** during lactation.

A **clinical protocol** and a **general method of analysis** by solid phase extraction and **gas chromatography-mass spectrometry** were developed to study the transfer of drugs into breast milk. The protocol is designed to control the collection of milk sample and to gather all the various information and parameters needed to perform comprehensive pharmacokinetic analyses. The analytical method allows the determination of various drugs in milk and is **easily and rapidly adaptable to other** drugs and their metabolites. The use of these modern tools assures that the interpretation of experimental data is independent from the context of the study.

For the evaluation of hepatic drug metabolizing enzymes (CYP450), **the ^{13}C -caffeine breath test** and **the urinary metabolic ratios of ^{13}C -caffeine** were both validated as **indicators of the variations of CYP1A2 activity**. The use of labelled caffeine for the measurement of metabolic ratios specifically eliminates potential interference from caffeine's metabolites relating to diet, thus improving the overall **selectivity** of the test.

The breath test is related to the metabolism of caffeine by CYP1A2 whereas metabolic ratios are related to various metabolic pathways and can be used as indicators to assess the activity of others enzymes. These non-invasive tests are of relevant interest for studying the **longitudinal variations** of CYP1A2 activity along pregnancy and potentially identify and anticipate damages due to diseases. These tests can be adapted to other substrates in order to determine other CYP450 activities.

In conclusion, **isotopic analysis and related technologies based on the use of stable isotopes** are innovative tools that were shown to improve the efficiency of clinical protocols, especially when protected populations such as pregnant women or nursing mothers are included.

Key words:

Stable isotopes, breath tests, caffeine, ratios metabolic, liquid chromatography, mass spectrometry, solid phase extraction, CYP450, breast milk, pregnancy.

TABLE DES MATIÈRES

Table des tableaux	16
Tables des figures	19
Liste des abréviations	22
Remerciements	24
INTRODUCTION GÉNÉRALE	25
SECTION I: PASSAGE DES MÉDICAMENTS DANS LE LAIT MATERNEL	30
<hr/>	
INTRODUCTION	31
PARTIE I : BIBLIOGRAPHIE	34
Chapitre 1 : Le lait maternel	35
1. Physiologie de la lactation	35
1.1. Morphologie de la glande mammaire	35
1.2. Contrôle hormonale de la lactation	36
1.3. Mécanisme de production du lait	38
2. Composition du lait maternel	39
2.1. Maturation du lait maternel	39
2.2. Composition du lait mature	41
2.3. Variations de la composition du lait maternel	43
3. Médicaments influençant la production de lait maternel	45
3.1. Médicaments diminuant la quantité de lait produite	46
3.2. Médicaments augmentant la quantité de lait produite	46

Chapitre 2 : Passage des médicaments dans le lait maternel	47
1. Mécanisme de passage des médicaments dans le lait maternel	47
2. Déterminants du passage des médicaments dans le lait maternel	48
2.1. Facteurs liés à la molécule médicamenteuse	48
2.1.1. La liaison protéiniques	48
2.1.2. Le degré d'ionisation	48
2.1.3. La solubilité	50
2.2. Facteurs liés à la mère	52
2.3. Facteurs liés à la glande mammaire	53
2.4. Facteurs liés à la composition et au pH du lait	54
2.5. Facteurs liés à l'enfant allaité	54
3. Calcul de la dose de médicament reçu par l'enfant via le lait maternel	55
3.1. Mesure du rapport L/P	56
3.2. Estimation du rapport L/P	57
Chapitre 3 : Méthodologie pour le dosage des médicaments dans le lait maternel	59
1. Prélèvements des échantillons de lait	59
1.1. Méthodes de prélèvements	60
1.2. Renseignements relatifs à l'échantillon de lait	61
1.3. Renseignements relatifs à la molécule médicamenteuse	61
2. Analyse des échantillons de lait	62
2.1. Caractéristiques du lait humain	62
2.1.1. Comparaison du lait aux autres milieux biologiques	62
2.1.2. Comparaison du lait humain au lait animal	62
2.2. Techniques de traitement des échantillons de lait	63
2.2.1. Extraction liquide/liquide	64
2.2.2. Extraction en phase solide	66
2.3. Techniques d'analyse des médicaments dans le lait	68

**PARTIE II : MISE AU POINT D'UNE MÉTHODOLOGIE POUR LE
CRIBLAGE DES MÉDICAMENTS DANS LE LAIT MATERNEL** 69

**Chapitre 1 : Protocole clinique pour le prélèvement des échantillons de
lait** 70

- 1. Introduction 70
- 2. Objectifs 71
- 3. Protocole 71

**Chapitre 2 : Méthode générale de criblage des médicaments dans le lait
maternel** 72

- 1. Introduction 72
- 2. Objectifs 73
- 3. Choix méthodologiques 73
 - 3.1. Molécules tests 73
 - 3.2. Méthode d'extraction 75
 - 3.3. Méthode d'analyse 76
- 4. Résultats 76
 - 4.1. Résumé de la publication 76
 - 4.2. Publication 77

**Chapitre 3 : Application de la méthode générale au dosage des
antidépresseurs dans le lait maternel** 92

- 1. Introduction 92
- 2. Objectifs 93
- 3. Résultats 93
 - 3.1. Résumé de la publication 94
 - 3.2. Publication 94

DISCUSSION	102
RÉFÉRENCES	106
SECTION II : TESTS RESPIRATOIRES – PHÉNOTYPAGE DES CYP450 – MODIFICATIONS PENDANT LA GROSSESSE	118
<hr/>	
INTRODUCTION	119
PARTIE I : BIBLIOGRAPHIE	122
Chapitre 1 : Analyse isotopique et tests respiratoires	123
1. Analyse isotopique	123
1.1. Description	123
1.2. Avantages des isotopes stables	123
1.3. Technique en analyse isotopique	125
1.4. Analyse isotopique appliquée au domaine biomédical	126
2. Tests respiratoires	127
2.1. Description	127
2.2. Spectrométrie de masse isotopique en flux continu	128
2.3. Utilisations des tests respiratoires	131
Chapitre 2 : Tests respiratoires et métabolisme hépatique	134
1. Introduction	134
2. CYP450	134
2.1. Activité des CYP450	136
2.2. Induction	138
2.3. Inhibition	139

3. Phénotypage des CYP450	140
3.1. Tests non sélectifs	142
3.1.1. Aminopyrine	142
3.1.2. Phénacétine	143
3.1.3. Méthacétine	143
3.2. Tests sélectifs	143
3.2.1. Erythromycine	143
3.2.2. Caféine	144
Chapitre 3 : Métabolisme des médicaments pendant la grossesse et la période post-partum	145
1. Modifications de la pharmacocinétique des médicaments pendant la grossesse	145
1.1. Absorption des médicaments	146
1.2. Distribution des médicaments	147
1.3. Liaison des médicaments aux protéines plasmatiques	150
1.4. Métabolisme des médicaments	151
1.5. Élimination des médicaments	153
2. Mesure de la fonction hépatique pendant la grossesse	154
2.1. Tests conventionnels	154
2.2. Sondes métaboliques	155
PARTIE II : UTILISATION DE LA CAFÉINE COMME MARQUEUR DE LA FONCTION MÉTABOLIQUE HÉPATIQUE	157
Chapitre 1 : Validation des tests respiratoires à la caféine et à l'aminopyrine	158
1. Introduction	158
2. Objectifs	158

3. Résultats	159
3.1. Résumé de la publication	160
3.2. Résumé des résultats concernant le TRC	160
3.3. Publication	160
Chapitre 2 : Dosage de la caféine ¹³C et de ses métabolites dans les urines	168
1. Introduction	168
2. Objectifs	168
3. Résultats	169
3.1. Résumé des publications	169
3.2. Publications	170
DISCUSSION	201
RÉFÉRENCES	205
CONCLUSION GÉNÉRALE	222
ANNEXES	226
Annexe 1 : Protocole d'étude clinique - Etude du passage des médicaments dans le lait maternel	227
Annexe 2 : Monographie des médicaments dosés dans le lait maternel	242

TABLE DES TABLEAUX

SECTION I : PASSAGE DES MÉDICAMENTS DANS LE LAIT MATERNEL

Tableau I – Composition du colostrum et du lait mature.	40
Tableau II – Les phases du lait et ses principaux constituants.	43
Tableau III – Renseignements à collecter lors d'une prise d'échantillon de lait.	61
Tableau IV – Composition du lait de différents mammifères.	63
Tableau V – Méthodes d'extraction en phase liquide pour le dosage des médicaments dans le lait maternel humain.	65
Tableau VI – Méthodes d'extraction en phase solide pour le dosage des médicaments dans le lait maternel humain.	67
Tableau VII – Molécules choisies pour la mise au point de la méthode de dosage des médicaments dans le lait.	74

SECTION II : TESTS RESPIRATOIRES – PHÉNOTYPAGE DES CYP450 – MODIFICATIONS PENDANT LA GROSSESSE

Tableau I – Abondance relative des principaux éléments retrouvés dans les composés organiques.	124
Tableau II - Comparaison de la GC-MS et de l'IRMS.	126
Tableau III – Les différents tests respiratoires au ¹³ C.	133
Tableau IV – Localisation tissulaire chez l'homme des CYP450 impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques.	135
Tableau V – Enzymes des CYP450 impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques dans le foie.	135
Tableau VI – Principales variables associées à la grossesse modifiant les paramètres pharmacocinétiques des médicaments.	145
Tableau VII – Variations du volume sanguin pendant la grossesse.	148
Tableau VIII – Composantes de l'augmentation de la masse d'eau (g) pendant la grossesse.	149

Tableau XIX – Tests fonctionnels in vivo de l'activité hépatique des CYP450 pour les patients avec des maladies hépatiques.

156

TABLE DES FIGURES

SECTION I : PASSAGE DES MÉDICAMENTS DANS LE LAIT MATERNEL

Figure 1 - Schéma de la glande mammaire : système de canaux et alvéoles.	35
Figure 2 – Synthèse et éjection du lait : rôle de la prolactine et de l'ocytocine.	37
Figure 3 – Evolution des taux hormonaux pendant la grossesse et la lactation.	37
Figure 4 – Les voies de synthèse et de sécrétion des constituants du lait dans l'alvéole mammaire.	38
Figure 5 – Profils de concentration des protéines et des lipides du lait lors du premier mois post-partum.	44
Figure 6 – Variation moyenne du taux de lipides du lait en fonction des heures de la journée.	44
Figure 7 – Variation de la quantité de lipides du lait au cours d'une tétée.	45
Figure 8 – Distribution d'un médicament entre les différentes phases du plasma et du lait.	49
Figure 9 – Estimation du rapport L/ P en fonction du pH du lait pour des molécules ayant différentes valeurs de pKa.	50
Figure 10 – Relation entre la liposolubilité et la concentration des médicaments dans le lait écrémé.	51
Figure 11 – Profil idéal de la prise de médicament par rapport à l'allaitement.	55
Figure 12 – Relation entre les concentrations d'un médicament mesuré dans le lait et le plasma, pour deux tétées prises pendant l'intervalle pharmacocinétique.	57
Figure 13 - Déterminants de la concentration du médicament dans le lait et de l'effet pharmacologique potentiel chez l'enfant.	60
Figure 14 – Méthodologie pour la détermination du passage des médicaments dans le lait maternel.	104

SECTION II : TESTS RESPIRATOIRES – PHÉNOTYPAGE DES CYP450 – MODIFICATIONS PENDANT LA GROSSESSE

- Figure 1** – Schéma des différentes techniques pour l'analyse des isotopes stables. 125
- Figure 2** – Production de $^{13}\text{CO}_2$ après déméthylation d'un substrat marqué au ^{13}C ($\text{R}_1\text{R}_2\text{-N-}^*\text{CH}_3$) par le CYP450. 128
- Figure 3** – Schéma du spectromètre de masse isotopique en flux continu équipé d'un Chromatographe en phase gazeuse et un détecteur à conductivité thermique pour la séparation des gaz et une interface à double entrée dynamique. 129
- Figure 4** – Exemples de réactions catalysées par les CYP450. 137
- Figure 5** – Cycle catalytique des CYP450. 137
- Figure 6** – Cinétique du $^{13}\text{CO}_2$ expiré par le rat après administration de 1,3,7- $^{13}\text{C}_3$ -caféine, avant et après une injection de 3-méthylcholantrène. 141
- Figure 7** – Effet de l'administration de CCl_4 sur le test respiratoire à l'aminopyrine. 142
- Figure 8** – Concentrations plasmatiques de péthidine (moyenne \pm SD) après une injection de 100 mg de péthidine chez la femmes enceinte et non enceinte. 147
- Figure 9** – Les composantes de l'augmentation du volume de distribution pendant la grossesse. 148
- Figure 10** – Concentration plasmatique et quantité totale circulante d'albumine pendant la grossesse. 150

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ARNm : acide ribonucléique messenger
BSP : excrétion de sulfobromophatléine
CCl₄ : tétrachlorométhane
CO : contraceptifs oraux
DAD : détecteur à barrette de diodes
GC : chromatographie en phase gazeuse
GC-C-IRMS : chromatographie en phase gazeuse – combustion – spectrométrie de masse
HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance
IRMS : spectrométrie de masse isotopique isotopique
LLE : extraction liquide/liquide
LGC : chromatographie en phase liquide et gazeuse
MS : spectrométrie de masse
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogénée
PDB : pee dee belemnitella
PKa : constante de dissociation
RMC rapports métaboliques de la caféine
¹³C-RMC : rapports métaboliques de la ¹³C-caféine
SGOT : Sérum Glutamooxaloacetate Transférase
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
SPE : extraction en phase solide
TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
TRA : test respiratoire à la ¹³C-aminopyrine
TRC : test respiratoire à la ¹³C-caféine
TRE : test respiratoire à l'érythromycine
TRH : hormone de libération de la thyrotropin
TRM : test respiratoire à la ¹³C-méthacétine
TRP : test respiratoire à la ¹³C-phénacétine
UV : ultra-violet
XDB-C18 : greffage C18 extra dense (extra densely bonded)

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribuées à la réalisation de ce travail.
Je suis sincèrement reconnaissante pour leur soutien financier, technique et moral.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Au cours de la grossesse et de la période d'allaitement, de nombreuses fonctions physiologiques, comme la fonction cardiovasculaire, rénale, métabolique, etc., sont modifiées chez la femme. En même temps, de nouveaux compartiments de distribution se développent : le placenta, le liquide amniotique et le fœtus pendant la grossesse et le lait pendant l'allaitement. La plupart de ces modifications physiologiques entraînent des modifications fonctionnelles en particulier au niveau de la pharmacocinétique des médicaments.

Les études pharmacocinétiques et les études des modifications fonctionnelles pendant la grossesse et la période post-partum sont difficiles à réaliser pour des raisons légales et éthiques évidentes. La plupart des études pharmacocinétiques recensées dans la littérature concernent des cas isolés, généralement pendant le premier trimestre de grossesse. Le manque de données cinétiques et d'informations relatives aux patientes limite beaucoup l'interprétation des mesures et conduit à des divergences d'interprétation. Bien que la prise de médicaments ne soit pas recommandée pendant la grossesse et l'allaitement, certaines pathologies, gestationnelles ou autres, nécessitent des traitements médicamenteux. Les risques encourus par la mère, le fœtus ou le nouveau-né sont d'autant plus importants que la pharmacocinétique des médicaments prescrits est mal connue.

Les études fonctionnelles chez la femme enceinte et la femme allaitant, requièrent l'utilisation d'une méthodologie générale adaptée qui inclue d'une part des techniques d'analyses non invasives et performantes et d'autre part des schémas d'études adaptés et détaillés, pour permettre la création d'une base de données pertinentes pour le corps médical.

Ces dernières années, l'augmentation des performances analytiques, l'accès à de très petits échantillons, la possibilité de mettre au point des méthodes non invasives de diagnostic et d'exploration fonctionnelle ont ouvert les portes du domaine biomédical à la spectrométrie de masse isotopique. Cette technique, qui utilise les isotopes non radioactifs, offre de nombreuses possibilités en diagnostic biomédical, pharmacologie,

gastro-entérologie, etc., et s'adapte très bien aux populations protégées et à risques, comme les femmes enceintes ou allaitant. En effet, les isotopes stables n'induisent pas de toxicité, ni d'embryotoxicité et constituent d'excellents traceurs biologiques. Par ailleurs, l'évolution des méthodes de traitement d'échantillons biologiques, la diffusion croissante de méthodes très performantes d'analyse qualitative et quantitative de micro-échantillons par spectrométrie de masse, permet de développer des techniques générales de criblage, d'identification et de dosage des molécules médicamenteuses dans des milieux complexes comme le lait maternel.

L'**objectif principal** de la thèse est de mettre en place **une méthodologie générale** pour l'évaluation de la fonction hépatique du métabolisme des médicaments au cours de la grossesse et l'étude du passage des médicaments dans le lait maternel. Pour des raisons d'éthiques évidentes, pour le confort des patientes et pour faciliter les inclusions dans les études cliniques, cette méthodologie doit impérativement être **non invasive** et **sans risque** pour la mère, le fœtus et l'enfant qui est allaité. Les méthodes analytiques utilisées doivent être **générales** et **extrapolables** à d'autres médicaments. De même, les tests fonctionnels hépatiques du métabolisme des médicaments doivent être potentiellement **transposables** à l'étude d'autres facteurs du métabolisme, en particulier d'autres enzymes. La stratégie générale est de permettre le recueil d'un maximum d'informations cliniques et de données scientifiques pertinentes en utilisant des méthodes économiques, faciles à réaliser, non contraignantes pour les patientes et rapidement adaptables à différents cas cliniques.

Dans ce contexte, les **isotopes stables** et la **spectrométrie de masse traditionnelle et isotopique** offrent plusieurs avantages :

- **les molécules marquées aux isotopes stables** sont d'excellents traceurs pour l'homme, en particulier les femmes enceintes et les enfants, puisqu'ils sont non radioactifs et sans toxicité intrinsèque, ni embryotoxicité,
- **la spectrométrie de masse** est une technique très sélective et très sensible qui permet d'identifier et de doser une large variété de composés et leurs isotopes,

- **la spectrométrie de masse isotopique** est conçue pour mesurer des variations infimes d'enrichissement isotopique entre autre à des fins de diagnostic et d'exploration fonctionnelle.

Pour mettre en place une méthodologie générale pour évaluer le transfert des médicaments de la mère au nouveau-né, la première étape consiste à établir une **bibliographie exhaustive et critique** sur les facteurs qui contrôlent le passage des médicaments dans le lait, sur les protocoles cliniques existants et sur les méthodes analytiques actuellement utilisées. A partir de ces données, la seconde étape consiste d'une part à définir **un protocole clinique de prélèvement d'échantillons de lait** et de recueil systématique des facteurs importants pour l'interprétation pharmacocinétique et clinique des concentrations mesurées et d'autre part, à mettre au point **une méthode générale de criblage des médicaments dans le lait**, applicable et adaptable au plus grand nombre de molécules.

Pour l'étude des variations du métabolisme chez la femme enceinte et en période post-partum, les tests respiratoires et la mesure des rapports métaboliques urinaires d'un substrat constituent des méthodes non invasives d'exploration fonctionnelle hépatique. La littérature rapporte différents tests respiratoires et différents substrats marqués aux isotopes stables qui peuvent être utilisés pour étudier la fonction métabolique et les activités enzymatiques des CYP450, *in vivo*. Parmi les substrats, la caféine est un marqueur spécifique du CYP1A2 qui à faible dose peut être utilisée sans risque pour la mère et le fœtus. Le premier objectif consiste donc à **valider le test respiratoire à la ^{13}C -caféine (TRC)** chez des sujets sains ayant des activités métaboliques hépatiques caractéristiques. Pour mesurer de façon non spécifique les activités des CYP450, le test respiratoire à la ^{13}C -aminopyrine est validé conjointement et comparé au TRC.

La mesure des **rapports métaboliques urinaires** est une méthode plus traditionnelle de mesure des variations d'activités des CYP450. Comparativement au TRC, la mesure des rapports métaboliques urinaires de la caféine (RMC) offre la possibilité d'explorer spécifiquement certaines voies métaboliques et par conséquent de mesurer différentes activités enzymatiques. Le deuxième objectif est donc de **mesurer les RMC au cours**

du TRC, de comparer les informations obtenues avec les deux tests et de montrer l'intérêt d'utiliser la caféine marquée pour la mesure des RMC, car des métabolites de la caféine (origine alimentaire ou thérapeutique) interfèrent la plupart du temps dans les analyses.

SECTION I

PASSAGE DES MÉDICAMENTS DANS LE LAIT MATERNEL

INTRODUCTION

L'allaitement maternel constitue le meilleur mode d'alimentation du nourrisson pendant sa première année de vie. Il confère de nombreux avantages nutritionnels, physiologiques, immunologiques, psychologiques et physiques à l'enfant.

La prise de médicaments, prescrits ou non chez la femme allaitant est très fréquente, surtout pendant les premières semaines après l'accouchement ou si elle est atteinte d'une pathologie nécessitant une thérapie médicamenteuse continue. Les médicaments administrés à la mère peuvent être distribués au niveau du lait. D'un point de vue pharmacologique, le lait peut être considéré comme un compartiment soumis principalement à la diffusion passive. Cette diffusion est modulée par de nombreux paramètres liés à la mère et à la molécule active. Dans ces conditions, une éventuelle activité pharmacologique ou toxique peut se retrouver chez le nouveau-né.

Dans la littérature, de nombreuses études portent sur le dosage de médicaments dans le lait maternel mais ces études sont ponctuelles, concernent généralement un ou deux médicaments et sont développées à partir de méthodes existantes pour le dosage des médicaments dans le plasma ou d'autres milieux biologiques. C'est pourquoi elles sont souvent mal adaptées et peu efficaces. De plus, le manque d'informations relatives à l'échantillon (dose, délai entre dose et tétées, etc.) et à la pharmacocinétique (cinétique de transfert, pourcentage transféré, etc.) limite l'interprétation clinique des résultats. Il n'existe pas de méthode analytique générale qui permet le criblage des médicaments dans le lait.

Dans ce contexte, il est intéressant de mettre en place une méthodologie générale qui, par la sélection de renseignements pertinents pour le prélèvement d'échantillons de lait et par la mise au point d'une méthode de dosage, efficace, sélective et sensible concernant les médicaments les plus utilisés pendant l'allaitement, permettrait de mieux comprendre et d'évaluer le transfert des médicaments de la mère au nouveau-né.

Ce projet nécessite des pré-requis :

- L'élaboration d'un protocole clinique pour la réalisation des prélèvements de lait maternel, comprenant la collecte de tous renseignements nécessaires à l'interprétation pharmacocinétique et clinique des concentrations des médicaments dosés dans le lait,
- La mise au point d'une méthode analytique de dosage, permettant l'identification et la quantification des médicaments dans le lait maternel.

L'objectif principal est donc de mettre en place une méthodologie générale de criblage, dans le lait maternel, des molécules médicamenteuses et des xéno-biotiques pouvant être prescrits en fin de grossesse et pendant la période post-partum et susceptibles de passer dans le lait puis chez le nouveau-né.

PARTIE I

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1 : Le lait maternel

1. Physiologie de la lactation

1.1. Morphologie de la glande mammaire

La glande mammaire est composée d'un nombre variable de glandes tubulo-alvéolaires ou lobes, entourées de tissus conjonctifs et adipeux, de vaisseaux sanguins et lymphatiques et de nerfs (cf. figure 1). Une glande mammaire possède 15 à 25 lobes aboutissant au niveau du mamelon. Chaque lobe comprend un canal lactifère qui mène à une dilatation locale, le sinus lactifère, correspondant à un réservoir où peut s'accumuler le lait. Le lobe se subdivise ensuite en lobules : les plus petits sont les canaux alvéolaires recouverts par des petites évaginations, les alvéoles.

Les canaux alvéolaires et les alvéoles sont tapissés de cellules sécrétrices cuboïdes responsables de la production du lait. Chaque cellule sécrétrice est entourée d'une unité contractile composée de cellules myoépithéliales responsables de l'expulsion du lait dans le canal alvéolaire.

[1-3]

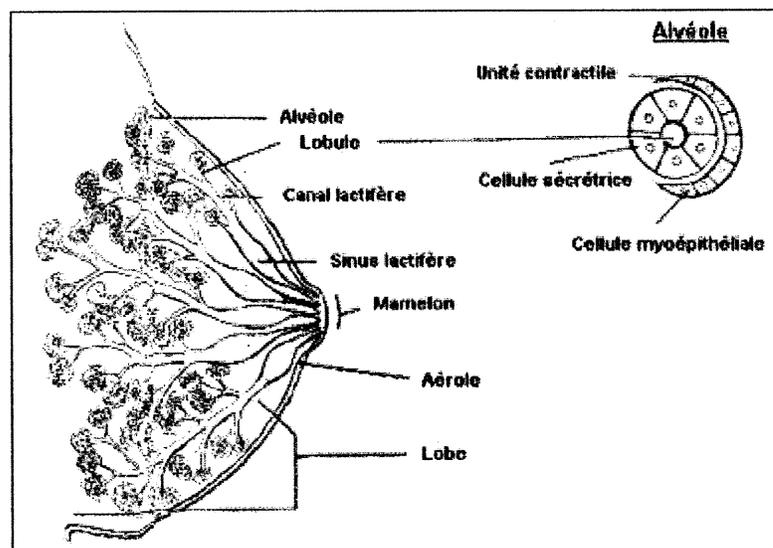


Figure 1 - Schéma de la glande mammaire : système de canaux et alvéoles d'après J Riordan et al. [4].

1.2. Contrôle hormonale de la lactation

La croissance et le développement de la glande mammaire ou mammogénèse commence dès la vie fœtale, continue pendant la puberté et n'est complète qu'après l'accouchement. Elle implique de nombreuses hormones, dont les oestrogènes et la progestérone pendant la puberté, et les hormones lutéales et placentaires ainsi que le lactogène placentaire, la prolactine et la gonadotrophine pendant la grossesse. D'autres hormones telles que l'insuline, l'hormone de croissance, les hormones thyroïdiennes et le cortisol semblent également jouer un rôle.

Les trois ou quatre premiers jours après l'accouchement, la sécrétion de lait dans la glande mammaire ou lactogénèse est déclenchée par une diminution post-partum de la progestérone et des oestrogènes plasmatiques, alors que la concentration de la prolactine est élevée.

Ensuite, la sécrétion est activée par l'acte de succion de l'enfant, qui stimule les nerfs sensoriels du mamelon (galactopoïèse) et permet la libération de la prolactine et de l'ocytocine (cf. figure 2 et figure 3) :

- La prolactine stimule la synthèse et la sécrétion du lait au niveau des espaces alvéolaires. Le taux de prolactine augmente et diminue proportionnellement à la fréquence, l'intensité et la durée de la stimulation du mamelon.
- L'ocytocine stimule la contraction de cellules myoépithéliales et permet l'éjection du lait. La concentration d'ocytocine augmente et diminue lors de la stimulation du mamelon.

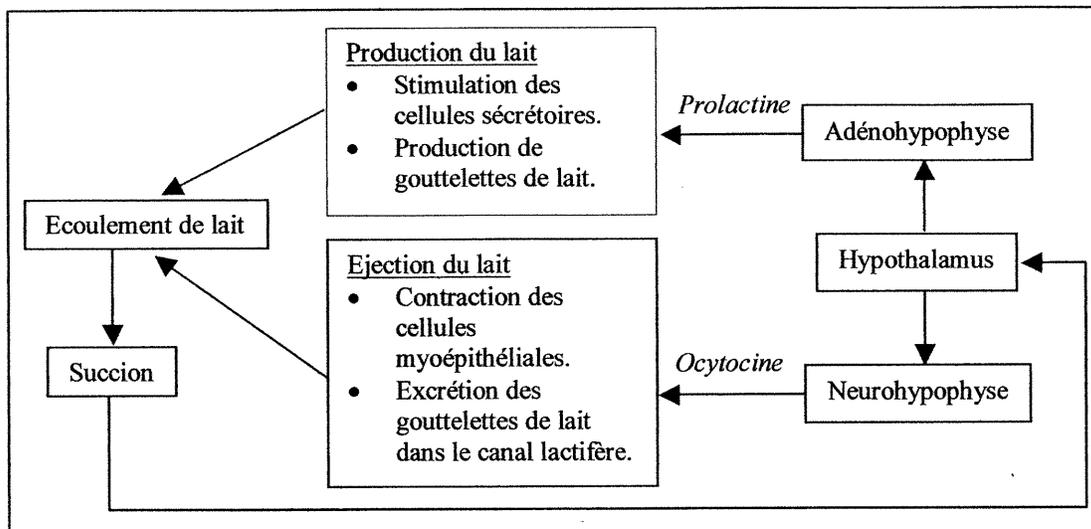


Figure 2 – Synthèse et éjection du lait : rôle de la prolactine et de l'ocytocine.

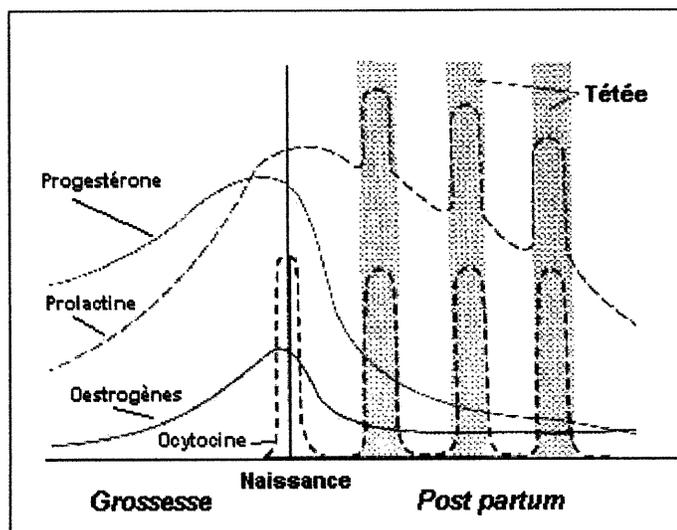


Figure 3 – Évolution des taux hormonaux pendant la grossesse et la lactation d'après Riordan et al. [4].

L'involution des parties sécrétrices se produit lorsque le sein n'est plus vidé, car l'enfant prend une autre alimentation. Les cellules épithéliales de la glande mammaire retrouvent un stade moins différencié et sont substituées par des cellules adipeuses.

[1,4,5]

1.3. Mécanisme de production du lait

Quatre processus, agissant de façon simultanée, sont impliqués dans la production du lait par les cellules sécrétrices alvéolaires (cf. figure 4):

- exocytose du lactose, des protéines, du calcium, du phosphate et du citrate,
- synthèse et excrétion des lipides via des globules de lipides,
- sécrétion des ions de l'eau et des protéines à travers la membrane apicale,
- pinocytose-exocytose des immunoglobulines.

Dans certaines conditions, les jonctions entre les cellules alvéolaires permettent l'entrée de sodium, de cellules et autres composés plasmatiques dans le lait à partir du fluide extracellulaire. [5]

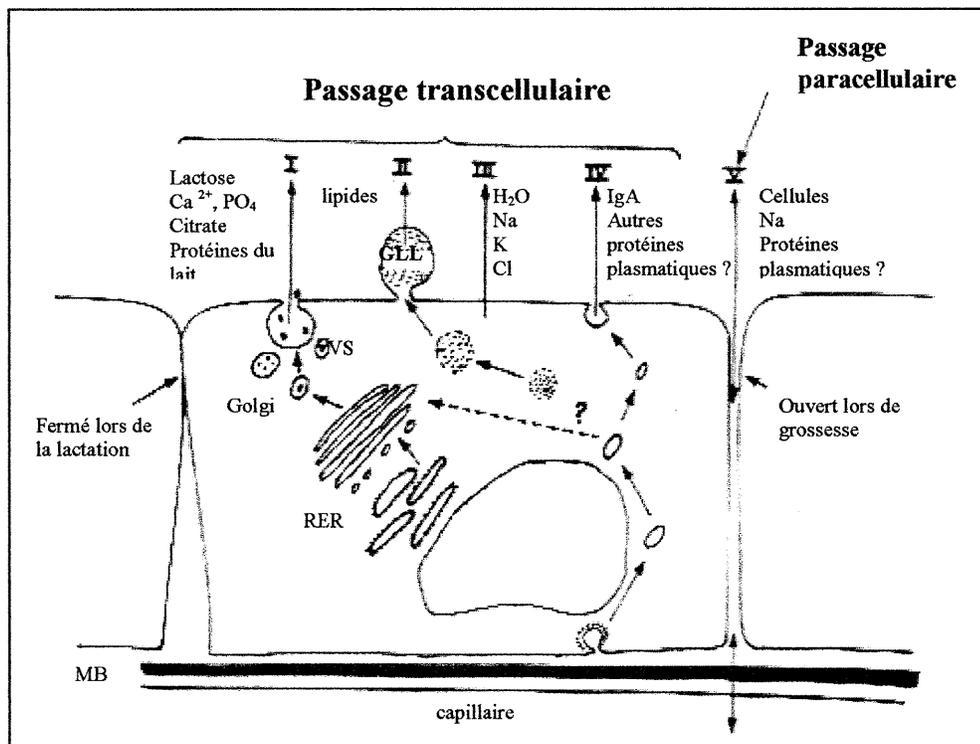


Figure 4 – Les voies de synthèse et de sécrétion des constituants du lait dans l'alvéole mammaire (I) Exocytose des protéines du lait et du lactose dans des vésicules de sécrétion issues de l'appareil de Golgi. (II) Sécrétion des lipides du lait via des globules de lipides. (III) Sécrétion des ions et de l'eau à travers la membrane apicale. (IV) Pinocytose-exocytose des immunoglobulines. (V) Voie paracellulaire pour le passage des composants du plasma et des leucocytes. (VS, vésicule de sécrétion; RER, réticulum endoplasmique rugueux; MB, membrane basale; GLL, globule de lipides du lait). D'après Neville [6].

2. Composition du lait maternel

2.1. Maturation du lait maternel

A partir du troisième mois de grossesse, une substance sécrétée apparaît dans les alvéoles de la glande mammaire. Dès le second trimestre, le lactogène placentaire commence à stimuler la sécrétion d'un fluide épais, jaunâtre, le colostrum. Ce lait est produit pendant la première semaine après la naissance et est remplacé progressive par le lait mature au bout de deux à quatre semaines. Le colostrum diffère du lait mature par la nature et la proportion de ses constituants (cf. tableau I).

[3,4]

Constituant pour 100 mL	Unité	Colostrum	Lait mature	Constituant pour 100 mL	Unité	Colostrum	Lait mature
Energie	kcal	58	70	<i>18 : 2, n-6 linoléique</i>		6.8	7.2
Solides totaux	g	12.8	12.0	<i>18 : 3 n-3 linoléique</i>		-	1.0
Lactose	g	5.3	7.3	<i>C₂₀ et C₂₂ polyinsaturés</i>		10.2	2.9
Nitrogène total	mg	360	171	Cholestérol	mg	27	16
Composées azotés protéiques	mg	313	129	Vitamines			
Composés azotés non protéiques	mg	47	42	Vitamines liposolubles			
Protéines totales	g	2.3	0.9	<i>Vitamine A</i>	µg	89	47
Caséine	mg	140	187	<i>Béta-carotène</i>	µg	112	23
Alpha-lactalbumine	mg	218	161	<i>Vitamine D</i>	µg	-	0.04
Lactoferrine	mg	330	167	<i>Vitamine E</i>	µg	1280	315
IgA	mg	364	142	<i>Vitamine K1</i>	µg	0.23	0.21
Acides aminés				Vitamines hydrosolubles			
Alanine	mg		52	<i>Thiamine</i>	µg	15	16
Arginine	mg	126	49	<i>Riboflavine</i>	µg	25	35
Aspartate	mg	-	110	<i>Niacine</i>	µg	75	200
Cystéine	mg	-	25	<i>Acide folique</i>	µg		5.2
Glutamate	mg	-	196	<i>Vitamine B₆</i>	µg	12	28
Glycine	mg	-	27	<i>Biotine</i>	µg	0.1	0.6
Histidine	mg	57	31	<i>Acide panthoténique</i>	µg	183	225
Isoleucine	mg	121	67	<i>Vitamine B₁₂</i>	µg	200	26
Leucine	mg	221	110	<i>Acide ascorbique</i>	µg	4.4	4.0
Lysine	mg	163	79	Minéraux			
Méthionine	mg	33	19	<i>Calcium</i>	mg	23	28
Phénylalanine	mg	105	44	<i>Magnésium</i>	mg	3.4	3.0
Proline	mg		89	<i>Sodium</i>	mg	48	15
Sérine	mg		54	<i>Potassium</i>	mg	74	58
Thréonine	mg	148	58	<i>Chlore</i>	mg	91	40
Tryptophane	mg	52	25	<i>Phosphore</i>	mg	14	15
Tyrosine	mg		38	<i>Soufre</i>	mg	22	14
Valine	mg	169	90	Eléments traces			
Taurine (non liée)	mg		8	<i>Chrome</i>	ng	-	39
Urée	mg	10	30	<i>Cobalt</i>	µg	-	1
Créatine	mg		3.3	<i>Cuivre</i>	µg	46	35
Lipides	g	2.9	4.2	<i>Fluor</i>	µg	-	7
Acides gras				<i>Iode</i>	µg	12	7
(% de lipides totaux)				<i>Fer</i>	µg	45	40
12 : 0 laurique		1.8	5.8	<i>Manganèse</i>	µg	-	0.1- 1.5
14 : 0 myristique		3.8	8.6	<i>Nickel</i>	µg	-	2
16 : 0 palmitique		26.2	21.0	<i>Sélénium</i>	µg	-	2.0
18 : 0 stéarique		8.8	8.0	<i>Zinc</i>	µg	540	166
18 : 1 oléique		36.6	35.5				

Tableau I – Composition du colostrum (de 1 à 5 jours) et du lait mature (>30 jours) d'après Neville et al. [6].

2.2. Composition du lait mature

Le lait est composé de plusieurs constituants (cf. tableau I):

- *L'eau.*
Elle constitue 85 à 95 % du lait. Elle est régulée par la quantité de lactose, le composé le plus actif au niveau osmotique dans le lait.
- *Les protéines.*
Elles représentent 0,8 à 0,9 % des constituants du lait, soit une concentration de 9 à 12 g.L⁻¹. Elles comprennent d'une part la caséine et d'autre part principalement l'alpha-lactalbumine, la lactoferrine, les IgA sécrétaires, la sérum albumine et le lysozyme, qui constituent les protéines du petit lait et qui représentent 60 à 70 % des protéines totales du lait. Le sel de calcium de caséine et les émulsions de lipides sont responsables de la blancheur du lait.
- *Les lipides.*
Ils forment 2 à 3 % des constituants du lait, ce qui correspond à une concentration de 25 à 35 g.L⁻¹. Ce sont principalement des triglycérides (environ 98 %). Le lait contient également des phospholipides et du cholestérol (0,5 à 0,8 %). Les lipides constituent la première source d'énergie dans le lait apportant 30 à 55 % de l'énergie.
- *Les glucides.*
Le glucide principal du lait est le lactose (environ 68 g.L⁻¹). Le lait contient également des monosaccharides, des oligosaccharides acides ou neutres, et des glucides liés aux peptides et aux protéines.

- *Les minéraux.*

Ils comprennent des éléments métalliques, des sels d'acides organiques et inorganiques. Ils sont présents sous forme d'ions, de sels non-ionisés ou faiblement ionisés et peuvent être liés à d'autres constituants.

- *Les autres constituants.*

Le lait contient des vitamines, des enzymes, des hormones, des prostaglandines, des sels biliaires et des facteurs de croissance.

Le lait est légèrement plus acide que le plasma. Son pH varie entre 6,9 et 7,4. L'osmolalité du lait est proche de celle du sérum (286 mosmol.kg⁻¹ dans l'eau).

Le lait est constitué de différentes phases dues essentiellement à la présence de protéines et de lipides qui forment des colloïdes (cf. tableau II)

[1]

Phase		Constituants majeurs	
Description	Quantité (%)	Nom	Quantité (%)
Phase aqueuse	87.0	Ca, Mg, PO ₄ , Na, K, Cl, CO ₂ , citrate, caséine.	0.2
Solution vraie			
Protéines du petit lait		Protéines du petit lait : alpha lactalbumine, lactoferrine, IgA, lysozyme, sérum albumine.	0.6
		Lactose et oligosaccharide.	8.0
		Composés azotés non protéiques : glucosamine, urée, acides aminés.	35-50 mg
		Autres : vitamine B, acide ascorbique.	
Dispersion colloïdale	0.3	Caséines.	0.2-0.3
Emulsion	4.0	Triacylglycérol, esters de stérol.	4.0
Globules de lipides			
Globules de lipides de la membrane	2.0	Protéines, phospholipides, cholestérol, enzymes, éléments trace, vitamines liposolubles.	2 % des lipides totaux
Couche interfaciale			
Cellules		Macrophages, neutrophiles, lymphocytes, cellules épithéliales.	

Tableau II – Les phases du lait et ses principaux constituants d’après Jensen [7].

2.3. Variations de la composition du lait maternel

Les taux de lipides et de protéines, ainsi que le pH du lait varient essentiellement en fonction des paramètres suivants :

- *Le stade de lactation (cf. figure 5)*

La concentration des protéines est maximale dans le colostrum et diminue rapidement pendant les quinze premiers jours après l’accouchement, pour atteindre la valeur relativement constante de 9 g.L⁻¹ dans le lait mature.

La concentration des lipides augmente graduellement au cours du premier mois post-partum pour atteindre environ 42 g.L^{-1} .

Le pH varie de 6,75 à 7,3 pendant les dix premiers jours de la lactation [8].

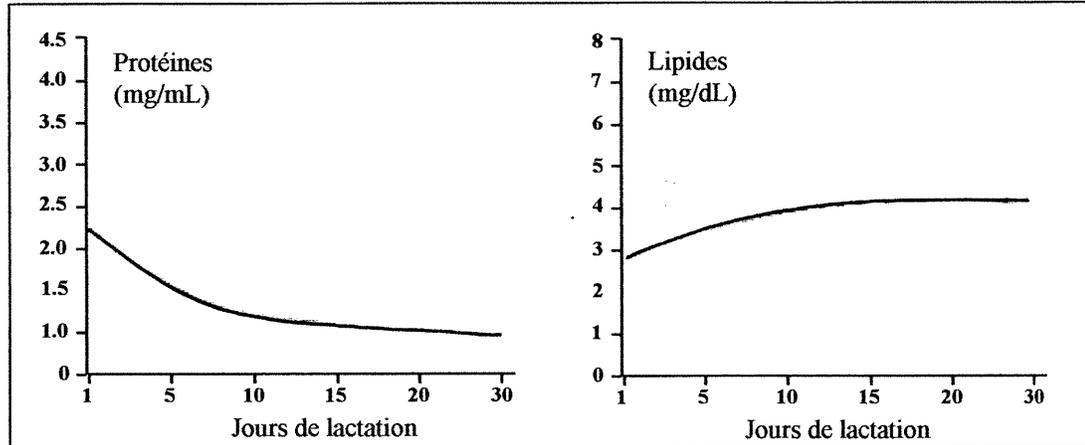


Figure 5 – Profils de concentration des protéines et des lipides du lait lors du premier mois post-partum d'après Riordan et al. [4].

- *L'heure de la journée (cf. figure 6)*

Le taux de protéines ne varie pas au cours de la journée. Par contre, le taux de lipides augmente le matin pour diminuer progressivement jusqu'en soirée.

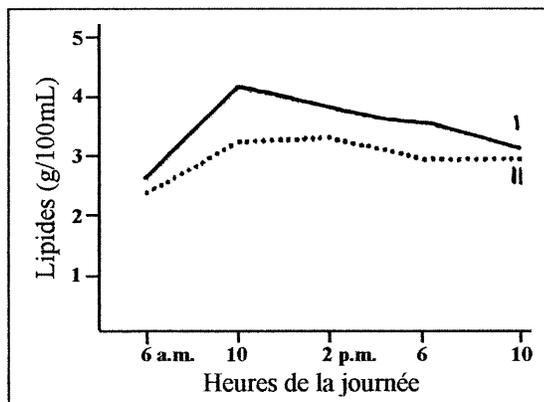


Figure 6 – Variation moyenne du taux de lipides du lait en fonction des heures de la journée d'après Hytten [9]. Courbe I : lait produit à partir du 21^{ème} jour de lactation. Courbe II : lait produit avant le 21^{ème} jour de lactation.

- *La tétée (cf. figure 7)*

Le taux de protéines augmente faiblement au cours de l'allaitement.

Le taux lipides augmente de 24 g.L^{-1} à 45 g.L^{-1} au cours de la tétée et plus le volume tété est grand, plus le taux de lipides est augmenté entre le début et la fin de la prise de lait [9]. Les variations des taux de lipides sont moins importantes pour les tétées de nuit [3].

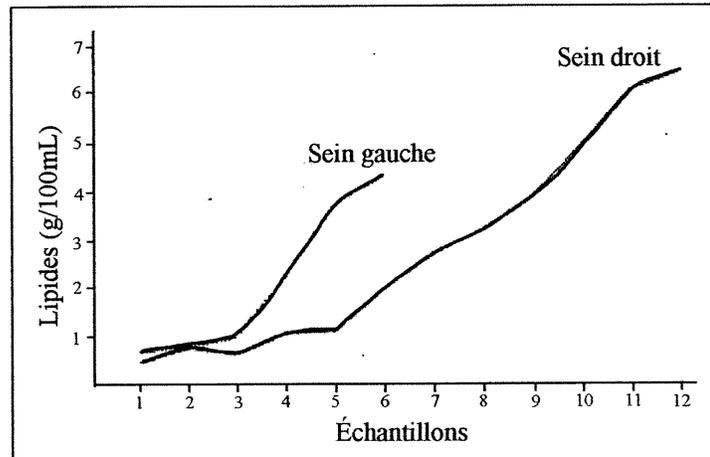


Figure 7 – Variation de la quantité de lipides du lait au cours d'une tétée d'après Hytten [9].

- *L'alimentation de la mère.*

La nature des lipides consommés par la mère a une incidence sur la composition des acides gras du lait [7]. Une étude récente a montré que la teneur en lipides du lait varie en fonction de la diététique maternelle [10].

3. Médicaments influençant la production de lait maternel

La production de lait est principalement contrôlée par la prolactine. Les médicaments qui influencent la sécrétion de la prolactine peuvent augmenter ou diminuer la quantité de lait produite [11].

3.1. Médicaments diminuant la quantité de lait produite

Les agents dopaminergiques tels que les dérivés de l'ergot, la levodopa, l'apomorphine, etc., activent les récepteurs des cellules sécrétrices de la prolactine et ainsi, inhibent la libération de cette hormone.

Plusieurs hormones (œstrogènes, progestérone, clomiphène, etc.) peuvent également diminuer la production de prolactine [12].

La production de lait peut être diminuée par la prise d'agents comme le méthylsergide, le valproate de sodium, les prostaglandines E₂ et F_{2α}, etc.

L'alcool, en quantité importante, inhibe la libération de l'ocytocine et diminue ainsi l'éjection du lait.

3.2. Médicaments augmentant la quantité de lait produite

Les antagonistes dopaminergiques (les neuroleptiques de la famille des phénothiazines et des butyrophénones, le dompéridone, la méthyldopa, la réserpine, etc.) inhibent l'action de la dopamine sur l'hypophyse et permettent ainsi la sécrétion de la prolactine et donc l'augmentation de la production de lait.

L'ocytocine intra-nasale et l'hormone de libération de la thyrotropin (TRH) stimulent la libération de la prolactine.

Chapitre 2 : Passage des médicaments dans le lait maternel

1. Mécanisme de passage des médicaments dans le lait maternel

Le passage d'une molécule du plasma dans le lait se produit principalement par diffusion à travers la membrane alvéolaire ou par pinocytose inverse.

Dans l'espace interstitiel mammaire, les médicaments existent sous plusieurs formes : ionisées et non-ionisées, liées et non-liées aux protéines ou aux cellules membranaires. La membrane épithéliale est perméable aux espèces non-ionisées et liposolubles. Par cette voie, les médicaments peuvent être métabolisés dans la cellule alvéolaire. Par exemple, il a été montré que le sulfanilamide est métabolisé en N-acetylsulfanilamide [13]. Le transport actif par des transporteurs ou des protéines lipophiles est une voie de passage mineure. Pour les molécules ionisées de petit poids moléculaire (<200), le passage se fait à travers les pores de la membrane. Les médicaments peuvent également circuler par les voies intercellulaires.

[1,14]

Si le débit sanguin diminue très rapidement, il peut exister une diffusion inverse, du lait vers le sang. Ainsi, il a été montré que la théophylline [15], le zipiclone [16] et le midazolam [17] pouvaient être réabsorbés du lait dans le plasma.

2. Déterminants du passage des médicaments dans le lait maternel

2.1. Facteurs liés à la molécule médicamenteuse

2.1.1. La liaison protéinique

L'importance et l'affinité de la liaison de la molécule aux protéines plasmatiques et aux protéines du lait, sont des facteurs influençant la concentration du médicament dans le lait.

Seule la fraction libre d'un médicament traverse la membrane biologique pour se retrouver dans le lait maternel : plus la molécule est liée aux protéines plasmatiques, moins elle diffuse librement à travers la membrane alvéolaire dans le lait.

Généralement, le pourcentage de fixation des médicaments aux protéines du lait est quantitativement plus faible qu'aux protéines du plasma. Cela est corrélé avec le fait que le taux de protéines du lait (9 g.L^{-1}) est beaucoup plus faible que celui du plasma (75 g.L^{-1}) et que l'affinité des médicaments aux protéines du lait est faible par rapport aux protéines du plasma, en particulier pour l'albumine[18]. Ainsi, la concentration du médicament dans le lait n'est influencée que très peu par la liaison aux protéines du lait. Cependant, si une molécule se lie facilement aux protéines du lait, celle-ci aura tendance à s'accumuler dans le lait maternel. Fleishaker et al. ont démontré que la liaison aux protéines du lait et du plasma affectait la détermination du rapport des concentrations dans le lait et dans le plasma, pour le diazépam, le phénytoïn et le propranolol [19].

[1,3,4]

2.1.2. Le degré d'ionisation

Seule la fraction non ionisée d'une molécule diffuse librement à travers la membrane biologique dans le lait jusqu'à l'équilibre des concentrations dans les phases aqueuses du plasma et du lait (cf. figure 8). Ainsi, les molécules faiblement ionisées sont excrétées dans le lait en plus grande quantité que les composés fortement ionisés [3]. Les

concentrations des fractions non-ionisées d'antipyrine, de sulphadimidine et de triméthoprime ont été mesurées dans le lait et le plasma et des valeurs similaires ont été obtenues dans les deux milieux [20].

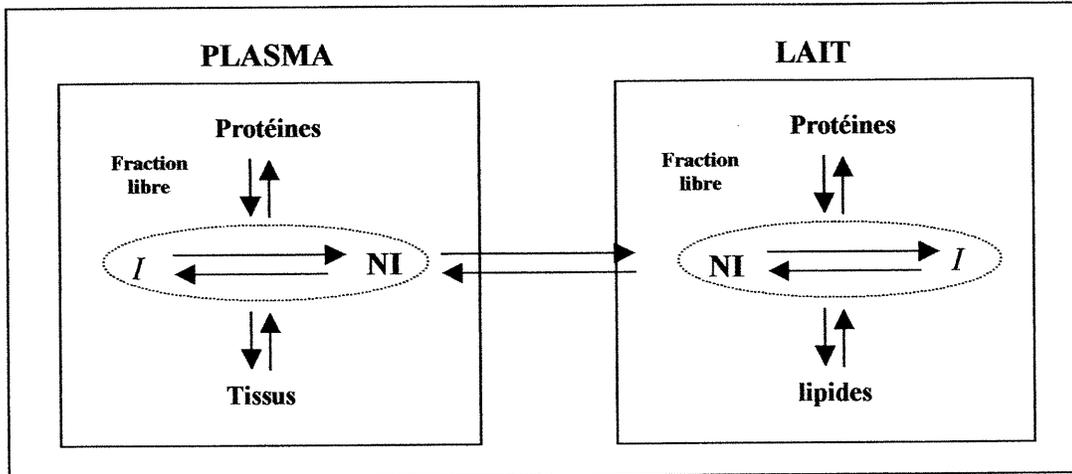


Figure 8 – Distribution d'un médicament entre les différentes phases du plasma et du lait. I : fraction ionisée du médicament, NI : fraction non ionisée du médicament, après Atkinson et al. [21] et Fleishaker et al. [19].

Le degré d'ionisation d'une molécule dépend du pH du milieu et de la constante de dissociation (pKa) :

$$\text{Molécule acide} \quad \log \frac{NI}{I} = pKa - pH$$

$$\text{Molécule basique} \quad \log \frac{I}{NI} = pKa - pH$$

(NI : fraction non ionisée de la molécule, I : fraction ionisée de la molécule)

Le rapport des concentrations totales (ionisés et non-ionisés) de la molécule, non liée aux protéines du lait et du plasma, peut être estimé à partir des pH du lait et du plasma et du pKa de la molécule médicamenteuse selon l'équation de Henderson-Haselbach [1] :

$$\text{Molécule acide} \quad \frac{L}{P} = \frac{1 + 10^{(pH_{\text{lait}} - pKa)}}{1 + 10^{(pH_{\text{plasma}} - pKa)}}$$

$$\text{Molécule basique} \quad \frac{L}{P} = \frac{1 + 10^{(pKa - pH_{\text{lait}})}}{1 + 10^{(pKa - pH_{\text{plasma}})}}$$

(*L*: concentration de la molécule non liée dans le lait, *P*: concentration de la molécule non liée dans le plasma, pH_{lait} : pH du lait, pH_{plasma} : pH du plasma)

En général, le rapport *L/P* a une valeur inférieure ou égale à 1 pour les acides faibles et une valeur supérieure ou égale à 1 pour les bases faibles (figure 9). Cela a été démontré pour la sulphadoxine, la pénicilline, le triméthoprim et l'érythromycine [20].

Les variations du pH du lait par rapport au pH du plasma entraînent des modifications du rapport *L/P* surtout pour les acides faibles et les bases faibles (cf. figure 9).

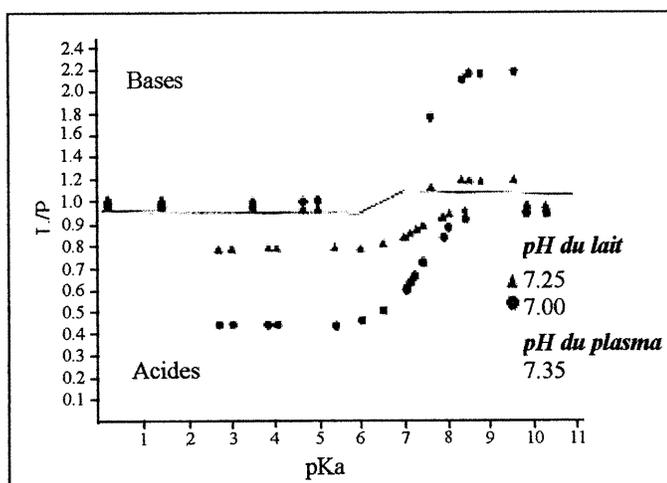


Figure 9 – Estimation du rapport *L/P* en fonction du pH du lait pour des molécules ayant différentes valeurs de pKa d'après Wilson et al.. [1].

2.1.3. la solubilité

La liposolubilité semble être la propriété physico-chimique la plus importante pour prédire les variations de concentrations d'un médicament dans le lait.

L'épithélium alvéolaire constitue une barrière lipidique qui est plus perméable les premiers jours de la lactation, lors de la production du colostrum. La liposolubilité d'un médicament non-ionisé détermine donc son passage dans le lait à travers la membrane alvéolaire. Pour les composés hydrosolubles et les ions, le passage se fait à travers les pores de la membrane ou les espaces intercellulaires (cf. figure 4). Même si une

molécule est non-ionisée à 100%, si sa liposolubilité est faible, son absorption à travers la membrane sera faible et son excrétion dans le lait sera limitée.

La liposolubilité détermine également la concentration d'un médicament dans les lipides du lait. Des études sur du lait animal ont montré que les barbituriques liposolubles se concentraient dans les lipides du lait tandis que les sulfonamides hydrosolubles se retrouvaient principalement dans la phase aqueuse du lait (cf. figure 10) [20,22]. Il a été montré que la distribution des barbituriques entre les phases aqueuse et lipidique était corrélée à leur coefficient de partage chloroforme/eau. Dans le lait humain, la distribution des médicaments dans les lipides a été étudiée pour le diazépam, la disopyramide, le phénobarbitone, la phénytoïne et la warfarin [23]. Il a été montré que le diazépam et la phénytoïne se concentraient dans les lipides du lait.

Le taux de lipides change pendant la période de lactation selon différents paramètres (cf. partie I, chapitre 1, 2.3.), ce qui entraîne des variations de concentrations des médicaments non-liés dans le lait. Par conséquent, il est important de connaître la teneur en lipides du lait pour estimer et mesurer la quantité de médicament dans le lait.

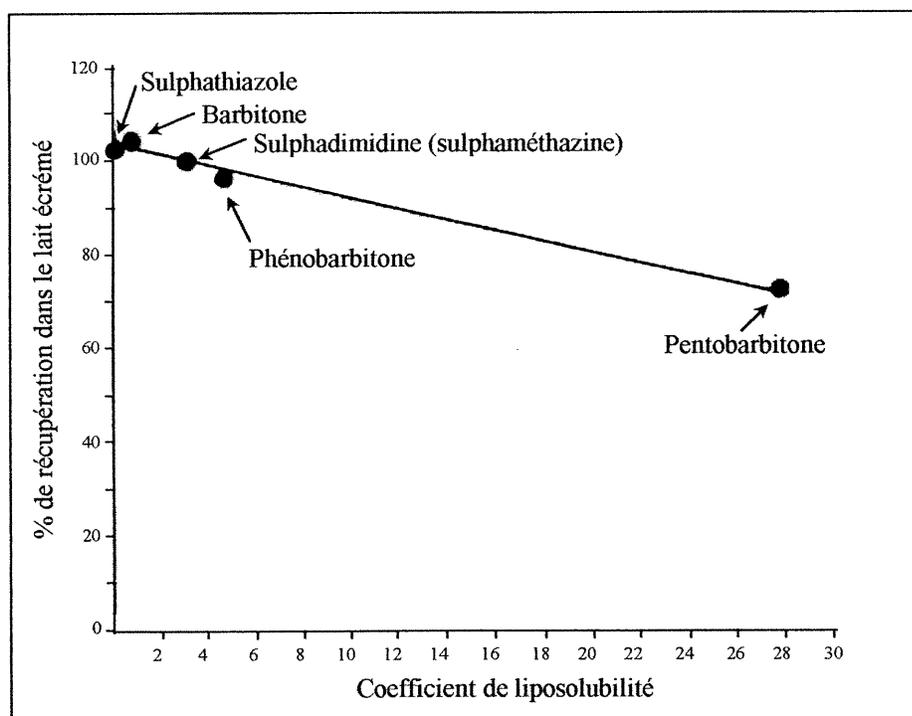


Figure 10 – Relation entre la liposolubilité et la concentration des médicaments dans le lait écrémé d'après Wilson et al. [1].

2.2. Facteurs liés à la mère

La dose, la fréquence et la voie d'administration sont des paramètres qui influencent la concentration d'un médicament dans le lait maternel. Plus la posologie d'un médicament est élevée, plus la concentration du médicament dans le lait est élevée. Suivant la voie d'administration, les médicaments se retrouvent plus ou moins rapidement et en plus ou moins grande quantité dans la circulation sanguine. Les voies intraveineuse et intramusculaire sont celles qui permettent un passage rapide des substances dans le lait, à des concentrations élevées, tandis que la voie topique modère et ralentit ce passage.

D'autre part, pendant la grossesse et la période de lactation, plusieurs paramètres physiologiques changent et affectent la disposition des médicaments au niveau de la mère. Les variations les plus importantes ont lieu pendant la grossesse et les premières semaines suivant l'accouchement. Ensuite, la pharmacocinétique des médicaments revient progressivement à l'état précédent la grossesse.

- *La distribution*

Pendant la grossesse et la période post-partum, le volume plasmatique augmente et donc les concentrations sanguines diminuent.

D'autre part, le taux de protéines plasmatiques diminuent et les taux d'hormones associés à la grossesse et à la lactation augmentent (cf. figure 3), ce qui entraîne une diminution de l'affinité des médicaments avec les protéines du plasma. La fraction non-lié des médicaments est donc plus élevée et peut entraîner une augmentation des concentrations dans le lait [24].

La glande mammaire constitue un nouveau compartiment pour la distribution des médicaments.

- *Le métabolisme*

Le tissu mammaire peut métaboliser certains médicaments comme le sulfanilamide [13].

L'augmentation du taux d'hormones peut influencer le métabolisme des médicaments par des phénomènes d'induction ou d'inhibition. Il a été montré que l'estradiol et la progestérone interagissent avec les CYP450 (CYP1A1 et CYP1A2) et inhibent par conséquent la formation des métabolites de la caféine [25].

Certaines activités hépatiques sont modifiées pendant la grossesse et l'allaitement. Par exemple, des altérations dans les rapports métaboliques de la carbamazépine ont été observées pendant la grossesse [26].

- *L'élimination*

Le lait constitue une voie additionnelle d'élimination.

L'augmentation du flux sanguin rénal entraîne une augmentation de la clairance des médicaments à élimination rénale majoritaire. Cela a été rapporté pour plusieurs médicaments, par exemple, la pénicilline et la digoxine [27], la péthidine [28] ou l'acide valproïque [29].

2.3. Facteurs liés à la glande mammaire

Plusieurs facteurs de la glande mammaire interviennent dans le passage des médicaments dans le lait :

- *La morphologie*

Des changements morphologiques au niveau de la structure du sein et des alvéoles se produisent pendant la grossesse et pendant la lactation, jusqu'à la fin de l'allaitement. Ces modifications influencent le passage des médicaments et le métabolisme mammaire.

- *Le flux sanguin*

La lactation est associée à un flux sanguin élevé au niveau des seins et à une augmentation du rythme cardiaque. Cela entraîne des variations de la vitesse de présentation des médicaments à la glande mammaire.

- *Le métabolisme mammaire*

Le tissu de la glande mammaire a la capacité de métaboliser certains médicaments [1].

2.4. Facteurs liés à la composition et au pH du lait

La distribution d'un médicament dans les différentes phases du lait dépend essentiellement des constituants suivants (cf. partie I, chapitre 1, 2.3. et chapitre 2, 2.3.):

- *Les protéines*

(liaisons à la lactalbumine, la caséine et les autres protéines du lait)

- *les lipides*

(dissolution à la surface ou à l'intérieur des globules de lipides)

- *la phase aqueuse*

(dissolution des médicaments non liés et non-ionisés suivant le pKa et le pH du lait)

2.5. Facteurs liés à l'enfant allaité

La concentration des médicaments dans le lait est étroitement liée à la période de prise du substrat par la mère par rapport à la période de tétée (cf. figure 11). Le moment le plus opportun pour donner la tétée se situe juste avant la prise d'une nouvelle dose, sauf

si le taux sérique a atteint un équilibre : dans ce cas, la période de tétée n'a pas d'importance par rapport à la prise de médicament et la concentration dans le lait n'est que peu influencée par le schéma thérapeutique.

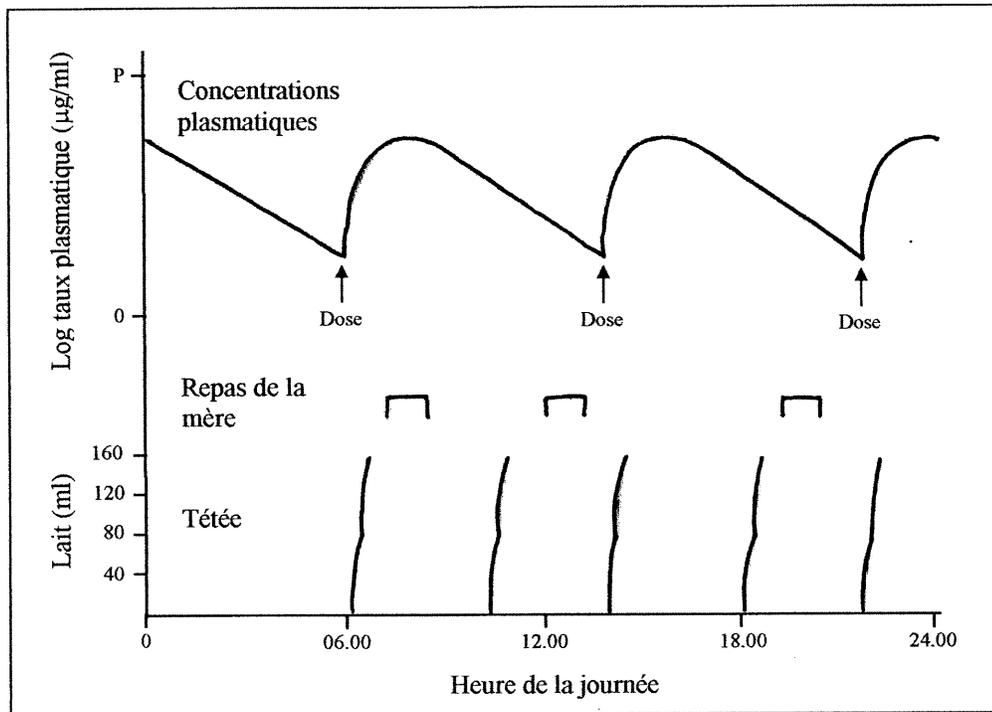


Figure 11 – profile idéal de la prise de médicament par rapport à l'allaitement d'après Wilson et al. [1].

3. Calcul de la dose de médicament reçu par l'enfant via le lait maternel

Le rapport des concentrations d'un médicament dans le lait et dans le plasma (L/P) est généralement utilisé pour estimer la concentration dans le lait (C_{lait}), en fonction de la concentration dans le plasma maternel (C_{plasma}).

$$C_{lait} = C_{plasma} \times L/P$$

C_{lait} permet ensuite de calculer la dose journalière reçue par l'enfant, en fonction du volume de lait consommé pendant une tétée et le nombre d'allaitements par jour [30] :

$$Dose = C_{lait} \times V_{lait} \times N$$

La concentration plasmatique moyenne à l'équilibre, après administration de doses répétées chez le nouveau-né, via l'allaitement est calculée suivant les paramètres pharmacocinétiques du médicament :

3.1. Mesure du rapport L/P

La mesure du rapport L/P a un instant donné t ne permet pas d'estimer correctement les doses reçues par l'enfant car il varie en fonction de nombreux facteurs (cf. partie I, chapitre 2, 2.).

$$C_{\text{plasmatique}} = \frac{\text{Dose} \times f}{K_e \times V_d \times t}$$

(f : biodisponibilité, K_e : constante d'élimination, V_d : volume de distribution, t : temps entre les tétés)

Le rapport L/P , calculé à partir des concentrations moyennes pendant une tétée, est plus approprié car il tient compte du fait que les concentrations dans les deux milieux évoluent différemment en fonction du temps. Les aires sous les courbes (ASC) de concentrations en fonction du temps permettent de calculer le rapport L/P et la concentration moyenne C_m dans le lait (cf. figure 12) :

$$L/P = \frac{ASC_{\text{lait}}}{ASC_{\text{Plasma}}} \quad C_m = \frac{ASC_{\text{lait}}}{t}$$

(t : intervalle de temps pour l'estimation de ASC)

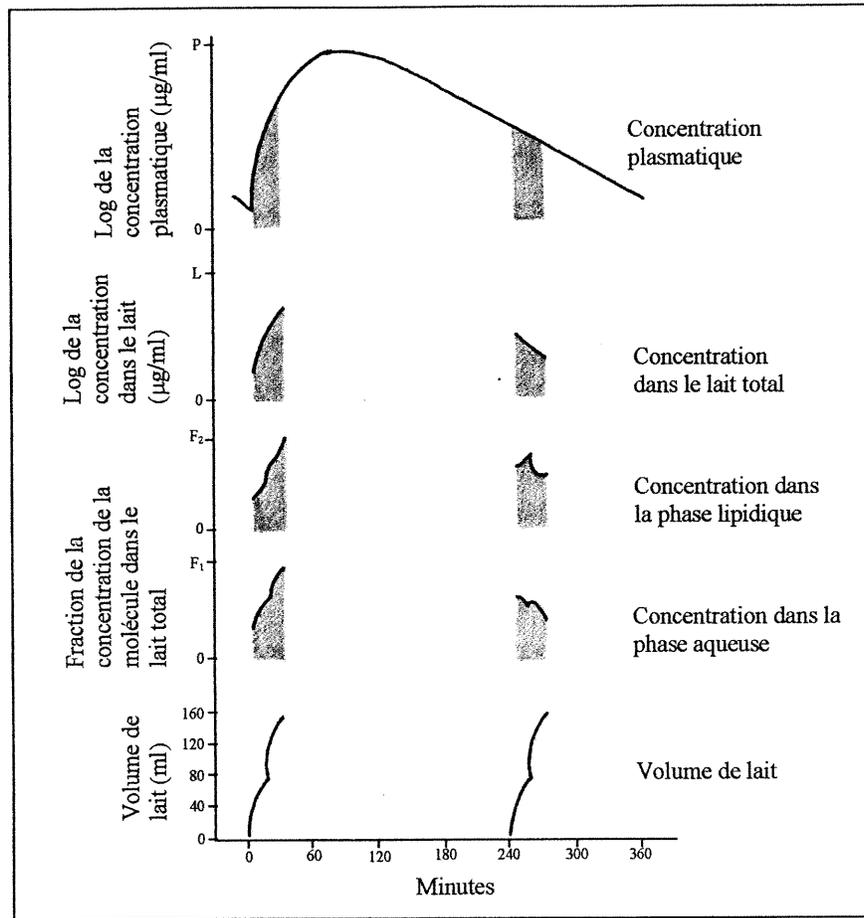


Figure 12 – Relation entre les concentrations d'un médicament mesuré dans le lait et le plasma, pour deux tétées prises pendant l'intervalle pharmacocinétique d'après Wilson et al. [1].

3.2. Estimation du rapport L/P

Il existe plusieurs modèles pour estimer les valeurs du rapport L/P à l'équilibre.

Le modèle d'Henderson-Haselbach, qui se base sur la partition ionique des molécules entre le lait et le plasma (cf. partie I, chapitre 2, 2.1.2.), est un modèle très simplifié qui ne tient pas compte de l'affinité protéinique et de la liposolubilité du médicament.

D'autres modèles [19,21] tiennent compte des liaisons aux protéines du plasma et du lait et des paramètres pharmacocinétiques du médicament (dose, clairance, biodisponibilité). Cependant, l'affinité des médicaments avec les protéines du lait n'est souvent pas

connue. Atkinson et al. utilisent alors une estimation à partir du coefficient de partage entre l'octanol et l'eau [21].

Les différents modèles s'ajustent plus ou moins bien aux mesures faites sur du lait humain [30]. Ils sont surtout utiles lorsque les études cliniques ne sont pas réalisables.

Chapitre 3 : Procédures analytiques de dosage des médicaments dans le lait maternel

1. Prélèvements des échantillons de lait

De nombreux facteurs affectent le passage des médicaments dans le lait maternel (cf. figure 13).

Pour que la concentration médicamenteuse ait une signification pharmacocinétique et clinique, il est donc important de recueillir un certain nombre de renseignements lors du prélèvement de lait maternel.

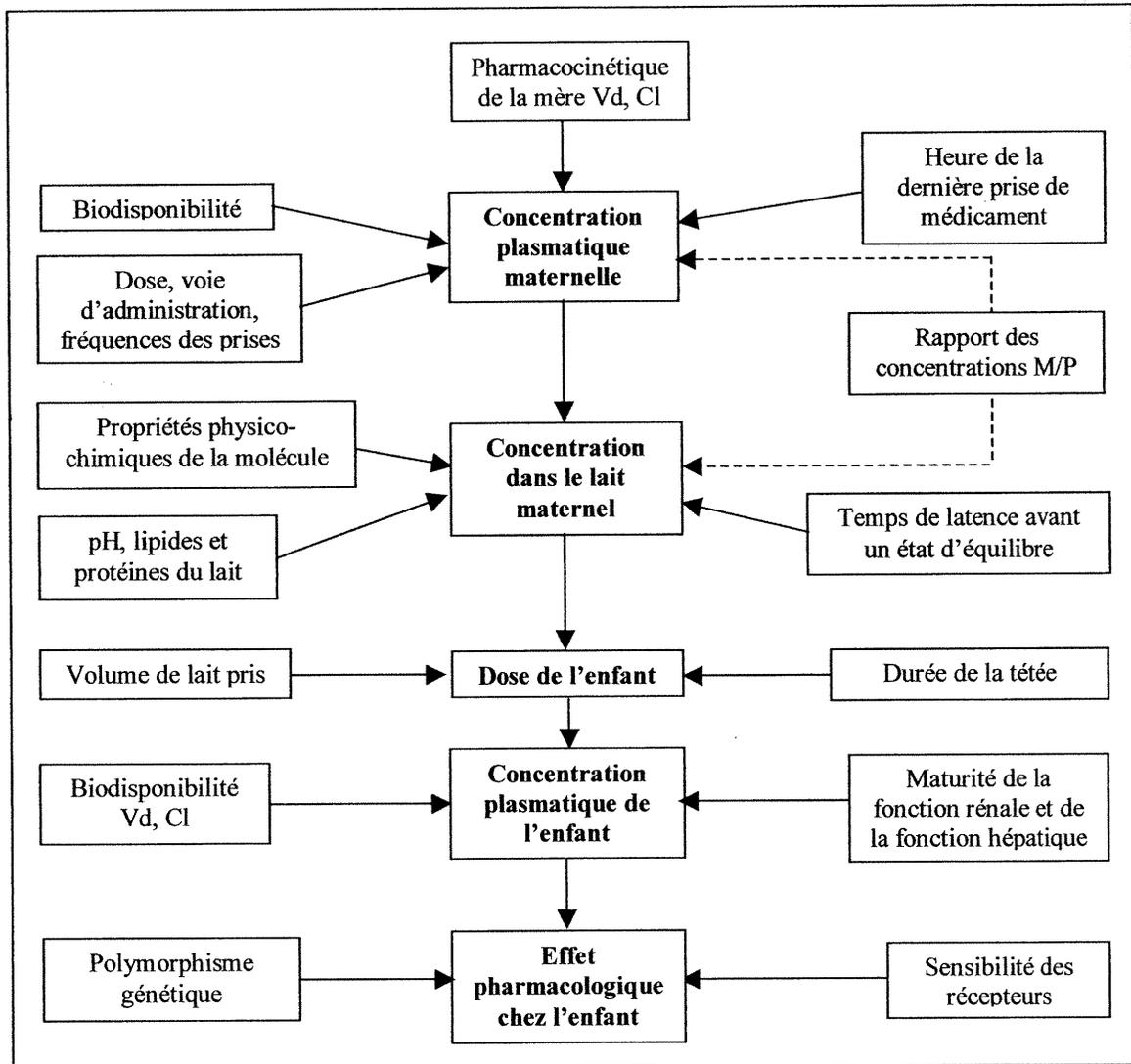


Figure 13 - Déterminants de la concentration du médicament dans le lait et de l'effet pharmacologique potentiel chez l'enfant d'après Pons et al. [11].

1.1. Méthodes de prélèvements

Il existe principalement deux méthodes pour collecter des échantillons de lait [31]. La première consiste à prélever du lait d'un sein à la main ou mécaniquement à l'aide d'une pompe. L'autre méthode consiste à recueillir le lait qui s'écoule du sein opposé à celui tété par l'enfant. La première méthode est préférable à la deuxième car la composition du lait est plus proche de celle du lait que reçoit l'enfant. Le prélèvement à la main est

une technique facile et confortable pour la mère, tandis que l'utilisation d'une pompe peut causer de l'œdème et l'éclatement des petits vaisseaux sanguins du mamelon [9].

1.2. Renseignements relatifs à l'échantillon de lait

Plusieurs renseignements relatifs à la mère, à la prise d'échantillon, au déroulement des tétées et à l'enfant sont importants de connaître pour pouvoir interpréter les concentrations mesurées dans le lait (cf. tableau III).

Renseignements à collecter	
Mère	<ul style="list-style-type: none">- Date de l'accouchement- Nombre de semaine de grossesse- Parité- Alimentation- Etat pathologique et psychologique- Présence éventuelle d'une nouvelle grossesse- autre traitement éventuel (molécule, schéma thérapeutique)
Échantillon	<ul style="list-style-type: none">- Date, heure- Mode d'expression- Sein prélevé- Début ou fin de tétée
Déroulement des tétées	<ul style="list-style-type: none">- heure des allaitements- seins tétés et dans quel ordre
Enfant	<ul style="list-style-type: none">- poids- score apgar- état de santé générale- enfant prématuré ou à terme

Tableau III – Renseignements à collecter lors d'une prise d'échantillon de lait.

1.3. Renseignements relatifs à la molécule médicamenteuse

Pour interpréter en terme pharmacocinétiques, les concentrations du médicament mesurées dans le lait, il est important de connaître le déroulement du traitement pharmaceutique :

- *Forme galénique et voie d'administration*
- *Dosage*
- *Début et durée du traitement*
- *Schéma thérapeutique (dose, fréquence des prises, horaires des prises)*

2. Analyse des échantillons de lait

2.1. Caractéristiques du lait humain

2.1.1. Comparaison du lait aux autres milieux biologiques

Le lait est un milieu particulièrement complexe qui contient environ autant d'éléments différents que le plasma. Cependant, le lait est plus difficile à traiter que le plasma car sa composition varie beaucoup suivant de nombreux facteurs, en particulier les taux de protéines et de lipides (cf. partie I, chapitre 1, 2.3.). Les taux élevés de lipides dans le lait rendent difficiles les procédures d'extraction et les analyses chromatographiques. La haute variabilité de la composition du lait entraîne généralement une faible reproductibilité au niveau des résultats de la méthode d'analyse [32].

Dans ces conditions, l'analyse des médicaments dans le lait maternel nécessite le développement de méthodes capables d'éliminer les lipides et les protéines et peu sensibles aux variations de composition.

2.1.2. Comparaison du lait humain au lait animal

Les mammifères produisent des laits maternels de composition différente (cf. tableau IV). La composition révèle en général les besoins post-partum du nouveau-né animal. Les variations des taux de lipides, de protéines et les variations de pH, suivant les espèces, rendent difficile l'extrapolation des résultats des laits animaux au lait humain.

(Dans les paragraphes suivants, ne sont citées que les études qui portent sur le lait humain.)

Constituants	Composition (g/100g de lait)						
	homme	vache	singe	chien	souris	rat	lapin
eau	87.6	87.3	84.6	76.5	70.7	69.1	67.2
solides	12.4	12.7	15.4	23.5	29.3	30.9	32.8
protéines	1.0	3.4	1.6	7.9	9.0	11.8	13.9
caséine	0.4	2.8	1.1	5.8	7.0	8.5	-
lipides	3.8	3.7	4.0	12.9	13.1	14.8	18.3
carbohydrates	7.0	4.8	7.0	3.1	3.0	2.8	2.1
cendres minérales	0.2	0.7	< 0.1	1.2	1.3	1.5	1.8
pH	7.0	6.7	-	-	-	6.6	-

Tableau IV – Composition du lait de différents mammifères d’après Rossi et al. [32].

2.2. Techniques de traitement des échantillons de lait

La plupart des méthodes d’extraction, utilisées pour le traitement des échantillons de lait humain, proviennent de méthodes existantes pour le traitement des échantillons de plasma.

De nombreuses études cliniques ponctuelles, qui concernent généralement le traitement d’une pathologie chez une ou quelques femmes allaitant, mentionnent le dosage de médicaments dans le lait maternel. Cependant, la méthode d’extraction utilisée n’est pratiquement jamais décrite ou fait référence directement à une méthode existante dans le plasma [33-36].

Dans les études qui détaillent les procédures de traitement des échantillons de lait, les extractions liquide/liquide (LLE) sont majoritairement utilisées. Quelques articles rapportent des méthodes d’extraction en phase solide (SPE).

D’autres techniques sont également décrites dans la littérature: injection directe [37], ultrafiltration ou dialyse [38], précipitation des protéines [39,40], extraction par

réactions enzymatiques et immunologiques [41-43]. Ces techniques sont moins efficaces que les extractions liquides ou solides et ne permettent pas d'éliminer suffisamment les lipides contenus dans le lait.

2.2.1. Extraction liquide/liquide

La plupart des méthodes LLE, utilisées pour le traitement des échantillons de lait, sont des méthodes qui ont été développées pour le traitement des échantillons de plasma (cf. tableau V). Très souvent, aucune modification n'est apportée du plasma au lait et les rendements d'extraction dans le lait ne sont pas mentionnés. Dans ces conditions, il est difficile de savoir si les procédures sont adaptées et efficaces.

Généralement, dans les méthodes d'extraction détaillées, des traitements supplémentaires sont nécessaires pour éliminer les lipides contenus dans le lait : par exemple, par acidification (pH 1-2) du lait avant l'extraction et élimination de la couche lipidique [44] ou par lavages successifs des différentes phases pendant l'extraction [45,46].

Réf.	Médicaments	V mL	Étalon interne	Solvant d'extraction	Méthode d'analyse	R %
[47]	* Diazépam N-desméthyl-diazépam Temazépam Oxazépam	0.5		Diéthyl éther	HPLC-UV	-
[48]	* Dothiépine Nordothiépine	1		Hexane/ alcool isoamyl (99/1 v/v)	HPLC-UV	-
[48]	* Oxide-S-dothiépine Oxide-S-nordothiépine-	0.5		Diéthyl éther	HPLC-UV	-
[49]	* Fluoxétine Norfluoxétine	1		Hexane / alcool isoamyl (99/1 v/v)	HPLC-UV	-
[50]	* Dompéridone	1		Isooctane / dichlorométhane / alcool isoamyl (49.5/49.5/1 v/v/v)	HPLC-MS	-
[51]	† Timolol	1	Pindolol	Diéthyl éther	HPLC-ED	60
[52]	* Lidocaïne Monoéthylglycinexylidide Bupivacaïne	1	Mépipvacaine	Hexane / chlorure de méthylène (4/1 v/v)	GLC-NPD	92 à 92
[53]	* Aténolol	1		Cyclohexane / butanol (55/45 v/v)	HPLC-UV	-
[44]	† Propanolol Acide naphthoxyacétique	0.5-1	Acide 2-naphthoxyacétique	Trichlorométhane/ méthanol (4/1 v/v)	HPLC-FD	100
[54]	Carbamazépine Carbamazépine-époxyde	1	5-p-méthylphényl-5-phénylhydantoin	Dichlorométhane	HPLC-UV	-
[55]	† Acide Valproïque	0.5	Acide dideuteropropylacétique méthyl ester	Cyclohexane	GC-MS	-
[45]	Imipramine Desipramine	2	Chlomipramine	Hexane / alcool isoamyl (99/1 v/v)	HPLC-UV	45
[56]	* Oxprénolol	2	Alprenolol	Chlorure de méthylène/diéthyl éther (1/4 v/v)	HPLC-UV	63
[46]	* Nifédipine Flurazépam Oxazépam Nordazépam Témazépam Diazépam	- 0.5	Diazépam Flurazépam	Toluène Diéthyl éther	HPLC-UV HPLC-UV	95 84 à 92
[57]	* Méthohexital Mépiridine	-	Hexobarbital Mépiridine-d4	Toluène	GC-MS	-

Tableau V – Méthodes d'extraction en phase liquide pour le dosage des médicaments dans le lait maternel humain. R: Rendement d'extraction. V: Volume de lait utilisé pour l'extraction. HPLC: Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance. GC: Chromatographie en phase Gazeuse. GLC: Chromatographie en phase Gazeuse et Liquide. ED: Détecteur Electrochimique. MS: Spectromètre de Masse. NPD: Détecteur Azote Phosphore. FD: Détecteur à fluorescence. * méthode identique pour le plasma. † méthode adaptée de la méthode pour le plasma.

2.2.2. Extraction en phase solide

Dans la littérature, quelques méthodes SPE sont décrites (cf. tableau VI). Certaines sont des procédures sommaires qui ne permettent pas d'obtenir des échantillons suffisamment propres, de telle sorte que des éléments de la matrice interfèrent avec les médicaments lors de l'analyse chromatographique [58]. Dans certain cas, une précipitation des protéines (par centrifugation après acidification, alcalinisation ou ajout d'un solvant organique) est réalisée avant la SPE pour libérer les médicaments liés et éliminer ainsi les protéines [59].

Un seul article rapporte l'analyse de médicaments variés, provenant de différentes classes pharmacologiques, pour le criblage toxicologique dans le lait maternel [59]. La méthode SPE, mise au point dans cette étude, permet d'obtenir des rendements d'extraction de 50 à 95 %, mais quelques éléments de la matrice interfèrent dans l'analyse par chromatographie en phase liquide (HPLC) et détection à ultra violet (UV). D'autre part, ces travaux se limitent à la mise au point de la méthode d'extraction et ne présentent pas la validation analytique.

La SPE est une méthode de choix pour l'extraction des médicaments dans le lait. Elle offre une large variété de colonnes (volume de la cartouche, nature et quantité de la phase stationnaire) ce qui permet d'extraire presque toutes les molécules. Contrairement à la LLE, la SPE a l'avantage d'être rapide, d'utiliser de petits volumes d'échantillon et de solvant et d'être facilement automatisable.

Réf.	Médicaments	V mL	Étalon interne	Cartouche d'extraction	Solvant d'éluion	Méthode d'analyse	R %
[60]	Olanzapine	1	Thienbenzodiazépine	Bound-elut certify LRC	acétate d'éthyle / hydroxyde d'ammonium (98/2 v/v)	HPLC-ED	101
[61]	* Néfazodone Hydroxynéfazodone BMS-180492 <i>m</i> -chlorophénylpipérazine	1	Trazodone	Vac-Elut rack	Dichlorométhane / isopropanol / hydroxide d'ammonium (78/20/2 v/v/v)	HPLC-UV	40 à 60
[57]	* Diazépam Nordiazépam	-	Diazépam-d5	Clean-Screen ZSDA020	-	GC-MS	-
[58]	* Phénytoïne	1	méphenytoïne	Sep-Pack® C ₁₈	Méthanol	HPLC-UV	93
[59]	Propranolol Métoprolol Alprénolol Acébutolol Prénalterol Alténolol Practolol Carbamazépine Imipramine Diazépam Prochlorpérazine Prométhazine Papavérine Yohimbine Vincamine Sulfate de quinine Sulphate de quinidine Cimétidine Thiabendazole	1	-	C ₁₈ C ₁₈ C ₁₈ CN C ₁₈ C ₁₈ C ₁₈ C ₁₈ CN C ₁₈ CN CN CN CN CN C ₁₈ CN C ₁₈ CN	Méthanol / propylamine (99/1 v/v)	HPLC-UV HPLC-FD	77 80 83 75 86 60 77 95 59 72 50 71 89 79 95 83 95

Tableau VI – Méthodes d'extraction en phase solide pour le dosage des médicaments dans le lait maternel humain. R: rendement d'extraction. V: volume de lait utilisé pour l'extraction. HPLC: Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance. GC: Chromatographie en phase Gazeuse. FD: Détecteur à Fluorescence. UV: détecteur Ultra-Violet. ED: Détecteur Electrochimique. MS: Spectromètre de Masse.

2.3. Techniques d'analyse des médicaments dans le lait

La méthode d'analyse la plus utilisée pour le dosage des médicaments dans le lait est l'HPLC couplée avec plusieurs types de détecteur, en particulier le détecteur UV (cf. tableau V et IV). L'HPLC-UV est une technique très courante, peu coûteuse et facile à mettre en œuvre pour un ou plusieurs médicaments mais elle nécessite souvent plusieurs étapes de traitement de l'échantillon, car la détection UV n'est pas très spécifique.

Pour réaliser le criblage des médicaments dans le lait, La chromatographie en phase gazeuse (GC) est préférable à l'HPLC, car elle possède un pouvoir de résolution élevée ce qui permet de séparer plusieurs composés dans un mélange complexe. La GC couplée avec un détecteur à spectrométrie de masse (MS) offre la possibilité de doser les médicaments avec une sélectivité et une sensibilité élevée, ce qui permet d'atteindre des limites de détection très basses.

PARTIE II

MISE AU POINT D'UNE MÉTHODOLOGIE POUR LE CRIBLAGE DES MÉDICAMENTS DANS LE LAIT MATERNEL

Chapitre 1 : Protocole clinique pour le prélèvement des échantillons de lait

1. Introduction

L'étude du passage des médicaments dans le lait maternel nécessite la connaissance détaillée des propriétés du lait et des facteurs qui peuvent modifier ce passage. La pharmacologie des médicaments chez la mère, la physiologie mammaire, la composition du lait, la demande nutritionnelle et la pharmacologie chez l'enfant, les propriétés physico-chimiques des médicaments, sont autant des facteurs qui modulent l'excrétion des médicaments dans le lait et qui affectent la vitesse de passage et les concentrations dans le lait (cf. partie I, chapitre 2).

Dans la littérature, de nombreuses études rapportent la présence de médicaments dans le lait maternel [33-36,62]. Ces études concernent souvent quelques cas cliniques et très peu d'informations relatives à l'échantillon (dose, délai entre dose et tétées, etc.) et à la pharmacocinétique du substrat (cinétique de transfert, pourcentage transféré, etc.) sont mentionnées. L'interprétation des résultats ne tient généralement pas compte des facteurs qui peuvent affecter le passage des médicaments. Dans ces conditions, il est difficile de comparer les concentrations obtenues chez différents sujets et de corrélérer les résultats à d'autres études. L'interprétation clinique est très limitée.

Dans ce contexte, il est important de mettre en place une méthodologie générale qui prend en compte la sélection de renseignements pertinents lors du prélèvement d'échantillons de lait pour l'évaluation et l'interprétation pharmacocinétique et clinique des concentrations des médicaments mesurées dans le lait.

2. Objectifs

L'objectif principal est de mettre en place un protocole clinique de prélèvement d'échantillons de lait pour l'étude du passage de plusieurs molécules médicamenteuses.

Ce protocole permettra :

- l'évaluation du passage des médicaments dans le lait maternel en fonction des différents paramètres de variation, à l'aide des données recueillies lors des prélèvements,
- l'élaboration d'une base de données pour des recherches futures sur la cinétique des médicaments chez la femme allaitant au niveau du lait maternel et chez le nouveau-né allaité.

3. Protocole

Le protocole est présenté en **annexe 1**.

Chapitre 2 : Méthode générale de criblage des médicaments dans le lait maternel

1. Introduction

Dans la littérature, de nombreuses études portent sur le dosage des médicaments dans le lait maternel, mais ces études sont ponctuelles et concernent généralement quelques médicaments et leurs métabolites (cf. partie I, chapitre 3, 2.2.). Un seul article rapporte l'analyse de différents principes actifs, provenant de plusieurs classes pharmacologiques, pour le criblage toxicologique dans le lait maternel [59]. Cette dernière étude est préliminaire et se limite à la mise au point d'une méthode d'extraction dans le lait. La validation analytique du dosage par HLPC-UV n'est pas détaillée.

D'autre part, la plupart des méthodes de dosage dans le lait proviennent de méthodes existantes pour le dosage des médicaments dans le plasma ou d'autres milieux biologiques. Souvent aucune modification n'est apportée par rapport à la méthode existante et les paramètres analytiques (rendements, linéarité, précision, etc.) ne sont pas détaillés. Dans ce contexte, il est difficile de savoir si ces méthodes sont adaptées et efficaces car le lait est plus riche en lipides et acides gras que le plasma.

Dans ce contexte, il est intéressant de mettre au point une méthode générale de dosage des médicaments les plus utilisés pendant l'allaitement, applicable aussi bien au criblage toxicologique dans le lait maternel qu'à la détection spécifique d'un médicament prescrit pour une pathologie pendant l'allaitement.

2. Objectifs

L'objectif est de développer une méthode générale de criblage, dans le lait maternel, des molécules médicamenteuses et des xénobiotiques pouvant être prescrits ou non pendant la période d'allaitement.

Cette étude doit :

- inclure des molécules médicamenteuses ayant des propriétés chimiques variées, qui représentent les différentes classes pharmacologiques utilisées pendant l'allaitement,
- être applicable et transposable à d'autres médicaments des ces mêmes classes pharmacologiques,
- être adaptée pour l'analyse routinière toxicologique et pharmacologique clinique.

3. Choix méthodologiques

3.1. Molécules tests

18 molécules médicamenteuses ont été choisies selon les critères suivants (cf. tableau VII):

- prescription possible chez la femme allaitant,
- passage dans le lait maternel puis chez le nouveau-né, observé antérieurement,
- appartenance à différentes classes pharmacologiques,
- structures et propriétés physico-chimiques différentes,
- molécules analysables en GC-MS.

Molécules	Classes pharmacologiques	Références
Caféine	analgésique	[63] [64]
Chlorphéniramine	antihistaminique H1	
Chlorpromazine	neuroleptique	[65] [66]
Cocaine	anesthésique local	[67]
Codéine	antitussif narcotique	[68]
Diazépam	hypnotique	[47] [46]
Doxylamine	antihistaminique H1	[69]
Fluoxétine	inhibiteur de la recapture de la sérotonine	[49] [70]
Méthadone	analgésique morphinique	[71] [72]
Méthorphan	antitussif	[69]
Nifédipine	antiangoreux	[56]
Norméthadone	analgésique morphinique	[71] [72]
Péthidine	analgésique morphinique	[73] [74]
Sélégiline	antiparkinsonien	[69]
Thioridazine	neuroleptique	[75]
Triazolam	hypnotique	[76,77]
Triméprazine	antipruritique	[78]
Trimipramine	antidépresseur	[79]

Tableau VII – Molécules choisies pour la mise au point de la méthode de dosage des médicaments dans le lait. Les références correspondent aux études concernant ces médicaments dans le lait maternel humain.

Les monographies de chaque médicament, comprenant la structure chimique, les propriétés physico-chimiques, ainsi que le spectre de masse obtenu dans les conditions de la méthode d'analyse sont présentés en annexe (cf. annexe 2).

Cette sélection permet d'inclure des molécules variées d'un point de vue analytique et d'un point de vue physiologique. La sélection comprend des acides (diazépam, $pka=3,3$) et bases (chlorpromazine, $pka=8,2$) (méthorphan, $pka=8,3$), ayant des groupements fonctionnels caractéristiques différents (amine, hydroxyle, phényle, etc.), des structures chimiques variées, des solubilités différentes, etc., ceci dans le but de développer une méthode d'analyse générale, applicable au plus grand nombre de molécules possible et transposable aux médicaments d'une même famille pharmaceutique et aux métabolites.

3.2. Méthode d'extraction

Dans la littérature, l'extraction liquide/liquide est largement utilisée pour la détermination des médicaments dans le lait (cf. partie I, chapitre 3, 2.2.1.). Cependant, l'extraction en phase solide présente de nombreux avantages et tend à être de plus en plus utilisée [80-83] :

- technique rapide et simple,
- pas de formation d'émulsion (par rapport à la LLE),
- technique flexible, par le large choix de phases stationnaires, et de solvants d'élution miscibles et non miscibles avec l'eau et par la possibilité d'éluer thermiquement les composés volatils et semi-volatils,
- technique nécessitant de faibles quantités d'échantillons et de solvants organiques.

Ainsi, la SPE a été choisi comme méthode d'extraction pour le criblage des médicaments. Sa facilité d'utilisation la rend particulièrement adaptée pour l'automatisation des analyses.

Dans le lait, les médicaments sont distribués dans différentes phases (cf. partie I, chapitre 1, 2.2) et peuvent être liés aux protéines du lait. Pour doser la totalité de médicament contenue dans le lait, la méthode d'extraction doit permettre de :

- utiliser une faible quantité de lait (≤ 1 mL),
- libérer les médicaments de leurs liaisons aux protéines du lait,
- libérer les médicaments contenus dans les micelles de lipides,
- éliminer les lipides et les protéines.

3.3. Méthode d'analyse

La GC-MS a été choisie pour l'analyse qualitative et quantitative des médicaments dans le lait, car c'est une technique sélective, spécifique et sensible. La GC est particulièrement adaptée à l'analyse de mélanges complexes car elle a un pouvoir de séparation chromatographique élevée. L'utilisation de la MS permet une détection spécifique puisque chaque composé a un schéma de fragmentation qui lui est propre. De plus, la MS est une technique sensible qui permet d'atteindre des limites de détection très basses.

La GC-MS est largement utilisée en médecine légale [84] et c'est une des techniques les plus adaptées au criblage de médicaments dans les milieux biologiques [85,86].

4. Résultats

La validation de la méthode de dosage des médicaments dans le lait est présentée dans la publication :

Screening of drugs in human breast milk by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography - Mass Spectrometry

Marie-Sophie Caubet, Jean-Louis Brazier

Journal of Analytical Toxicology (soumise)

4.1. Résumé de la publication

Une méthode générale, simple a été développée pour l'analyse de médicaments variés dans le lait maternel. Dix huit composés, provenant de classes pharmacologiques différentes, ont été extraits de 500 µL de lait par extraction en phase solide sur cartouches C18 et analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. La plupart des rendements d'extraction obtenus étaient

supérieur à 80 %. Les fonctions de calibration étaient linéaires pour une gamme de concentrations comprises entre 0.1 et 50 ng.µL⁻¹. Dans la littérature, une seule méthode rapporte le criblage de plusieurs médicaments dans le lait maternel. Par conséquent, la présente méthode est particulièrement intéressante pour évaluer les risques de passage des médicaments chez le nouveau-né, pendant la lactation. La méthode peut-être appliquée au dosage d'une grande variété de principes actifs, prescrits et non prescrits, utilisés pendant l'allaitement.

4.2. Publication

Screening of drugs in human breast milk by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography - Mass Spectrometry.

Journal of Analytical Toxicology (soumise)

Marie-Sophie Caubet MSc, Jean-Louis Brazier PhD

Chaire Pharmacie,
Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine,
CP 6128, succursale Centre-Ville
Montréal (QC) H3C3J7
Tel.: (514) 345 4931 ext. 3983
Fax: (514) 345 4988



ABSTRACT

A simple general method was developed to determine various drugs in human breast milk. Eighteen drugs were selected as representative from different pharmacological groups and extracted from 500 μ l of milk by a solid phase extraction procedure on a polymeric sorbent-C18-based cartridge. Extracts were analysed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. Most of the recoveries were greater than 80 %. Calibration functions were linear in the calibration range of 0.1-50 μ g.ml⁻¹. In the literature, only one method has been previously reported for the screening of several drugs in human breast milk. Therefore, the present method is particularly relevant for the analysis of breast milk of women receiving drugs and can be adapted for a large variety

of chemicals, drugs of abuse, as well as other pharmacotherapeutic agents. It can help to evaluate the potential toxicological risk for the neonate associated with breast-feeding.

INTRODUCTION

In the recent years, the advantages of human milk for the optimum growth and development of the infant have become more widely recognized. As a result, there has been an increase of the incidence and the duration of breast-feeding (1). Prescription and non-prescription medications are common during the lactation, particularly when the mother is affected by pathologies like diabetes, hypertension, asthma or epilepsy (2). As the number of women choosing to breast-feed their infant increases, the potential exposure of their child to a variety of drugs through breast milk also increases (2, 3). Most often, the guidelines for prescription and contraindication are limited by the absence of data for many drugs and the questionable reliability of the available data. Above all, the determination of the degree of transfer of drugs from the blood stream to breast milk requires the availability of analytical methods for identifying and quantifying these drugs in both plasma and breast milk.

Literature gathers only few analytical methods for human breast milk screening as compared to other biological fluids, like plasma. A lot of studies for drugs excretion into milk have been reported in clinical journals, but the analytical methods are generally not described (4, 5). Most of the time, authors refer to existing methods developed for plasma but do not report any of the analytical parameters of the milk analysis, such as recovery, linearity, variability, etc. (6, 7). However, milk is a complex and variable matrix, which cannot be handled like other biological samples. Moreover, methods reported in the literature generally focus on the determination of only one specific drug or very few drugs of the same pharmacological class.

Most of the reported methods consist in liquid-liquid extraction procedure and high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis (9-12). Few articles mention the use of solid phase extraction (SPE). SPE has been described for the dosage of methohexital, mepiridine and diazepam (13) and nefazodone (14) in breast milk, using procedures similar to those developed for plasma. Picò Y. et al (15) extracted

organochlorine pesticides from human milk on C-18 glass column, using however large volume of milk sample (5 ml). Phenytoin (16) and zonisamide (17) have been monitored into breast milk after SPE on C-18 cartridges. Olanzapine was also determined into breast milk by SPE on ion-exchange cartridges (18). Some SPE procedures were very simple but could not afford a correct clean-up of the samples in order to avoid matrix peaks interferences on the chromatogram (16, 19).

Only one article reported the screening from breast milk of several drugs from different pharmacological classes, by SPE and HPLC analysis (19). In this study, difficulties were encountered for cleaning the matrix properly and a high variability was observed in the results. Moreover, the use of HPLC and ultra-violet detection resulted in poor selectivity and sensitivity, making this method not suitable for a useful screening from breast milk. Furthermore, no drugs of abuse were included in this study.

The aim of the present work was to develop a general analytical method for the screening of various drugs in breast milk for routine toxicological assays as well as specific determination of drugs in pharmacological studies. Eighteen drugs, which can be prescribed or used freely during breast-feeding, were selected as models for the study. These drugs were chosen from classes with different physical and chemical properties and from various pharmacological, in order to provide a method easily transferable for other drugs. Analyses were carried out using SPE and gas chromatography coupled mass spectrometry (GC-MS).

EXPERIMENTAL

Chemicals

Methanol and hexane were purchased from V.W.R. Scientific (Montreal, Quebec, Canada). Water HPLC reagent was from Moquin scientific Inc. (Lachenaie, Quebec, Canada). Hydrochloric acid and isopropylamine were from Sigma-Aldrich Ltd. (Oakville, Ontario, Canada).

Anhydrous caffeine, chlorpheniramine maleate, chlorpromazine HCl, cocaine HCl, codeine phosphate, diazepam, doxylamine Succinate salt, fluoxetine HCl, methadone

HCl, methorphan HBr, nifedipine, normethadone HCl, pethidine HCl, selegiline hydrochloride, thioridazine, triazolam, trimeprazine tartrate and trimipramine maleate acid were a gift of the Clinical Department of Biochemistry of the Sainte-Justine Hospital (Montreal, Quebec, Canada).

Solvents and chemicals were all of analytical grade.

Calibration and reagent solutions

A stock solution containing 500 µg/mL of caffeine, chlorpheniramine, chlorpromazine, cocaine, codeine, diazepam, doxylamine, fluoxetine, methadone, methorphan, nifedipine, normethadone, pethidine, selegiline, thioridazine, triazolam, trimeprazine and trimipramine was prepared in methanol. This mixture was added to blank milk to give the final concentrations of 0.1, 1, 2, 5, 10, 20 and 50 µg.mL⁻¹. Human blank milk samples were obtained from the Obstetric-Gynaecology Department of the Hospital Sainte-Justine (Montreal, Quebec, Canada), from nursing mother, who had taken no medication and had abstained consuming any caffeine and xanthines-containing products.

The stock solution and specimens were kept from light and stored at -20°C for one month without deterioration.

Instrumentation and chromatographic conditions

GC-MS was used for the analysis of drugs. The instrumentation consisted of a HP-6890 Series gas chromatograph and a HP-5973 Series mass selective detector, from Hewlett-Packard (Kirkland, Quebec, Canada).

The gas chromatograph was equipped with an HP-5MS fused silica capillary GC column (30 m × 0.25 mm I.D., 0.25 µm film thickness; 5% phenyl-methyl-siloxane) from Hewlett-Packard (Kirkland, Quebec, Canada). Helium was used as carrier gas at 1 mL/min. Samples were injected in the splitless mode (inlet temperature, 260°C) using a purge delay of 0.8 min. The GC temperature was programmed at 90°C for 1 min, then rapped at 4°C/min to 290°C and held for 7 min. The GC-MS interface was maintained at 280°C.

The mass spectrometer was operated under electron impact ionization conditions, in the positive ion mode, with the following source parameters: electron energy 70 eV, ion source temperature 230°C. A solvent delay of 7 min was used for the recording. Mass scanning from m/z 50 to m/z 550 was used for drugs identification (SCAN). Quantification was achieved using a selected ion monitoring technique (SIM). The ions monitored are gathered in table I. The Dwell times were set at 100 ms per ion.

Sample preparation

1 mL of HCl 0.02 M was added to 500 μ L of human breast milk. After vortex-mixing for 1 min, the mixture was agitated in a ultrasonic bath for 30 min in order to break the micelles of fat. The mixture was then centrifuged (3000 rpm) for 5 min. The supernatant was loaded onto a SPE column Oasis C18 from Waters Corporation (Milford, Massachusetts, USA), which had been previously conditioned with 1 mL of methanol and 1 mL of water. The column was washed with 1 mL of water and dried under vacuum for 5 min, then washed with 1 mL of hexane and dried under vacuum for 5 min. 1 mL of methanol containing 1% of isopropylamine was used for the elution. The eluate was collected and dried in a RapidvapTM evaporator from Labconco (Kansas City, Missouri, USA) at 45°C under vacuum, at 95% of the vortex speed. Finally, the sample was reconstituted into 500 μ L of methanol and centrifuged (13000 rpm) for 4 min. 1 μ L of supernatant was injected into the GC column.

Analytical parameters

Calibration functions were determined by a least-squares linear regression analysis, weighted inversely to the variance of the signal, using peak areas and standard concentrations (20).

The efficiency of the extraction procedure was evaluated for each compound at two concentrations, by comparing a milk sample pooled with the reagent's solution before and after the extraction.

The intra-day and inter-day variabilities were calculated at three different concentrations from 4 replicates of the same pooled sample and 4 replicates of the pooled sample preparation, respectively.

The limit of detection (LOD) was calculated as a three-fold signal to noise ratio at the baseline. The limit of quantification (LOQ) was set at the lowest concentration of the calibration range.

RESULTS AND DISCUSSION

The drugs selected in this study included drugs of non medical use (caffeine, cocaine) and drugs of medical use during lactation, belonging to various pharmacological classes: analgesics (methadone, normethadone, pethidine); H1-antihistaminics (chlorpheniramine, doxylamine); neuroleptics (chlorpromazine, thioridazine); cough agents (codeine, metorphan); hypnotics (diazepam, triazolam); anti-Parkinson agent (selegiline); antidepressive (trimipramine), serotonin blocking agent (fluoxetine); calcium channel blocker (nifedipine); anti-pruritus (trimeprazine). These drugs were chosen because of their different physical and chemical properties in order to develop a general method potentially applicable to a large variety of other drugs.

Human milk contains high amount of fat, which required specific attention when extracting drugs from milk. Once milk specimens are frozen and thawed, the solution is heterogeneous, containing micelles of fat. Acidification and sonication have been investigated and approved for breaking the micelles and releasing drugs into the skim milk phase. Different concentrations of HCl and different times of sonication have been tested. The best results were obtained with HCl 0.02 M and 30 min of sonication.

Once the milk loaded on the cartridge, a washing step with hexane was used to remove residual lipids.

A total ion current chromatogram, in SCAN mode, of a pooled blank milk sample extracted according to the procedure described above is shown in figure 1 (chromatogram B). The 19 drugs were separated within approximately 60 min and resolution factors between peaks were higher than 4. All the peaks were identified in the chromatogram as the analyzed drugs. When comparing chromatogram B to the one obtained from an extracted blank milk sample (figure 1, chromatogram A), none of the studied drugs interfered with residual peaks from blank milk. Peaks at 28.0 min, 32.1

min and 32.6 min were identified as palmitic acid, oleic acid and stearic acid respectively, but their intensity was negligible compared to the intensity of drug's peaks (they cannot be seen in figure 1, chromatogram B and C). Consequently, the extraction method is shown to allow the elimination of most the fat acids and other contaminants from milk.

Recoveries (Table II) ranged from 65% to 100%, except for thioridazine (21%). Most of them were higher than 80%. Recoveries for diazepam and chlorpromazine were greater than those obtained with the method developed by Moors et al. (19): 73% and 50%, respectively. These results demonstrate that, the present extraction procedure is efficient for a large variety of drugs, with different physical and chemical properties and could also be used for the determination of drugs different from those chosen in this study. The same SPE method was also used for the analysis of amitriptyline and nortriptyline in milk of nursing mother treated with antidepressant (21). High recoveries were obtained for amitriptyline (92 %) and nortriptyline (89 %). Therefore, the proposed method is suitable for the screening of various drugs in human milk. However, some compounds, such as thioridazine, may require some changes or maybe another method of extraction in order to improve recovery.

The LOD are gathered in table II. The calibration range was limited to 5-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for fluoxetine, because LOD was about 2000 pg. For triazolam and thioridazine, LOD was about 200 pg and the calibration range was then limited to 1-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Since the studied range of concentration was large (500 fold) and the relative standard deviation was roughly constant over this range, the errors in the least-square linear regression calculation were larger as the concentration increased. Consequently, a weighted regression was applied to calibration plots, in order to give each point a weighting inversely proportional to the corresponding variance. The values of the correlation coefficients (R^2) of the weighted calibration functions were mostly greater than 0.99. Therefore, the response of the detector showed a good linearity for quantification of drugs in the studied range of concentrations. The correlation coefficient was 0.971 for fluoxetine probably because of the low stability of this drug when analysed by GC-MS. As shown in figure 1, the elution peak of fluoxetine was large and unsymmetrical, even though the retention time was only 28.5 min. Fluoxetine may

required a derivatization, for example with PFTA to improve the elution in the GC column and to increase the limit of detection (22).

For all the drugs, most of the intra-day and inter-day coefficients of variation were below 5% for the concentrations of 0.1, 5, 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Coefficients of variation for fluoxetine exceed 5 % probably because of the same reasons mentioned above.

CONCLUSION

This paper provides an analytical method, which can be useful for the screening of various drugs into breast milk for toxicological assays as well as pharmacological studies. The SPE procedure described above is simple and efficiency and could be easily automated for routine analysis. The greater selectivity and sensitivity of GC-MS compared to HPLC generally used for breast milk analysis, allows the determination of traces of drugs into breast-milk.

REFERENCES

1. P.O. Anderson. Drug use during breast feeding. *Clin. Pharm.* 10: 594-624 (1991).
2. I. Matheson, K. Kristensen and P.K.M. Lunde. Drug utilization in breast-feeding women. A survey in Oslo. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 38: 453-459 (1990).
3. S. Kacew. Adverse effects of drugs and chemicals in breast milk on the nursing infant. *J. Clin. Pharmacol.* 33: 213-221 (1993).
4. M. Wretlind. Excretion of oxazepam in breast milk. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 33: 209-210 (1987).
5. R. Bald, M. Bernbeck-Betthäuser, H. Spahn and E. Mutschler. Excretion of azapropazone in human breast milk. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 39: 271-273 (1990).
6. D. Ortega, X. Viviani, A.M. Lorec, M. Gannerre, C. Martin and B. Bruguerolle. Excretion of lidocaine and bupivacaine in breast milk following epidural anesthesia for cesarean delivery. *Acta Anaes. Scan.* 43: 394-397 (1999).

7. P.N. Jensen, O.V. Olensen, A. Bertelsen and K. Linnet. Citalopram and desmethylcitalopram concentrations in breast milk and in serum of mother and infant. *Ther. Drug. Monit.* 19: 236-239 (1997).
8. D.T. Rossi and D.S. Wright. Analytical consideration for trace determinations of drugs in breast milk. *J. Pharm. Biomed. Ana.* 15: 495-504 (1997).
9. S.E. Tsuei and J. Thomas. Quantification of oxprenolol in biological fluids using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 181: 135-140 (1980).
10. K.F. Ilett, T.H. Lebedevs, R.E. Wojnar-Horton, P. Yapp, M.J. Roberts, L.J. Dusci and L.P. Hackett. The excretion of dothiepin and its primary metabolites in breast milk. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 33: 635-639 (1993).
11. S.H.Y. Wong. Monitoring of drugs in breast milk. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 15: 100-105 (1985).
12. J. Blanchard, C.W. Weber and L.E. Shearer. HPLC analysis of methylxanthines in human breast milk. *J. Chromatogr. Sci.* 28: 640-642 (1990).
13. L. Borgatta, R.W. Jenny, L. Gruss, C. Ong and D. Barad. Clinical significance of methohexital, meperidine, and diazepam in breast milk. *J. Clin. Pharmacol.* 37: 186-192 (1997).
14. S. Dodd, A. Buist, G.D. Burrows, K.P. Maguire and T.R. Norman. Determination of nefazodone and its pharmacologically active metabolites in human blood plasma and breast milk by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 730: 249-255 (1999).
15. Y. Picó, E. Viana, G. Font and J. Mañes. Determination of organochlorine pesticide content in human milk and infant formulas using solid phase extraction and capillary gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1610-1615 (1995).
16. R. Shimoyama, T. Ohkubo, K. Sugawara, T. Ogasawara, T. Ozaki, A. Kagiya and Y. Saito. Monitoring of phenytoin in human breast milk, maternal plasma and cord blood plasma by solid-phase extraction and liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Ana.* 17: 863-869 (1998).
17. R. Shimoyama, T. Ohkubo and K. Sugawara. Monitoring of zonisamide in human breast milk and maternal plasma by solid-phase extraction HPLC method. *Biochem. Chrom.* 13: 370-372 (1999).

18. S. Kasper, E.L. Mattiuz, S.P. Swanson, J.A. Chiu, J.T. Johnson and C.O. Garner. Determination of olanzepine in human breast milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chrom. B* 726: 203-209 (1999).
19. M. Moors and D.L. Massart. Evaluation of solid-phase extraction of basic drugs from human milk. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9: 129-139 (1991).
20. J.C. Miller and J.N. Miller. Statistics for analytical chemistry, 2nd ed. *Ellis Horwood Limited*, Chichester, USA, 1988, pp 124-128.
21. M.S. Caubet, A. Millaret, W. Elbast and J.L. Brazier. Solid-phase extraction with HPLC-DAD selective detection of amitriptyline and nortriptyline in human breast milk. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 24: 1181-1187 (2001).
22. M. Lefebvre, M. Marchand, J.M. Horowitz and G. Torres. Detection of fluoxetine in brain, blood, liver and hair of rats using gas chromatography mass spectrometry. *Life Sci.* 64: 805-811 (1999).

Table I

Selected ions monitored for mass spectrometry analysis according to retention time of the drugs.

(Tr: retention time, ion 1: quantification, ion 2: qualification)

Compound	Tr (min)	Monitoring Period (min)	Ion 1 m/z	Ion 2 m/z
Selegiline	14.8	7 - 20	96	91
Pethidine	24.1	20 - 25.5	247	172
Caffeine	26.1	25.5 - 30	194	109
Fluoxetine	27	25.5 - 30	162	104
Doxylamine	28.5	25.5 - 30	180	167
Chlorpheniramine	30.6	30 - 32.5	203	167
Normethadone	32.9	32.5 - 35	58	224
Methorphan	33.6	32.5 - 35	271	150
Methadone	33.9	32.5 - 35	72	294
Cocaine	35.2	35 - 36.5	182	303
Trimipramine	35.5	35 - 36.5	249	294
Trimeprazine	37.3	36.5 - 38.5	298	198
Codeine	39.0	38.5 - 40	299	162
Diazepam	40.2	40 - 45	256	283
Chlorpromazine	41.2	40 - 45	318	272
Nifedipine	43.0	40 - 45	329	284
Triazolam	51.2	45 - 58	313	238
Thioridazine	52.5	45 - 58	98	370

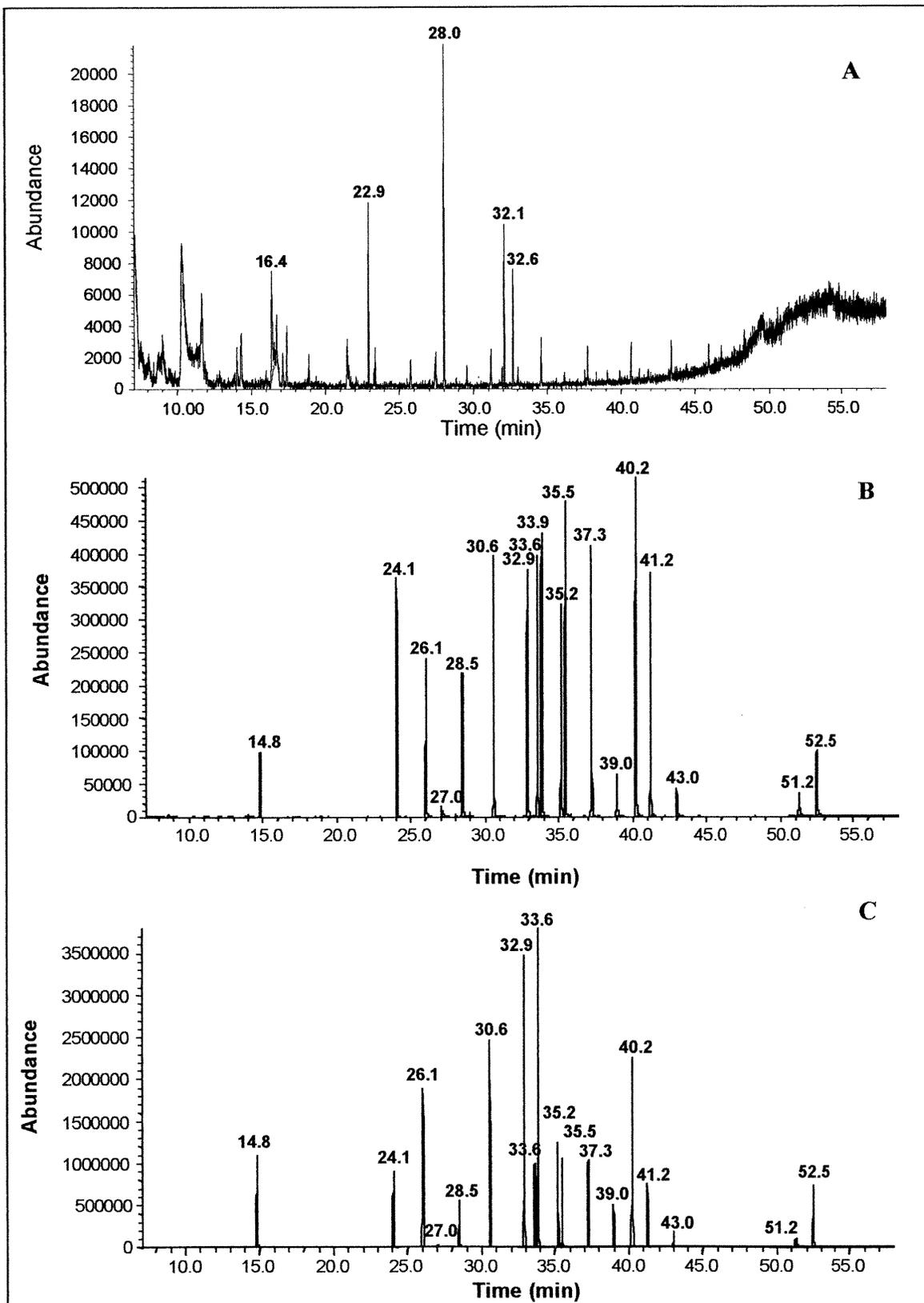
Table II

LOD, recovery, intra-day and inter-day variabilities.

Compound	LOD pg	Recovery %	Coefficient of variation %					
			Within day			Between day		
			0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
Selegiline	30	65 ± 7	0.8	2.7	1.7	2.8	2.5	3.5
Pethidine	50	91 ± 2	1.8	3.1	1.5	2.9	4.1	4.1
Caffeine	16	94 ± 4	2.5	1.7	1.9	4.5	2.7	3.7
Fluoxetine	1942	70 ± 8	-	3.9	5.3	-	7.0	8.2
Doxylamine	20	84 ± 9	3.4	2.3	3.9	4.4	5.3	3.9
Chlorpheniramine	36	92 ± 5	1.8	1.7	1.7	2.8	3.7	3.9
Normethadone	27	92 ± 9	2.3	2.2	1.9	4.0	3.9	4.2
Methorphan	63	86 ± 4	3.4	2.9	1.8	3.4	2.8	3.8
Methadone	17	90 ± 7	1.8	1.3	1.9	1.7	2.3	2.7
Cocaine	58	100 ± 3	1.1	1.6	1.1	3.1	3.6	4.0
Trimipramine	48	87 ± 4	2.9	3.1	2.2	3.0	2.1	3.2
Trimeprazine	63	87 ± 7	3.5	3.4	2.1	3.5	3.7	4.1
Codeine	90	81 ± 7	4.3	2.8	4.4	4.3	3.8	3.8
Diazepam	63	88 ± 9	1.9	2.4	1.7	4.7	4.4	5.3
Chlorpromazine	97	75 ± 6	1.7	2.3	1.9	3.7	4.9	4.8
Nifedipine	92	92 ± 10	2.2	2.0	2.4	2.2	1.9	2.6
Triazolam	180	89 ± 4	-	1.7	1.4	2.1	1.7	2.4
Thioridazine	170	21 ± 7	-	3.2	2.2	3.6	3.2	3.9

FIGURE LEGEND

Figure 1: **A:** Total ion current chromatogram (SCAN) of a blank milk sample. **B:** Total ion current chromatogram (SCAN) of a milk sample spiked with the standard solution containing drugs. **C:** Total ion current chromatogram (SIM) of a milk sample spiked with the standard solution containing drugs. For Peaks identification refer to table I.



Chapitre 3: Application de la méthode générale au dosage des antidépresseurs dans le lait maternel

1. Introduction

La possibilité de développer une maladie psychiatrique est potentiellement élevée pendant la grossesse et la période d'allaitement [87]. En effet, des troubles psychiatriques post-partum affectent environ 80 % des femmes et 20% des femmes développent une dépression post-partum, qui nécessite souvent l'utilisation d'antidépresseurs ou de tranquillisants [11]. L'amitriptyline est un antidépresseur efficace qui est utilisé pendant la grossesse et la période d'allaitement. L'excrétion dans le lait de l'amitriptyline et de son métabolite actif, la nortriptyline, a été observée dans plusieurs études, mais les risques potentiels pour le nouveau-né sont encore mal connus [11,88,89].

Plusieurs méthodes utilisant l'extraction liquide/liquide ou en phase solide et l'HPLC ou la chromatographie en phase gazeuse (GC) ont été développées pour doser l'amitriptyline et ses métabolites dans le plasma. Cependant, seules deux méthodes de dosage dans le lait maternel ont été rapportées dans la littérature. Pittard et al. [90] et Bader et al. [88] ont dosé l'amitriptyline dans le lait en utilisant les méthodes existantes pour le plasma, sans vérifier cependant la validité des paramètres analytiques pour le lait. Seuls, Brixen-Rasmussen et al. [91] ont adapté la méthode mise au point par Jørgensen [92] pour le plasma aux échantillons de lait. Ils ont utilisé des extractions liquides successives et par conséquent la méthode était contraignante et les limites de détection élevées (10 et 30 ng.mL⁻¹ pour l'amitriptyline et la nortriptyline respectivement).

Dans ce contexte, il est intéressant de vérifier la validité de la méthode générale de criblage des médicaments (cf. partie II, chapitre 2) pour le dosage de l'amitriptyline et la nortriptyline dans le lait maternel humain.

2. Objectifs

L'objectif principal est d'utiliser la méthode d'extraction générale de criblage des médicaments dans le lait pour le cas particulier du dosage de l'amitriptyline et la nortriptyline. L'HPLC-DAD (DéTECTEUR à barrettes de Diodes) est choisie comme méthode d'analyse car c'est une méthode rapide et facile à développer pour le dosage de 1 ou quelques composés. En effet, dans le cas présent, la haut pouvoir de résolution de la GC et la spécificité de la MS ne sont pas nécessaires.

L'objectif est donc de :

- vérifier la validité de la SPE pour l'amitriptyline et la nortriptyline,
- doser ces 2 médicaments par HPLC-DAD.

Dans la méthode générale, un autre antidépresseur tricyclique, la trimipramine, a été étudié. L'objectif secondaire est donc de vérifier que la méthode de criblage des médicaments peut facilement être utilisée pour des médicaments appartenant à la même famille que les molécules testées.

3. Résultats

La validation de la méthode de dosage de l'amitriptyline et la nortriptyline dans le lait est présentée dans la publication :

Solid-phase extraction with HPLC-DAD selective detection of amitriptyline and nortriptyline in human breast milk.

Marie Sophie Caubet, Arnaud Millaret, Walid Elbast, Jean-Louis Brazier

Journal of liquid Chromatography and Related Technologies 24(8): 1181-1187 (2001).

3.1. Résumé de la publication

Une méthode simple, rapide et efficace a été développée pour analyser l'amitriptyline et la nortriptyline dans le lait humain, par chromatographie en phase liquide (HPLC) et détection à barrette de diodes (DAD). Les composés ont été extraits de 250 μL de lait par extraction en phase solide sur cartouche C18. La séparation chromatographique à polarité des phases inversées a été réalisée sur une colonne Eclipse XDB-C18 (30 mm \times 4.6 mm, 3.5 μm de taille de particules), avec les phases mobiles acétonitrile et acétate d'ammonium 0.1 M (33/67, v/v). Le standard interne était l'imipramine. Les fonctions de calibration étaient linéaires pour une gamme comprise entre 60 et 300 ng.mL^{-1} . Les limites de détection étaient 1.9 ng.mL^{-1} pour les deux composés. Les rendements d'extraction étaient 92% pour l'amitriptyline et 89% pour la nortriptyline. Dans la littérature, aucune méthode ne rapporte le dosage de ces médicaments de lait humain. Par conséquent, la présente méthode offre un outil de choix pour évaluer le passage de ces drogues dans le lait maternel et les risques pour le nouveau-né.

3.2. Publication

J. LIQ. CHROM. & REL. TECHNOL., 24(8), 1181–1187 (2001)

**SOLID-PHASE EXTRACTION WITH
HPLC-DAD SELECTIVE DETECTION OF
AMITRIPTYLINE AND NORTRIPTYLINE
IN HUMAN BREAST MILK**

M. S. Caubet,* A. Millaret, W. Elbast, and J. L. Brazier

Chaire Pharmaceutique Famille Louis Boivin,
Médicaments, Grossesse et Allaitement, Centre de
Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, Université de
Montréal, Faculté de Pharmacie, C. P. 6128, Succursale
Centre-Ville, Montreal (Quebec) H3C 1J7, Canada

ABSTRACT

A simple, rapid, highly selective and sensitive method was developed to determine concentrations of amitriptyline and nortriptyline in human breast milk, using high performance liquid chromatography (HPLC) with a diode-array detector (DAD). Drugs were effectively extracted from 250 μL of milk by a solid phase extraction procedure on a polymeric sorbent-C18-based cartridge. The separation was carried out on a Eclipse XDB-C18 reversed phase column (30 mm \times 4.6 mm, 3.5 μm particle size) using the mobile phase composed of acetonitrile and ammonium acetate 0.1M (33/67, v/v). Imipramine was used as internal standard. Calibration functions were linear in the calibration range of 60–300 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. The lower limit of detection was 1.9 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ for both compounds. The recoveries were 92% for amitriptyline and

*Corresponding author.

1182

CAUBET ET AL.

89% for nortriptyline. Since no method have been reported in the literature for the dosage of these two drugs in breast milk, this method could be useful, particularly, when evaluating the potential risk for the neonate during the lactation period.

INTRODUCTION

The postpartum period is a time of great physical and emotional changes. The incidence of psychiatric illness is potentially higher in this period and may require an antidepressant therapy. Amitriptyline is an effective tricyclic antidepressant used for treatment of depressive disorders during pregnancy and lactation period. Amitriptyline undergoes an extensive metabolism to form mainly nortriptyline, which is the active metabolite responsible for the clinical antidepressant activity.¹ The excretion of amitriptyline and nortriptyline into breast milk is still controversial in the literature, and the potential risk for the neonate remains unclear.^{2,4}

The determination of the degree of transfer of drugs from the blood stream into the breast milk requires the availability of analytical methods for quantifying these drugs in both plasma and breast milk. The primary difference between breast milk samples and other body fluids usually analysed is that breast milk contains higher amounts of fatty acids and related lipids (3.8% on average).⁵ The lipid materials can reduce extraction efficiency and cause analytical interference, especially when using gas liquid chromatography.² Breast milk also contains high levels of proteins (1% on average)⁵ and tricyclic antidepressants are known to have high affinity to both plasma and milk proteins (amitriptyline is 95% bound to plasma proteins). Consequently, extraction of tricyclic antidepressants from milk requires an efficient method able to break the micelles of fatty acids and eliminate lipids.

Various methods, using either liquid phase or solid phase extraction and gas-liquid chromatography or HPLC, has been reported in the literature for determination of amitriptyline and its metabolites in plasma,⁶⁻⁸ however, no methods describing the determination of these drugs in human milk are yet available. Pittard et al.⁴ and Bader et al.⁹ have applied to milk samples the commonly used gas liquid chromatography methods developed by Jørgensen¹⁰ or Biggs et al.¹¹ for plasma samples, without any change. However, the quality parameters of the measurements from milk were not discussed. In 1980, Brixen-Rasmussen et al.¹² adapted the method from Jørgensen to milk samples, but multiple solvent extractions were necessary, reducing the extraction efficiencies and subsequently the limits of detection to 10 ng.mL⁻¹ and 30 ng.mL⁻¹ for amitriptyline and nortriptyline, respectively. Until now, no other attempt of extraction has been mentioned in the literature.

AMITRIPTYLINE AND NORTRIPTYLINE

1183

In this paper, a new method using a solid-phase extraction and a reversed phase liquid chromatography with a diode array detector (RP-HPLC-DAD), for the determination of amitriptyline and nortriptyline in human breast milk is reported.

EXPERIMENTAL

Chemicals

Amitriptyline-HCl, nortriptyline-HCl, and imipramine-HCl were obtained from Sigma-Aldrich Ltd. (Oakville, Ontario, Canada).

Acetonitrile, methanol, isopropylamine, and hexane were purchased from V.W.R. Scientific Ltee (Montreal, Quebec, Canada). HPLC water reagent was from Moquin scientific Inc. (Lachenaie, Quebec, Canada). Ammonium acetate and hydrochloric acid were from Sigma-Aldrich Ltd. (Oakville, Ontario, Canada).

Solvents and chemicals were all of analytical grade.

Calibration and Reagent Solutions

A standard solution containing $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of amitriptyline and nortriptyline was prepared in methanol. The working internal standard (IS) solution contained $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of imipramide in methanol.

For the milk assays, a series of dilution was prepared in order to obtain the following concentrations of amitriptyline and nortriptyline: 60, 120, 180, and 300 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Standard solutions were kept away from light and stored at 4°C for several months, without deterioration. Milk samples were stored at 4°C for a few days.

Instrumentation and Chromatographic Conditions

HPLC-DAD analyses of amitriptyline and nortriptyline were performed on a HP-1100 system, from Hewlett-Packard (Kirkland, Quebec, Canada). The chromatographic system consisted of a vacuum degasser on line with a binary pump linked to a thermostatted column compartment via an autosampler. The detection was carried out using a diode array UV detector (200 – 400 nm). Drugs were separated on a Eclipse XDB-C18 reversed phase column (30 mm \times 4.6 mm, 3.5 μm particle size) from Hewlett-Packard (Kirkland, Quebec, Canada).

The mobile phase was a mixture of acetonitrile and acetate ammonium 0.1M (33/67, v/v). A fresh mobile phase was prepared every 3 days. Before use,

1184

CAUBET ET AL.

the mobile phase was filtered through a 0.45 μm membrane from Gelma Sciences (Ann Arbor, Michigan, USA). The flow was set at 1.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The column compartment was kept at a controlled temperature of $38^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$. The pressure was monitored at 80 bars. Amitriptyline and nortriptyline were detected at 238 nm and imipramine was detected at 250 nm.

Sample Preparation: Solid Phase Extraction (SPE)

One mL of HCl 0.02 M and 25 ng of imipramine (IS) were added to 250 μL of human breast milk. After vortex-mixing for 1 min, the mixture was sonicated in a ultrasonic bath for 45 min. The sample was then loaded onto a SPE column, Oasis C18 from Waters Corporation (Milford, Massachusetts, USA), which had previously been conditioned with 1 mL of methanol, 1 mL of 0.02 N HCl and 1 mL of water. The column was washed with 1 mL of water and dried under vacuum for 5 min. Then, it was washed with 2×1 mL of hexane and dried under vacuum for 5 min. One mL of methanol containing 1% of isopropylamine was used for the elution. The eluent was collected and dried in a RapidvapTM evaporator (Labconco, Kansas City, Missouri, USA) at 45°C under vacuum, with 95% vortex speed. Finally, the sample was reconstituted into 1 mL of methanol and a 1 μL aliquot was injected into the HPLC system for analysis.

Analytical Parameters

The within-day precision was calculated from repeated analysis ($n=5$) during one working day and the between-day precision was calculated from repeated analysis on 5 successive working days. The efficiency of the extraction procedure was evaluated by comparing peak area ratios to internal standard, obtained with and without extraction.

Calibration curves were constructed by plotting peak area ratios (compound/internal standard) versus standard concentrations, and the best relationship was determined by a least-squares linear regression analysis.

The accuracy was tested using a Student's T-test, comparing the mean concentration C_m of a milk standard sample injected five times ($n=5$) calculated from the equation of the linear regression, with the theoretical target concentration C_t of this sample. Accuracy was verified with a risk of 5% when $T=(C_m-C_t)/(SD/2) < T_{\text{table}}(\alpha=5\%,n-1)$, where SD is the standard deviation of C_m .

The limit of detection (LOD) was evaluated at a signal-to-noise ratio of 3.

AMITRIPTYLINE AND NORTRIPTYLINE

1185

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows a typical chromatographic profile of the analysis of amitriptyline and nortriptyline extracted from a human breast milk sample. Chromatographic conditions were optimised to obtain baseline separation of the two drugs and the internal standard. Retention times of amitriptyline, imipramine (IS), and nortriptyline were 1.32 min, 1.77 min, and 2.41 min, respectively. Resolution factors between peaks were calculated and found to be superior to 1.5.

SPE has been chosen for milk sample extraction and cleanup due to its simplicity and rapidity, as well as low solvent requirements, compared to liquid-liquid extraction. Furthermore, for practical and ethical reasons, it is often difficult to obtain large volumes of breast milk. SPE allows working on small volumes of sample. The extraction procedure described above required only 250 μL of milk. Before loading the sample onto the extraction cartridge, the milk was acidified with diluted HCl in order to ionise drugs, without degradation. The milk sample was sonicated in an ultrasonic bath in order to break the micelles of fatty acids and to break bonds between drugs and proteins. When the sample is loaded onto the SPE column, fatty acids and proteins are retained by the sorbent. Therefore, the column was washed with hexane to elute these contaminants. Then, the drugs were eluted by proton exchange with methanol containing 1% of isopropylamine.

The recoveries and the precision of the method are listed in Table 1. High mean recoveries were obtained for amitriptyline (92%) and nortriptyline (89%). Results indicate that extraction recoveries are independent of the concentrations

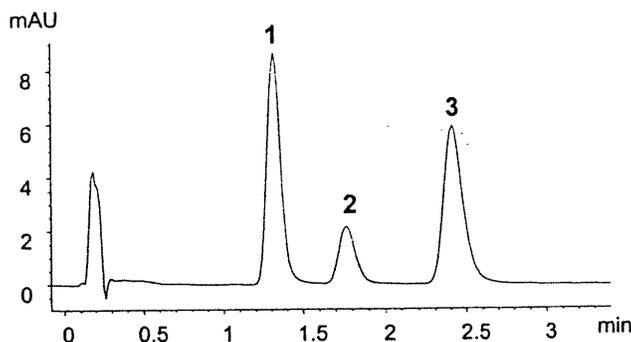


Figure 1. Chromatogram of blank milk spiked with standard solution at $120 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, registered at 238 nm. Peaks: 1=amitriptyline, 2=imipramine (IS), 3=nortriptyline.

1186

CAUBET ET AL.

Table 1. Recoveries, Within- and Between-Day Precision (n=5)

Concentration (ng.ml ⁻¹)	Recovery (%)	Coefficient of Variation (%)	
		Within-Day	Between-Day
<i>Amitriptyline</i>			
60	91 ± 3	0.9	5.7
120	92 ± 6	1.1	2.5
180	90 ± 8	0.5	5.1
300	93 ± 9	0.3	6.5
<i>Nortriptyline</i>			
60	86 ± 10	1.3	5.8
120	91 ± 6	1.6	1.8
180	88 ± 9	0.4	3.7
300	92 ± 9	0.3	5.2

of amitriptyline (SD 7%) and nortriptyline (SD 8%). Within-day precision values were below 1.6%. Between-day coefficients of variation were higher than within-day coefficients, ranging from 1.8% to 6.5%. The modifications of milk composition during the storage under refrigeration at 4°C may contribute to these variations.¹³ Nevertheless, the precision is sufficient enough for the determination of amitriptyline and nortriptyline in breast milk.

The calibration functions were $y = 0.0316 x - 0.0737$ ($R^2=0.9992$) and $y = 0.0304 x - 0.0773$ ($R^2=0.9996$) for amitriptyline and nortriptyline, respectively. Therefore, the response of the detector showed a good linearity for quantification of both drugs in the studied range of concentrations (60-300 ng.mL⁻¹). The limit of detection for amitriptyline and nortriptyline was of 1.9 ng.mL⁻¹. These values

Table 2. Accuracy Using a T-Statistic*

Compound	C _i =90 (ng.ml ⁻¹)		C _i =240 (ng.ml ⁻¹)	
	C _m	T	C _m	T
Amitriptyline	89 ± 2	1.3	243 ± 3	1.8
Nortriptyline	89 ± 1	2.3	242 ± 3	1.1

* $T=(C_m - C_i)/(SD/2)$; C_m and SD: mean and standard deviation of concentrations measured from the equation of the linear regression (n=5); C_i: concentration of the standard sample. T_{tabc}(0.95, 3)=2.8.

AMITRIPTYLINE AND NORTRIPTYLINE

1187

are of the same order than those reported in the literature for plasma sample, analysed by liquid-liquid extraction and HPLC-DAD ($5\text{-}10\text{ ng.mL}^{-1}$,¹⁴ 2 ng.mL^{-1} .¹⁵

Accuracy was tested with two concentrations within the calibration range. Table 2 displays the values of C_m and T for two standard milk samples containing amitriptyline and nortriptyline at $90\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ and $240\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. The accuracy of the method is validated.

In conclusion, the solid-phase extraction procedure described here provides a simple and efficient preparation method for the determination of amitriptyline and nortriptyline in human breast milk. Since no method has been reported in the literature as being as simple, rapid, efficient, and sensitive as our SPE with HPLC-DAD procedure, the method described above could be useful for measuring the transfer of amitriptyline and nortriptyline in the breast milk and the potential risk of adverse effect or toxicity for the neonate.

REFERENCES

1. Venkatakrisnan, D.; Greenblatt, D.J.; Von Moltke, L.L.; Schmider, J.; Harmatz, J.S.; Shader, R.I. *J. Clin. Pharmacol.* **1998**, *38*, 112–121.
2. Pons, G.; Rey, E.; Matheson, I. *Clin. Pharmacokinet.* **1994**, *27*, 270–289.
3. Winsner, K.L.; Perel, J.M. *Am. J. Psychiatry* **1991**, *148*, 1234–1236.
4. Pittard, W.B.; O'Neal, W. *J. Clin. Psychopharmacol.* **1986**, *6*, 383–384.
5. Rossi, D.T.; Wright, D.S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *15*, 495–504.
6. Theurillat, R.; Thormann, W. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *18*, 751–760.
7. Ulrich, S.; Martens, J. *J. Chrom. B* **1997**, *696*, 217–234.
8. Ulrich, S.; Isensee, T.; Pester, U. *J. Chrom. B* **1996**, *685*, 81–89.
9. Bader, T.F.; Newman, K. *Am. J. Psychiatry* **1980**, *137*, 855–856.
10. Jørgensen, A. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **1975**, *36*, 79–90.
11. Biggs, J.T.; Holland, W.H.; Chang, S.; Hipps, P.P.; Sherman, W.R. *J. Pharm. Sci.* **1976**, *65*, 261–268.
12. Brixen-Rasmussen, L.; Halgrener, H.; Jørgensen, J. *Psychopharmacology* **1982**, *76*, 94–95.
13. Hamosh, M.; Berkow, S.; Bitman, J.; Freed, L.; Happ, B.; Jones, J.B.; Mehta, N.R.; Wood, D.L.; Hamosh, P. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **1984**, *3*, 284–289.
14. Kudo, K.; Jitsufuchi, N.; Imamura, T. *J. Anal. Toxicol.* **1997**, *21*, 185–189.
15. Ghahramani, P.; Lennard, M.S. *J. Chrom. B* **1996**, *685*, 307–313.

Received October 4, 2000
Accepted October 19, 2000

Manuscript 5407

DISCUSSION

Le lait maternel est reconnu comme étant la meilleure source d'alimentation pour le nouveau-né, et l'allaitement maternel est recommandé lors qu'il n'y a pas de contre-indication. Ainsi, de plus en plus de femmes choisissent d'allaiter leur enfant.

Pendant la grossesse et les premières semaines suivant l'accouchement, l'utilisation de médicaments, prescrits ou non, est relativement fréquente. Certaines pathologies, comme le diabète, l'hypertension, l'asthme, l'épilepsie ou la dépression, sont courantes pendant cette période et nécessitent la prescription d'un ou plusieurs médicaments. Or, la plus part de ces médicaments passent dans le lait et se retrouvent chez le nouveau-né. Il y a alors le risque d'une éventuelle activité pharmacologique chez l'enfant.

Actuellement, les déterminants du passage des médicaments dans le lait sont encore mal connus et peu d'informations sont disponibles dans la littérature quant aux quantités de substrats retrouvées dans le lait et quant aux risques liés à l'enfant. Pour de nombreux médicaments, les données concernant le passage dans le lait sont très sommaires et proviennent généralement d'observations cliniques éparses. Le manque d'uniformité dans les études réalisées sur le lait, ainsi que l'absence de certains paramètres essentiels, rendent difficile les comparaisons entre les différents cas rapportés et l'interprétation des données pour une évaluation générale.

La méthodologie présentée ci-dessous (cf. figure 14) constitue un outil structuré pour réaliser des études sur le passage des médicaments dans le lait maternel et sur les effets pharmacologiques chez le nouveau-né.

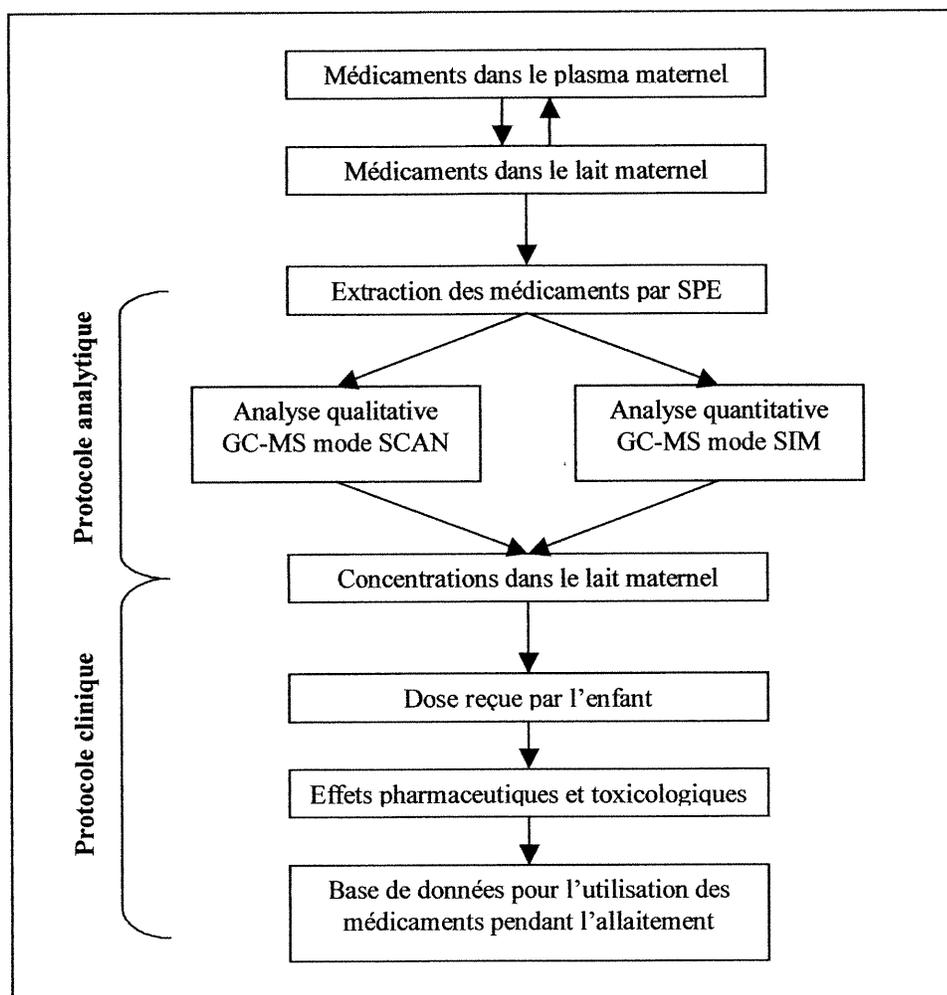


Figure 14 – Méthodologie pour la détermination du passage des médicaments dans le lait maternel.

Cette méthodologie comprend un protocole clinique qui permet de recueillir systématiquement les renseignements pertinents pour l'interprétation des mesures analytiques et une méthode de dosage générale qui offre la possibilité de qualifier et quantifier de nombreux médicaments utilisés pendant l'allaitement. La méthode de dosage ne se limite pas aux molécules choisies pour la mise au point mais peut facilement être utilisée ou adaptée à d'autres médicaments et à leurs métabolites.

L'utilisation conjointe de ces deux outils garantit une interprétation indépendante des conditions de l'étude clinique et permet la généralisation des résultats recueillis, pour former une base de données pertinente et utilisable pour le corps médical.

Cette méthodologie répond à un besoin important qui apparaît dans les études citées dans la littérature. Par exemple, dans le cas de l'étude du passage de la nifédipine dans le lait maternel réalisée par Manninen A.K. et al. [56], de nombreux paramètres relatifs aux prélèvements d'échantillons de lait sont manquants : mode d'expression du lait, sein prélevé, moment du prélèvement par rapport à la tétée, nombre de semaines de grossesse, etc. Ainsi, les concentrations mesurées dans le lait sont très variables d'un échantillon à l'autre (de 1 à 10.3 ng.mL⁻¹) et ne peuvent être corrélées aux doses reçues par l'enfant. Dans une autre étude, Borgatta L. et al. [57] évaluent le passage du diazépam dans le lait maternel. Beaucoup de paramètres, concernant les prélèvements de lait effectués et la méthode de dosage utilisée, ne sont pas décrits. Les échantillons de lait correspondent à un prélèvement par jour recueillis dans de conditions différentes. Ainsi, l'interprétation des résultats est très limitée et les auteurs ne peuvent calculer la dose reçue par l'enfant.

Pour les études à venir, l'utilisation de cette méthodologie structurée permettra de s'assurer de la qualité des mesures et de la pertinence des résultats. Elle facilitera l'interprétation clinique des effets chez le nouveau-né et les comparaisons entre les différentes études. Les résultats obtenus dans les projets pourront être rassemblés en une base de données générale indiquant les doses et les effets toxicologiques pour l'enfant.

RÉFÉRENCES

- [1] Wilson JT, Don Brown R, Don Cherek R, Dailey JW, Hilman B, Jobe PC, Manno BR, Manno JE, Redetki HM, Stewart JJ. Drug excretion in human breast milk. Principles, pharmacokinetics and projected consequences. *Clin. Pharmacokinet.* 5(1-66 (1980).
- [2] De Schuiteneer B, De Coninck B. Médicaments et allaitement. Guide de prescriptions des médicaments en période d'allaitement. *Arnette Blackwell, Paris*, (1995).
- [3] Lawrence RA. Breastfeeding. A guide for the medical profession. *The C.V. Mosby Compagny, St Louis*, (1994).
- [4] Riordan J, Auerbach KG. Breastfeeding in human lactation. *Jones and Bartlett Publishers, London*, (1993).
- [5] Bennett PN. Drugs and human lactation. *Elsevier Science Publisher B.V., New-York*, (1988).
- [6] Neville MC, Neifert MR. Lactation. Physiology, Nutrition, and Breast Feeding. *Plenum Press, New York*, (1983).
- [7] Jensen RG. The lipids of human milk. *CRC Press, Boca Raton*, (1989).
- [8] Ansell C, Moore A, Barrie H. Electrolyte and pH changes in human milk. *Pediatr. Res.* 11(1177-1179 (1977).
- [9] Hytten FE. Clinical and chemical studies in human lactation. *Br. Med. J.* 1(176-255 (1954).
- [10] Rocquelin G, Tapsoba S, Dop MC, Mbemba F, Traissac P, Prével YM. Lipid content and essential fatty acid (EFA) composition of mature congolese breast milk are

influenced by mothers' nutritional status : impact of infants' EFA supply. *Eur. J. Clin. Nutr.* 52(164-171 (1998).

[11] Pons G, Rey E, Matheson I. Excretion of psychoactive drugs into breast milk. *Clin. Pharmacokinet.* 27(4): 270-289 (1994).

[12] Catz CS, Giacoia GP. Drugs and breast milk. *Pediatr. Clin. North. Am.* 19(1): 151-166 (1972).

[13] Ramussen F, Linzell JL. The acetylation of sulfonilamide by mammary tissue of lactating goats. *Biochem. Pharmacol.* 16(918-919 (1967).

[14] Singer SJ. Architecture and topography of biologic membranes. *Hos. Pract.* 8(81-90 (1973).

[15] Yurchak AM, Jusko WJ. Theophylline secretion into breast ilk. *Pediatrics* 57(518-520 (1976).

[16] Matheson I, Sande HA, Gaillot J. The excretion of zopiclone into breast milk. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 30(267-271 (1990).

[17] Matheson I, Lunde PKM, Bredesen JE. Midazolam and nitrazepam in the maternity ward: milk concentrations and clinical effects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 30(787-793 (1990).

[18] Anderson PO. Drug use during breast feeding. *Clin. Pharm.* 10(594-624 (1991).

[19] Fleishaker JC, Desai N, Mc Namara PJ. Factor affecting the milk-plasma drug concentration ratio in lactating women: physical interactions with protein and fat. *J. Pharm. Sci.* 76(3): 189-193 (1987).

- [20] Ramussen F. Dietary lipids and postnatal development. *Raven Press, New-York*, (1973).
- [21] Atkinson HC, Begg EJ. Prediction of drug distribution into human milk from physicochemical characteristics. *Clin. Pharmacokinet.* 18(2): 151-167 (1990).
- [22] Ramussen F. Mammary excretion of sulphonamides. *Acta Pharmacol. & Toxicol.* 15(139-148 (1958).
- [23] Syverson GB, Ratjke SK. Drug distribution within human milk phases. *J. Pharm. Sci.* 74(10): 1071-1074 (1985).
- [24] Guyton AC. Textbook of medical physiology. *Saunders, Philadelphia*, (1986).
- [25] Eugster HP, Probst M, Wurgler FE, Sengstag C. Caffeine, estradiol, and progesterone interact with human CYP1A2. Evidence from cDNA-directed expression in *saccharomyces cerevisiae*. *Drug. Metab. Dispos.* 21(1): 43-49 (1993).
- [26] Bennett GD, Amore BM, Finnell RH, Wlodarczy B, Kalhorn TF, Skiles GL, Nelson SD, Slatery JT. Teratogenicity of carbamazepine-10,11-epoxide and oxcarbazepine in the SWV mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279(3): 1237-1242 (1996).
- [27] Loebstein R, Lalkin A, Koren G. Pharmacokinetics changes during pregnancy and their clinical relevance. *Clin. Pharmacokinet.* 33(5): 328-343 (1997).
- [28] Todd EL, Stafford DT, Bucovaz ET, Morrison JC. Pharmacokinetics of meperidine in pregnancy. *Int. J. Gynaecol. Obstet* 29(2): 143-146 (1989).
- [29] Nau H, Rating D, Koch S, Hauser I, Helge H. Valproic acid and its metabolites: placental transfer, neonatal pharmacokinetics, transfer via the mother milk and clinical

status in neonates of epileptic mothers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219(3): 768-777 (1981).

[30] Wilson JT, Brown RD, Hinson JL, Dailey JW. Pharmacokinetic pitfalls in the estimation of the breast milk/plasma ratio for drugs. *A. Rev. Pharmacol. & Toxicol.* 25(667-689 (1985).

[31] Picciano MF. What constitutes a representative human milk sample. *J. Pediatr. gastroenterol. Nutr.* 3(2): 280-283 (1984).

[32] Rossi DT, Wright DS. Analytical consideration for trace determinations of drugs in breast milk. *J. Pharm. Biomed. Ana.* 15(495-504 (1997).

[33] Wretling M. Excretion of oxazepam in breast milk. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 33(209-210 (1987).

[34] Bald R, Bernbeck-Betthäuser M, Spahn H, Mutschler E. Excretion of azapropazone in human breast milk. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 39(271-273 (1990).

[35] Moretti ME, Ito S, Koren G. Disposition of maternal ketoconazole in breast milk. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173(1625-1626 (1995).

[36] Steen B, Rane A, Lönnerholm G, Folk O, Elwin CE, Sjöqvist F. Phenytoin excretion in human breast milk and plasma levels in nursed infants. *Ther. Drug. Monit.* 4(4-): 331-334 (1982).

[37] Gonzalez AJ, Jiménez B, Hernández LM, Vidal-Adjar C, Place H. Use of a new HPLC stationary phase for one-step clean-up of human milk for PCDD, PCDF, and PCB analysis. *J. High. Resol. Chromatogr.* 16(129-130 (1993).

- [38] Ohkubo T, Uno T, Sugawara K. Determination of propylthiouracil in human breast milk by direct injection high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 14(14): 2745-2753 (1991).
- [39] Blanchard J, Weber CW, Shearer LE. HPLC analysis of methylxanthines in human breast milk. *J. Chromatogr. Sci.* 28(640-642 (1990).
- [40] Kearns GL, Johnson VA, Hendry IR, Wells TG. Microanalytical high-performance liquid chromatographic assay for cefpirome in human milk and urine. *J. Chromatogr.* 574(356-360 (1992).
- [41] Franke AA, Custer LJ. Diadzein and genistein concentrations in human milk after soy consumption. *Clin. Chem.* 42(6): 955-964 (1996).
- [42] Khachik F, Spangler CJ, Smith JC. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human breast milk and serum. *Anal. Chem.* 69(1873-1881 (1997).
- [43] Zeisler JA, Gaarder TD, De Mesquita SA. Lidocaine excretion in breast milk. *Drug Intelligence and Clinical Pharmacy* 20(691-693 (1986).
- [44] Smith MT, Livingstone I, Hooper WD, Eadie MJ, Triggs EJ. Propranolol, propranolol glucuronide, and naphthoxylactic acid in breast milk and plasma. *Ther. Drug. Monit.* 5(1): 87-93 (1983).
- [45] Wong SHY. Monitoring of drugs in breast milk. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 15(2): 100-105 (1985).
- [46] Stebler T, Guentert TW. Determination of diazepam and nordazepam in milk and plasma in the presence of oxazepam and temazepam. *J. Chromatogr.* 564(330-337 (1991).

- [47] Dusci LJ, Good SM, Hall RW, Ilett KF. Excretion of diazepam and its metabolites in human milk during withdrawal from combination high dose diazepam and oxazepam. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 29(123-126 (1990).
- [48] Ilett KF, Lebedevs TH, Wojnar-Horton RE, Yapp P, Roberts MJ, Dusci LJ, Hackett LP. The excretion of dothiepin and its primary metabolites in breast milk. *Br. J. Clin. Pharmac.* 33(635-639 (1993).
- [49] Kristensen JH, Ilett KF, Hackett LP, Yapp P, Paech M, Begg EJ. Distribution and excretion of fluoxetine and norfluoxetine in human milk. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 48(521-527 (1999).
- [50] Zavitsanos AP, MacDonald C, Bassoo E, Gopaul D. Determination of domperidone in human breast milk by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chrom. B* 730(9-24 (1999).
- [51] Gregg MR, Jack DB. Determination of timolol in plasma and breast milk using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.* 305(244-249 (1984).
- [52] Lorec AM, Bruguerolle B, Attolini L, Roucoules X. Rapid simultaneous determination of lidocaine, bupivacaine, and their two main metabolites using capillary gas-liquid chromatography with nitrogen phosphorus detector. *Ther. Drug. Monit.* 16(592-595 (1994).
- [53] White WB, Andreoli JW, Wong SH, Cohn RD. Atenolol in human plasma and breast milk. *Obstet. Gynecol.* 63(3): 42S-44S (1984).
- [54] Froescher W, Eichelbaum M, Niesen M, Dietrich K, Rausch P. Carbamazepine levels in breast milk. *Ther. Drug. Monit.* 6(3): 266-271 (1984).

- [55] Von Unruh GE, Froescher W, Hoffman F, Niesen M. Valproic acid in breast milk: how much is really there? *Ther. Drug. Monit.* 6(3): 272-276 (1984).
- [56] Manninen AK, Juhakoski A. Nifedipine concentrations in maternal and umbilical serum, amniotic fluid, breast milk and urine of mothers and offspring. *Int. J. Clin. Pharm. Res.* 11(5): 231-236 (1991).
- [57] Borgatta L, Jenny RW, Gruss L, Ong C, Barad D. Clinical significance of methohexital, meperidine, and diazepam in breast milk. *J. Clin. Pharmacol.* 37(186-192 (1997).
- [58] Shimoyama R, Ohkubo T, Sugawara K, Ogasawara T, Ozaki T, Kagiya A, Saito Y. Monitoring of phenytoin in human breast milk, maternal plasma and cord blood plasma by solid-phase extraction and liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Ana.* 17(863-869 (1998).
- [59] Moors M, Massart DL. Evaluation of solid-phase extraction of basic drugs from human milk. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9(2): 129-139 (1991).
- [60] Kasper S, Mattiuz EL, Swanson SP, Chiu JA, Johnson JT, Garner CO. Determination of olanzepine in human breast milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chrom. B* 726(203-209 (1999).
- [61] Dodd S, Buist A, Burrows GD, Maguire KP, Norman TR. Determination of nefazodone and its pharmacologically active metabolites in human blood plasma and breast milk by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 730(2): 249-255 (1999).
- [62] Kunka RL, Venkataramanan R, Stern RM, Ladik CF. Excretion of propoxyphene and norpropoxyphene in breast milk. *Clin. Pharmacol. Ther* 35(5): 675-680 (1984).

- [63] Tyrala EE, Dodson WE. Caffeine secretion into breast milk. *Arch. Dis. Child.* 54(787-800 (1979).
- [64] Ryu JE. Caffeine in human milk and in serum of breast-fed infant. *Dev. Pharmacol. Ther.* 8(329-337 (1985).
- [65] Blacker KH, Weinstein BJ, Ellman GL. Mother's milk and chlorpromazine. *Am. J. Psychiatry* 19(178-179 (1962).
- [66] Yoshida K, Smith B, Craggs M, Kumar RC. Neuroleptic drugs into breast milk - A study of pharmacokinetics and of possible adverse effects in breast fed infants. *Psychol. Med.* 28(1): 81-91 (1998).
- [67] Chasnoff IJ, Lewis DE, Squires L. Cocaine intoxication in a breast-fed infant. *Pediatrics* 80(836-838 (1987).
- [68] Findlay JWA, Deangelis RL, Kearney RF, Welch RM, Findlay JM. Analgesic drugs in breast milk and plasma. *Clin. Pharmacol. Ther* 29(625-633 (1981).
- [69] Briggs GG, Freeman RK, Yaffe SJ. Drugs in pregnancy and lactation. *Williams & Wilkins, Baltimore*, (1998).
- [70] Yoshida K, Smith B, Craggs M, Kumar R. Fluoxetine in breast milk and developmental outcome of breast fed infants. *Br. J. Psychiatry* 1998(175-179 (1998).
- [71] Pond SM, Kreek MJ, Tong TG, Raghunath J, Benowitz NL. Altered methadone pharmacokinetics in methadone maintained pregnant women. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 233(1-6 (1985).

- [72] Wojnar-Horton RE, Kristensen JH, Yapp P, Ilett KF, Dusci LJ, Hackett LP. Methadone distribution and excretion into breast milk of clients in a methadone maintenance program. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 44(6): 543-547 (1997).
- [73] Peiker G, Muller B, Noschel H. Excretion of pethidine in mother's milk. *Zentralbl. Gynakol.* 102(10): 537-541 (1980).
- [74] Kanto J. Risk-benefit assessment of anaesthetic agents in the puerperium. *Drug Saf.* 6(4): 285-301 (1991).
- [75] Arias IM, Gartner LM. Jaundice in breast-fed neonates. *JAMA* 218(5): 746 (1971).
- [76] Committee on drugs, American Academy of pediatrics. The transfer of drugs and other chemicals into human milk. *Pediatrics* 93(137-150 (1994).
- [77] Product Information. *Pharmacia & Upjohn, New Jersey*, (1998).
- [78] O'Brian TE. Excretion of drugs in human milk. *Am. J. Hosp. Pharm.* 31(844-854 (1974).
- [79] Ananth J. Side effects in the neonate from psychotropic agents excreted through breast-feeding. *Am. J. Psy.* 135(7): 801-805 (1978).
- [80] Mc Dowall MC. Sample preparation for biomedical analysis. *J. Chromatogr.* 492(3-58 (1989).
- [81] Liska I, Krupcik J, Leclercq PA. The use of solid sorbents for direct accumulation of organic compounds from water matrices - A review of solid-phase extraction techniques. *J. High. Resol. Chromatogr.* 12(9): 577-590 (1989).

- [82] Musch G, Massart DL. Isolation of basic drugs from plasma using solid-phase extraction with a cyanopropyl-bonded phase. *J. Chromatogr.* 432(209-222 (1988).
- [83] Musch G, Buelens Y, Massart DL. A strategy for determination of beta blockers in plasma using solid-phase extraction in combination with high-performance liquid-chromatography. *J. Pharm. Biomed. Ana.* 7(4): 483-497 (1989).
- [84] Lehrer M. The role of gas chromatography mass spectrometry - Instrumental techniques in forensic urine drug testing. *Clin. Lab. Med.* 18(4): 631-649 (1998).
- [85] Cretu G, Ionica M, Danet AF. GC/MS and GC/MS-MS systems utilization for analytical diagnosis in clinical toxicology. *Revista de chimie* 50(12): 839-846 (1999).
- [86] Maurer HH. Systemic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 580(1-2): 3-41 (1992).
- [87] Hopkins J, Marais M, Campbell S. Post-partum depression: a critical review. *Psychol. Bull.* 95(498-515 (1984).
- [88] Bader TF, Newman K. Amitriptyline in human breast milk. *Am. J. Psychiatry* 137(7): 855-856 (1980).
- [89] Winsner KL, Perel JM. Serum nortriptyline levels in nursing mothers and their infants. *Am. J. Psychiatry* 148(9): 1234-1236 (1991).
- [90] Pittard WB, O'Neal W. Amitriptyline excretion in human milk. *J. Clin. Psychopharmacol.* 6(6): 383-384 (1986).
- [91] Brixen-Rasmussen L, Halgrener J, Jørgensen A. Amitriptyline and nortriptyline excretion in human breast milk. *Psychopharmacology* 76(94-95 (1982).

[92] Jørgensen A. A gas chromatography method for the determination of amitriptyline and nortriptyline in human serum. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 36(79-90 (1975).

SECTION II

TESTS RESPIRATOIRES – PHÉNOTYPAGE DES CYP450 – MODIFICATIONS PENDANT LA GROSSESSE

INTRODUCTION

Au cours de la grossesse normale ou pathologique, l'activité hépatique de la femme varie, en particulier les réactions du métabolisme des médicaments dépendantes des CYP450.

Certaines pathologies comme l'épilepsie, l'hypertension, le SIDA, etc., nécessitent un traitement continu pendant la grossesse. D'autres pathologies liées à la grossesse, comme l'hypertension gestationnelle, la cholestase obstétricale et le diabète obstétrical ou l'hyperemesis gravidarum, nécessitent également l'utilisation de médicaments pendant cette période. Les anticonvulsivants, les antihypertenseurs, les antiviraux ou autres substrats qui peuvent être prescrits, voient ainsi leur métabolisme modifié par des mécanismes qu'il faut connaître pour limiter les risques tant pour la mère que le fœtus.

Les modifications associées au métabolisme sont conventionnellement évaluées par la détermination statique de paramètres biochimiques comme la mesure des taux plasmatiques de bilirubine, SGOT, albumine plasmatique, etc. Cependant, ces tests ne révèlent que l'étendue des dommages causés à l'hépatocyte, sans en prévenir l'apparition.

C'est pourquoi, l'utilisation de tests dynamiques mesurant les activités métaboliques est plus appropriée pour détecter et quantifier les modifications hépatiques. Ces tests permettent, d'une part, de prévoir le comportement des substrats pouvant être pris pendant la grossesse, via leur métabolisme, et d'autre part, de mettre en évidence et d'anticiper les dommages dus aux pathologies. Parmi ces tests, les mesures des rapports métaboliques d'une molécule cible dans les milieux biologiques et les tests respiratoires, constituent deux outils d'exploration fonctionnelle *in vivo* qui peuvent être facilement utilisés chez les femmes enceintes, puisqu'ils sont non invasifs. Suivant le choix du traceur, il est possible de mesurer des activités métaboliques spécifiques ou non spécifiques des CYP450.

Actuellement, la plus part des études sur les variations d'activités métaboliques hépatiques chez la femme enceinte, utilisent la comparaison des paramètres pharmacocinétiques entre les femmes enceintes et non enceintes, essentiellement

pendant le dernier trimestre de grossesse et les premières semaines d'allaitement. Dans ces conditions, il est particulièrement intéressant de valider des tests non invasifs d'exploration fonctionnelle métabolique *in vivo* pour l'évaluation et le suivi longitudinal des modifications du métabolisme hépatique au cours de la grossesse et la période post-partum.

La caféine est un substrat spécifique du CYP1A2 qui à faible dose peut être utilisée sans risque pour la mère et le fœtus. Le but de la présente étude est de valider l'utilisation de la caféine à travers le test respiratoire à la ¹³C-caféine (TRC) et la mesure des rapports métaboliques urinaires de la caféine pour mesurer les variations d'activité du CYP1A2 au cours de la grossesse et la période post-partum.

Ce projet comprend :

- La validation du TRC comme marqueur spécifique de l'activité du CYP1A2, chez des sujets sains ayant des activités métaboliques hépatiques induites ou inhibés,
- La mise au point d'une méthode analytique de dosage, permettant la quantification de la caféine et de ses métabolites dans les urines pour le calcul des rapports métaboliques urinaires de la caféine,
- La validation des rapports métaboliques urinaires de la caféine comme marqueurs spécifiques de l'activité du CYP1A2, chez des sujets sains ayant des activités métaboliques hépatiques induites ou inhibées.

PARTIE I

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1 : Analyse isotopique et tests respiratoires

1. Analyse isotopique

1.1. Description

L'analyse isotopique utilise l'abondance relative des différents isotopes des divers éléments comme source d'information des origines et des transformations de la matière. La spectrométrie de masse isotopique et les méthodes modernes de spectrométrie de masse en flux continu permettent de mesurer des variations infimes de composition isotopique d'isotopes stables du carbone, de l'azote, de l'oxygène, de l'hydrogène et du soufre.

Les domaines d'application de la spectrométrie de masse isotopique sont très nombreux. La géochimie, la pétrochimie, l'analyse environnementale et les sciences de la terre, utilise ces techniques entre autre pour la datation, le traçage, l'authentification d'origine et de propriété [1,2]. Plus récemment, l'augmentation des performances analytiques et la possibilité de mettre au point des méthodes non invasives utilisant les isotopes stables, ont ouvert les portes de la spectrométrie de masse isotopique au domaine biomédical, à des fins de diagnostic et d'exploration fonctionnelle [3,4].

[5]

1.2. Avantages des isotopes stables

A l'état naturel, sur la terre, les isotopes stables sont présents dans la matière dans des proportions connues (cf. tableau I). Les échantillons qui sont utilisés en analyse chimique et biochimique possèdent donc des teneurs 'naturelles' en isotopes stables. Ils peuvent être aussi enrichis.

Elément	Masse Atomique	Abondance relative
¹ H	1.000783	99.985
² H	2.01410	0.015
¹² C	12.00000	98.89
¹³ C	13.00335	1.11
¹⁴ N	14.00307	99.63
¹⁵ N	15.00011	0.37
¹⁶ O	15.99491	99.759
¹⁷ O	16.99914	0.037
¹⁸ O	17.99916	0.204

Tableau I – Abondance relative des principaux éléments retrouvés dans les composés organiques.

Le marquage d'une molécule se fait de façon spécifique et quantitative :

- des réactions chimiques spécifiques permettent le marquage d'un ou plusieurs sites précis de la molécule.
- le taux d'incorporation d'isotope tend généralement vers 100%. Il est connu avec précision.

Contrairement aux isotopes radioactifs, les isotopes stables sont sans danger pour les individus et pour l'environnement. Les molécules marquées par ces isotopes stables constituent donc d'excellents traceurs et marqueurs biologiques qui peuvent être utilisés dans des protocoles cliniques concernant des populations à risques.

Le marquage isotopique n'induit pas de toxicité, ni d'embryotoxicité intrinsèque, pour la plupart des isotopes stables [6-8]. Cependant, dans le cas du deutérium, il existe des effets isotopiques qui modifient l'activité biologique du substrat, en raison de la différence de masse importante entre H et ²H [9,10]. En effet, la longueur et la force de la liaison de C-D sont supérieures à celles de la liaison C-H, ce qui entraîne des modifications cinétiques dans les réactions chimiques au niveau des groupements fonctionnels marqués. D'autre part, ²H étant plus petit que H, la liposolubilité du substrat marqué est plus faible que celle du substrat non-marqué.

Pour les isotopes plus lourds (^{13}C , ^{15}N , etc.), les effets isotopiques dans les processus enzymatiques, cellulaires ou physiologiques, sont négligeables, car la différence de masse entre l'élément et son isotope est relativement faible [11].

[12]

1.3. Techniques en analyse isotopique

L'analyse des isotopes stables peut-être réalisée par la Spectrométrie de Masse traditionnelle (MS) ou la Spectrométrie de Masse Isotopique (IRMS) (cf. figure 1 et tableau II).

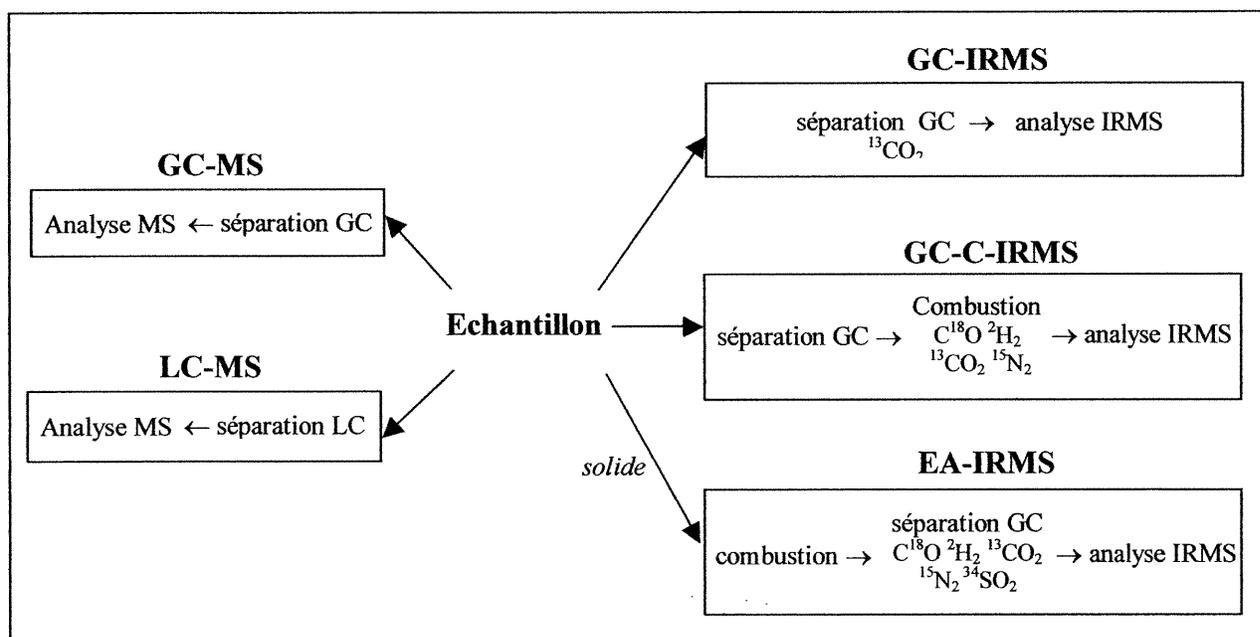


Figure 1 – Schéma des différentes techniques pour l'analyse des isotopes stables. GC : Chromatographie en phase gazeuse, LC : Chromatographie en phase Liquide, C : Combustion, EA : Analyse Élémentaire, MS : Spectrométrie de Masse, IRMS : Spectrométrie de Masse Isotopique d'après Douthitt [13].

L'IRMS permet de mesurer, de façon très précise et très exacte, des variations d'abondance isotopique naturelle des isotopes du C, O, H, N, S et moins fréquemment du Cl, Si et Se. Le spectromètre de masse isotopique est conçu pour analyser des espèces moléculaires gazeuses simples comme le CO_2 , N_2 , SO_2 , CO , etc. Le couplage de l'IRMS

avec des techniques chromatographiques permet d'analyser des échantillons liquides et gazeux (GC-IRMS) ou solides après combustion (GC-C-IRMS).

[13]

	<u>IRMS</u>	<u>GC-MS</u>
Analyte	CO ₂ , N ₂ , CO, H ₂	pure compound
Flow into source	0.3 mL He.min ⁻¹	1 mL He.min ⁻¹
Ion source	EI	EI/CI
Analyser	Sector	Quadrupole or ion trap
Detector	3-8 faraday cups	1 electron multiplier
Measured	¹³ C/ ¹² C	M+1/M
	¹⁵ N/ ¹⁴ N	M+1/M
	¹⁸ O/ ¹⁶ O	M+2/M
	D/H	M+1/M
Precision ‰	0.2-3 ‰	1000-50 ‰

Tableau II - Comparaison de la GC-MS et de l'IRMS d'après Douthitt [13].

1.4. Analyse isotopique appliquée au domaine biomédical

Les isotopes stables sont de plus en plus utilisés dans le domaine biomédical principalement parce qu'ils sont non radioactifs et donc sans danger dans les protocoles cliniques concernant les populations à risques ou les populations protégées, comme les femmes enceintes, les nouveau-nés, les enfants.

Les molécules marquées au ¹³C, ¹⁵N, ¹⁸O constituent d'excellents traceurs biologiques dont les effets isotopiques sont négligeables. Ces traceurs sont utilisés dans de nombreux domaines pharmaceutiques [11]:

- étude des interactions protéine-ligand,
- bilan de masse,

- identification et caractérisation de métabolites,
- étude d'absorption des médicaments et de bioéquivalence,
- étude de distribution des médicaments,
- étude des mécanismes de bio-transformation et d'élimination (études pharmacocinétiques et du métabolisme des tissus),
- étude des interactions médicamenteuses.

2. Tests respiratoires

Les tests respiratoires constituent un outil de diagnostic non invasif pour la médecine clinique. Ils ont été développés pour simplifier les tests traditionnels d'exploration fonctionnelle qui souvent nécessitent une intubation ou le prélèvement d'échantillons de tissu, de sang, de fèces, etc. [14]. A l'origine, les tests respiratoires utilisaient le ^{14}C . Aujourd'hui, le ^{14}C a été remplacé par le ^{13}C pour des raisons évidentes d'absence de toxicité et de facilité d'utilisation. Les tests respiratoires permettent de mesurer de façon spécifique ou non spécifique l'activité métabolique de certains organes.

2.1. Description

Le concept des tests respiratoires est basé sur l'administration d'un substrat marqué généralement au ^{13}C . Ce substrat subit un métabolisme qui conduit à la formation de CO_2 marqué, éliminé ensuite dans les gaz expirés. L'enrichissement du gaz expiré en $^{13}\text{CO}_2$ est mesuré par GC-IRMS. Des informations sur l'intégrité ou l'activité du système biologique considéré sont obtenues à partir des corrélations entre les cinétiques d'élimination du $^{13}\text{CO}_2$ et la capacité fonctionnelle du système. Le substrat agit donc comme un marqueur du système biologique étudié.

Par exemple, il est possible de décrire la déméthylation d'un substrat *N*-méthylé par les CYP450, à partir de l'analyse du CO_2 produit dans le métabolisme (cf. figure 2). Le

substrat subit une déméthylation oxydative par les CYP450 pour former les métabolites et le ^{13}C -formaldéhyde, qui par la suite est transformé en ^{13}C -formate. L'oxydation de ^{13}C -formate, principalement suivant la voie du folate, méthionine dépendante, conduit à la formation de $^{13}\text{CO}_2$ qui est éliminé en partie par exhalation.

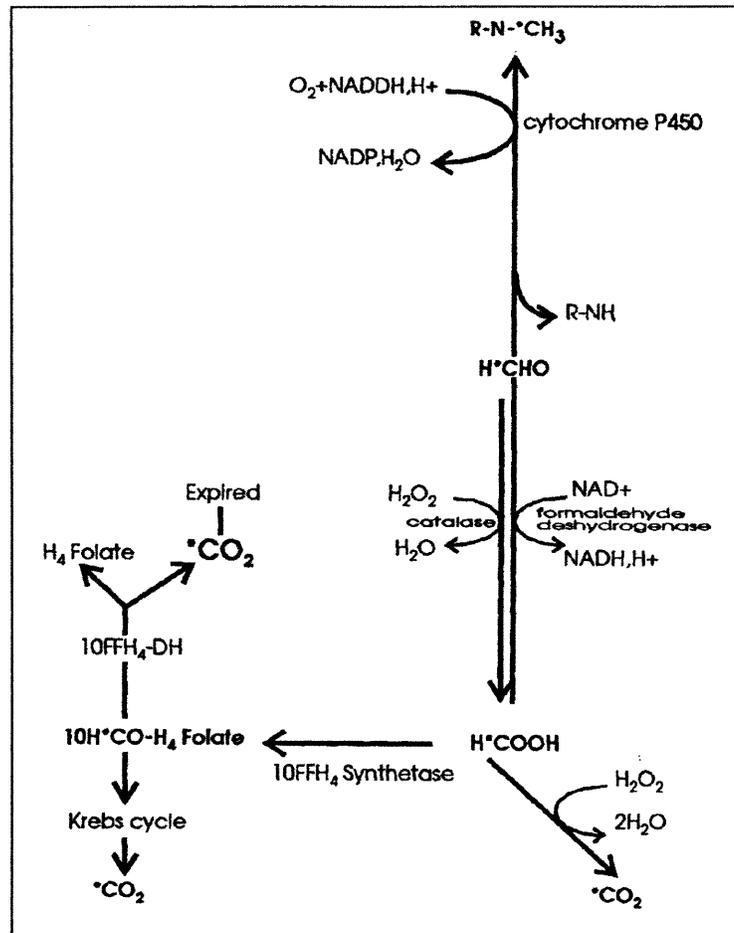


Figure 2 – Production de $^{13}\text{CO}_2$ après déméthylation d'un substrat marqué au ^{13}C ($\text{R-N-}^{13}\text{CH}_3$) par le CYP450 d'après Browne [11].

2.2. Spectrométrie de masse isotopique en flux continu

L'enrichissement en $^{13}\text{CO}_2$ du gaz expiré lors du test respiratoire est mesuré par IRMS en flux continu (cf. figure 3).

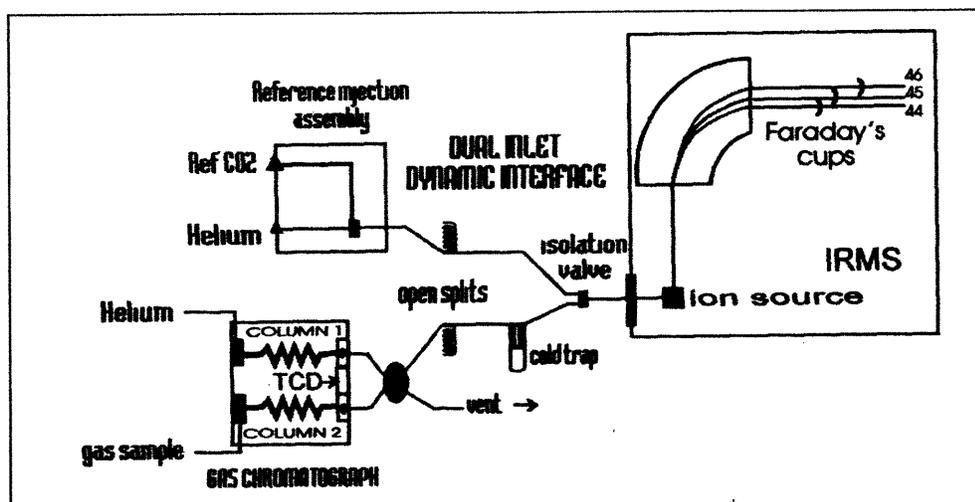


Figure 3 – Schéma du spectromètre de masse isotopique en flux continu équipé d'un Chromatographe en phase gazeuse et un détecteur à conductivité thermique pour la séparation des gaz et une interface à double entrée dynamique d'après Browne [11].

Les échantillons de gaz sont d'abord déshydratés, par passage sur une membrane, pour éviter la formation de CO_2H^+ dans le spectromètre de masse. Les différents gaz contenus dans l'échantillon (CO_2 , H_2 , O_2 , etc.) sont séparés par GC. Seul le CO_2 entre dans l'IRMS par le biais d'une valve située à l'entrée de l'appareil.

L'IRMS est ajusté pour analyser les isotopomères majoritaires du $^{13}\text{CO}_2$:

- m/z 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$)
- m/z 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$)
- m/z 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$, $^{12}\text{C}^{17}\text{O}_2$)

Dans le spectromètre de masse, les différents faisceaux d'ions traversent un champ magnétique constant et sont accélérés avec un voltage approprié dans une cage de Faraday. Une double entrée à la source du spectromètre permet l'analyse simultanée de l'échantillon et d'un gaz de référence dont la teneur en $^{13}\text{CO}_2$ est connue [15]. La mesure des trois faisceaux d'ions aux masses m/z 44, 45 et 46 permet le calcul de l'enrichissement (δ) isotopique en ^{13}C de l'échantillon, par rapport au gaz de référence suivant l'équation :

$$\delta^{13}C \text{ (‰)} = \left(\frac{{}^{13}C/{}^{12}C \text{ échantillon}}{{}^{13}C/{}^{12}C \text{ référence}} - 1 \right) \times 1000$$

La référence internationale utilisée est le Pee Dee Belemnite (PDB), un fossile dont le rapport ${}^{13}C/{}^{12}C$ est 0.011237. Par rapport au PDB, les composés naturels ont une valeur de δ ‰ négative. Au laboratoire, l'IRMS est calibré avec du CO_2 de référence dont l'enrichissement en ${}^{13}C$ est connu et étalonné par rapport à celui du PDB.

Dans l'équation décrite ci-dessus, le rapport ${}^{13}C/{}^{12}C$ est calculé à partir des abondances des ions m/z 44, 45 et 46 en utilisant les équations de Craig de façon à tenir compte de la présence de ${}^{17}O$ et ${}^{18}O$ [16]:

$$\delta^{13}C = 1.0676 \times \delta 45 - 0.0338 \times \delta^{18}O$$

$$\delta^{18}O = 1.0010 \times \delta 46 - 0.0021 \times \delta^{13}C$$

Exemple de calcul :

Soit un gaz de référence dont $\delta^{13}C = -38.82$ et $\delta^{18}O = -28.62$, par rapport au PDB.

Les équations de Craig permettent de calculer $\delta 45_{\text{référence/PDB}}$ et $\delta 46_{\text{référence/PDB}}$ pour ce gaz :

$$\delta 45_{\text{référence/PDB}} = \frac{(\delta^{13}C + 0.0338 \times \delta^{18}O)}{1.0676} = -37.27$$

$$\delta 46_{\text{référence/PDB}} = \frac{(\delta^{18}O + 0.0021 \times \delta^{13}C)}{1.0010} = -28.67$$

Supposons que pour un échantillon donné, les abondances des ions m/z 45 et 46 par rapport au gaz de référence choisi ci-dessus soient : $\delta 45_{\text{échantillon/référence}} = 10$ et $\delta 46_{\text{échantillon/référence}} = -2$.

L'équation suivante permet de calculer $\delta_{\text{échantillon/PDB}}$:

$$\delta_{\text{échantillon/PDB}} = (\delta_{\text{échantillon/référence}} \times \delta_{\text{référence/PDB}}) \times 1000 + \delta_{\text{référence/PDB}} + \delta_{\text{échantillon/référence}}$$

Ainsi :

$$\delta_{45\text{échantillon/PDB}} = -27.64$$

$$\delta_{46\text{échantillon/PDB}} = -30.61$$

Les abondances en ^{13}C et ^{18}O de l'échantillon par rapport au PDB sont calculées selon les équations de Craig :

$$\delta^{13}\text{C} = 1.0676 \times \delta_{45} - 0.0338 \times \delta_{46} = -28.48$$

$$\delta^{18}\text{O} = 1.0010 \times \delta_{46} - 0.0021 \times \delta_{45} = -30.59$$

Les calculs d'abondances isotopiques sont généralement effectués par le logiciel d'utilisation de l'IRMS. Le spectromètre de masse isotopique permet de mesurer des variations d'enrichissement de façon très précise ($\pm 0.2 \delta \text{ ‰}$) sur des échantillons contenant aussi peu que 10 nanomoles de CO_2 [17].

2.3. Utilisations des tests respiratoires

Les tests respiratoires sont une alternative particulièrement intéressante aux tests traditionnels d'exploration fonctionnelle, puisqu'ils sont non invasifs (ingestion orale du substrat, pas de prélèvements d'échantillons de sang, d'urine ou de tissu). Ils sont utilisés préférentiellement chez les patients à risques, comme les nouveau-nés, les enfants ou les femmes enceintes.

De nombreux tests respiratoires, utilisant des substrats marqués au ^{13}C , ont été développés pour évaluer différentes fonctions biologiques et diagnostiquer certaines infections (cf. tableau III). Ils permettent entre autre l'évaluation de :

- Infection par l'helicobacter pylori
 ^{13}C -urée
- Fonction métabolique hépatique (CYP450, induction et inhibition)
 ^{13}C -aminopyrine, ^{13}C -caféine, ^{13}C -méthacétine, acide ^{13}C -cétoisocaproïque,
 ^{13}C -érythromycine
- Vidange gastrique
 ^{13}C -bicarbonate, acide ^{13}C -octanoïque, ^{13}C -xylose
- Fonction exocrine du pancréas
 ^{13}C -triglycérides mixtes, ^{13}C -tioléine

Substrate	Function tested	Reference
¹³ C-aminopyrine	hepatic - CYP450	[18]
¹³ C-methacetin	hepatic - CYP450	[19]
¹³ C-caffeine	hepatic - CYP1A2	[20,21]
¹³ C-phenacetin	hepatic - CYP1A2 & CYP2E1	[22]
¹³ C-erythromycin	hepatic - CYP3A	[23]
¹³ C diazepam	hepatic - CYP2C19	[24]
¹³ C-galactose	hepatic	[25]
¹³ C-ketoisocaproic acid	hepatic / cholostatic	[26]
¹³ C-urea	helicobacter infection	[27,28]
¹³ C-bicarbonate	gastric emptying	[29,30]
¹³ C-mixedtriglycerides	intestinal lipase activity	[31]
¹³ C-trioctanoic acid	maldigestion, metabolism, gastric emptying	[32,33]
¹³ C-triolein	maldigestion, metabolism	[34]
¹³ C-glycocholic acid	bile acid malabsorption, bacterial overgrowth	[35]
¹³ C-xylose	Small bowel bacterial overgrowth	[36]
¹³ C-glucose	absorption, metabolism	[37]
¹³ C-sucrose	absorption, metabolism, sucrose intolerance	[38]
² H ¹³ C-lactose	maldigestion, lactose intolerance	[37]
¹³ C ¹⁵ N-ureide lactose	Oro-coecal transit	[39]
¹³ C-leucine	protein metabolism	[40,41]
² H ₂ ¹⁸ O	Energy expenditure	[42,43]

Tableau III – Les différents tests respiratoires au ¹³C d'après Rating et al. [44].

D'autres éléments marqués comme ²H, ¹⁸O et ¹⁵N sont utilisés dans les tests respiratoires (cf. tableau III). L'eau doublement marquée conduit à l'estimation de la dépense énergétique sur des temps très courts. Le lactose ¹³C-¹⁵N-uréide permet de mesurer le temps de transit oro-coecal. Ce dernier test met en jeu la détermination de l'enrichissement en ¹³CO₂ et de l'azote ¹⁵N urinaire par GC-C-IRMS.

Chapitre 2 : Tests respiratoires et métabolisme hépatique

1. Introduction

Le foie est le principal organe impliqué dans le métabolisme des substances endogènes et exogènes. La diversité et la complexité du foie rendent difficile les évaluations fonctionnelles d'intégrité et d'activité. De nombreux mécanismes de bio-transformation dans le foie impliquent les CYP450. L'activité de ces CYP450 peut être altérée par des pathologies hépatiques, des polymorphismes génétiques ou des interactions médicamenteuses qui entraînent des phénomènes d'induction et d'inhibition.

Les tests respiratoires permettent d'accéder à l'activité de ces systèmes mono-oxygénase et d'explorer la fonction métabolique hépatique. Les changements d'activité enzymatiques dus aux inductions ou aux inhibitions sont mesurés par ces tests par le biais de modifications dans le métabolisme du traceur marqué.

2. CYP450

Les CYP450 constituent une importante super-famille d'hémoprotéines à fonction de mono-oxygénase dont plus de 500 enzymes différentes ont été identifiées et caractérisées. Les CYP450 se retrouvent majoritairement dans le foie et sont responsables de la détoxification des médicaments et des composés naturels mais aussi, pour certains, de leur activation (cf. tableau IV). Les familles d'enzymes, CYP1 à CYP4, interviennent dans le métabolisme des xénobiotiques (cf. tableau V).

CYP450	Tissus	CYP450	Tissus
1A1	Nombreux	2C19	Foie
1A2	Foie	2D6	Foie, intestin, rein, cerveau
2A6	Foie	2E1	Foie, intestin, leucocytes
2A7	Foie	2F1	Poumon
2B6	Foie	3A3	Foie
2B7	Poumon	3A4	Foie, tractus gastro-intestinal
2C8	Foie, intestin	3A5	Foie, placenta
2C9	Foie, intestin	3A7	Foie (fœtal)
2C17	Foie	4B1	Poumon
2C18	Foie		

Tableau IV – Localisation tissulaire chez l’homme des CYP450 impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques d’après Gonzalez et al. [45].

Enzymes CYP450	Taux d’enzymes (% du total)	variabilité
<u>1A2</u>	~ 13	~ 40 fois
1B1	< 1	
<u>2A6</u>	~ 4	~ 30 – 400 fois
<u>2B6</u>	~ < 1	~ 50 fois
2C	~ 18	de 25 à 100 fois selon l’enzyme
<u>2D6</u>	Jusqu’à 2.5	> 1000 fois
<u>2E1</u>	Jusqu’à 7	
2F1		
2J2		
<u>3A4</u>	Jusqu’à 28	~ 20 fois
4A		
4F		

Tableau V – Enzymes des CYP450 impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques dans le foie. En gras : enzymes impliquées dans le métabolisme de nombreux médicaments. En souligné : enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments les plus courants, avec des effets toxiques possibles d’après Rendic et al. [46].

Parmi ces sous-familles, les CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1 et CYP3A4 participent au métabolisme d'un grand nombre de substrats [46]:

- CYP1A2
caféine, phénacétine, acétaminophène, (R)-Warfarine
- CYP2D6
Codéine, dextrométhorphan, débrisoquine, spartéine
- CYP2E1
Acétaminophène, halothane, dapsone, chlorzoxazone
- CYP3A4
Carbamazépine, cortisol, diazépam, érythromycine, midazolam, nifédipine, oméprazole

2.1. Activité des CYP450

Les CYP450 catalysent une très grande variété de réactions (cf. figure 4), essentiellement des réactions spécifiques d'oxydation comme l'hydroxylation du carbone, l'oxygénation d'un hétéro-atome, la libération d'un hétéro-atome ou l'oxydation d'un système insaturé.

Toutes les réactions ont en commun l'insertion d'un groupement hydroxyle sur le substrat pour former un intermédiaire hydroxylé, qui peut ensuite subir une déalkylation, une déamination, une déhalogénéation, etc. [47]. Cette hydroxylation s'inscrit dans le cycle catalytique des CYP450, qui met en jeu le NADPH en présence d'oxygène (cf. figure 5).

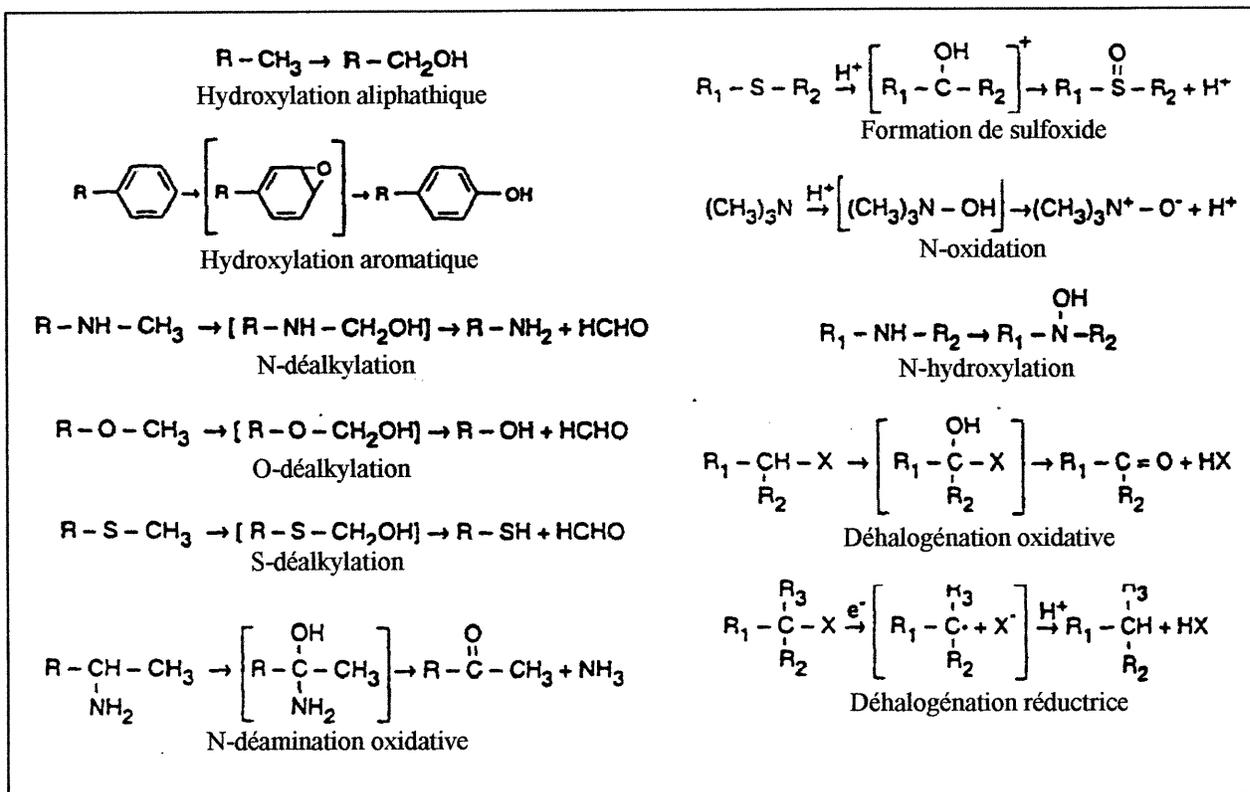


Figure 4 – Exemples de réactions catalysées par les CYP450 d'après Schuler et al. [48].

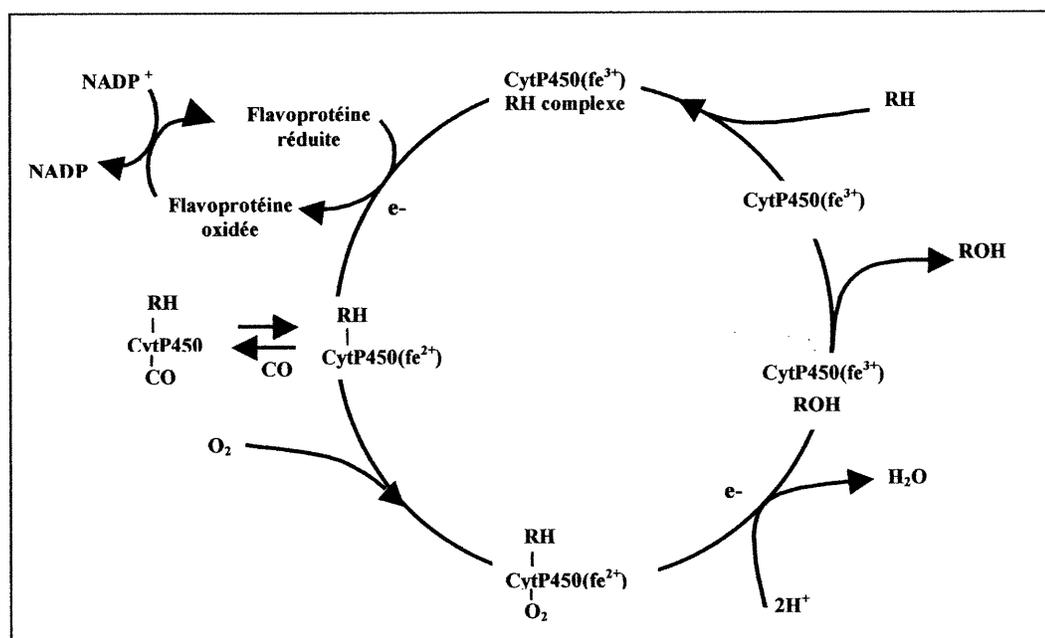


Figure 5 – Cycle catalytique des CYP450.

2.2. Induction des CYP450

La superfamille des CYP450 comprend des enzymes exprimées de manière constitutive, et d'autres au contraire, qui ne sont exprimées qu'en réponse à un stimulus du à un inducteur hormonal ou chimique. L'induction fait appel à plusieurs mécanismes [49]:

- activation de la transcription du gène codant pour l'enzyme,
- stabilisation de l'ARNm, ce qui entraîne une augmentation de la traduction,
- stabilisation de la protéine.

Une grande variété d'agents chimiques peut induire le métabolisme des xénobiotiques. Les inducteurs se classent en cinq catégories [50]:

- Les hydrocarbures polycycliques (aromatiques), dont le 3-méthylcholantène, le benzo(α)pyrène et ses dérivés, et la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) induisent les CYP1A1 et CYP1A2 suivant un processus transcriptionnel [49].
- Les barbituriques, particulièrement le phénobarbital, induisent les cytochromes des sous-familles 2A, 2B et 2C par activation transcriptionnelle. D'autres produits tels que les pesticides organochlorés, les biphényles polychlorés, les oxydes du transtilbène, etc. possèdent des propriétés inductrices similaires au phénobarbital [51].
- L'éthanol et de nombreuses molécules de faible poids moléculaire (pyrazole, acétone, izoniazide, pyridine, benzène, etc.) ont la capacité d'induire le CYP1E1, suivant un processus de stabilisation de l'ARNm [52].
- Le CYP3A est induit par les glucocorticoïdes comme la dexaméthasone et prégénolone 16 α -carbonitrile [53]. C'est le résultat d'une activation de la

transcription de l'ARNm. Les glucocorticoïdes induisent plus faiblement les CYP2B.

- Le clofibrate a la propriété d'induire les CYP4A, selon un mécanisme transcriptionnel [54]. D'autres produits comme les herbicides chlorés et les phtalates induisent aussi les CYP4A.

2.3. Inhibition des CYP450

Les différentes étapes du cycle catalytique des CYP450 sont des cibles potentielles pour les inhibiteurs. Il existe trois sortes d'inhibition [55,56]:

- *l'inhibition réversible*
Les inhibiteurs réversibles entrent en compétition avec le substrat. Ils se lient au CYP450 au niveau du domaine hydrophobe, au niveau de l'atome de fer ou sur des sites spécifiques par des liaisons hydrogènes ou des interactions ioniques. La 7,8-benzoflavone pour les CYP1A1 et CYP1A2, le sulfaphénazole pour le CYP2C9 et la quinidine pour le CYP2D6 font partie de cette catégorie d'inhibiteurs.
- *l'inhibition irréversible par complexation d'un métabolite intermédiaire*
Certaines molécules peuvent être converties par les CYP450 en composés fortement inhibiteurs. Ces métabolites intermédiaires maintiennent les CYP450 dans un état catalytique non fonctionnel et stable. Les alkylamines, les hydrazines et les dérivés méthylènedioxybenzènes sont des inhibiteurs de cette catégorie.
- *l'inhibition par inactivation auto-catalytique*
L'inactivation auto-catalytique conduit à une modification irréversible des CYP450. L'enzyme est alkylée par un intermédiaire radicalaire qui provient de la

transformation de l'inhibiteur par le CYP450 lui-même. C'est le cas des oléfines, des acétylènes, des dihydropyridines pour les CYP450 et du chloramphénicol pour les CYP2B1, CYP2C6, et CYP2C11.

3. Phénotypage des CYP450

Plusieurs tests biochimiques, en particulier la mesure des paramètres biochimiques sanguins (aminotransférases, bilirubine, etc.) et la mesure du débit sanguin hépatique, sont utilisés pour détecter des pathologies hépatiques [57]. L'analyse génétique moléculaire (génotypage) des gènes codant pour les CYP450 est réalisée pour classer les sujets en métaboliseurs faibles, modérés et forts [57]. Ces tests permettent d'évaluer respectivement l'intégrité globale des cellules du foie et de détecter un polymorphisme génétique au niveau des enzymes du métabolisme des médicaments, mais ils ne reflètent pas la capacité métabolique enzymatique *in vivo*, à un moment donné, dans des conditions données. Seul le phénotypage permet de déterminer un niveau de fonctionnement des enzymes du métabolisme des médicaments à un moment donné. Les tests qui étudient la cinétique métabolique de substrats des CYP450, comme les tests respiratoires et les tests mesurant les rapports métaboliques sanguins ou urinaires, donnent accès directement à l'activité *in vivo* de ces enzymes et permettent de prévoir le métabolisme d'autres substances médicamenteuses vis à vis de ces mêmes enzymes. Les tests respiratoires sont capables de mettre en évidence des inductions ou des inhibitions des CYP450.

Par exemple, l'administration de 3-méthylcholanthrène, qui est un puissant inducteur du CYP1A2, modifie de façon significative les résultats du test respiratoire à la ¹³C caféine (cf. figure 6).

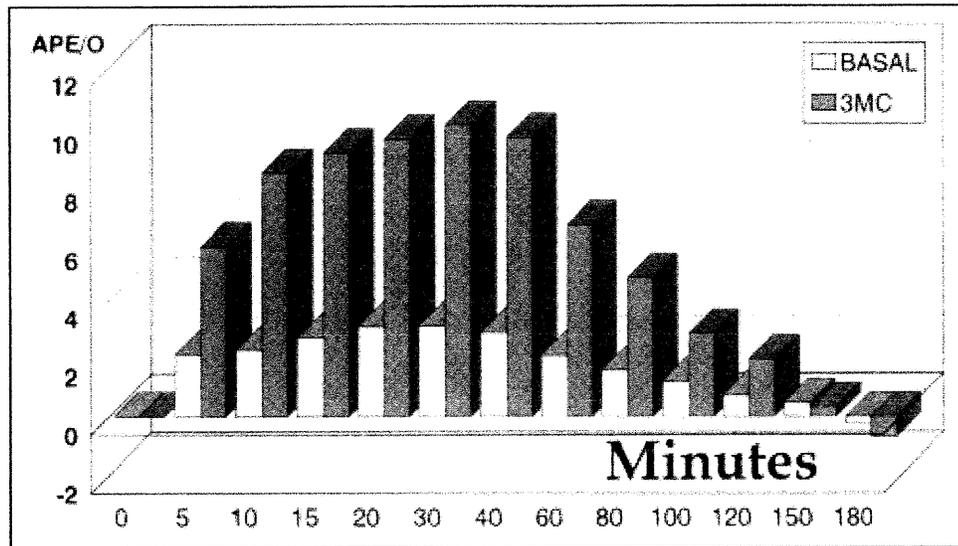


Figure 6 – Cinétique du $^{13}\text{CO}_2$ expiré par le rat après administration de $1,3,7\text{-}^{13}\text{C}_3$ -caféine, avant et après une injection de 3-méthylcholanthrène d'après Browne et al. [11].

De la même façon, le test respiratoire à l'aminopyrine est modifié significativement par l'administration de tétrachlorométhane (CCl_4), qui est un inhibiteur irréversible des CYP450 (cf. figure 7). Les enzymes retrouvent un niveau d'activité basal au bout de 7 jours seulement car le processus de réactivation met en jeu le processus de synthèse de nouvelles enzymes.

Parmi les substrats utilisés comme marqueur de l'activité des CYP450, certains sont non spécifiques et d'autres spécifiques des cytochromes comme le CYP1A2, CYP3A, CYP2E1 (cf. tableau III) [58].

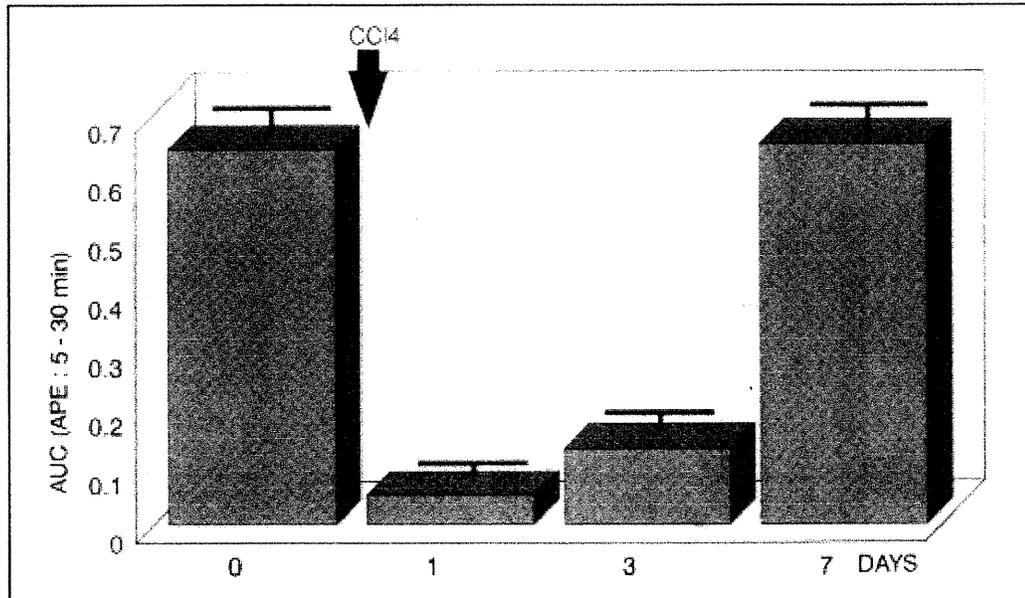


Figure 7 – Effet de l'administration de CCl_4 sur le test respiratoire à l'aminopyrine. Des tests successifs ont été réalisés avant (0) et 1, 3, 7 jours après l'administration de CCl_4 (n=10). Les valeurs d'aire sous la courbe $\delta\% = f(t)$ entre 5 et 30 min ont baissé de 92% au jour 1, 78% au jour 3 et sont retourné à la valeur initiale (0) au jour 7 d'après Mion et al.[59].

3.1. Tests respiratoires non sélectifs

3.1.1. Aminopyrine

Le métabolisme de l'aminopyrine comprend deux N-déméthylations qui impliquent plusieurs enzymes des CYP450, en particulier le CYP1A2 et les CYP3A3/4 [60,61]. La quantité de $^{13}\text{CO}_2$ exhalée lors du test respiratoire à la ^{13}C -aminopyrine (TRA) fournit une évaluation indirecte de la vitesse de N-déméthylation hépatique, et par conséquent de l'activité des CYP450 [62]. Les résultats du TRA ont été corrélés à la quantité de CYP450 chez le rat [63] et à la masse fonctionnelle hépatique chez l'humain [18].

Ainsi, le TRA est utilisé pour mesurer l'activité des CYP450 *in vivo* et diagnostique des dysfonctionnements hépatiques.

Il permet de contrôler le développement de cirrhose et les variations de la masse fonctionnelle hépatique [64,65] et également d'évaluer les risques des patients atteints de pathologie du foie [66].

3.1.2. Phénacétine

Le test respiratoire à la ^{13}C -phénacétine (TRP) a été développé comme une alternative au TRA, pour mesurer l'activité des CYP450 et évaluer les dommages dus aux maladies hépatiques [22,67]. Le métabolisme de la phénacétine comprend une déalkylation par les CYP450 comme l'aminopyrine. Cependant le métabolisme et la clairance de ces deux substrats sont différents. Des études réalisées chez le rat et l'humain ont démontré que le TRP est aussi sensible que l'ABT mais que ces deux test sont faiblement corrélés, probablement parce qu'ils mesurent des paramètres hépatiques différents [68].

3.1.3. Méthacétine

Le métabolisme de la méthacétine consiste en une *O*-déalkylation rapide par les enzymes des microsomes hépatiques pour former l'acétaminophène. Comme le TRA, le test respiratoire à la ^{13}C -méthacétine (TRM) permet de mesurer l'activité globale des CYP450 [69] et d'évaluer les dommages causés par des dysfonctionnements hépatiques chroniques ou des cirrhoses [70,71].

3.2. Tests sélectifs

3.2.1. Erythromycine

Les CYP3A sont les enzymes les plus abondantes des CYP450 (30% en moyenne de l'activité des CYP450 du foie) et elles participent au métabolisme d'un très grand

nombre de médicaments. Le test respiratoire à l'érythromycine (TRE) mesure l'activité *in vivo* des CYP3A3/4 qui sont responsables de la *N*-déméthylation du substrat [72,73]. Il a été démontré que le TRE est sélectif vis à vis de ces cytochromes [74,75]. Contrairement à d'autres tests respiratoires, l'érythromycine est administrée par injection intraveineuse. Dans la littérature, seule la ¹⁴C-érythromycine est utilisée, car le substrat marqué au ¹³C est très coûteux. Il est très souhaitable que dans l'avenir le coût de la ¹³C-érythromycine soit rendu plus accessible car le TRE est le seul test respiratoire spécifique des CYP3A3/4.

3.2.2. Caféine

La caféine est largement utilisée pour phénotyper les enzymes responsables du métabolisme des médicaments, en particulier le CYP1A2 [57]. En effet, le métabolisme de la caféine est catalysé essentiellement par le CYP1A2 [76]. Le test respiratoire à la ¹³C-caféine (TRC) permet de mesurer l'activité *in-vivo* de ce cytochrome [77]. L'activité du CYP1A2 est également évaluée par la mesure des rapports métaboliques urinaires de la caféine ou la mesure de la concentration de la caféine dans la salive et le plasma [78,79].

Chapitre 3 : Métabolisme des médicaments pendant la grossesse et la période post-partum

1. Modifications de la pharmacocinétique des médicaments pendant la grossesse

De nombreuses fonctions physiologiques sont modifiées de façon importante pendant la grossesse et la période post-partum. Ces changements affectent les paramètres pharmacocinétiques des médicaments et modifient potentiellement leurs concentrations aux niveau des sites actifs (cf. tableau VI). C'est pourquoi, toute prescription pendant cette période doit être évitée. Si la prise de médicament est nécessaire, la formulation, le mode d'administration et la posologie doivent être ajustés.

variables	Paramètres cinétiques affectés
Vomissement, nausée Mobilité gastro-intestinale pH gastro-intestinal Débit sanguin gastro-intestinal	Biodisponibilité Vitesse d'absorption
Poids corporel et composition Débit sanguin dans les différents organes Protéines plasmatiques et tissulaires	Volume de distribution apparent Liaison aux protéines
Fonction rénale Fonction hépatique Fonction respiratoire Débit sanguin dans les organes responsables de l'élimination	Clairance plasmatique apparente Vitesse d'élimination Demi-vie Pente terminale de la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps dans le processus d'élimination Paramètres de l'équation de Michaelis-Menten (V_{max} et K_m) dans les processus saturables

Tableau VI – Principales variables associées à la grossesse modifiant les paramètres pharmacocinétiques des médicaments d'après Krauer et al. [80].

1.1. Absorption des médicaments

Pendant la grossesse, plusieurs changements modifient l'absorption des médicaments [80]:

- *Fonction gastrique*

Dans l'estomac, la sécrétion d'acide est réduite et la sécrétion de mucus est augmentée [81]. La vidange gastrique est retardée de 30 à 50%, en particulier lors de la prise de repas très liquide ou lors d'un effort physique [82]. Cela peut entraîner une accumulation des médicaments dans l'estomac pour atteindre des concentrations toxiques.

- *Fonction intestinale*

Le temps de transit intestinal est prolongé parfois considérablement [83], alors que le rythme cardiaque est augmenté d'environ 30%. Cela peut accélérer l'absorption des médicaments au niveau de la paroi intestinale.

- *Fonction pulmonaire*

L'hyper ventilation et les changements hémodynamiques, liés à l'augmentation du rythme cardiaque pendant la grossesse, influencent l'absorption des médicaments au niveau des voies respiratoires.

- *Peau et muqueuses*

L'augmentation du débit sanguin et de la vascularisation entraînent une augmentation de l'absorption des médicaments au niveau de la peau et des muqueuses.

- *Muscle et espace épidural*

Le débit sanguin et la vascularité dans les muscles striés ne sont pas modifiés pendant la grossesse. Cependant, la pression dans la veine fémorale augmente alors que le débit sanguin diminue dans les membres inférieurs. Cela peut

affecter l'absorption et le transport des médicaments administrés par injection intramusculaire.

L'absorption de médicaments injectés dans l'espace épidural est augmentée chez les femmes enceintes, en raison d'une augmentation de la vascularisation. Husemeyer R.P. et al. [84] ont montré que les concentrations plasmatiques de péthidine, après une injection épidurale, étaient plus élevées chez la femme enceinte (cf. figure 8).

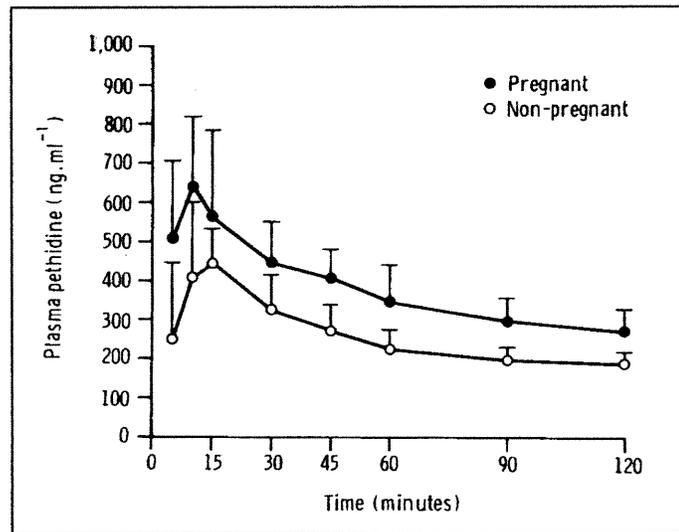


Figure 8 – Concentrations plasmatiques de péthidine (moyenne \pm SD) après une injection de 100 mg de péthidine chez la femmes enceinte et non enceinte d'après Husemeyer et al.[84].

1.2. Distribution des médicaments

La distribution des médicaments est liée à la composition corporelle. Pendant la grossesse, le volume de distribution augmente de façon très importante et très variable (cf. figure 9), ce qui entraîne une diminution des concentrations plasmatiques des médicaments.

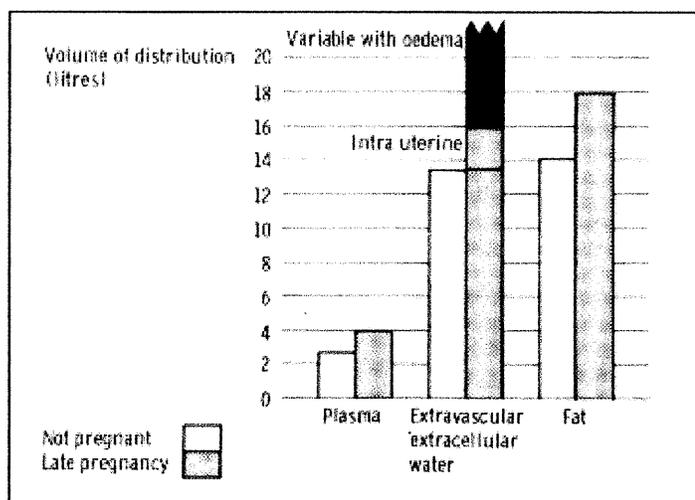


Figure 9 – Les composantes de l’augmentation du volume de distribution pendant la grossesse d,après Krauer et al. [80].

La distribution des médicaments est modifiée en fonction de plusieurs paramètres [80]:

- *Volume sanguin et plasmatique*

La grossesse est associée à une augmentation du volume plasmatique d’au moins 50%, en fonction essentiellement de la taille du fœtus (cf. tableau VII). Le volume de globule rouge dans le sang augmente d’environ 18% ce qui entraîne une diminution de la concentration de l’hémoglobine. L’augmentation du volume plasmatique conduit à une diminution des concentrations des médicaments dans le sang.

	Non-pregnant	20 weeks	30 weeks	40 weeks
Plasma volume (mL)	2600	3150	3700	3850
Red cell volume (mL)	1400	1540	1550	1650
Total blood volume (mL)	4000	4600	5250	5500

Tableau VII – Variations du volume sanguin pendant la grossesse d’après Hytten et al. [85].

- *Quantité d’eau corporelle*

Pendant la grossesse, il y a une augmentation importante du volume total d’eau dans le corps, lié au développement de nouveaux tissus et à l’expansion majeure

du volume des fluides extracellulaires (cf. tableau VIII). Cette augmentation du volume d'eau entraîne une dilution des médicaments.

	Weeks of pregnancy			
	10	20	30	40
Foetus	4	264	1185	2414
Placenta	18	153	366	540
Amniotic fluid	30	346	742	792
Blood-free uterus	116	264	495	800
Mammary gland	34	135	270	304
Blood	90	538	1156	1083
Extracellular and extravascular fluid				
no oedema or leg oedema	0	30	80	1680
generalized oedema	0	500	1526	4897

Tableau VIII– Composantes de l'augmentation de la masse d'eau (g) pendant la grossesse d'après Hytten et al. [86].

- *Poids corporel*

La grossesse est associée à une prise de poids moyenne d'environ 12 kg essentiellement pendant les deux premiers trimestres [87]. Une augmentation de poids supérieure à cette moyenne conduit à une accumulation de gras dans les tissus. Pendant le troisième trimestre, les taux d'acides gras libres et de glycérol augmentent dans le sang [88].

Cette augmentation générale du taux de lipides peut conduire à l'accumulation des médicaments liposolubles.

- *Changements hémodynamiques*

Le débit cardiaque augmente pendant la grossesse d'environ 1.5 L.min⁻¹. Cette augmentation est liée à la croissance utérine et mammaire et conduit à une augmentation générale de la vascularisation [86]. Par ailleurs, la pression artérielle diminue.

La dynamique cardiovasculaire varie en fonction de nombreux paramètres, comme les contractions utérines, la posture, l'exercice, etc. Ces variations

affectent la pharmacocinétique des médicaments. Par exemple, il a été montré que la vitesse d'élimination de plusieurs médicaments à élimination rénale majoritaire est augmentée en position allongée [89,90]. De même, la clairance des médicaments à élimination hépatique majoritaire avec un rendement d'extraction élevé varie en fonction de la posture, puisque la clairance est dépendante du débit sanguin hépatique [91,92].

1.3. Liaison des médicaments aux protéines plasmatiques

La plupart des médicaments sont liés aux protéines plasmatiques, essentiellement à l'albumine et à l' α 1-glycoprotéine acide, et seule la fraction non liée traverse les membranes biologiques et contribue ainsi à l'activité pharmacologique.

Pendant la grossesse, la concentration plasmatique d'albumine diminue et le volume plasmatique augmente de telle façon que la masse totale d'albumine en circulation dans le sang varie en fonction du stade de gestation (cf. figure 10).

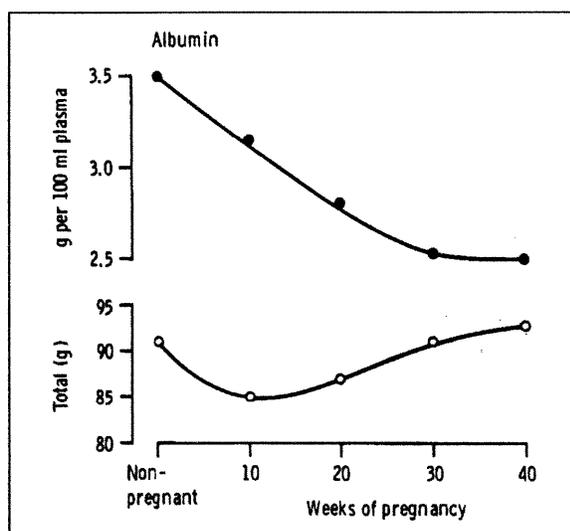


Figure 10 – Concentration plasmatique et quantité totale circulante d'albumine pendant la grossesse d'après Hytten et al. [87].

Pour les médicaments fortement liés aux protéines, la diminution du taux d'albumine pendant la grossesse entraîne une diminution la capacité de liaison des médicaments. En

effet, plusieurs auteurs ont montré une augmentation des concentrations non liées du diazépam, de la phénytoïne et de l'acide salicylique, du sulfisoxazone et de la dexaméthasone, conjointement à une diminution de la concentration en albumine, pendant la grossesse et la période post-partum [93,94].

D'autres facteurs comme l'augmentation des taux d'hormones, d'acides gras et de lipides dans le sang ainsi que les modifications de concentrations sanguines de nombreuses autres substances endogènes entraînent des phénomènes de compétitions et/ou d'inhibition au niveau des sites de liaison [95].

Ainsi, pour plusieurs médicaments, les modifications au niveau de la liaison aux protéines plasmatiques peuvent conduire à une augmentation de l'activité pharmacologique. Cependant, les récents travaux de Benet LZ et al. [96] montrent que cela ne concerne que les médicaments à forte clairance hépatique administrés par voie intraveineuse et les médicaments à forte clairance non hépatique, administrés par voie orale ou intraveineuse, et que pour la plupart des médicaments, les variations des taux protéiniques n'entraînent pas de modification d'activité pharmacologique. Par ailleurs, le degré d'affinité aux protéines plasmatiques est généralement moins élevé dans le fœtus que dans la mère [97]. Ainsi, les concentrations des médicaments non liés peuvent alors atteindre des concentrations toxiques pour le fœtus.

1.4. Métabolisme des médicaments

La grossesse est associée à des changements au niveau du métabolisme général; cependant ces changements ne sont pas toujours apparents pour le métabolisme des médicaments. Ainsi, Peiker et al. [98] n'ont pas observé de différence dans le métabolisme du phénobarbital chez la femme enceinte alors que Tomson et al. [99] ont montré que les concentrations plasmatiques de la carbamazépine et de la phénytoïne diminuent pendant le dernier trimestre de grossesse. Il a été montré également que la clairance de l'acide valproïque est multipliée au moins par trois pendant le dernier trimestre de grossesse par rapport aux autres trimestres [100].

Les variations du métabolisme pendant la grossesse impliquent différents éléments :

- *Foie*

Peu d'informations sont connues quant aux changements qui apparaissent au niveau du métabolisme hépatique pendant la grossesse. La clairance hépatique des médicaments est essentiellement modifiée par les changements d'affinité des liaisons des médicaments aux protéines plasmatiques et par l'augmentation des taux de stéroïdes. L'augmentation du taux de progestérone stimule l'activité hépatique des microsomes et augmente ainsi la clairance intrinsèque de certains médicaments comme l'amobarbital. A l'inverse, la progestérone et l'estradiol sont des inhibiteurs compétitifs des enzymes du foie et ils peuvent réduire la vitesse d'élimination des médicaments tels que l'éthylmorphine ou l'hexabarbitone [101].

- *Unité fœto-placentale*

L'unité fœto-placentale contribue non seulement à l'augmentation du volume de distribution mais aussi au métabolisme des médicaments.

Le placenta contient un système enzymatique capable de catalyser les réactions classiques de métabolisme (oxydation, réduction, hydrolyse, etc.) comme par exemple l'hydroxylation du benzo(α)pyrène chez les fumeuses enceintes [102]. Dès le premier trimestre de grossesse, le placenta possède plusieurs gènes d'ARNm des CYP450 : CYP1A1, 1A2, 2C, 2D6, 2E1, 2F1, 3A4, 3A5, 3A7 et 4B1 et certains de ces gènes sont exprimés : CYP1A, 2E1 et 3A [103].

Le fœtus est capable de réaliser plusieurs fonctions métaboliques et de nombreux médicaments sont métabolisés dès la sixième semaine de gestation [104]. Parmi les enzymes oxydatives du foie fœtal, le CYP3A7 représente 50% de la quantité totale des CYP450. Après la naissance, l'expression de cette enzyme diminue considérablement. D'autres cytochromes, comme le CYP1A1, CYP2C8, CYP2D6, CYP3A4, etc., sont également présents dans le foie fœtal [105].

La contribution du métabolisme fœto-placental à la pharmacocinétique des médicaments en période de gestation est probablement mineure car le fœtus est petit et l'abondance des CYP450 dans le placenta est faible. Par contre, des cas d'intoxication sévères ont été corrélés à des dysfonctionnements métaboliques au niveau de l'unité fœto-placentaire.

1.5. Élimination des médicaments

L'élimination des médicaments est modifiée pendant la grossesse :

- *Fonction rénale*

Le débit sanguin rénal et la vitesse de filtration glomérulaire augmentent considérablement pendant la grossesse, d'environ 50% et 80% respectivement [106]. Il en résulte une augmentation de la clairance des médicaments à élimination rénale majoritaire comme la pénicilline, la digoxine, etc. [107-109]. Pour les femmes qui doivent rester alitées, la position couchée favorise une diminution du débit sanguin rénal et de la filtration glomérulaire et par conséquent une diminution de la clairance des médicaments [89].

- *Fonction hépatique*

La clairance hépatique des médicaments est essentiellement modifiée par les changements d'affinité des liaisons des médicaments aux protéines plasmatiques et par l'augmentation des taux de stéroïdes (cf. partie I, chapitre 3, 1.4.)

- *Fonction pulmonaire*

L'élimination par voie pulmonaire intervient pour les médicaments pris par inhalation. L'hyper ventilation liée à l'augmentation du rythme cardiaque pendant la grossesse peut accélérer l'élimination des médicaments inhalés.

2. Mesure de la fonction hépatique pendant la grossesse

Au cours de la grossesse, la fonction métabolique hépatique est modifiée (cf. partie I, chapitre 3, 1.4). Les pathologies chroniques post-gestationnelles (épilepsie, hypertension, SIDA, etc.) nécessitent un traitement continu pendant la grossesse. D'autres pathologies, comme l'hypertension gestationnelle, le cholestase et le diabète obstétrical ou l'hyperemesis gravidarum, nécessitent également l'utilisation de médicaments pendant cette période. Dans ces conditions, il est important de mesurer les activités métaboliques hépatiques par des tests dynamiques pour d'une part, prévoir le comportement des substrats pouvant être pris pendant la grossesse, via leur métabolisme, et d'autre part, mettre en évidence et d'anticiper les dommages dus aux pathologies.

2.1. Tests conventionnels

L'évaluation conventionnelle de la fonction hépatique est basée sur la mesure de plusieurs paramètres cliniques [110]:

- historique du patient,
- examen physique,
- taux d'enzymes (aminotransférases, glutamyltransférases, alcaline phosphatase),
- bilirubine, albumine plasmatique, temps prothrombine, excrétion de sulfobromophatléine (BSP), capacité d'élimination du galactose
- hémodynamique,
- imagerie médicale,
- biopsie.

Ces différents tests peuvent donner une évaluation appréciable pour les pathologies hépatiques avancées. Cependant, dans le cas de dysfonctionnements hépatiques mineurs

ou modérés, ces tests ne sont pas toujours efficaces et ne permettent pas de prévoir l'aggravation de la pathologie [111]. En général, ces tests sont peu corrélés au degré d'altération du métabolisme des médicaments [112].

2.2. Sondes métaboliques

Une autre approche consiste à mesurer différents paramètres pharmacocinétiques d'une molécule (traceur) qui est métabolisée majoritairement par le foie. Cela permet de quantifier l'activité des CYP450 du foie, de façon spécifique ou non spécifique et par extrapolation de déterminer les dommages fonctionnels hépatiques et leur progression [58].

Différents tests, comme la mesure des clairances plasmatiques, la mesure des rapports métaboliques dans le plasma, les urines, la salive et autres milieux et les tests respiratoires, sont utilisés pour calculer des activités métaboliques hépatiques (cf. tableau VIX).

Pour les femmes enceintes, certains substrats tels que l'aminopyrine ou le triméthiadone ne sont pas recommandés car ils présentent des risques toxicologiques pour le fœtus [80]. Par contre, les tests utilisant la caféine, l'érythromycine, la lidocaïne, etc. peuvent être utilisés sans risques pour étudier les modifications d'activité hépatique dans le cas de grossesses normales ou mesurer les dommages causés à l'hépatocyte dans le cas de grossesses pathologiques.

Substrat	Tests cliniques	Enzymes impliquées	Références
Tests fonctionnels non sélectifs			
Aminopyrine	Test respiratoire	CYP1A2, 2C9, 3A4	[18,65]
Antipyrine	Clairance plasmatique, urinaire et salivaire	CYP1A2, 2B6, 2C, 3A	[113,114]
Triméthiadone	Clairance plasmatique, rapports métaboliques plasmatiques	CYP2C9, 2E1, 3A4	[115,116]
Tests fonctionnels sélectifs			
Caféine	Clairance plasmatique et salivaire, test respiratoire, rapports métaboliques urinaires	CYP1A2	[21,117,118] [78,79]
Chlorzoxazone	Concentrations plasmatiques, rapports métaboliques plasmatiques	CYP2E1	[119,120]
Dextromethorphan	Rapports métaboliques plasmatiques	CYP2D6, CYP3A	[121,122]
Erythromycin	Test respiratoire	CYP3A3/4	[23,74,75]
Lidocaïne	Concentration plasmatique du métabolite	CYP3A4	[123,124]
Midazolam	Clairance plasmatique, rapports métaboliques plasmatiques	CYP3A3/4	[125,126]

Tableau VIX – Tests fonctionnels in vivo de l'activité hépatique des CYP450 pour les patients avec des maladies hépatiques d'après Tanaka et al. [58].

Les tests respiratoires constituent un outil de mesure particulièrement adapté aux femmes enceintes puisque ces tests sont non invasifs et très faciles à réaliser (cf. partie I chapitre 2, 2.). Ils présentent plusieurs avantages :

- durée d'échantillonnage courte (3 heures maximum),
- pas d'échantillonnage invasif (sang),
- possibilité de manger et boire pendant le test,
- possibilité de se déplacer pendant le test mais éviter l'exercice et l'effort,
- possibilité de faire le test à la maison (suivant le substrat).

PARTIE II

UTILISATION DE LA CAFÉINE COMME MARQUEUR DE LA FONCTION MÉTABOLIQUE HÉPATIQUE

Chapitre 1 : Validation des tests respiratoires à la ¹³C-caféine et ¹³C-aminopyrine

1. Introduction

Au cours de la grossesse normale ou pathologique, l'activité hépatique de la femme varie, en particulier les réactions du métabolisme des médicaments dépendantes des CYP450. Les modifications d'activités des enzymes du métabolisme peuvent induire non seulement des variations dans la pharmacocinétique des médicaments, mais également des risques générés par des métabolites toxiques ou tératogènes.

Pour le CYP1A2, les variations des taux hormonaux pendant la grossesse entraînent des variations d'activité de ce cytochrome [76]. Il a été montré ainsi que la clairance de la caféine diminue pendant la grossesse et retourne à sa valeur pré-gestationnelle pendant la période post-partum simultanément au rétablissement des taux d'hormones [127,128].

Actuellement, aucune étude n'a été rapportée pour la mesure de l'activité du CYP1A2 par le TRC, pendant la grossesse. Or, le TRC est un test spécifique du CYP1A2, particulièrement adapté aux femmes enceintes, puisqu'il est non invasif et que la caféine est un substrat à très faibles risques pour la mère et le fœtus [129]. L'utilisation du TRC peut permettre, d'une part, de prévoir le comportement des substrats du CYP1A2 pouvant être pris pendant la grossesse, via leur métabolisme, et d'autre part, de mettre en évidence et d'anticiper les dommages dus aux pathologies.

2. Objectifs

L'objectif principal est de valider TRC comme marqueur de l'activité métabolique hépatique du CYP1A2, pour pouvoir l'utiliser dans le suivi des variations hépatiques chez la femme enceinte.

La validation du TRC est effectuée chez 5 groupes de sujets sains :

- hommes fumeurs,
- hommes non-fumeurs,
- femmes non-fumeuses ne prenant de contraceptif oral (CO),
- femmes non-fumeuses prenant des CO,
- femmes fumeuses prenant des CO.

Dans le cadre d'un projet plus général sur les tests respiratoires, le TRA est validé conjointement au TRC, chez ces mêmes groupes de sujets, comme marqueur non spécifique de l'activité métabolique des CYP450.

(Comme l'aminopyrine présente des risques toxicologiques pour le fœtus, le TRA ne peut pas être utilisé pendant la grossesse [80].)

3. Résultats

La validation du TRC et du TRA est présentée dans la publication :

¹³C-Aminopyrine and ¹³C-caffeine breath tests: influence of gender cigarette smoking and oral contraceptives intake.

*Marie-Sophie Caubet, Annick Laplante, Jean Caillé, Jean-Louis Brazier
Isotopes in Health and Environmental Studies 38(2):71-77 (2002).*

Étant donné que de nombreuses publications sont déjà parues sur la validation du TRC (cf. partie I, chapitre 2, 3.2.2), la présente publication oriente la discussion plus spécifiquement sur le TRA. Cependant, tous les résultats concernant le TRC sont inclus dans le manuscrit.

3.1. Résumé de la publication

Le TRA mesure l'activité globale des CYP450 *in vivo* et est un indicateur sensible des dysfonctionnements métaboliques hépatiques. La présente étude a pour but de déterminer si les résultats du TRA sont influencés par le sexe du sujet, la consommation de cigarette et la prise de CO. 110 sujets sains, comprenant des hommes et des femmes, des sujets fumeurs et non-fumeurs et des femmes prenant ou non des CO ont été soumis à un TRC pour phénotyper le CYP1A2 et à un TRA. Les résultats du TRA ont montré des variations inter-individuelles importantes liées aux variations du contenu hépatique des CYP450. Le TRA a permis de mettre en évidence des inductions et des inhibitions significatives corrélées à la consommation de cigarettes et de CO. L'effet combiné de la prise de CO et de la consommation de cigarettes a conduit à une activité métabolique globale comparable à celle des femmes non fumeuses, ne prenant pas de CO. Par conséquent, l'impact des facteurs étudiés sur les résultats du TRA doit être considéré et pris en compte par les cliniciens et les investigateurs.

3.2. Résumé des résultats concernant le TRC

Le TRC a été validé chez les mêmes groupes de sujets que le TRA (cf. partie II, chapitre 1, 2.). Ces groupes ont été choisis pour mettre en évidence des phénomènes d'inductions et d'inhibitions du CYP1A2.

Les résultats du TRC ont montré des variations inter-individuelles importantes à l'intérieur de chaque groupe de sujets. Ces variations sont en accord avec la diversité du contenu enzymatique hépatique individuel (cf. partie I, chapitre 2, 2.). Le TRC a permis de différencier de façon significative les activités enzymatiques des hommes fumeurs et non-fumeurs, des femmes non fumeuses prenant et ne prenant de CO et des femmes prenant des CO, fumeuses et non fumeuses. Par conséquent, le TRC peut être utilisé comme un indicateur de l'activité métabolique du CYP1A2, puisqu'il permet de mettre en évidence l'induction ou l'inhibition de cette enzyme.

3.3. Publication

Isotopes Environ. Health Stud., 2002, Vol. 38(2), pp. 71–77

Taylor & Francis
healthsciences

[¹³C]AMINOPYRINE AND [¹³C]CAFFEINE BREATH TEST: INFLUENCE OF GENDER, CIGARETTE SMOKING AND ORAL CONTRACEPTIVES INTAKE

M. S. CAUBET¹, A. LAPLANTE², J. CAILLÉ² and J. L. BRAZIER¹

¹Université de Montréal, Faculté de Pharmacie, Montréal (Québec); ²Dianatec Iso Inc., Montréal (Québec) H4R 2EG, Canada

(Received 22 June 2001; In final form 7 November 2001)

The [¹³C]aminopyrine breath test ([¹³C]ABT) measures the global activity of cytochrome P450 *in vivo* and is a sensitive indicator of liver metabolic dysfunction. The present study aims to determine whether gender and cigarette smoking influence the results of [¹³C]ABT as well as to confirm the effect of oral contraceptive steroids (OCS) intake on this metabolic test. Hundred and ten healthy subjects, including men and women, smoker and non-smoker, women taking OCS or not, were phenotyped for CYP1A2 using the [¹³C]caffeine breath test and underwent a [¹³C]ABT. Both tests showed large inter-individual variations in accordance with that of CYP450 liver content. [¹³C]ABT was sensitive enough to point out a significant induction or inhibition related to cigarette smoking habits or OCS. The combined effect of smoking and OCS resulted in an overall unchanged metabolic activity. Consequently, the impact of the studied conditions on the [¹³C]ABT parameters must be considered by clinicians or clinical investigators.

Keywords: [¹³C]Aminopyrine; breath test; [¹³C]caffeine; Carbon 13; CYP450; induction; inhibition

INTRODUCTION

Various *in vivo* methods are used to assess the liver state and its capacity to metabolize substrates. Among them are breath tests using molecules labelled with stable isotopes as metabolic probes for various enzyme systems [1–3].

The [¹³C]aminopyrine breath test ([¹³C]ABT) is used world wide for measuring the activity of cytochrome P450 (CYP450) *in vivo* and assessing a degree of disorder of the liver [4–6]. The contribution of the CYP450 enzymes to the metabolic pathways of aminopyrine is not yet well known but seems close to the antipyrine's metabolism. The later involves CYP1A2, and CYP2C9, CYP2E1 to a lesser extent and also CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A [7]. The metabolism of aminopyrine shows two sequential oxidative *N*-demethylations, which involve different CYP450, especially CYP1A2 and CYP3A3/4 [8]. No correlation between [¹³C]aminopyrine breath test ([¹³C]ABT) results and CYP1A2 or CYP3A4

Address for correspondence: Marie-Sophie Caubet, Université de Montréal, Faculté de Pharmacie, C. P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal (Québec) H3C 3J7, Canada, Tel.: (514) 345-4931 ext. 3983+; Fax: (514) 345-4988; E-mail: mscaubet@justine.umontreal.ca

activities have been demonstrated but [¹³C]ABT has been correlated to the amounts of CYP450 [9] and the functional hepatic mass [10]. Like antipyrine, aminopyrine clearance is a global measure of CYP450 oxidative capacity because of the multiplicity of the enzymes involved in the formation of their metabolites with a slight to moderate weight toward CYP1A2 [11].

Nevertheless, the influence of potential inhibitors or inducers of the aminopyrine metabolism has still not been evaluated on the [¹³C]ABT results, except for oral contraceptive steroids (OCS). In 1978, Herz *et al.* [12] studied the effect of OCS on the rate of demethylation of [¹⁴C]aminopyrine using the [¹⁴C]ABT. Later, Opekun *et al.* [13] demonstrated that the intake of low-dose OCS could affect the score of the ABT but no assays have mentioned the impact of other factors such as the gender or smoking habits. In this context, it is highly relevant to study factors that could affect the results and the clinical interpretation of the [¹³C]ABT.

The aim of this study was to analyse the influence of gender, cigarette smoking and OCS intake on the [¹³C]ABT, in healthy subjects.

Furthermore, caffeine is mainly metabolised by CYP1A2 [14] and has been applied as a substrate for phenotyping CYP1A2 in the liver [15–17]. The non-invasive [¹³C]caffeine breath test ([¹³C]CBT) is able to point out the influence of inhibitors or inducers on the CYP1A2 activity, via caffeine metabolism [18, 19].

Since CYP1A2 participates to aminopyrine metabolism, [¹³C]CBT was performed together to [¹³C]ABT in order to check the CYP1A2 activity of the selected subjects. The use of these two tests was compared for phenotyping specific and non-specific CYP450 enzyme activities.

METHODS

Chemicals

[1,3,7-trimethyl-¹³C₃]caffeine (99% ¹³C) and [*N,N*-dimethyl-¹³C₂]aminopyrine (99% ¹³C) were obtained from Isotec Inc., Ohio, USA. Helium and SFC grade CO₂ were purchased from Prodair Canada, Quebec, Canada.

Subjects and Drug Administration

The protocol was approved by the Research and Ethical Committee of Algorithm Pharma Inc. (Montreal, Canada), in accordance with the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. An informed written consent was obtained from each subject. The trial was

TABLE I Subjects included in the Trial.

Groups	Subjects	Number of subjects	Weight (kg) Mean ± SD
A	Men non-smokers	24	75 ± 8
B	Men smokers	22	74 ± 8
C	Women non-smokers taking no oral contraceptives steroids	24	62 ± 9
D	Women non-smokers taking oral contraceptives steroids	20	60 ± 6
E	Women smokers taking oral contraceptives steroids	20	62 ± 10

carried out in 5 groups of healthy adult subjects, aged from 18 to 40 (Tab. I). These groups were chosen as characteristic groups to evaluate the basal level of general drug metabolizing enzyme activity (A and C), the effect of induction of CYP1A2 (B), the effect of inhibition of CYP1A2 (D), the effect of combined exposition to inducers and inhibitors of CYP1A2 (E) and the influence of sex (A and C). All subjects had normal total bilirubin, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, gamma-glutamyl transferase and alkaline phosphatase. Women were not pregnant.

Pre-requisites required 7 days without medication, 48 h without alcohol and a ten-hour fast before the tests. After this period of washout, the subjects underwent a [¹³C]CBT and 2 days after a [¹³C]ABT. For both tests, subjects ingested an oral dose of the labelled metabolic probe as an aqueous solution (50 ml). According to body weight ranging from 45–60 kg, 60–75 kg and 75–90 kg [1,3,7-methyl-¹³C]caffeine doses were 155 mg, 200 mg and 245 mg respectively and [4-dimethyl-¹³C]aminopyrine doses were 105 mg, 135 mg and 165 mg respectively. These doses were chosen to simplify the usual doses per kg of the body weight, with a view to eventually develop a simple commercial test. Breath samples were collected in duplicate, 5 min before beginning the test, every 15 min for the first 90 min and then every 30 min during the last 90 min.

Measurements

Breath samples were collected in duplicate into glass tubes (Vacutainer®). Isotope ratio measurements were carried out using a AP 2003 gas chromatography – isotope ratio mass spectrometer (GC-IRMS), from Analytical Precision (Northwich, Cheshire, UK). The mass spectrometer was calibrated for ¹³C and ¹⁸O with an online internally calibrated CO₂ reference gas.

The results were expressed as $\Delta\% = \delta\%_{(t)} - \delta\%_{(t=0)}$, where $\delta\%_{(t=0)}$ is the isotope abundance prior to the administration of the labelled probe and $\delta\%_{(t)}$ is the isotope abundance measured at “t” time during the test, with respect to the Pee Dee Belemnite, the international ¹³C reference.

The area under the $\Delta\% = f(t)$ curve (AUC) was calculated according to the trapezoidal rule. As the doses of labelled caffeine and aminopyrine were administered according to the body weight, isotope abundances were expressed using the data without normalization according to the body weight.

Statistical Analysis

The results are presented as the mean AUC ± standard deviation (SD) for each groups of subjects, for both the [¹³C]CBT and [¹³C]ABT. Student's *t* test was used for comparison between groups. Similar results were obtained when using AUC between 0 and 60 min, 0 and 90 min, 0 and 120 min and 0 and 180 min. Therefore, only calculations and comparisons performed with AUC between 0 and 180 min (AUC₁₈₀) are reported.

RESULTS

[¹³C]CBT

The inter-individual variations of the AUC₁₈₀ for the [¹³C]CBT, expressed as the coefficients of variation of the AUC₁₈₀, ranged between 33% and 58%, for the 5 different groups.

74

M. S. CAUBET *et al.*

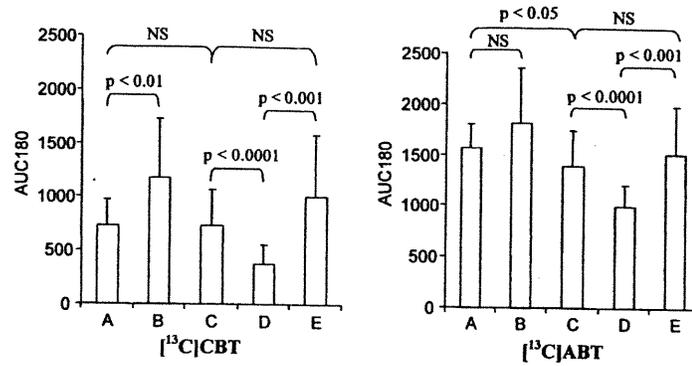


FIGURE 1 Mean AUC₁₈₀ ± standard deviation (SD) for [¹³C]CBT and [¹³C]ABT. A: men non-smokers, B: men smokers, C: women non-smokers taking no oral contraceptives, D: women non-smokers taking oral contraceptives, E: women smokers taking oral contraceptives, NS: not significant.

As shown in Figure 1 lefthand, the smoking habit in men significantly increased the AUC₁₈₀ ($p < 0.01$ for A and B). The intake of OCS in women decreased significantly the AUC₁₈₀ ($p < 0.0001$ for C and D). Moreover, smoking habit increased significantly the AUC₁₈₀ in women taking OCS ($p < 0.001$ for D and E). Nevertheless, the AUC₁₈₀ calculated from the [¹³C]CBT were not significantly different in men and women.

[¹³C]ABT

The results obtained from the [¹³C]ABT showed large inter-individual variations too. The values of the coefficients of variation of the AUC₁₈₀ values ranged between 15% and 31%, for the 5 different groups. Figure 2 shows the mean $\Delta\% = f(\text{time})$ curve for the [¹³C]ABT, for men non-smokers. It can be observed that the ¹³C abundance increases during the first 60 min of the test and then decreases progressively. The abundance of the expired CO₂ ($\Delta\%$) shows large SD among subjects.

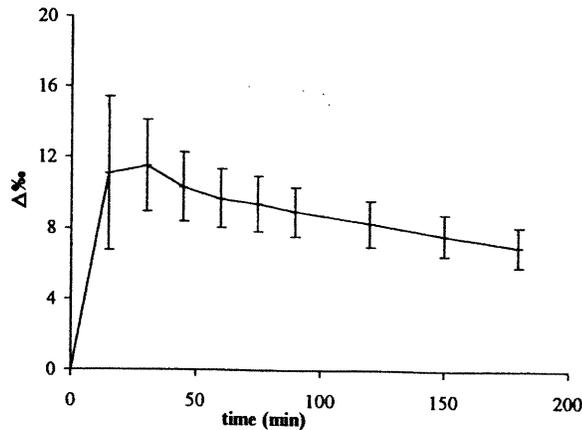


FIGURE 2 Mean $\Delta\% = f(\text{time})$ for group A, during the [¹³C]ABT.

When comparing [¹³C]ABT from [¹³C]CBT results in Figure 1, [¹³C]ABT also showed an increase, but not significant, of AUC₁₈₀ for men smokers and a significant decrease of AUC₁₈₀ for women taking OCS ($p < 0.0001$ for C and D). Smoking habit increased significantly AUC₁₈₀ for women taking OCS for either [¹³C]ABT or [¹³C]CBT. However, unlike [¹³C]CBT, the parameters calculated from the [¹³C]ABT show a significant gender difference ($p < 0.05$ for A and C).

The values of the biochemical parameters measured for the hepatic function (bilirubin, aminotransferase, etc.) showed no significant difference between the 5 groups of subjects, except between men (A) and women (C), and no correlation with the [¹³C]CBT or [¹³C]ABT results.

DISCUSSION

The high inter-individual variations for both tests were in accordance with what is known on the individual variability of the CYP450 and CYP1A2 content in the human liver (about 40% for CYP1A2) [20].

[¹³C]CBT results confirmed the CYP1A2 enzyme induction and inhibition related respectively to cigarette smoking habits and OCS intake. Actually, previous studies using either [¹³C]CBT or urinary metabolic ratios of caffeine demonstrated that CYP1A2 activity is induced by the polycyclic aromatic hydrocarbons contained in cigarette smoke and inhibited by oral steroids contraceptives [18, 19, 21–23]. As mentioned in literature [24], [¹³C]CBT was not able to differentiate men from women.

The comparisons between the groups of subjects showed that gender, smoking and OCS had an influence on the [¹³C]ABT results. The significant inhibitory effect of OCS confirms the results obtained from Herz *et al.* [12] and Opekun *et al.* [13]. Differences between smokers and non-smokers observed with [¹³C]ABT were due to the participation of CYP1A2 to the metabolism of aminopyrine. However, the contribution of this enzyme is not important enough to show a significant induction.

The present studies allowed to evaluate the influence of smoking habit in women taking OCS on the enzymatic liver activities. [¹³C]CBT and [¹³C]ABT showed that the inductive effect of smoking combined with the inhibitory effect of OCS results in an overall metabolic activity which is not different from that of women non-smokers not taking OCS.

In contrast to [¹³C]CBT, [¹³C]ABT results show significant differences when comparing men and women. This can be explained by the fact that aminopyrine metabolism is less specific for CYP1A2 than caffeine metabolism and involves various other liver enzymes. Hormonal fluctuations within the menstrual cycle may be a primary cause of gender differences. Since aminopyrine can be used as a probe to assess non-selective P450 liver function [3, 10], the [¹³C]ABT is appropriate to point out differences in the enzymatic liver activities between men and women.

The comparison between the values of biochemical parameters and the [¹³C]ABT score confirms that there is no relationship between the conventional static biochemical tests, which are routine examinations of the liver condition, and the dynamic test used for checking drug metabolizing enzyme activity [25]. Therefore, static biochemical liver function tests must not be used as indicators of potential modifications of drug metabolizing enzymes. The non-specific [¹³C]ABT and/or other specific breath tests ([¹³C]CBT or [¹³C]erythromicin breath test [26]) are more relevant to measure, in a non-invasive way, changes in global or specific metabolic activities.

The present studies shows that, in addition to medical applications designed to assess liver diseases (diagnosis or prognosis), [¹³C]ABT could be used for other application where a global assessment of drug metabolizing activities is required. As example, clinical trials, especially biopharmaceutical trials (bioavailability and bioequivalence studies), require selection of healthy subjects with biochemical and pharmacokinetic characteristics as homogeneous as possible, in order to minimise the inter-individual variations of the measured pharmacokinetic parameters. In that context, the [¹³C]ABT could be useful to give information on the liver detoxification and metabolism capacities.

Today, the cost of molecules labelled with stable isotopes and their analysis decreases regularly. The feasibility (oral ingestion) and non-invasive procedure should participate to the development of tests using labelled molecules combined with breath tests. Depending on the purpose of their application it is useful to make a choice between non-specific tests such as [¹³C]ABT or [¹³C]methacetin or [¹³C]phenylalanine breath test [27] and specific tests as [¹³C]CBT or [¹³C]erythromycin breath test.

Therefore, it is important for clinicians and investigators to recognise factors and medications that can influence test results and what kind of information they are able to afford.

References

- [1] Becker, M. (1998). ¹³C breath test for measurement of liver function. *Gut*, **43**, 25–27.
- [2] Geneve, J., Bergmann, J. F., Caulin, C. and Segrestaa, J. M. (1990). Méthodes d'exploration du métabolisme hépatique des médicaments chez l'homme. *Thérapie*, **45**, 91–97.
- [3] Tanaka, A. and Breimer, D. D. (1993). In vivo function tests of hepatic drug-oxidising capacity patients with liver disease. *J. Clin. Pharm. Ther.*, **22**, 237–249.
- [4] Perri, F., Pastore, M., Annese, V. and Andriulli, A. (1994). The aminopyrine breath test. *Ital. J. Gastroenterol.*, **26**(6), 306–317.
- [5] Sakamoto, A., Nabeya, Y. and Isono, K. (1998). Study of liver function tests using various stable isotope labelled compounds in liver cirrhosis. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.*, **42**, 93–99.
- [6] Kotake, A. N., Schreider, B. D. and Latts, J. R. (1982). The in vivo measurement of expired ¹⁴CO₂ derived from the N-demethylation of aminopyrine as a reflection of the in vitro hepatic cytochrome P-450 drug-metabolism activity in rats. *Drug. Meta. Dispo.*, **10**(3), 251–258.
- [7] Engel, G., Hofmann, U., Heidemann, H., Cosme, J. and Eichelbaum, M. (1996). Antipyrine as a probe for human oxidative drug metabolism: Identification of the cytochrome P450 enzymes catalyzing 4-hydroxyantipyrine, 3-hydroxymethylantipyrine, and norantipyrine formation. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **59**(6), 613–623.
- [8] Paolini, M., Mesirca, R., Pozzetti, L., Sapone, A. and Cantelliforti, G. (1997). Biomarkers of effect in evaluating dithianon cocarcinogenesis: selective induction and suppression of murine CYP3A isoform. *Cancer Lett.*, **113**, 221–228.
- [9] Guitton, J., Souillet, G., Rivière, J. L., Gerard, R., Guilluy, R. and Brazier, J. L. (1994). Action of methotrexate on cytochrome P-450 monooxygenases in rats – Study performed with [C-13]-aminopyrine micro breath test. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **19**, 119–124.
- [10] Mion, F., Queneau, P. E., Rousseau, M., Brazier, J. L., Paliard, P. and Minaire, Y. (1995). Aminopyrine breath test – Development of a C-13-breath test for quantitative assessment of liver function in humans. *Hepatogastroenterology*, **42**, 931–938.
- [11] Persico, M., Romano, M., Villano, N., Montella, F. and Gentile, S. (1994). The association between rifamycin-SV (R-SV) related hyperbilirubinaemia and antipyrine clearance as a new test of liver function in cirrhosis. *Eur. J. Clin. Invest.*, **24**(3), 201–204.
- [12] Herz, R., Koelz, H. R., Haemmerli, U. P., Benes, I. and Blum, A. L. (1978). Inhibition of hepatic demethylation of aminopyrine by oral contraceptive steroids in humans. *Eur. J. Clin. Invest.*, **8**(1), 27–30.
- [13] Opekun, A. R., Klein, P. D. and Graham, D. Y. (1995). [¹³C]aminopyrine breath test detects altered liver metabolism caused by low-dose oral contraceptives. *Dig. Dis. Sci.*, **40**, 2417–2422.
- [14] Eugter, H. P., Probst, M., Wurgler, F. E. and Sengstag, C. (1993). Caffeine, estradiol, progesterone interact with human CYP1A1 and CYP1A2. cDNA-directed expression in *saccharomyces cerevisiae*. *Drug Meta. Dispo.*, **21**(1), 43–49.
- [15] Klebovich, I., Arvela, P. and Pelkonen, O. (1993). HPLC method for rapid determination of acetylator phenotype by measuring urinary caffeine metabolites. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **11**, 1017–1102.
- [16] Parker, A. C., Pritchard, P., Preston, T. and Choonara, I. (1998). Induction of CYP1A2 activity by carbamazepine in children using the caffeine breath test. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **45**(2), 176–178.
- [17] Parker, A. C., Pritchard, P., Preston, T., Smyth, R. L. and Choonara, I. (1997). Enhanced drug metabolism in young children with cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child.*, **77**(3), 239–241.

[¹³C]AMINOPYRINE + [¹³C]CAFFEINE TESTS

77

- [18] Lambert, G. H., Kotake, A. N. and Schoeller, D. (1983). The CO₂ breath tests as monitors of the cytochrome P450 dependent mixed function monooxygenase system. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **135**, 119–145.
- [19] Wietholtz, H., Voegelin, M., Arnaud, M. J., Bircher, J. and Preisig, R. (1981). Assessment of the cytochrome P-448 dependent liver enzyme system by a caffeine breath test. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **21**(1), 53–59.
- [20] Rendic, S. and Di Carlo, F. J. (1997). Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Meta. Dispo.*, **29**, 413–580.
- [21] Kalow, W. and Tang, B. K. (1993). The use of caffeine for enzyme assays: a critical appraisal. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **53**(5), 503–514.
- [22] Kalow, W. and Tang, B. K. (1991). Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **50**, 508–519.
- [23] Vistisen, K., Poulsen, H. E. and Loft, S. (1992). Foreign compound metabolism capacity in man measured from metabolites of dietary caffeine. *Carcinogenesis*, **13**, 1561–1568.
- [24] Horn, E. P., Tucker, M. A., Lambert, G., Silverman, D., Zemetkin, D., Sinha, R., Hartage, T. and Caporaso, N. E. (1995). A study of gender-based cytochrome P4501A2 variability – A possible mechanism for the male excess of bladder cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarker. Prev.*, **4**(5), 529–533.
- [25] Carlisle, R., Galambos, I. T. and Warren, W. D. (1979). The relationship between conventional liver tests, quantitative function tests, and histopathology in cirrhosis. *Dig. Dis. Sci.*, **24**(5), 358–362.
- [26] Wagner, D. (1998). CYP3A4 and the erythromycin breath test. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **64**(1), 129–130.
- [27] Lara Baruque, S., Razquin, M., Jimenez, I., Vasquez, A., Gisbert, J. P. and Pajares, J. M. ¹³C-phenylalanine and ¹³C-methacetin breath test to evaluate functional capacity of hepatocyte in chronic liver disease. *Dig. Liver Dis.*, **32**(3), 226–232.

Chapitre 2 : Dosage de la ^{13}C -caféine et de ses métabolites dans les urines

1. Introduction

Parmi les tests dynamiques d'exploration fonctionnelle hépatique autre que les tests respiratoires, la mesure des rapports métaboliques d'un substrat dans le plasma, les urines ou autres milieux, peut permettre la détermination des activités métaboliques hépatiques et par extrapolation l'évaluation des dommages fonctionnels du foie et leur progression.

La mesure des rapports métaboliques de la caféine (RMC) dans les urines est un test qui peut permettre l'évaluation des variations d'activité du CYP1A2 (cf. partie I, chapitre 3, 2.2.). Les RMC peuvent être utilisés conjointement au TRC pour étudier de façon non invasive les variations longitudinales du métabolisme des médicaments chez les femmes enceintes et en période post-partum.

2. Objectifs

L'objectif principal est de valider l'utilisation des rapports métaboliques urinaires de la ^{13}C -caféine (^{13}C -RMC) comme marqueurs des variations d'activité du CYP1A2, pour permettre l'évaluation *in vivo* des modifications de ces enzymes pendant la grossesse. La mesure des ^{13}C -RMC est effectuée au cours du TRC, chez les mêmes groupes de patients sains (cf. partie II chapitre 1, 2.).

L'objectif secondaire est donc de comparer les résultats obtenus avec les ^{13}C -RMC et le TRC.

La détermination des RMC nécessite l'utilisation d'une méthode analytique performante pour mesurer les concentrations urinaires de la caféine et de ses métabolites :

- mise au point et validation de l'extraction en phase solide et du dosage par chromatographie liquide à haute performance et détection à barrette de diode (HPLC-DAD) de la caféine et de ses métabolites dans les urines,
- étude de l'apport de la détection par spectrométrie de masse (MS) au dosage de la caféine et de ses métabolites dans les urines.

3. Validation et résultats

Les résultats des tests utilisant les ^{13}C -RMC a fait l'objet de 2 publications qui incluent la validation des méthodes de dosage par HPLC-DAD et par HPLC-MS :

Analysis of urinary caffeine metabolites by HPLC-DAD: the use of metabolic ratios to assess CYP1A2 enzyme activity.

*Marie-Sophie Caubet , Walid Elbast, Marie-Claude Dubuc, Jean-Louis Brazier
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 27(1-2): 261-270 (2001).*

Analysis of urinary caffeine metabolites by liquid chromatography – mass spectrometry: The use metabolic ratios to explore CYP1A2 activity.

*Marie-Sophie Caubet, Blandine Comte, Jean-Louis Brazier
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (soumise)*

3.1. Résumé des publications

Analysis of urinary caffeine metabolites by HPLC-DAD: the use of metabolic ratios to assess CYP1A2 enzyme activity.

Une nouvelle méthode d'analyse par HPLC-DAD, rapide et sélective, a été développée pour la détermination de la caféine et de ses métabolites dans les urines. Les composés ont été isolés par extraction en phase solide, séparé par HPLC sur colonne XBD-C18 et détectés par DAD à 270 et 290 nm. Les rendements d'extraction obtenus étaient compris entre 83 et 99%. La linéarité et la précision de la méthode étaient comprises dans les limites d'acceptabilité. Cette méthode a permis de mesurer les rapports métaboliques urinaires de 20 sujets ayant des activités du CYP1A2 caractéristiques, liées à l'habitude de fumer et à la prise de contraceptifs oraux. Les rapports métaboliques ont permis de mettre en évidence des inductions et des inhibitions du CYP1A2.

Analysis of urinary caffeine metabolites by liquid chromatography – mass spectrometry: The use metabolic ratios to explore CYP1A2 activity.

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse avec une source électronspray à pression atmosphérique a été utilisée pour l'analyse de la caféine et 14 de ses métabolites. Les rapports métaboliques urinaires de la caféine ont été déterminés après administration d'un bol oral de caféine marquée chez 20 sujets sains. Ces sujets avaient des activités caractéristiques du CYP1A2 différentes, relatives à l'habitude de fumer et à la prise de contraceptifs oraux. L'utilisation de la caféine marquée pour le calcul des rapports métaboliques a permis d'éliminer la contribution des métabolites endogènes de la caféine, qui sont toujours présents même après une diète spécifique. La sélectivité et la haute sensibilité de la spectrométrie de masse ont permis de limiter la collecte d'urine sur une période de 3 heures. Les comparaisons entre les groupes des sujets caractéristiques ont démontré que les rapports métaboliques de la caféine étaient des marqueurs sensibles des variations d'activité du CYP1A2.

3.2. Publications



Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis
27 (2002) 261–270

JOURNAL OF
PHARMACEUTICAL
AND BIOMEDICAL
ANALYSIS

www.elsevier.com/locate/jpba

Analysis of urinary caffeine metabolites by HPLC-DAD: the use of metabolic ratios to assess CYP1A2 enzyme activity

Marie-Sophie Caubet *, Walid Elbast, Marie-Claude Dubuc,
Jean-Louis Brazier

Chaire Médicaments, Grossesse et Allaitement, Faculté de Pharmacie, Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montreal, Que., Canada, H3C 3J7

Received 27 October 2000; received in revised form 21 July 2001; accepted 26 July 2001

Abstract

An improved extraction procedure and a new RP-HPLC method were developed for selective and rapid analysis of caffeine and 14 of its metabolites in urine. Analytes were isolated by solid-phase extraction and separated on an Eclipse XDB-C18 column. Recoveries ranged between 83 and 99%. Precision, linearity and accuracy of the chromatographic method were found to be within required limits. Using this procedure, caffeine metabolic ratios were determined in 20 subjects with characteristic CYP1A2 activities, relatively to smoking habit and contraceptives intake. The method might be useful to point out induction and inhibition of CYP1A2 activity. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Caffeine; Caffeine metabolites ratios; Phenotyping; CYP1A2

1. Introduction

Given the involvement of CYP1A2 (isoform of the CYP1A cytochrome P450 subfamily) in drug metabolism and its potentially important role in the induction of chemical carcinogenesis, there has been a real interest in the identification of substrates which can be used as *in vivo* probes for assessing the activity of this enzyme in humans. Caffeine, 1,3,7-trimethylxanthine (137X), is used

world-wide in many kind of beverages as well as a drug and has been applied as a metabolic probe for determining CYP1A2 activity. This enzyme is involved in the liver biotransformation of many drugs and xenobiotics [1–3].

As shown in Fig. 1, CYP1A2 catalyses the N-1, N-3 and N-7 demethylations of caffeine (137X) to form theobromine (37X), paraxanthine (17X) and theophylline (13X), respectively, accounting for about 80, 11 and 4% of caffeine metabolism [4]. Each of these xanthines undergoes a N-monomethylation reaction to give the corresponding monomethylxanthine, 1-methylxanthine (1X), 3-methylxanthine (3X) and 7-methylxanthine (7X). Caffeine and xanthines are hydroxy-

* Corresponding author. Tel.: +1-514-345-4931x3983; fax: +1-514-345-4988.

E-mail address: mscaubet@justine.umontreal.ca (M.-S. Caubet).

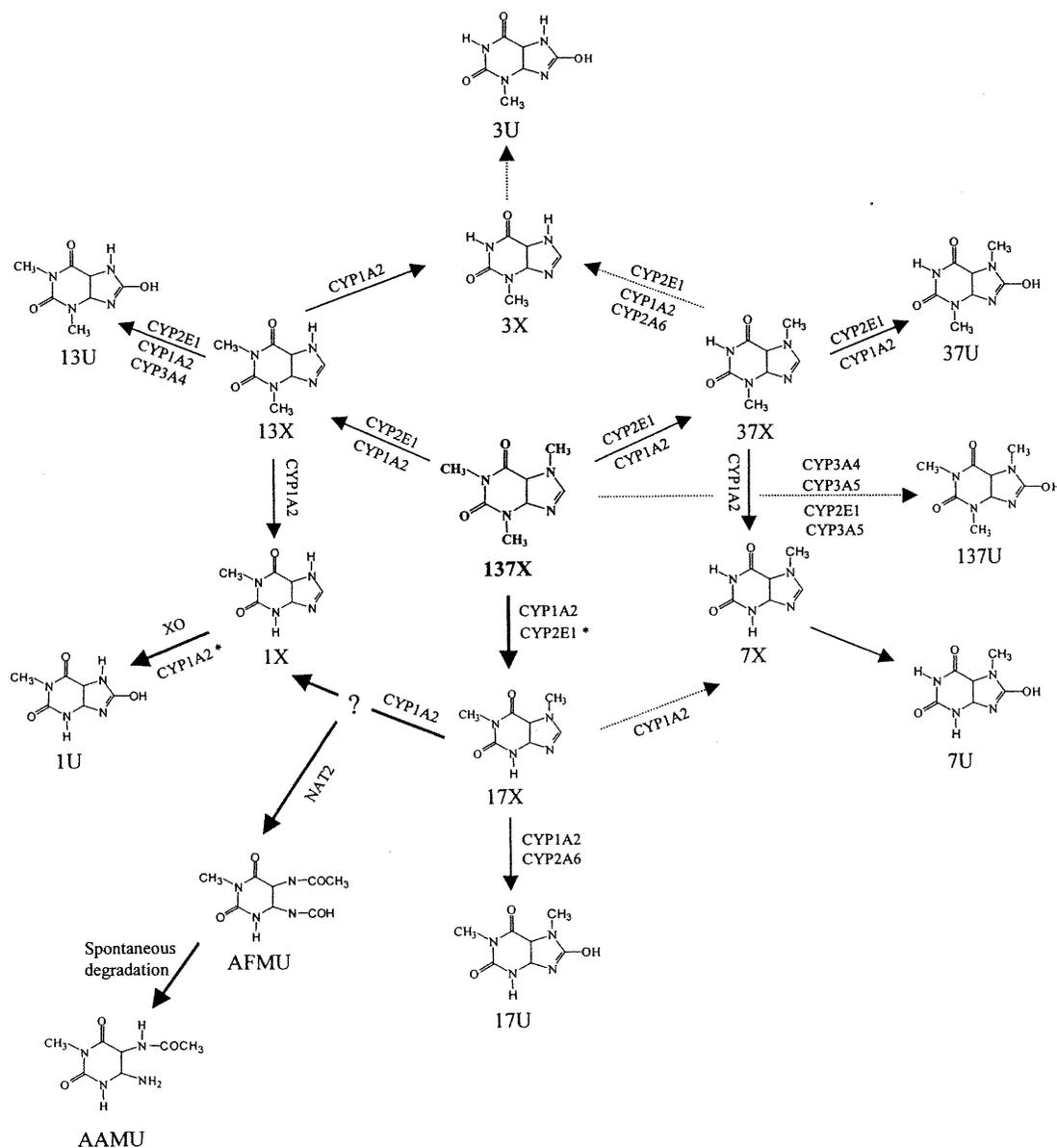


Fig. 1. Caffeine metabolism pathways in human liver. Bold arrows point out main pathways and dotted arrows mark minor pathways, which do not contribute to any of the ratios used to mark CYP1A2 or NAT2 activity. Symbols beside arrows indicate enzymes: NAT2, *N*-acetyltransferase; XO, xanthine oxidase. 137X is caffeine or 1,3,7-trimethylxanthine; 13X is theophylline or 1,3-dimethylxanthine; 17X is paraxanthine or 1,7-dimethylxanthine; 37X is theobromine or 3,7-dimethylxanthine; 1X is 1-methylxanthine; 3X is 3-methylxanthine; 7X is 7-methylxanthine; 137U is 1,3,7-trimethyluric acid; 13U is 1,3-dimethyluric acid; 17U is 1,7-dimethyluric acid; 37U is 3,7-dimethyluric acid; 1U is 1-methyluric acid; 3U is 3-methyluric acid; 7U is 7-methyluric acid; AFMU, 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil; AAMU, 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil.

lated into their corresponding uric acids, 1,3,7-trimethyluric acid (137U), 1,3-dimethyluric acid (13U); 1,7-dimethyluric acid (17U); 3,7-dimethyluric acid (37U); 1-methyluric acid (1U); 3-methyluric acid (3U) and is 7-methyluric acid (7U). Other non-microsomal enzymes participate in caffeine metabolism [5]. The polymorphic *N*-acetyltransferase, NAT2, catalyses the C8–N9 bond scission and the acetylation of paraxanthine to produce 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil (AFMU) which is then spontaneously transformed into 5-acetylamino-6-amino-3-methyluracil (AAMU) in urine. Xanthine oxidase (XO) is responsible for the conversion of 1X into 1U.

Several chromatographic methods, especially HPLC methods, have been reported for determining caffeine and its metabolites in human biological fluids. Some of these methods focused on the determination of caffeine and several methylxanthines [6–8] while others separated and identified few xanthines and uric acids [9,10]. Furthermore, these methods used a liquid-phase extraction. Solid-phase extraction (SPE) is progressively substituting for liquid–liquid extraction, because it is more easy and solvent saving. However, literature reports assays that do not extract more than six or seven metabolites, generally of the xanthines group [6,11,12].

A new method using a solid-phase extraction from urine and able to analyse and quantify caffeine and 14 of its metabolites by reversed phase liquid chromatography–diode array detector (RP-HPLC-DAD) is reported. The method has been applied to the measurement of caffeine and its metabolites in urine samples taken from 20 healthy subjects, men and women, smokers (S) and non-smokers (NS), and women taking or not taking oral contraceptives (OC).

Molar ratios of the different caffeine metabolites have been calculated to assess the characteristic CYP1A2 activity of these groups of subjects. Among the various metabolic ratios reported in the literature, the following ratios were chosen as being not influenced by renal clearance and not affected by the contribution of the other enzymes involved in the caffeine metabolism, $(17X + 17U)/137X$; $(13X + 17X + 37X)/137X$; $(3X + 13U + 13X)/137X$ and $(7X + 37U + 37X)/137X$ [3,9].

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Caffeine, its xanthine and uric acid derivatives and β -hydroxyethyltheophylline (β HT) were obtained from Sigma-Aldrich Ltd (Oakville, Ont., Canada). Methanol, tetrahydrofuran (THF) and acetonitrile were purchased from V.W.R. Scientific Ltee (Montreal, Que., Canada). Glacial acetic acid and water HPLC reagent were from Moquin scientific Inc (Lachenaie, Que., Canada). Sodium hydroxide, hydrochloric acid, sodium acetate and sodium chloride were from Sigma-Aldrich Ltd (Oakville, Ont., Canada).

Solvents and chemicals were all of analytical grade.

2.2. Calibration and reagent solutions

Individual stock solutions containing 1 mg ml⁻¹ of methylxanthines and uric acids were prepared in water/methanol (70:30, v/v). Metabolites needed addition of 1 N sodium hydroxide for complete dissolution, except for 13X, 17X, 137X and 137U. As 1U and casually 3U have been found to be unstable in basic or acidic solvent, in particular at room temperature, basic solutions were buffered at pH 7 with 1 N hydrochloric acid. A standard solution containing 100 μ g ml⁻¹ of all the metabolites was prepared. This standard mixture was diluted to 1, 10, 20 and 40 μ g ml⁻¹ with blank urine. Since it was really difficult to obtain urine free of all xanthines and uric acids, quantitative urine controls (Fisher Scientific, Montreal, Canada) were used for blank urine samples.

β -hydroxyethyltheophylline was chosen as internal standard because it is an analogue of theophylline which has chemical properties similar to those of caffeine metabolites. A stock solution containing 0.2 mg l⁻¹ of β -hydroxyethyltheophylline was prepared in water/methanol (70:30, v/v). The concentration of the internal standard was set at 20 μ g ml⁻¹ in the blank urine. Solutions were kept stable when stored at 4 °C for several months.

2.3. Instrumentation and chromatographic conditions

An HPLC-DAD system, series 1100, from Hewlett-Packard (Kirkland, Que., Canada) was used. The chromatographic system consisted of a vacuum degasser on line with a binary pump linked to a thermostatted column compartment via an autosampler. The detection was carried out using a diode array UV detector (200–400 nm). Metabolites were separated on an Eclipse XDB-C18 reversed phase column (250 × 4.6 mm, 5 µm particle size) coupled with a Eclipse XDB-C18 guard column (12.5 × 4.6 mm, 5 µm particle size), from Hewlett-Packard (Kirkland, Que., Canada). The mobile phase A was a mixture of water/acetic acid/THF (996.5:1:2.5, v/v/v) (pH 3.3) and the mobile phase B was acetonitrile [6]. Both of them were filtered through a 0.45 µm membrane from Gelma Sciences (Ann Arbor, MI, USA). The elution program was chosen as follows, B was set at 3.5% for 11 min, then increase linearly to 12% from 11 to 18 min and then held at 12% for 7 min; with a post run of 10 min in order to equilibrate the column between injections. The flow rate was set at 1 ml min⁻¹. The column compartment was kept at a controlled temperature of 23 ± 0.5 °C. The pressure was 11 000 kPa. Compounds were detected at their maximum absorbance wavelength, 270 nm for xanthines and the internal standard and 290 nm for uric acids.

2.4. Sample preparation: solid phase extraction (SPE)

Before treatment, urine samples were filtered through a 0.45 µm nylon membrane from Millipore (Neapan, Ont., Canada). 500 µl of urine was spiked with 50 µl of internal standard (100 µg ml⁻¹) and then acidified with 50 µl of 1 N HCl. The solution was loaded onto a SPE column Oasis C18 from Waters Corporation (Milford, MA, USA) which had been previously conditioned with 2 × 1 ml of methanol, 2 × 1 ml of 0.02 N HCl and 2 × 1 ml of water. The column was dried under vacuum for 10 min and then washed with 0.1 M sodium acetate in methanol/acetonitrile

(80:20, v/v) adjusted to pH 7.5 with glacial acetic acid. The eluate was collected and dried in a Rapidvap™ evaporator from Labconco (Kansas City, MO, USA) at 45 °C under vacuum, at 95% of the maximum vortex speed. Finally, the sample was reconstituted into 500 µl of water/methanol (70:30, v/v) and a 5 µl aliquot was injected into the HPLC system for analysis.

2.5. Analytical parameters

2.5.1. Precision and recovery

Within run precision was calculated from repeated analysis ($n = 4$) during one working day.

Day to day precision was calculated from repeated analysis of quality control samples on four successive working days. The efficiency of the extraction procedure was evaluated by comparing peak area ratios to internal standard, with and without extraction.

2.5.2. Linearity

Calibration curves were constructed by plotting peak area ratios (compound/internal standard) versus standard concentrations and the best relationship was determined by a least-squares linear regression analysis.

2.5.3. Limit of detection and quantification

The limits of detection (LOD) were calculated as a three-fold signal to noise ratio at the baseline. The limit of quantification (LOQ) was set as the lowest concentration of the calibration function.

2.5.4. Accuracy

The accuracy was tested using a Student's t -test, comparing the mean value Y_m ($n = 4$) of the peak area ratio of a urine standard of known concentration, injected four times ($n = 4$), with the peak area Y_R measured from the equation of the linear regression. Accuracy was verified with a threshold of tolerance of 5% when $t = (Y_m - Y_R) / (S.D./2) < t_{table}(\alpha = 5\%, n - 1)$, where S.D. is the standard deviation of Y_m .

Accuracy was checked with concentrations of 1 and 40 µg ml⁻¹.

2.6. Subject and drug administration

A clinical trial was carried out in five groups of four healthy adults, aged between 18 and 40 years, men NS (group A); men S (group B); women NS taking no OC (group C); women NS taking OC (group D) and women S taking OC (group E). These subjects were part of 125 healthy volunteers who participated in a CYP1A2 phenotyping study with metabolic probes labeled with ^{13}C . Characteristic groups were chosen to evaluate the induction of the CYP1A2 (group B), the inhibition of the CYP1A2 (group D) and the simultaneous exposition to both an inducer and an inhibitor of this enzyme (group E).

The pre-requisites were a 7 day period without any medication, 48 h without alcohol and charbroiled meat and a 10 h fast before the trial. All subjects ingested an oral dose of labeled ^{13}C caffeine in aqueous solution, depending of the body weight. Doses were either 155, 200 or 245 mg for body weights ranging between 45 and 60 kg, 60 and 75 kg and 75 and 90 kg, respectively. These doses, corresponding to 3 mg about per kg of the

body weight, were chosen according the doses previously used in the literature for caffeine breath test [13].

A urine sample, U_0 , was collected just before the beginning of the test. All the urines were collected from the ^{13}C caffeine administration up to the end of the test, divided in two samples, U_1 and U_2 for, respectively, the time period between 0 and 3 h and the time period between 3 and 6 h.

Samples were stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ until analysis.

2.7. Data analysis

The concentrations of caffeine and metabolites were measured in the three urine samples for the 20 subjects. The following molar ratios were calculated in U_1 and U_2 and used as an index for CYP1A2 activity, $(7\text{X} + 37\text{U} + 37\text{X})/137\text{X}$, $(17\text{X} + 17\text{U})/137\text{X}$, $(3\text{X} + 13\text{U} + 13\text{X})/137\text{X}$ and $(13\text{X} + 17\text{X} + 37\text{X})/137\text{X}$, for measuring, respectively, the N-1-demethylation, N-3-demethylation, N-7-demethylation and the first three N-demethylations of caffeine. Mean ratios were compared between groups using a Student's *t*-test.

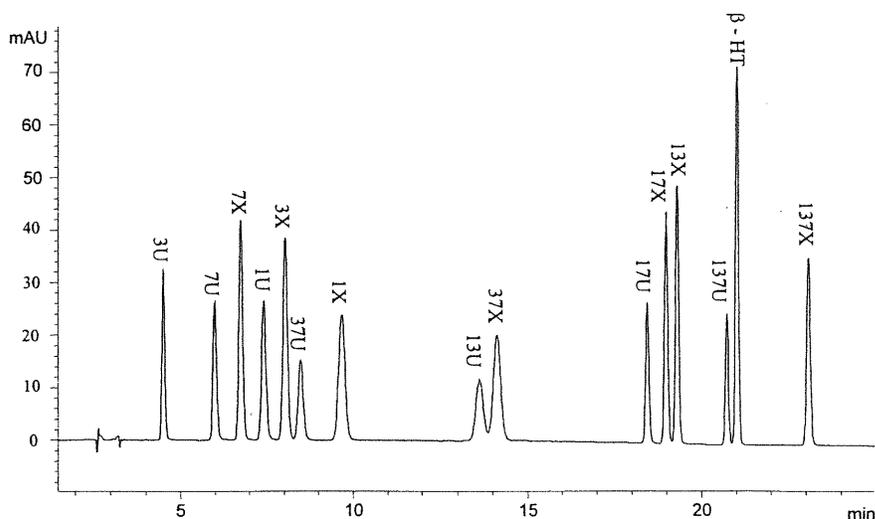


Fig. 2. Chromatogram for blank urine spiked with standard solution at $10\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ at 270 nm. For compounds abbreviations refer to Table 1. Retention times are 4.51, 6.00, 6.76, 7.42, 8.04, 8.48, 9.67, 13.63, 14.12, 18.46, 18.99, 19.31, 20.73, 21.02, 23.08 min for 3U, 7U, 7X, 1U, 3X, 37U, 1X, 13U, 37X, 17U, 17X, 13X, 137U, βHT , 137X, respectively.

266

M.-S. Caubet et al. / J. Pharm. Biomed. Anal. 27 (2002) 261–270

Table 1
Recovery and within-day and between-day precision ($n = 4$)

Compound	Recovery (%)	Coefficient of variation (%)							
		Within day				Between day			
		1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	10 $\mu\text{g ml}^{-1}$	20 $\mu\text{g ml}^{-1}$	40 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	10 $\mu\text{g ml}^{-1}$	20 $\mu\text{g ml}^{-1}$	40 $\mu\text{g ml}^{-1}$
137X	97 \pm 1	0.1	0.3	0.1	0.2	3.1	1.2	0.3	0.2
13X	99 \pm 3	1.3	0.4	0.1	0.4	4.8	4.5	0.3	0.1
17X	99 \pm 2	1.8	0.3	0.1	0.4	4.9	5.0	0.2	0.2
37X	97 \pm 1	0.7	0.6	0.1	0.4	2.6	0.6	0.1	0.7
1X	98 \pm 2	1.8	0.2	0.1	0.2	0.9	5.0	1.2	0.4
3X	96 \pm 3	0.4	0.2	0.1	0.1	2.9	4.5	0.3	0.7
7X	90 \pm 6	0.2	1.2	0.1	0.2	2.5	4.9	0.1	1.7
137U	95 \pm 2	0.2	0.2	0.1	0.2	3.1	1.8	1.7	0.2
13U	96 \pm 1	1.1	0.2	0.1	0.0	1.2	1.7	1.7	0.2
17U	95 \pm 0	0.5	0.2	0.0	0.3	0.7	1.8	1.6	0.1
37U	96 \pm 2	0.4	1.8	0.1	0.2	4.7	1.7	1.6	1.3
1U	86 \pm 5	1.0	1.6	0.4	0.1	4.0	2.6	1.0	0.2
3U	33 \pm 7								
7U	83 \pm 7	0.4	0.5	0.0	0.1	0.7	1.9	1.6	2.7
β HHT	98 \pm 1								

3. Results and discussion

3.1. Method validation

In Fig. 2 is shown a chromatogram of extracted blank urine sample spiked caffeine and its metabolites, according to the method described above. Peak's resolution factors were superior to 1.5. No interference in blank urine control and no matrix effect were observed.

3.1.1. Precision and recovery

Coefficients of variation and the recoveries are listed in Table 1. For all metabolites, within day reproducibility values were below 1.8% for the concentrations of 1 and 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and below 0.4% for the concentrations of 20 and 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Day-to-day coefficients of variation never exceeded 5%. Recovery for methylxanthines were higher than 90% and those for uric acids ranged between 83 and 96%, except for 3U (33%). 3U was not taken into account in the rest of the study because it is a minor metabolite of caffeine, which does not contribute significantly to any of the ratios used to check CYP1A2 activity.

The advantages of the SPE compared with liquid–liquid extraction has been described extensively [14,15]. SPE is simple, safety, solvent saving and low cost. Furthermore, our SPE method permitted to obtain recoveries similar to those reported when liquid extraction is used [8,10]. The method improved the determination of caffeine and its metabolites in terms of number of metabolites and efficiencies, as compared with the previously published SPE procedures. Recoveries using the current method were the same or greater than those archived previously by Z.Y. Zhang et al. [11] and I.N. Papadoyannis et al. [6].

3.1.2. Linearity

The values of the correlation coefficients (R^2) of the calibration functions were mostly higher than 0.999. Therefore, the response of the detector showed a good linearity for quantification of caffeine and its derivatives in the studied range of concentrations.

The LOD was evaluated at 3 ng for 1X, 37X, 37U and 13U and 2 ng for caffeine and the other metabolites. LOQ was set at 5 ng.

3.1.3. Accuracy

Accuracy was calculated for two concentrations within the calibration range ($1\text{--}40\ \mu\text{g ml}^{-1}$). T was inferior to $t_{\text{table}}(0.95, 3) = 3.18$, except for 37X at $1\ \mu\text{g ml}^{-1}$ and 37U and 1U at $40\ \mu\text{g ml}^{-1}$, thus the accuracy of the method can be considered as acceptable.

In conclusion, the results show that this new method allows to separate and quantify rapidly (23 min) the metabolites of caffeine, with high precision and accuracy, and that the parameters of quality of the method are similar to those reported in the literature [9,10,16]. Moreover, The solid-phase extraction procedure described here provides an easier and solvent saving sample

preparation that with traditional liquid–liquid procedure. This SPE method is also the first method reported able to extract almost all caffeine metabolites with high recoveries ($> 90\%$).

3.2. Human samples analysis

3.2.1. Urinary profile

Fig. 3 shows the chromatographic urinary profile of a U_1 sample and the various concentrations measured from U_1 and U_2 , for one of the subjects included in the trial. It can be observed that caffeine and nearly all its metabolites were present in urine, 3 h after the ingestion of labeled caffeine (U_1). Concentrations were generally lower in U_2 than in U_1 .

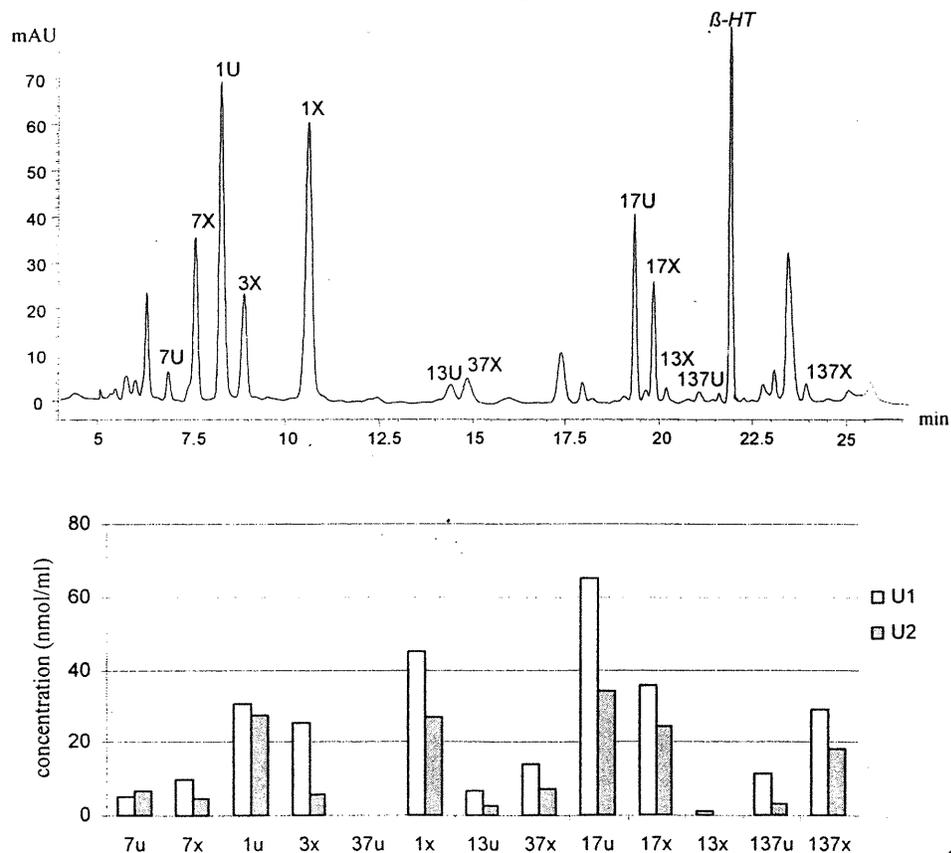


Fig. 3. Chromatogram for urine U_1 at 270 nm and concentrations in urine U_1 and U_2 , for a women non-smoker taking no oral contraceptive steroids. U_1 and U_2 are the urines collected between 0 and 3 h and 3 and 6 h following the caffeine administration, respectively. For compounds abbreviations refer to Fig. 1.

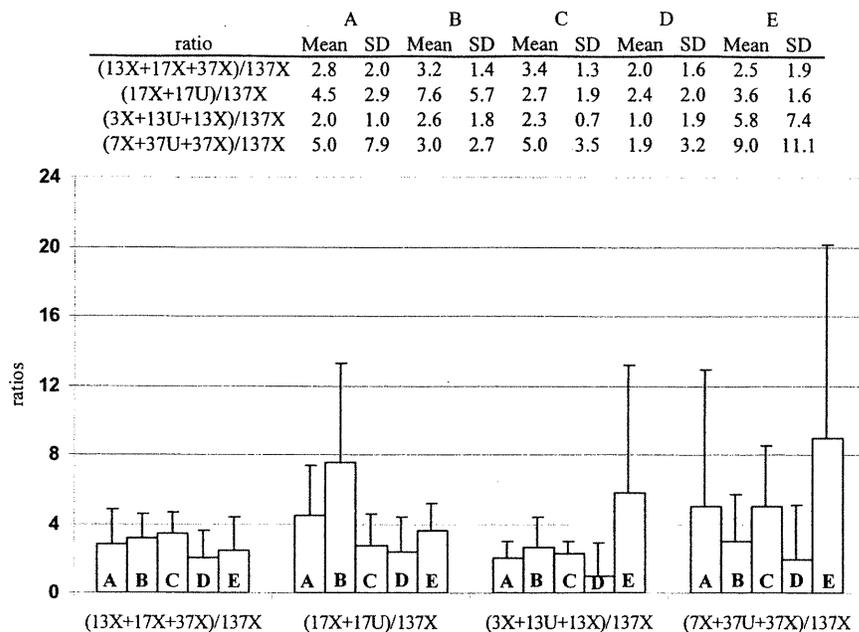


Fig. 4. Caffeine metabolite ratios used for marking CYP1A2 activity, calculated in U_1 for the groups of subjects A, B, C, D and E. U_1 , urine collected between 0 and 3 h following the caffeine administration. A, four men non-smokers. B, four men smokers. C, four women non-smokers taking no oral contraceptive. D, four women non-smokers taking oral contraceptives. E, women smokers taking oral contraceptives.

3.2.2. Metabolic ratios

Figs. 4 and 5 gather the mean and the S.D. of various metabolic ratios in U_1 and U_2 , respectively, for the five groups of subjects. Statistics differentiated significantly group C and group D for the ratio $(17X + 17U)/137X$ calculated in U_2 , but failed to differentiate the five groups for the other ratios. Nevertheless, the values of metabolic ratios and their relative variations among groups show trends to induction and inhibition relative to smoking habits or OC intake.

The comparison of the ratios between group A and B showed that the values obtained from men NS were lower, but insignificantly, than those from men S, except for the ratio $(7X + 37U + 37X)/137X$ where it was the reverse. This observation is in accordance with an induction on the expression of the CYP1A2, due to the polycyclic aromatic hydrocarbons contained in smoke [17].

Comparisons between groups C and D seemed to show that the intake of OC inhibits the activity

of the CYP1A2, as mentioned in other studies reporting also lower ratios in OC users [1,18]. The combination of the smoking habits and the OC intake increased slightly the activity of the CYP1A2 (group E vs. D). Moreover, the metabolic ratios observed in group E seemed to be higher than those observed in group C. Thus, the overall effect of smoking combined with the OC intake results preferentially in an induction of the CYP1A2.

The results obtained, in terms of metabolic ratios, from U_1 and U_2 , brought nearly the same information about the activity of the CYP1A2 for the various groups. Nevertheless, the quality of measurement was improved when working with U_2 .

These observations are in accordance with the ^{13}C caffeine breath test results [19]. However, the presence of metabolites observed in all samples of U_0 (even after a 10 h fast period) might have generated potential errors. Under these condi-

M.-S. Caubet et al. / J. Pharm. Biomed. Anal. 27 (2002) 261–270

269

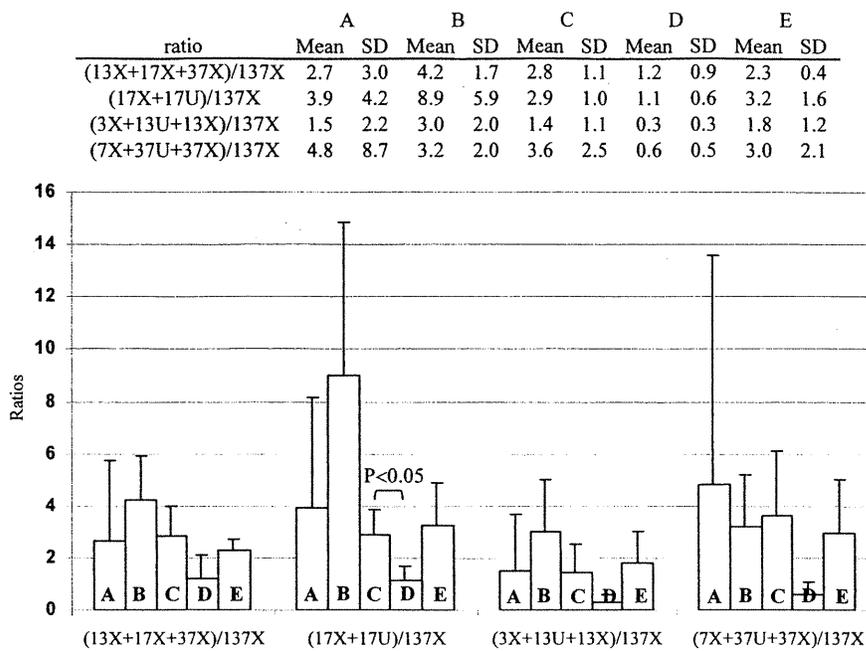


Fig. 5. Caffeine metabolite ratios used for marking CYP1A2 activity, calculated in U_2 for the groups of subjects A, B, C, D and E. U_2 : urine collected between 3 and 6 h following the caffeine administration. A, four men non-smokers. B, four men smokers. C, four women non-smokers taking no oral contraceptive. D, four women non-smokers taking oral contraceptives. E: women smokers taking oral contraceptives.

tions, the validation of the comparisons between reference groups would require a higher number of subjects and a stricter xanthine-free diet, at least 2 days before the test.

4. Conclusion

The analytical method described above can easily be applied for the evaluation of the individual variations of the CYP1A2 activity in longitudinal study, for example for the evaluation of the drug metabolizing liver function during either normal or pathological pregnancy, for the study of drug–drug interaction or drug–environmental interaction, for assessing liver metabolic function during hepatic diseases, etc. In the context of these kinds of studies, the inter-individual variations do not interfere in the comparison of metabolic ratios, as each subject acts as its own standard.

Moreover, if ^{13}C caffeine is used as the metabolic probe, mass spectrometry could be used to detect more specifically the labeled substrate and its metabolites. Hence, labeled xanthines and uric acid metabolites could be differentiated from the unlabeled ones present in urine prior to the test.

References

- [1] M.E. Campbell, S.P. Spielberg, W. Kalow, Clin. Pharmacol. Ther. 42 (1987) 157–165.
- [2] F. Berthou, D. Ratanasavanh, C. Riche, D.J. Picart, T. Voisin, A. Guillouzo, Xenobiotica 19 (1989) 401–417.
- [3] A. Rostami-Hodjegan, S. Nurminen, P.R. Jackson, G.T. Turcker, Pharmacogenetics 6 (1996) 121–149.
- [4] J.O. Miners, D.J. Birkett, Gen. Pharmacol. 24 (1996) 245–249.
- [5] B.K. Tang, D. Kadar, L. Qian, J. Iriah, W. Kalow, Clin. Pharmacol. Ther. 49 (1991) 648–657.
- [6] N. Papadoyannis, V.F. Samanidou, K.A. Georga, J. Liquid Chromatogr. Rel. Technol. 19 (16) (1996) 2559–2578.

270

M.-S. Caubet et al. / J. Pharm. Biomed. Anal. 27 (2002) 261–270

- [7] D.T. Holland, A.K. Godfredsen, T. Page, J. Connor, J. Chromatogr. B 707 (1998) 105–110.
- [8] E. Schreiber-Deturmeny, B. Bruguerolle, J. Chromatogr. B 677 (1996) 305–312.
- [9] J.A. Carrillo, J. Benitez, Clin. Pharmacol. Ther. 55 (3) (1993) 293–304.
- [10] B.R. Dorrbecker, S.H. Mercik, P.A. Kramer, J. Chromatogr. 336 (2) (1984) 293–300.
- [11] Z.Y. Zhang, M.J. Fasco, L.S. Kaminsky, J. Chromatogr. B 665 (1995) 201–208.
- [12] E. Naline, B. Flouvat, C. Advenier, M. Pays, J. Chromatogr. 419 (1987) 177–189.
- [13] A.C. Parker, P. Pritchard, T. Preston, R.L. Smyth, I. Choonara, Arch. Dis. Child 77 (3) (1997) 239–241.
- [14] I. Liska, J. Krupcik, P.A. Leclercq, J. High Resol. Chromatogr. 12 (9) (1989) 577–590.
- [15] R.D. McDowall, J. Chromatogr. 492 (1989) 3–58.
- [16] C. Krul, G. Hagem, J. Chromatogr. B 709 (1998) 27–34.
- [17] W. Kalow, B.K. Tang, Clin. Pharmacol. Ther. 49 (1991) 44–48.
- [18] K. Vistisen, H.E. Poulsen, S. Loft, Carcinogenesis 13 (1992) 1561–1568.
- [19] M.S. Caubet, A. Laplante, J. Caillé, J.L. Brazier, Gastroenterology, in press.

**DETERMINATION OF URINARY ¹³C-CAFFEINE METABOLITES BY
LIQUID CHROMATOGRAPHY - MASS SPECTROMETRY: THE USE
METABOLIC RATIOS TO ASSESS CYP1A2 ACTIVITY.**

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (soumise)

Marie-Sophie CAUBET MSc^{1*}, Blandine COMTE PhD², Jean-Louis BRAZIER PhD¹

¹Faculté de Pharmacie, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal (Québec) H3C 3J7,
Canada

Telephone: (514) 345-4931 ext. 3983

Fax: (514) 345-4988

E-mail 

²Chaire de Pharmacie Louis Boivin, Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-
Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, Montréal, (Québec) H3T 1C5, Canada

Running title: Caffeine metabolic ratio by LC-MS to study CYP1A2 activity

ABSTRACT

A method using liquid chromatography coupled with mass spectrometry with an atmospheric pressure electrospray source was developed for analysis of caffeine and fourteen of its metabolites in urine. Labelled caffeine metabolic ratios were determined after an oral bolus of labelled caffeine in twenty healthy subjects with different characteristic CYP1A2 activities, relative to smoking habit and oral contraceptives intake. The use of labelled caffeine for the calculation of metabolic ratios avoided

taking into account the important background of endogenous caffeine metabolites, very difficult to eliminate even after a specific diet. The selectivity and high sensitivity of mass spectrometry detection allowed urine collections for only a three-hour period. Comparison between characteristic groups showed that labelled caffeine metabolic ratios were sensitive markers of changes in CYP1A2 activity.

Key words

Labelled caffeine, LC-MS, CYP1A2, caffeine metabolic ratios.

INTRODUCTION

Caffeine has been used as a model probe for CYP450 liver function investigation [1]. As shown in figure 1, caffeine is metabolized via successive pathways mainly catalyzed by CYP1A2, xanthine oxidase or N-acetyltransferase to give thirteen different metabolites. Molar caffeine metabolites ratios (CMRs) have been used to assess the metabolic phenotype of those enzymes [2-4]. CYP1A2 activity shows an inter-individual variability among the population. Moreover, behavioural parameters such as alcohol consumption, exercise, smoking, contraceptives intake, etc., have been reported to modify the activities of these drug-metabolizing enzymes [4-6]. Metabolic phenotyping may be of relevance in determining whether patients may develop adverse reactions to certain drugs or risks for developing bladder or liver disorder [7,8].

High performance liquid chromatography (HPLC) coupled with ultra-violet (UV) detection is the most frequently used method for the analysis of caffeine and its metabolites in biological samples [9-12]. However, poor selectivity and sensitivity are recorded with this method of detection, particularly when analyzing metabolites with very similar UV spectra. Moreover, biological fluids such as plasma or urine generally contain endogenous compounds absorbing UV radiations and being sources of interference. Mass spectrometry (MS) improves both selectivity and sensitivity and is a powerful tool for drugs analysis. The aim of the present study was to develop a new

HPLC-MS method with an atmospheric pressure electrospray source (API-ES) for the analysis of ^{13}C labelled caffeine and its metabolites in urine to assess the CYP1A2 activity.

In the previous study [13], HPLC-UV was used for measuring caffeine metabolic ratios from 20 healthy subjects, males and females, including smokers and women taking oral contraceptives steroids (OCS), who received an oral bolus of ^{13}C labelled caffeine. These subjects were also evaluated with the ^{13}C -caffeine breath test. Results showed the presence of high concentrations of caffeine metabolites in urine samples taken before the beginning of the protocol and after a 10 hours fasting period. In fact, as mentioned in other studies [14], it is really difficult to obtain urine free of any caffeine metabolites, even after a three-day washout. This background is the main source of potential errors in the measurement of urine concentrations of caffeine metabolites. The interest and the power of the HPLC-MS combined with the use of labelled substrate, is obvious in this context. The present study used mass spectrometry to quantify both labelled and unlabelled compounds in the urine samples of the same 20 healthy subjects previously studied [13], allowing us to determine how unlabelled residual caffeine derivatives in urine contribute to the total metabolites levels. The method was used for the measurement of labelled CMRs for evaluation of CYP1A2 activity: $(7\text{X}+37\text{U}+37\text{X})/137\text{X}$, $(17\text{X}+17\text{U})/137\text{X}$, $(3\text{X}+13\text{U}+13\text{X})/137\text{X}$, $(13\text{X}+17\text{X}+37\text{X})/137\text{X}$ (for compound abbreviations, refer to figure 1).

MATERIELS AND METHODS

Chemicals

Caffeine, its xanthine and uric acid derivatives and β -hydroxyethyltheophylline (β HT) were obtained from Sigma-Aldrich Ltd. (Oakville, Ontario, Canada). Caffeine(1,3,7-trimethyl- $^{13}\text{C}_3$, 99%) was purchased from Isotec Inc., Ohio, USA.

Subject and drug administration

The 20 subjects included in this study (18-40 years old, 68 ± 12 kg) were part of the 125 healthy adult volunteers who participated in a clinical trial for CYP1A2 phenotyping study with the ^{13}C -caffeine breath test [15]. The protocol was reviewed and approved by the Research and Ethical Committee of Algorithm Pharma Inc. (Montreal, Canada), in accordance with the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. Eight men, 4 non-smokers (group A), 4 smokers (group B), and 12 women, 4 non-smokers (group C), 4 non-smokers taking OCS (group D) and 4 smokers taking OCS (group E) were included. The induction of CYP1A2 activity was evaluated in the group B whereas its inhibition was studied in the group D. The simultaneous exposition to both an inductor and inhibitor of this enzyme was evaluated in the group E.

The pre-requisites for this study were a seven-day period without any medication, 48 hours without alcohol and charbroiled meat consumption and a 10 hour fast before the trial. Each volunteer received an oral bolus of labelled caffeine (1,3,7-trimethyl- $^{13}\text{C}_3$ -caffeine, 99%) in aqueous solution, depending on the body weight. Three different doses were used: 155 mg, 200 mg and 245 mg for body weights ranging between 45-60 kg, 60-75 kg and 75-90 kg, respectively (2.6 to 3.4 mg/kg of caffeine). These doses correspond to those usually used for a caffeine breath test in adult and can be found in about two cups of coffee. No adverse effect from caffeine was observed during the protocol. One urine sample was collected before the oral bolus and all the following urine volumes were collected and combined for the 3 hour period of the study. Subjects were allowed to drink water *ad libitum*, 1 hour after the caffeine administration. Samples were stored at -20°C until further analysis.

Sample analysis

Analyses were performed on a 1100 series HPLC-MS, from Agilent Technologies (Kirkland, Quebec, Canada). Caffeine and its metabolites were extracted from urine by solid phase extraction (SPE) and separated by HPLC as previously described [13]. The method was slightly modified for the mass spectrometry detection. After the SPE procedure, evaporated samples were concentrated and reconstituted in 50 μL instead of 500 μL . The mobile phase flow rate was set at 0.8 mL/min. The chromatographic

elution program was chosen as follow: 3.5% acetonitrile for 11 min, then increased linearly to 8 % from 11 to 32 min and then increased linearly to 13 % from 32 to 36 min; with a post run of 20 min in order to re-equilibrate the column between injections. Compounds were introduced into the mass spectrometer by API-ES. In the spray chamber, drying gas temperature was set at 350°C, drying gas flow at 10 mL/min and nebulization pressure at 55 psig. The mass spectrometer was operated in the positive and the negative ion mode for the detection of xanthines and uric acids respectively. Capillary voltage was set at 5000 V and fragmentor voltage at 70eV. Quantification was achieved using selected ion monitoring (SIM). For each compounds, appropriate ion sets were monitored to analyse both labelled and unlabelled molecules (table I), with a dwell time of 296 and 329 ms/ion for positive and negative mode respectively. Calibrations with standard curves in urine were achieved using unlabelled compounds. β -hydroxyethyltheophylline (β -HT) and 1,9-dimethyluric acid (19U) were chosen as internal standards (IS) for xanthines and uric acids, respectively. Blank urine samples were spiked with standard solutions for final concentrations of 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20 and 40 ng/ μ L for caffeine and its metabolites and 5 ng/ μ L for IS. Areas under the peaks from non-spiked urine samples were subtracted to peak areas from spiked samples and calibration curves were determined by a least-squares linear regression analysis. The precision of the method was determined from 4 repeated assays. For measurement of the labelled metabolites, the peak areas were corrected for naturally occurring heavy isotopes as previously described by Fernandez *et al.* [16].

Data analysis

Each caffeine metabolite excreted in the combined 3-hour urine collection was expressed as a percentage of the administered dose of caffeine per weight (kg). The following CMRs were calculated and used as an index of CYP1A2 activity: $CMR_1=(7X+37U+37X)/137X$ for caffeine *N*-1-demethylation, $CMR_2=(17X+17U)/137X$ for *N*-3-demethylation of caffeine, $CMR_3=(3X+13U+13X)/137X$ for *N*-7-demethylation of caffeine and $CMR_4=(13X+17X+37X)/137X$ for the three *N*-demethylations of caffeine. Differences were analysed by the Student's *t*-test and correlations were

calculated as Spearman's rank order correlation coefficient. A $p < 0.05$ was accepted as significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Analytical method

Figure 2 illustrates the ion chromatograms of labelled caffeine and its metabolites extracted from a representative urine sample obtained from a male smoker (group B). Most of metabolites were detected in both positive (figure 2a) and negative (figure 2b) conditions. However, higher sensitivity was achieved when analysing xanthines in the positive mode (ion $[M+H]^+$) and uric acids in the negative mode (ion $[M-H]^-$). The ions used for each metabolite are presented in Table I. Small modifications were made to adapt the previous HPLC-UV method to MS detection. The time of analysis was lengthened in order to separate 17X and 13X in positive mode and the flow rate was reduced to fit with the API-EI source conditions. Changes could eventually be done in the chromatographic elution conditions to reduce the run time. However, this time depends on the number of metabolites of interest to be analysed. The samples were concentrated 10 times compared to the previous method in order to be able to quantify very low concentrations of metabolites. Using the HPLC-UV method, both labelled and unlabelled compounds were not distinguished, leading therefore to the measurement of higher concentrations than with the HPLC-MS method.

Figure 3 presents the ion chromatograms under positive (a) and negative (b) mode of a blank urine sample showing that before the beginning of the protocol, all metabolites, except caffeine, were detected. In most of the urine samples, unlabelled compound often represented more than 50% of the total amount of the assayed metabolite, particularly for monomethylxanthines (1X, 3X and 7X) and monomethyluric acids (1U, 3U and 7U). This confirms that a 10-hour fast period before the trial is not enough to obtain urine free of xanthines and uric acids. As reported in other studies [14], it is really difficult to obtain urine free of caffeine metabolites even after a three-day fasting period. In fact, caffeine and xanthines are not only contained in coffee or tea, but also in

numerous foods such as chocolate and soft drinks [17]. Moreover, the caffeine is metabolized via several parallel and successive pathways (figure 1), leading to the production of different metabolites with more or less rapid metabolism, even if the half-life of caffeine is only about 4 hours. Therefore, the use of labelled caffeine as a metabolic probe for the assessment of CYP1A2 activity, is particularly relevant differentiate labelled caffeine derivatives from residual endogenous metabolites.

The lower limit of detection (LOD), defined as a three-fold signal to noise ratio at the baseline was 50 pg for all compounds. The limit of quantification was set at the lowest concentration of the calibration curves. Compared to the UV detection [13], the MS analysis increased about sixty times the LOD (50 pg *versus* 3 ng). Similar LOD were obtained in the only paper reported in the literature for the determination of caffeine and its metabolites in plasma by HPLC-MS [18].

Calibration functions were linear through the studied range of concentrations, with correlation coefficients ranging from 0.97 to 0.99; the same order than those presented in the study of Kanazawa *et al.* [18]. Correlation coefficients from HPLC-MS methods are slightly lower than those in conventional HPLC-UV method [13,14]. The ionisation process in MS detection (API-ES or APCI sources) is probably the main source of distortion in the linearity. Coefficients of variation for the method precision were less than 6%. Standard curves were performed using unlabelled standards and after subtraction of the important background from blank urine. Utilization of ^2H or ^{13}C labelled standards (M+4 or above to not interfere with the metabolism of the ingested labelled caffeine) would have been preferable and more specific. However, these compounds were unfortunately not commercially available and their utilisation would have increased considerably the cost of the study.

Figure 4 presents the quantities of labelled caffeine and its various metabolites assayed in urine and expressed as a percentage of the amount of the labelled caffeine ingested per kg. The negative values measured for few metabolites were due to the variability of the method (the standard deviation presented on the graph represents the variability of the percentage measured in a group). The main metabolites eliminated 3 hours after caffeine administration were 17X and 1X and their corresponding uric acids. These results confirm that caffeine is mainly *N*-3-demethylated into 17X for about 80% and

17X is then *N*-1-demethylated mainly into 1X for about 12 % [1]. In a 3-hour urine collection, 0.01 to 0.16 % of the individual dose/kg (or 0.7 to 13% of the individual dose) was recovered, depending on the subjects. These recovery coefficients are low compared to those generally used for CMRs measurement (from 30 to 50% of recovery depending the time of urine collection, 8 to 24 hours after the caffeine administration) [1,19]. Nevertheless, our results show that LC-MS, allowing measurements of very low amounts of metabolites with high sensitivity, shorten the time of urine collection, without damaging the sensitivity of CMR tests.

Metabolic ratios

Four ratios were chosen among the different CMRs previously reported as being probes for the *in vivo* CYP1A2 activity [19,20]. Figure 5 summarised CRM calculations in the different groups of subjects.

Inter-individual coefficients of variations were on average 50% in each group and for each ratio. The variability was slightly higher than in previous published studies (15 to 40%) and was probably related to the small number of subjects analysed (4 per group) [2,19]. Inter and intra-individual differences in the renal clearances or the excretion rates of the various metabolites may also contribute in a large extent to the variability of CRMs [21].

OCS intake decreased significantly all ratios in non-smoking women (group D versus group C). On the contrary, smoking habit increased significantly all ratios in women taking OCS (group E versus group D). This result is in accordance with previous studies on the inhibitory effect of OCS on the CYP1A2 activity. In fact, it has been shown that the CMR (AFMU+1X+1U)/17U [4,22] decreased with OCS intake. Similar results have been obtained with the caffeine breath test [15]. The significant inductive effect of CYP1A2 activity in smoking women taking OCS was also in accordance with the previous observation using either the HPLC-UV detection or the breath test [13,15]. Smoking habit in women taking OCS resulted in an overall metabolic activity not significantly different from that measured in non-smoking women taking no OCS.

No significant difference was observed between smokers and non-smokers men. In a study done on 37 smokers and 70 non-smokers, Carrillo *et al.* [19] reported no

significant difference for the CMR_3 and a significant difference for the CMR_1 . Butler *et al.* [23] showed that CRM_2 increased significantly in Arkansas and Italian smokers compared to non-smokers but it was not affected in Italian smokers of black tobacco and Chinese smokers compared to Italian and Chinese non smokers. Consequently, these results show that not all of the calculated CMRs are able to point out the induction of CYP1A2 activity by smoking. Moreover, as previously mentioned [23], CMRs showed much larger inter-individual variability inside groups than differences between groups. Finally, it has been shown that inter-ethnic variation may have an influence on the clearance of dimethylxanthines [5]. Nevertheless, 3 hours after caffeine intake, urine of smokers contained twice more 17X and 17U than urine of non-smokers, reflecting the rapid main first *N*-demethylation of caffeine through the induction of the CYP1A2 (figure 4, group B versus group A). A significant increase in all the calculated CMRs was observed when women taking OCS are smoking (figure 5, group E versus group D). As previously reported in other studies, no gender difference was observed of the CYP1A2 indexes (figure 5, group A versus group C) [19,24].

Table II presents correlation coefficients between the different CMRs and shows that all CMRs were strongly correlated with each other ($p < 0.0001$). These significant correlation coefficients are in accordance with the high participation of CYP1A2 in the three *N*-demethylation of caffeine and confirm that any of those CMRs are relevant markers of the CYP1A2 activity. Nevertheless, the different ratios do not have the same specificity and sensitivity. A study from Rostami-Hodjegan *et al.* [20] used computer simulations with values measured *in vivo* to examine the validity of the various CMRs. Among the ratios used in the present study, CMR_4 seemed to be the most sensitive to the CYP1A2 activity and all CMRs could be affected by the renal clearance of caffeine but also by changes in the CYP2A6 activity.

As all the subjects presented in this study were also part of a caffeine breath test study [15], we have calculated correlation coefficients between the CMRs and the results of the areas under curve of the breath test (Table II). A very good concordance of the results performed with the two tests was observed ($p < 0.001$) and the inter-individual variations were of similar magnitude. However, it is interesting to note that caffeine

breath test was able to significantly differentiate CYP1A2 activity between non-smoking and smoking men.

In conclusion, the present LC-MS method provides a new sensitive way for measurement of caffeine and its metabolites in urine. MS detection records higher selectivity and sensitivity than UV detection (50 fold). The increased sensitivity of MS detection allows urine collections for only a 3-hours period with the possibility of relevant metabolic ratio calculations to assess the CYP1A2 activity. The use of labelled caffeine for the calculation of CMRs as indexes of CYP1A2 activity avoids taking into account the important background of endogenous caffeine metabolites, difficult to eliminate even after a specific diet. Comparisons between the different specific groups show that CMRs are sensitive markers of changes in CYP1A2 activity. However, the large inter-individual variations and the small number of subjects included in the present study limit the extent of the results interpretation. Further investigation should take into account the influence of racial gender and should compare CMRs to the clearances of caffeine and its metabolites.

REFERENCES

- [1] W. Kalow, B. K. Tang, *Clin. Pharmacol. Ther.* **53(5)**, 503-514 (1993).
- [2] W. Kalow, B. K. Tang, *Clin. Pharmacol. Ther.* **50(5)**, 508-519 (1991).
- [3] B. K. Tang, D. Kadar, L. Qian, J. Iriah, J. Yip, W. Kalow, *Clin. Pharmacol. Ther.* **49(6)**, 648-657 (1991).
- [4] K. Visiten, H. E. Poulsen, S. Loft, *Carcinogenesis* **13(9)**, 1561-1568 (1992).
- [5] D. M. Grant, B. K. Tang, W. Kalow, *Clin. Pharmacol. Ther.* **33(5)**, 591-602 (1983).
- [6] W. Kalow, B. K. Tang, *Clin. Pharmacol. Ther.* **49(1)**, 44-48 (1991).
- [7] A. C. Parker, P. Pritchard, T. Preston, R. L. Smyth, I. Choonara, *Arch. Dis. Child.* **77(3)**, 239-241 (1997).
- [8] A. Holstege, M. Staiger, K. Haag, W. Gerok, *Klin. Wochenschr.* **67(1)**, 6-15 (1989).
- [9] E. Schreiber-Deturmeny, B. Bruguerolle, *J. Chrom. B* **677(2)**, 305-312 (1996).

- [10] I. N. Papadoyannis, V. F. Samanidou, K. A. Georga, *J. Liq. & Rel. Technol.* **19(16)**, 2559-2578 (1996).
- [11] H. Tajerzadeh, S. Dadashzadeh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **13(12)**, 1507-1512 (1995).
- [12] K. A. Georga, V. F. Samanidou, I. N. Papadoyannis, *J. Liq. & Rel. Technol.* **22(19)**, 2975-2990 (1999).
- [13] M. S. Caubet, E. Walid, M. C. Dubuc, J. L. Brazier, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **27(1-2)**, 261-270 (2001).
- [14] C. Krul, G. Hageman, *J. Chrom. B* **709(1)**, 27-34 (1998).
- [15] M. S. Caubet, J. L. Brazier, *I. Health Envir. Stud.* **in press** (2002).
- [16] C. A. Fernandez, C. Des Rosiers, *J. Biol. Chem.* **270(17)**, 10037-10042 (1995).
- [17] J. J. Barone, H. R. Roberts, *Food Chem. Toxicol.* **34(1)**, 119-129 (1996).
- [18] H. Kanazawa, R. Atsumi, Y. Matsushima, J. Kizu, *J. Chrom. A* **870(1-2)**, 87-96 (2000).
- [19] J. A. Carrillo, J. Benitez, *Clin. Pharmacol. Ther.* **55(3)**, 293-304 (1994).
- [20] A. Rostami-Hodjegan, S. Nurminen, P. R. Jackson, G. T. Tucker, *Pharmacogenetics* **6(2)**, 121-149 (1996).
- [21] D. Birkett, J. O. Miners, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **31(4)**, 405-408 (1991).
- [22] M. E. Campbell, S. P. Spielberg, W. Kalow, *Clin. Pharmacol. Ther.* **42(2)**, 157-165 (1987).
- [23] M. A. Butler, N. P. Lang, J. F. Young, N. E. Caporaso, P. Vineis, R. B. Hayes, C. H. Teitel, J. P. Massengill, M. F. Lawsen, F. F. Kadlubar, *Pharmacogenetics* **2(3)**, 116-127 (1992).
- [24] M. V. Relling, J. S. Lin, G. D. Ayers, W. E. Evans, *Clin. Pharmacol. Ther.* **52(6)**, 643-658 (1992).

TABLE I

Selected ions monitored for analysis of caffeine and its metabolites. The mass spectrometer was operated on selected ion monitoring (SIM) with a dwell time of 296 and 329 ms/ion for respectively positive and negative detection mode. The different ions for each compound correspond to $[M_0]$, $[M_0+1]$, $[M_0+2]$ or $[M_0+3]$ for the presence of 0, 1, 2 or 3 atoms of ^{13}C respectively on the molecule, where M_0 corresponds to $[M+H]^+$ for xanthines and $[M-H]^-$ for uric acids.

Compound	m/z
Positive mode	
1X, 3X, 7X	167, 168
13X, 17X, 37X	181, 182, 183
137X	195, 196, 197, 198
β -HT (IS)	225
Negative mode	
1U, 7U	181, 182
13U, 17U, 37U, 19U (IS)	195, 196, 197,
137U	209, 210, 211, 212

TABLE II

Correlation matrix (Spearman correlations) between the different calculated caffeine metabolic ratios (CMRs) and between these ratios and caffeine breath test (CBT) previously measured [15]. $CMR_1=(7X+37U+37X)/137X$, $CMR_2=(17X+17U)/137X$, $CMR_3=(3X+13U+13X)/137X$, $CMR_4=(13X+17X+37X)/137X$. ** $p<0.001$ and *** $p<0.0001$, using the Student's *t*-test. For compound abbreviations, refer to figure 1.

	CMR ₁	CMR ₂	CMR ₃	CMR ₄	CBT
CMR ₁	1.00				0.62 **
CMR ₂	0.90 ***	1.00			0.59 **
CMR ₃	0.81 ***	0.83 ***	1.00		0.64 **
CMR ₄	0.83 ***	0.81 ***	0.91 ***	1.00	0.80 ***

LEGENDS OF FIGURES

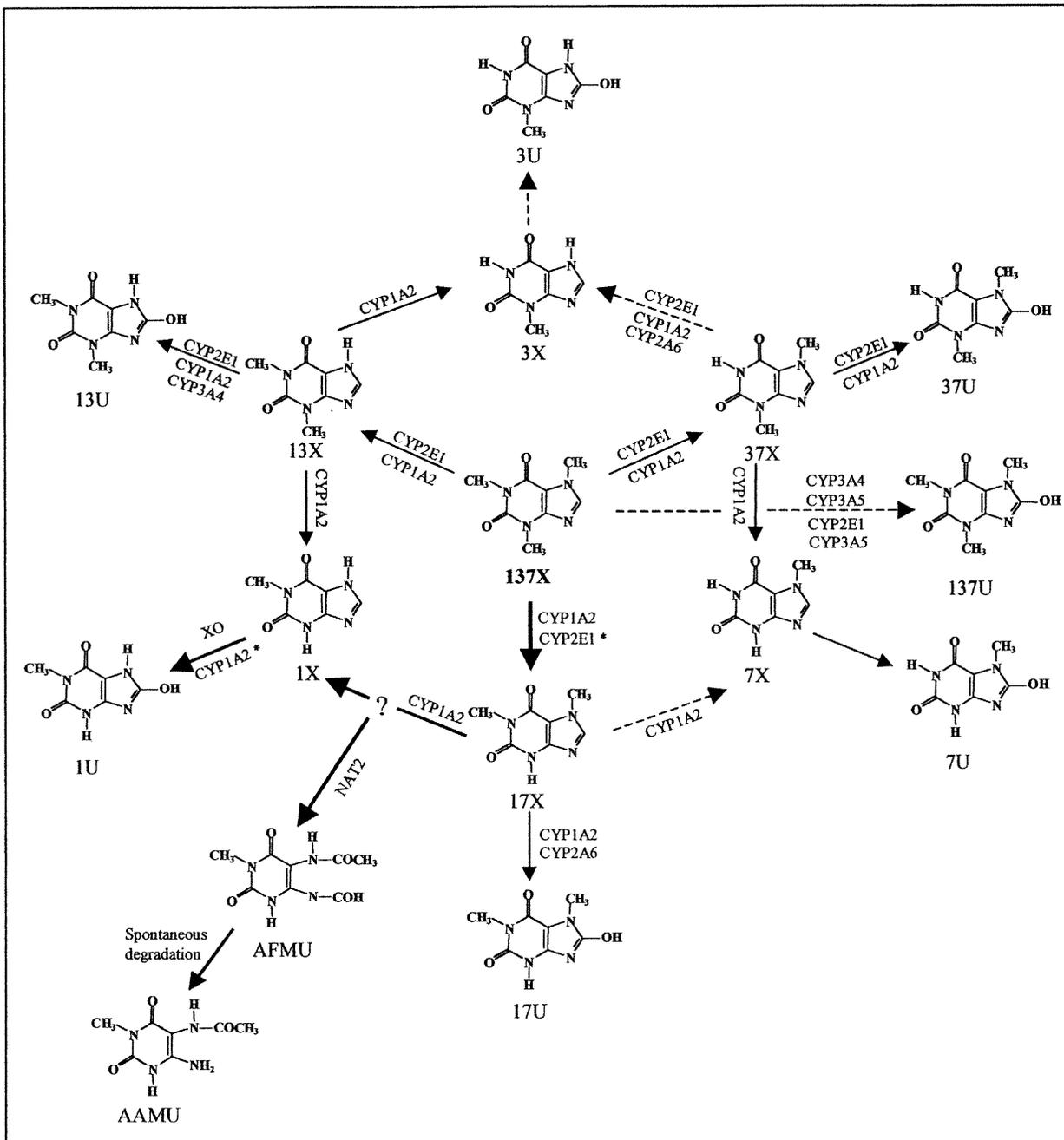
Figure 1: Caffeine metabolism pathways in human liver [13]. Bold arrows point out main pathways and dotted arrows minor pathways, which do not contribute to any of the ratios used to study CYP1A2 or NAT2 activities. Symbols beside arrows indicate enzymes: NAT2: N-acetyltransferase; XO: xanthine oxidase. 137X: caffeine or 1,3,7-trimethylxanthine; 13X: theophylline or 1,3-dimethylxanthine; 17X: paraxanthine or 1,7-dimethylxanthine; 37X: theobromine or 3,7-dimethylxanthine; 1X: 1-methylxanthine; 3X: 3-methylxanthine; 7X: 7-methylxanthine; 137U: 1,3,7-trimethyluric acid; 13U: 1,3-dimethyluric acid; 17U: 1,7-dimethyluric acid; 37U: 3,7-dimethyluric acid; 1U: 1-methyluric acid; 3U: 3-methyluric acid; 7U: 7-methyluric acid; AFMU: 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil; AAMU: 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil.

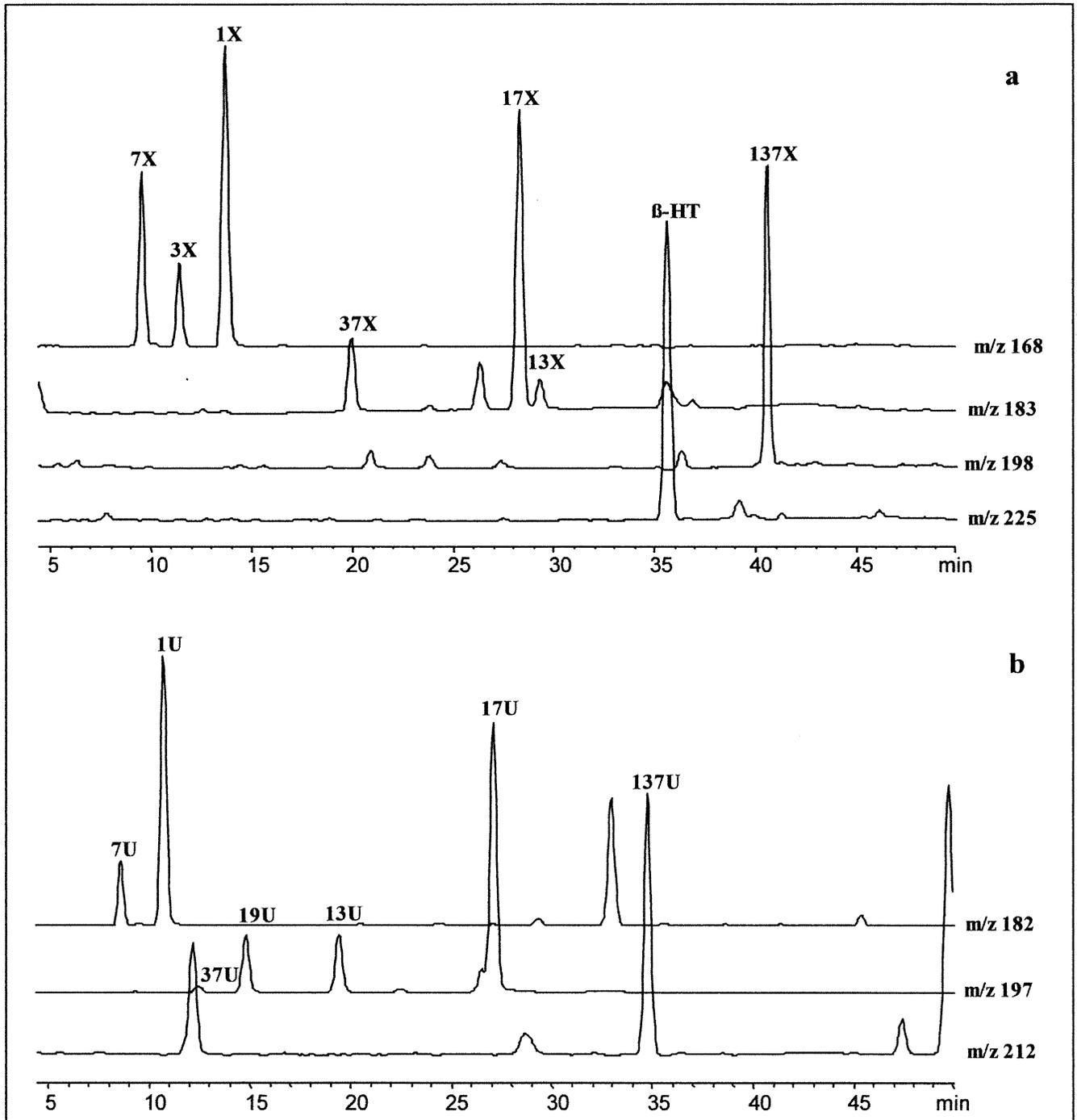
Figure 2: Selected ion chromatograms of labelled caffeine and its metabolites analysed under (a) positive and (b) negative ion detection modes, extracted from a representative urine sample coming from a smoking men (group B). For compound abbreviations, refer to figure 1 and text.

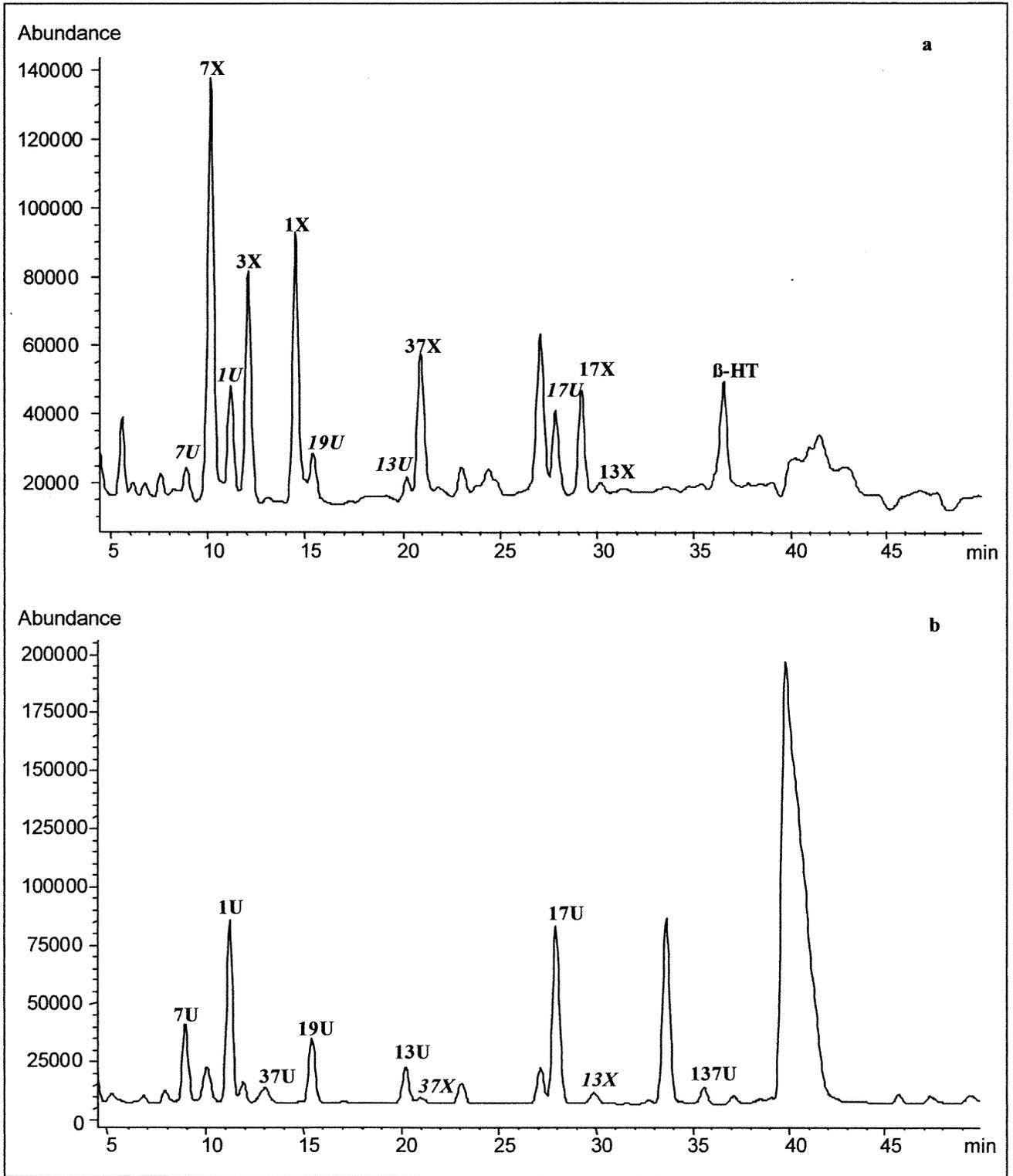
Figure 3: Total ion chromatogram of non labelled caffeine and its metabolites detected under (a) positive and (b) negative modes in a urine sample spiked with internal standards. For compound abbreviations, refer to figure 1 and text.

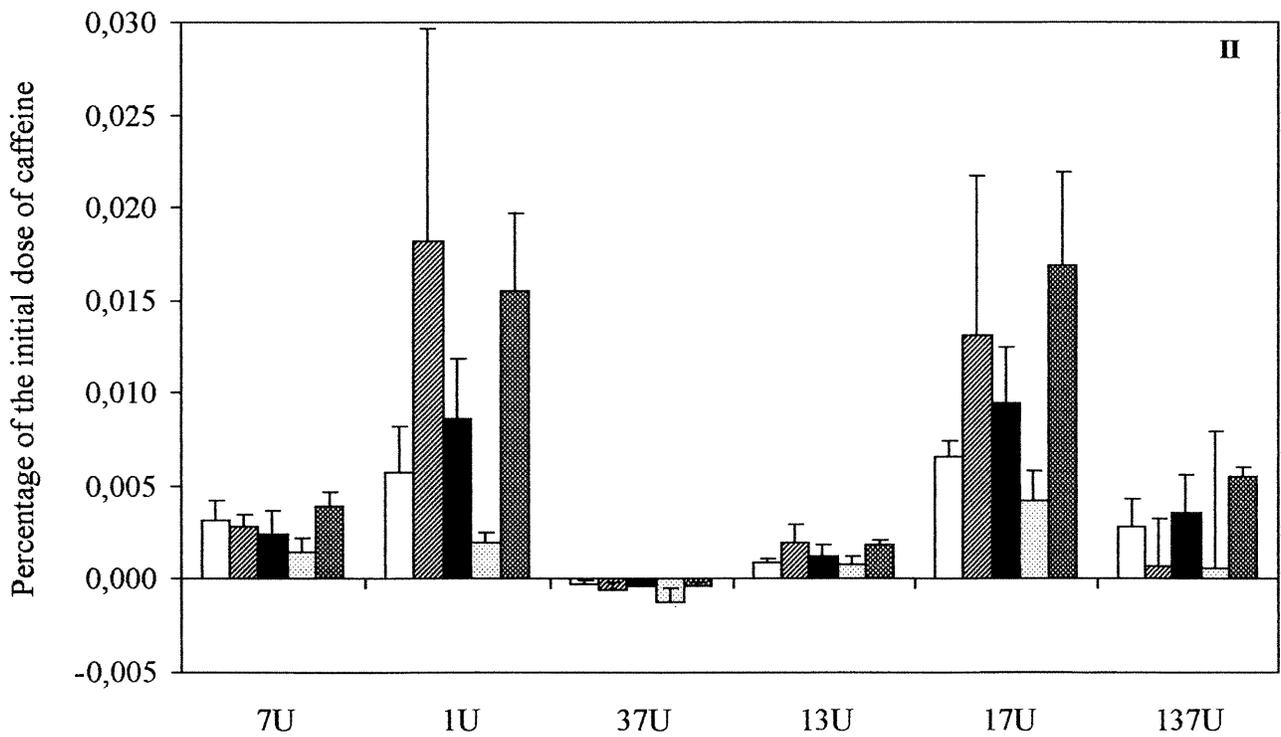
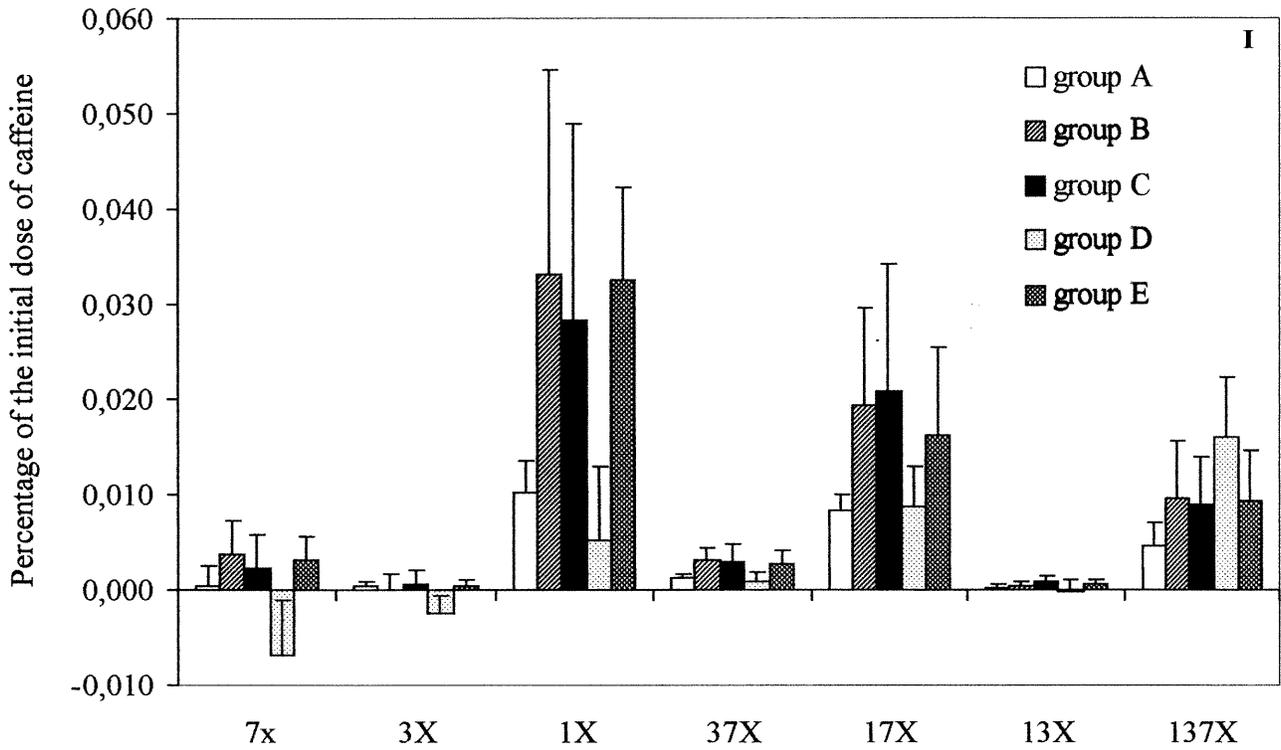
Figure 4: Caffeine metabolites (Xanthine (I) and Uric Acid (II)) in urine samples, expressed as percentages of the initial dose of labelled ingested caffeine (molar quantity of metabolites/molar quantity of caffeine/kg). For compound abbreviations, refer to figure 1. A: non-smoking men; B: smoking men; C: non-smoking women; D: non-smoking women taking oral contraceptives; E: smoking women taking oral contraceptives. Data are expressed as means \pm standard deviations; number of patients per group: n=4.

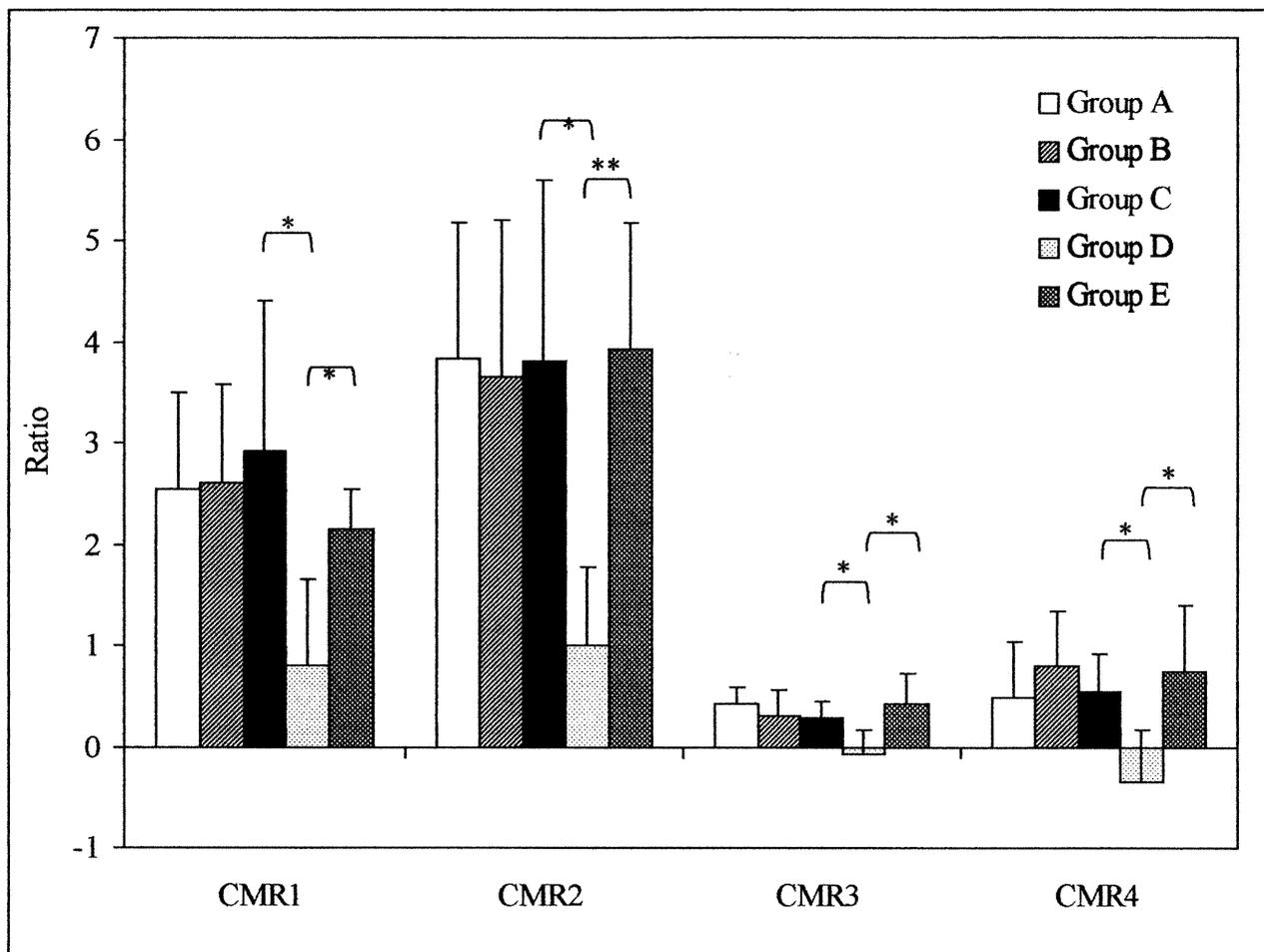
Figure 5: Caffeine metabolic ratios (CMRs) used for phenotyping CYP1A2 activity. $CMR_1 = (7X+37U+37X)/137X$, $CMR_2 = (17X+17U)/137X$, $CMR_3 = (3X+13U+13X)/137X$, $CMR_4 = (13X+17X+37X)/137X$. For compound abbreviations, refer to figure 1. A: non-smoking men; B: smoking men; C: non-smoking women; D: non-smoking women taking oral contraceptives; E: smoking women taking oral contraceptives. Data are expressed as means \pm standard deviations; number of patients in each group: n=4; * $p<0.05$, ** $p<0.001$ using Student's *t*-tests.











DISCUSSION

Pendant la grossesse et l'allaitement, il est recommandé de ne pas prendre de médicaments. Cependant certaines pathologies chez la femme enceinte nécessitent un traitement continu. Or, tout au long de la période de gestation, plusieurs modifications apparaissent au niveau du métabolisme hépatique. Ces modifications peuvent induire des variations des paramètres pharmacocinétiques des médicaments et ainsi augmenter les risques de toxicité pour la mère et le fœtus. Actuellement, très peu d'études relatives aux variations du métabolisme chez la femme enceinte sont rapportées dans la littérature, essentiellement en raison de la difficulté d'inclure des femmes enceintes dans les protocoles d'études cliniques pour des considérations éthiques évidentes. Dans ce contexte, il est pertinent de développer des tests dynamiques et non invasifs pour l'exploration fonctionnelle *in vivo* du métabolisme.

Parmi les tests dynamiques d'exploration métabolique hépatique, les tests respiratoires sont particulièrement adaptés aux populations à risques, comme les femmes enceintes. Ce sont des tests non invasifs, très facile à mettre en œuvre et très peu contraignant pour le patient. L'utilisation de substrat marqué aux isotopes stables (à l'exception du ^2H) n'apporte aucun risque supplémentaire par rapport au substrat non marqué.

Les mesures des rapports métaboliques urinaires d'une molécule cible constituent également des tests dynamiques qui peuvent être utilisés facilement chez les femmes enceintes. En effet, ce sont des tests non invasifs qui, comme les tests respiratoires, sont peu contraignant pour le patient et facile à mettre en oeuvre.

Pour réaliser ces différents tests, plusieurs substrats peuvent être utilisés comme traceur métabolique. La caféine, qui est majoritairement métabolisée dans le foie par le CYP1A2, constitue une sonde spécifique de ce cytochrome qui peut être utilisée chez les femmes enceintes. En effet, la caféine est un composé largement consommé quotidiennement, et qui a faible dose, ne présente pas de risque pour la mère et le fœtus. Le TRC et la mesure des ^{13}C -RMC dans les urines constituent donc deux outils privilégiés pour l'étude des variations du métabolisme pendant la grossesse et la période post-partum

La validation du TRC sur une population de référence (cf. partie II, chapitre 1) a permis de démontrer l'efficacité de ce test pour mettre évidence des variations d'activité métabolique du CYP1A2. En présence d'inducteurs ou d'inhibiteurs du CYP1A2, comme respectivement des hydrocarbures poly-aromatiques ou des stéroïdes contraceptifs, le métabolisme global de la caféine est altéré et par conséquent les résultats du TRC sont significativement modifiés. Des études antérieures menées chez des patients atteints de cirrhose, d'intoxications ou autres dysfonctionnement hépatiques ont montré que le TRC est un indicateur sensible des pathologies hépatiques.

La mesure des ^{13}C -RMC dans les urines sur une population de référence (cf. partie II, chapitre 2) a permis de démontrer la validité de ce test pour mettre en évidence des modifications d'activité du CYP1A2. L'utilisation de la caféine marquée permet d'être très spécifique vis à vis du substrat, et de ne pas tenir compte de la présence systématique de métabolites endogènes de la caféine. En effet, même après une diète de trois jours sans caféine ni xanthines, les urines contiennent encore des métabolites résiduels de la caféine.

La mise en évidence d'inductions ou d'inhibitions du CYP1A2 avec les ^{13}C -RMC n'a pas toujours été significative, contrairement au TRC, en particulier dans le cas des hydrocarbures poly-aromatiques. Cette différence de sensibilité entre les deux tests peut s'expliquer entre autre par le nombre limité de sujets inclus dans la validation des ^{13}C -RMC (n=20) comparativement au nombre inclus dans la validation du TRC (n=110). Cependant, les ^{13}C -RMC ne sont associés qu'à une ou plusieurs réactions du métabolisme de la caféine alors que le TRC tient compte du métabolisme global. Ainsi, suivant la contribution du CYP1A2 et l'implication d'autres enzymes dans les différentes voies du métabolisme, les RMC choisis sont des marqueurs plus ou moins sensibles aux phénomènes d'induction ou d'inhibition. D'autre part, dans la validation du TRC et des ^{13}C -RMC, les variabilités inter-individuelles sont élevées (de 30 à 50%) et interfèrent avec la mise en évidence variations d'activités.

Pour l'étude des variations longitudinales d'activité du CYP1A2 au cours de la grossesse, les variations inter-individuelles n'interviennent pas. Le TRC et les ^{13}C -RMC sont donc deux outils pertinents et sensibles pour évaluer de façon non invasive les

variations d'activité du CYP1A2 chez les femmes enceintes, pour des grossesses normales ou pathologiques. Une toute récente étude utilise la mesure des RMC chez douze femmes enceintes, à différents stades de gestation, et met en évidence une diminution de l'activité du CYP1A2 non seulement en fin de grossesse mais également en début et milieu de grossesse [130]. Actuellement, aucune étude utilisant le ^{13}C -TRC n'a été menée chez la femme enceinte.

En conclusion, les isotopes stables, les tests respiratoires et les rapports métaboliques urinaires constituent une méthodologie de choix pour l'exploration fonctionnelle hépatique chez la femme enceinte :

- les molécules marquées aux isotopes stables sont d'excellents traceurs pour l'homme, en particulier les femmes enceintes et les enfants, puisqu'ils sont non radioactifs et sans toxicité intrinsèque ni embryotoxicité,
- les tests respiratoires qui utilisent ces molécules marquées, sont non invasifs, facile d'utilisation et non contraignants pour le patient,
- le TRC est un test sensible aux variations d'activité métabolique du CYP1A2 et peut être utilisé comme marqueur des dysfonctionnements hépatiques dans le cas de pathologies,
- les RMC sont des indicateurs sensibles aux variations d'activité du CYP1A2,
- l'utilisation de ^{13}C -caféine pour la mesure des RMC permet une détermination analytique très spécifique des métabolites générés par le traceur (détection MS).

Cette méthodologie ne se limite pas seulement à l'utilisation de la ^{13}C -caféine mais elle peut et doit être investiguée pour d'autres substrats (dextrométophan, erythromycine, etc.) de manière à étudier les différentes activités des CYP450 au cours de la grossesse. Cette méthodologie permettra d'obtenir plus d'informations sur les modifications métaboliques pharmacocinétiques des médicaments pendant la grossesse et la période post-partum. Ces informations pourront être utilisées pour le suivi pharmacocinétique et pour la prédiction de risques associés à la prise de médicaments chez les femmes enceintes.

RÉFÉRENCES

- [1] Mazeas L, Budzinski H. Quantification of petrogenic PAH in marine sediment using molecular stable carbon isotopic ratio measurement. *Analisis* 27(3): 200-203 (1999).
- [2] Besacier F, Chaudron-Thozet H, Lascaux F, Rousseau-Tsangaris M. Application du couplage chromatographie gazeuse - spectrométrie de masse isotopique de l'azote à l'analyse d'échantillons de drogues. *Analisis* 27(3): 213-217 (1999).
- [3] Chapman TE. Stables isotopes in paediatric nutritional and metabolic research. *Intercept Ltd, Andover*, (1990).
- [4] Krumbiegel P. Stable isotopes pharmaceuticals for clinical research and diagnosis. *Urban & Fischer, Jena*, (1991).
- [5] Brazier JL. L'analyse isotopique: un vaste terrain de jeu pour l'imagination. *Analisis* 27(3): 195 (1999).
- [6] Gregg CT, Hutson JY, Prine JR, Ott DG, Furchner JE. Substantial replacement of mammalian body carbon with carbon-13. *Life Sci.* 13(7): 775-782 (1973).
- [7] Spielmann H, Eibs HG, Nagel D, Gregg CT. The effects of carbon-13 incorporation into preimplantation mouse embryos on the development before and after implantation. *Life Sci.* 19(5): 633-640 (1976).
- [8] Browne TR, Van Langenhove A, Costello CE, Beimann K, Greenblatt DJ. Pharmacokinetic equivalence of stable-isotope-labeled and unlabeled drugs. Phenobarbital in man. *J. Clin. Pharmacol.* 22(7): 309-315 (1982).
- [9] Cox PJ, Farmer PB, Foster AB, Gilby ED, Jarman M. The use of deuterated analogs in qualitative and quantitative investigations of the metabolism of cyclophosphamide. *Cancer Treat. Rep.* 60(4): 483-491 (1976).

- [10] Benchekroun Y, Dautraix S, Desage M, Brazier JL. Deuterium isotope effects on caffeine metabolism. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 22(2): 127-133 (1997).
- [11] Browne TR. Stable isotopes in pharmaceutical research. *Elsevier, Amsterdam*, (1997).
- [12] Brazier JL, Elbast W. Que peut apporter l'analyse isotopique en flux continu à la recherche et aux utilisations biomédicales. *Analisis* 27(3): 218-224 (1999).
- [13] Douthitt CB. Hyphenation of gas chromatographic techniques with isotope ratio mass spectrometry: Present status and future. *Analisis* 27(3): 197-199 (1999).
- [14] Loft S, Poulsen HE. Prediction of xenobiotic metabolism by non-invasive methods. *Pharmacol. Toxicol.* 67(2): 101-108 (1990).
- [15] Prosser SJ, Brookes ST, Linton A, Preston T. Rapid, automated analysis of ¹³C and ¹⁸O of CO₂ in gas samples by continuous-flow, isotope ratio mass spectrometry. *Biol. Mass. Spectrom.* 20(11): 724-730 (1991).
- [16] Krueger WH, Reesman RR. Carbon isotope analysis in food technology. *Mass Spectrom. Rev.* 1(205-236 (1982).
- [17] Guilluy R, Billion-Rey F, Brazier JL. On-Line measurements of ¹³C enrichments in rat breath. Non-invasive method for in vivo study of drug enzymatic induction. *J. Chromatogr.* 562(1-2): 341-350 (1991).
- [18] Mion F, Queneau P, Rousseau M, Brazier JL, Paliard P, Minaire Y. Aminopyrine breath test - Development of a ¹³C-breath test for quantitative assessment of liver function in humans. *Hepatogastroenterology* 42(6): 931-938 (1995).

- [19] Likura Y, Iwasaki A, Tsubaki T, Akasawa A, Onda T, Katsunuma T, Miura K, Ebisawa M, Saito H, Koya N, Kajiwara M. Study of liver function in infants with atopic dermatitis using the C-13-methacetin breath test. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107(1-3): 189-193 (1995).
- [20] Parker AC, Pritchard P, Preston T, Smyth RL, Choonara I. Enhanced drug metabolism in young children with cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child.* 77(3): 239-241 (1997).
- [21] Rost KL, Brosicke H, Brockmoller J, Scheffler M, Helge H, Roots I. Increase of cytochrome P4501A2 activity by omeprazole: evidence by the 13-C[N-3-methyl]-caffeine breath test in poor and extensive metabolizers of S-mephenytoin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 52(2): 170-180 (1992).
- [22] Kajiwara M, Okazali T, Iida K, Narumi S, Hirose M, Ijichi M, Abel T, Hirano S, Linuma M. Studies on C-13-phenacetin metabolism. II. A combination of breath test and urine test of in vivo metabolites in the diagnosis of liver disease. *Chem. Pharm. Bull.* 44(6): 1258-1260 (1996).
- [23] Rivory LP, Slaviero KA, Hoskins JM, Clarke SJ. The erythromycin breath test for the prediction of drug clearance. *Clin. Pharmacokinet.* 40(3): 151-158 (2001).
- [24] Hepner GW, Vesell ES, Lipton A, Harvey HA, Wilkinson GR, Schenker S. Disposition of aminopyrine, antipyrine, diazepam, and indocyanine green in patients with liver disease or on anticonvulsivant drug therapy: diazepam breath test and correlations in drug elimination. *J. Lab. Clin. Med.* 90(3): 440-456 (1977).
- [25] Berry GT, Nissim I, Mazur AT, Elsas LJ, Singh RH, Klein PD, Gibson JB, Lin Z, Segal S. In vivo oxidation of [13C] galactose in patients with galactose-1-phosphate uridylyltransferase deficiency. *Biochem. Mol. Med.* 56(2): 158-165 (1995).

- [26] Lauterburg BH, Grattagliano I, Gmur R, Stadler M, Hilderbrand P. Noninvasive assessment of the effect of xenobiotics on mitochondrial function in human beings: Studies with acetylsalicylic acid and ethanol with the use of the carbon 13-labelled ketoisocaproate breath test. *J. Lab. Clin. Med.* 125(3): 378-383 (1995).
- [27] Mana F, Ham HR, Reynaert H, Franken P, Urbain D. Urea breath test for the diagnosis of helicobacter pylori. *Gastrointest. Endosc.* 53(5): 700 (2001).
- [28] Graham DY, Klein PD, Evans DJ, Evans DG, Alpert LC, Opekun AR, Boutton TW. campylobacter pylori detected noninvasively by 13C-urea breath test. *Lancet* 23(1): 1174-1177 (1987).
- [29] Horswill CA, Zipf WB, Kein CL. Measuring energy costs of leisure activity in adolescents using CO2 breath test. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29(9): 1263-1268 (1997).
- [30] Kein CL, McClead RE. Estimation of CO2 production in enterally fed preterm infants using an isotope dilution stable tracer technique. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 20(6): 389-393 (1996).
- [31] Hoshi J, Nishida H, Yasui M, Ohishi M, Takahashi M. [13C] breath test of medium-chain triglycerides and oligosaccharides in neonates. *Acta Paediatr. Jpn.* 34(6): 674-677 (1992).
- [32] Van Den Driessche M, Peeters K, Marien P, Ghoos Y, Devlieger H, Veereman-Wauters G. Gastric emptying in formula-fed infants measured with the C-13-octanoic acid breath test. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 29(1): 46-51 (1999).
- [33] Veereman-Wauters G, Ghoos Y, vanderschoor S, Maes B, Hebbalkar N, Devlieger H, Eggermont E. The C-13-octanoic acid breath test - A noninvasive technique to assess gastric emptying in preterm infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 23(2): 111-117 (1996).

- [34] Lembecke B, Braden B, Caspary WF. Exocrine pancreatic insufficiency: accuracy and clinical value of the uniformity labelled ^{13}C -hiolein breath test. *Gut* 39(5): 668-674 (1996).
- [35] Solomons NW, Schoeller DA, Wagonfeld JB, Ott D, Rosenberg IH, Klein PD. Application of a stable isotope (^{13}C)-labelled glycocholate breath test to diagnosis of bacterial overgrowth and ideal dysfunction. *J. Lab. Clin. Med.* 90(3): 431-439 (1977).
- [36] Dellert SF, Nowicki MJ, Farrel MK, Delent J, Heubi JE. The ^{13}C -xylose breath test for the diagnosis of small bowel bacterial overgrowth in children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 25(2): 153-158 (1997).
- [37] Kein CL, Murray RD, Ailabouni A, Powers P, Kepner J, Powers L, Brunengraber H. Stable isotope model for assessing production of short chain fatty acids from colon-derived sugar - Application in pigs. *J. Nutr.* 126(12): 3069-3076 (1996).
- [38] Hiele M, Ghoo Y, Rutgeerts P, Vantrappen G. Measurement of the rate of assimilation of oligo- and polysaccharides by $^{13}\text{CO}_2$ breath tests and isotope ratio mass spectrometry. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 16(133-135 (1988).
- [39] Wutzke KD, Heine WE, Plath C, Leitzmann P, Radke M, Mohr C, Richter I, Gulzow HU, Hobusch D. Evaluation of oro-coecal transit time - A comparison of the lactose- ^{13}C , N- 15]ureide (CO_2)-C- 13 and the lactulose H-2-breath test in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51(1): 11-19 (1997).
- [40] Park W, Paust H, Brosicke H, Knoblash G, Meshe M, Helge H. Effect of carbohydrate administration on leucine oxidation in newborn infants. Studies using ^{13}C leucine breath test. *Infusionsther. Klin. Ernahr.* 14(2): 66-70 (1987).

- [41] Kibririge MS, Morris Jones PH, Stevens RF, Rennie MJ. Reduced leucine catabolism induced by chemotherapy in leukemic children. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 6(1): 289-295 (1989).
- [42] Lanigan JA, Wells JC, Lawson MS, Lucas A. Validation of food dietary method for assessment of dietary energy and macronutrient intake in infants and children aged 6-24 months. *Eur. J. Clin. Nutr.* 55(2): 124-129 (2001).
- [43] Hill RJ, Davies PS. The validity of self-reported energy intake as determined using the doubly labelled water technique. *Br. J. Nutr.* 85(4): 415-430 (2001).
- [44] Rating D, Langhans CD. Breath tests: concepts, applications and limitations. *Eur. J. Pediatr.* 156(Suppl 1): S18-S23 (1997).
- [45] Gonzalez FJ, Crespi CL, Czerwinski M, Gelboin HV. Analysis of human cytochrome P450 catalytic activities and expression. *Tohoku. J. Exp. Med.* 168(2): 67-72 (1992).
- [46] Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab. Dispos.* 29(1&2): 413-580 (1997).
- [47] White RE, Sligar SG, Coon MJ. Evidence for a homolytic mechanism of peroxide oxygen-oxygen bond cleavage during substrate hydroxylation by cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 255(23): 11108-11111 (1980).
- [48] Schuler MA. The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions. *Plant. Physiol.* 112(4): 1411-1419 (1996).
- [49] Okey AB. Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. *Pharmacol. Ther.* 45(2): 241-298 (1990).

- [50] Batt AM, Strazielle N, Siegst G. Induction and repression of cytochromes P450. In vivo and in vitro approach. *Thérapie* 48(6): 527-536 (1993).
- [51] Waxman DJ, Azaroff L. Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem. J.* 281(577-592 (1992).
- [52] Song BJ, Veech RL, Park SS, Gelboin HV, Gonzalez FJ. Induction of rat hepatic N-nitrosodimethylamine demethylase by acetone is due to protein stabilization. *J. Biol. Chem.* 264(6): 3568-3572 (1989).
- [53] Eisen LP, Harmon JM. Activation of the rat kidney mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* 119(4): 1419-1426 (1986).
- [54] Parmentier JH, Kremers P, Ferrari L, Batt AM, Gielsen JE, Siegst G. Repression of cytochrome P450 by cytokines: IL-1 beta counteracts clofibrac acid induction of CYP4A in cultured foetal rat hepatocytes. *Cell. Biol. Toxicol.* 9(3): 307-313 (1993).
- [55] Halpert JR. Structural basis of selective cytochrome P450 inhibition. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35(29-53 (1995).
- [56] Murray RD. Mechanisms of the inhibition of cytochrome P-450-mediated drug oxidation by therapeutics agents. *Drug Metab. Dispo.* 18(1): 55-81 (1987).
- [57] Brockmöller J, Roots I. Assessment of liver metabolic function. Clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* 27(3): 216-248 (1994).
- [58] Tanaka A, Breimer DD. In vivo function tests of hepatic drug-oxidizing patients with liver disease. *J. Clin. Pharm. Ther* 22(237-249 (1997).

- [59] Mion F, Geloën A, Rousseau M, Brazier JL, Minaire Y. Mechanism of carbon tetrachloride autoprotection: an vivo study based on ¹³C-aminopyrine and ¹³C-galactose breath tests. *Life Sci.* 54(26): 2093-2098 (1994).
- [60] Slusher LB, Park SS, Gelboin HV, Vesell ES. Studies on the metabolism of aminopyrine, antipyrine and theophylline using monoclonal antibodies to cytochrome P-450 isozymes purified from rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 36(2359-2367 (1987).
- [61] Paolini M, Mesirca R, Pozetti L, Sapone A, Cantelliforti G. Biomarkers of effect in evaluating dithianon cocarcinogenesis - selective induction and suppression of murine CYP3A isoform. *Cancer Lett.* 113(1-2): 221-228 (1997).
- [62] Perri F, Pastore M, Annese V, Andriulli A. The aminopyrine breath test. *Ital. J. Gastroenterol.* 26(6): 306-317 (1994).
- [63] Guitton J, Souillet G, Rivière JL, Gerard F, Guilluy R, Brazier JL. Action of methotrexane on cytochrome P-450 monooxygenases in rats - study performed with [¹³C-13]-aminopyrine micro breath test. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 19(2): 119-124 (1994).
- [64] Alder M, Verset D, Bouhdid, Gulbis B, Lemoine O, Vanderstadt J, Gelin M, Thiry P. Prognostic evaluation of patients with parenchymal cirrhosis - Proposal of a new simple score. *J. Hepatol.* 26(3): 642-649 (1997).
- [65] Merkel C, Bolognesi M, Bellon S, Bianco S, Honisch B, Lampe H, Angeli P, Gatta A. Aminopyrine breath test in the prognostic evaluation of patients with cirrhosis. *Gut* 33(6): 836-842 (1992).
- [66] Gill RA, Goodman MW, Golfus GR, Onstad GR, Burbrick MP. Aminopyrine breath test predicts surgical risk for patients with liver disease. *Ann. Surg.* 198(6): 701-704 (1983).

- [67] Breen KJ, Bury RW, Calder IV, Desmond PV, Peters M, Mashford ML. A [¹⁴C]phenacetin breath test to measure hepatic function in man. *Hepatology* 4(1): 47-52 (1984).
- [68] Schoeller DA, Kotake AN, Lambert GH, Krager PS, Baker AL. Comparison of the phenacetin and aminopyrine breath tests: effect of liver disease, inducers and cobaltous chloride. *Hepatology* 5(2): 276-281 (1985).
- [69] Klatt S, Taut C, Mayer D, Alder G, Beckh K. Evaluation of ¹³C-methacine breath test for quantitative liver function testing. *Gastroenterol.* 35(8): 609-614 (1997).
- [70] Lara Baruque S, Razquin M, Jimenez I, Vasquez A, Gisbert JP, Pajares JM. ¹³C-phenylalanine and ¹³C-methacetin breath test to evaluate functional capacity of hepatocyte in chronic liver disease. *Dig. Liver Dis.* 23(3): 226-232 (2000).
- [71] Matsumoto K, Suehiro M, Iio M, Kawabe T, Shiratori Y, Okano K, Sugimoto T. [¹³C]methacetin breath test for evaluation of liver damage. *Dig. Dis. Sci.* 32(4): 344-348 (1987).
- [72] Watkins PB. Noninvasive tests of CYP3A enzymes. *Pharmacogenetics* 4(171-184 (1994).
- [73] Watkins PB. Erythromycin breath test and clinical transplantation. *Ther. Drug. Monit.* 18(4): 368-371 (1996).
- [74] Lown K, Kolars J, Turgeon K, Merion R, Wrighton SA, Watkins PB. The erythromycin breath test selectively measures P450III_A in patients with server liver disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* 51(3): 229-238 (1992).

- [75] Watkins PB, Murray SA, Winkelman LG, Heuman DM, Wrighton SA, Guzelian PS. Erythromycin breath test as an assay of glucocorticoid-inducible liver cytochromes P-450. Studies in rats and patients. *J. Clin. Invest.* 83(2): 688-697 (1989).
- [76] Eugter HP, Probst M, Wurgler FE, Sengstag C. Caffeine, estradiol, progesterone interact with human CYP1A1 and CYP1A2. Evidence from cDNA-directed expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Drug Metab. Dispos.* 21(1): 43-49 (1993).
- [77] Guilluy R, Billion-Rey F, Brazier JL. On-line measurements of ¹³C enrichments in rat breath. Non-invasive method for in-vivo study of drug enzymatic induction. *J. Chromatogr.* 562(1-2): 341-350 (1991).
- [78] Wahllander A, Mohr S, Paumgartner G. Assessment of hepatic function. Comparison of caffeine clearance in serum and saliva during the day and at night. *J. Hepatol.* 10(2): 129-137 (1990).
- [79] Campbell ME, Spielberg SP, Kalow W. A urinary metabolite ratio that reflects systemic caffeine clearance. *Clin. Pharmacol. Ther.* 42(2): 157-165 (1987).
- [80] Krauer B, Krauer F, Hytten FE. Drug prescribing in pregnancy. *Churchill Livingstone, New York*, (1984).
- [81] Parbhoo SP, Johnston ID. Effects of oestrogens and progestogens on gastric secretion in patients with duodenal ulcer. *Gut* 7(6): 612-618 (1966).
- [82] Davison JS. Gastric emptying time in late pregnancy and labour. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.* 77(1): 37-41 (1970).
- [83] Parry E. Transit time in the small intestine in pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.* 77(10): 900-901 (1970).

- [84] Husemeyer RP, Davenport HT, Cummings AJ, Rosankiewicz JR. Comparaison of epidural and intramuscular pethidine for analgesia in labour. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 88(7): 711-717 (1981).
- [85] Hytten FE, Robertson EG. Maternal water metabolism in pregnancy. *Proc. R. Soc. Med.* 64(10): 1072 (1971).
- [86] Hytten FE, Chamberlain GVP. Clinical physiology in obstetrics. *Blackwell Scientific Publications, Oxford*, (1980).
- [87] Hytten FE, Leitch I. The physiology of human pregnancy. *Blackwell Scientific Publications, Oxford*, (1971).
- [88] McDonald-Gibson RG, Young M, Hytten FE. Changes in plasma non esterified fatty acids and serum glycerol in pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 82(6): 460-466 (1975).
- [89] Levy G. Effect of bed rest on distribution and elimination of drugs. *J. Pharm. Sci.* 56(7): 843-847 (1967).
- [90] Krauer B. Effect of posture on elimination of sulfisomidine. *Schweiz Med. Wochenschr.* 99(52): 1896-1898 (1969).
- [91] Wilkinson GR. Pharmacokinetics of drug disposition: hemodynamic considerations. *Ann. Rev. Pharmacol.* 15(11-27 (1975).
- [92] Elfström J, Lindgren S. Influence of bed rest on the pharmacokinetics of phenazone. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 13(379-383 (1978).
- [93] Dean m, Stock B, Patterson RJ, Levy G. Serum protein binding of drugs during and after pregnancy in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 28(2): 253-261 (1980).

- [94] Chen SS, Perucca E, Lee JN, Richens A. Serum protein binding and free concentration of phenytoin and phenobarbitone in pregnancy. *Br. J. Pharmacol.* 13(4): 547-552 (1982).
- [95] Perucca E, Crema A. Plasma protein binding of drugs in pregnancy. *Clin. Pharmacokinet.* 7(336-352 (1982).
- [96] Benet LZ, Hoener BA. Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.* 71(3): 115-121 (2002).
- [97] Krauer B, Krauer F, Hytten FE. Drug disposition and pharmacokinetics in the maternal-placental-fetal unit. *Pharmacol. Ther.* 10(2): 301-328 (1980).
- [98] Peiker G, Traeger A. Pharmacokinetics of phenobarbital in pregnancy. *Zentralbl. Gynakol.* 96(19): 577-582 (1974).
- [99] Tomson T, Lindbom U, Ekqvist b, Sundqvist A. Epilepsy and pregnancy: a prospective study of seizure control in relation to free and total plasma concentrations of carbamazepine and phenytoin. *Epilepsia* 35(1): 122-130 (1994).
- [100] Nau H, Rating D, Koch S, Hauser I, Helge H. Valproic acid and its metabolites; placental transfer, neonatal pharmacokinetics, transfer via the mother's milk and clinical status in neonates of epileptic mothers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219(3): 768-777 (1981).
- [101] Davis M, Simmons CJ, Dordoni B, Maxwell JD, Williams R. Induction of hepatic enzymes during normal human pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.* 80(8): 690-694 (1973).

- [102] Arnould JP, Verhoest P, Bach V, Libert JP, Belegaud J. Detection of benzo[a]pyrene-DNA adducts in human placenta and umbilical cord blood. *Hum. Exp. Toxicol.* 16(12): 716-721 (1997).
- [103] Pasanen M. The expression and regulation of drug in human placenta. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 38(1): 81-97 (1999).
- [104] Ring JA, Ghabrial H, Ching MS, Smallwood RA, Morgan DJ. Fetal hepatic drug elimination. *Pharmacol. Ther.* 84(3): 429-445 (1999).
- [105] Hakkola J, Pelkonen O, Pasanen M, Raunio H. Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in the human fetoplacental unit - Role in intrauterine toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 28(1): 35-72 (1998).
- [106] Dunlop W. Serial changes in renal haemodynamics during normal human pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 88(1): 1-9 (1981).
- [107] Luxford AM, Kellaway GS. Pharmacokinetics of digoxin in pregnancy. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 25(1): 117-121 (1983).
- [108] Heikkila A, Erkkola R. Pharmacokinetics of piperacillin during pregnancy. *J. Antimicrob. Chemother.* 28(3): 419-423 (1991).
- [109] Mucklow JC. The fate of drugs in pregnancy. *Clin. Obstet. Gynaecol.* 13(2): 161-175 (1986).
- [110] Carlisle R, Calambos GT, Warren WD. The relationship between conventional liver tests, quantitative function tests and histopathology in cirrhosis. *Dig. Dis. Sci.* 24(5): 358-362 (1979).

- [111] McIntyre N. The limitations of conventional liver function tests. *Semin. Liver Dis.* 3(4): 265-274 (1983).
- [112] Roberts RK, Branch RA, Desmond PV, Schenker S. The influence of liver diseases on drug disposition. *Clin. Gastroenterol.* 8(1): 105-121 (1979).
- [113] Poulsen HE, Loft S. Antipyrine as a model drug to study hepatic drug-metabolizing capacity. *J. Hepatol.* 6(3): 374-382 (1988).
- [114] St Petre JV, Awni WM. Quantifying hepatic function in the presence of liver disease with phenazone (antipyrine). *Clin. Pharmacokinet.* 20(1): 50-65 (1991).
- [115] Nakamura M, Tanaka E, Misawa S, Shimada T, Imaoka S, Funae Y. Trimethiadione metabolism, a useful indicator for assessing hepatic drug-oxidizing capacity. *Biochem. Pharmacol.* 47(2): 247-251 (1994).
- [116] Tanaka A, Ishikawa A, Ono A, Okamura T, Misawa S. Trimethiadone metabolism in patients with normal liver and in patients with chronic liver disease. *J. Pharmacobiodyn.* 10(9): 499-502 (1987).
- [117] Lelo A, Miners JO, Robson RA, Birkett DJ. Quantitative assessment of caffeine clearances in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 22(2): 183-186 (1986).
- [118] Tanaka A, Ishikawa A, Yamamoto Y, Osada A, Tsuji K, Fukao K, Misawa S, Iwasaki Y. A simple useful method for determination of hepatic function in patient with liver cirrhosis using caffeine and its three major dimethylmetabolites. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 30(9): 336-341 (1992).
- [119] Peter R, Bocker R, Beaune PH, Iwasaki M, Guengerich FP, Yang CS. Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1. *Chem. Res. Toxicol.* 3(6): 566-573 (1990).

- [120] Girre C, Lucas D, Hispard E, Menez C, Dally S, Menez JF. Assessment of cytochrome P4502E1 induction in alcoholic patients by chlorzoxazone pharmacokinetics. *Biochem. Pharmacol.* 47(9): 1503-1508 (1994).
- [121] Jones DR, Gorski JC, Haehner BD, O'Mara EM, Hall SD. Determination of P450 3A4/5 activity in vivo with dextromethorphan N-demethylation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 60(4): 374-384 (1996).
- [122] Ducharme J, Abdullah S, Wainer IW. Dextromethorphan as a in vivo probe for the simultaneous determination of CYP2D6 and CYP3A activity. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 678(1): 113-128 (1996).
- [123] Potter JM, Oellerich M. The use of lidocaine as a test of liver function in liver transplantation. *Liver Transpl. Surg.* 2(3): 211-224 (1996).
- [124] Huang YS, Lee SD, Deng JF, Wu JC, Lu RH, Lin YF, Wang YJ, Lo KJ. Measuring lidocaine metabolite-monoethylglycinexylidide as a quantitative index of hepatic function in adults with chronic hepatitis and cirrhosis. *J. Hepatol.* 19(1): 140-147 (1993).
- [125] Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, Kunze KL, Trager WF, Hartwell PS, Raisys VA, Marsh CL, McVicar JP, Barr DM. Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: I. In vitro-in vivo correlations in liver transplant patients. *J. Pharm. Exp. Ther.* 271(1): 549-556 (1994).
- [126] Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, Kunze KL, Trager WF, Bacchi CE, Marsh CL, McVicar JP, Barr DM, Perkins JD. Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: II. Characterization of inter- and intraindividual hepatic CYP3A variability after liver transplantation. *J. Pharm. Exp. Ther.* 271(1): 557-566 (1994).

- [127] Parsons WD, Pelletier JG. Delayed elimination of caffeine by women in the last 2 weeks of pregnancy. *Can. Med. Assoc. J.* 127(5): 377-380 (1982).
- [128] Brazier JL, Ritter J, Berland M, Khenfer D, Faucon G. Pharmacokinetics of caffeine during and after pregnancy. *Dev. Pharmacol. Ther.* 6(5): 315-322 (1983).
- [129] Watkinson P, Fried PA. Maternal caffeine use before, during and after pregnancy and effects upon offspring. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 7(9-17):1985).
- [130] Tsutsumi K, Kotegawa T, Matsuki S, Tanaka Y, Ishii Y, Kodama Y, Kuranari M, Miyakawa I, Nakano S. the effect of pregnancy on cytochrome P4501A2, xanthine oxidase, and N-acetyltransferase activities in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 70(2): 121-125 (2001).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les différents travaux présentés dans ce mémoire constituent une méthodologie générale pour l'étude du passage des médicaments dans le lait maternel et l'évaluation de la fonction métabolique hépatique au cours de la grossesse et de l'allaitement. Cette méthodologie définit les bases pour la réalisation des études cliniques sur la pharmacocinétique et les modifications fonctionnelles hépatiques chez la femme enceinte et allaitant.

Un protocole clinique (cf. annexe 1) **et une méthode générale de criblage** (cf. section I, partie II, chapitre 2, *Screening of drugs in human breast milk by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography - Mass Spectrometry*) ont été mis au point pour les études sur le transfert des médicaments dans le lait maternel et sur les effets pharmacologiques chez le nouveau-né. Le protocole clinique permet de recueillir systématiquement tous les **renseignements importants** et les paramètres qui interviennent dans l'interprétation des mesures analytiques. La méthode de **traitement des échantillons de lait par extraction en phase solide** et de **dosage des médicaments par GC-MS** offre la possibilité de qualifier et quantifier de nombreuses substances utilisées pendant l'allaitement et peut être **facilement et rapidement adaptée et extrapolée** à d'autres médicaments et à leurs métabolites. L'utilisation conjointe de ces deux outils garantit une interprétation pharmacocinétique indépendante des conditions de l'étude clinique et permet la généralisation des résultats recueillis, pour former une base de données pertinente et utilisable pour le corps médical.

Pour l'étude de la fonction métabolique hépatique, **les isotopes stables constituent d'excellents traceurs non invasifs** qui peuvent être utilisés comme sondes métaboliques dans les tests respiratoires ou dans la mesure des rapports métaboliques urinaires.

La **validation du TRC** (cf. section II, partie II, chapitre 1, *¹³C-Aminopyrine and ¹³C-caféine breath test: influence of gender, cigarette smoking and oral contraceptives intake*) sur une population de référence a permis de démontrer l'**efficacité** de ce test pour mettre évidence des **variations d'activité du CYP1A2** et pour potentiellement détecter et anticiper les dommages dus aux pathologies. En effet, des études antérieures menées

chez des patients atteints de cirrhose, d'intoxications ou autres dysfonctionnement hépatiques ont montré que le TRC est un indicateur sensible des pathologies hépatiques. La **mesure des ^{13}C -RMC dans les urines** (cf. section II, partie II, chapitre 2, *Analysis of urinary caffeine metabolites by liquid chromatography – mass spectrometry: The use metabolic ratios to explore CYP1A2 activity*) effectuée conjointement au TRC, a permis de confirmer la **validité** de ces rapports comme **indices des modifications d'activités du CYP1A2**. L'utilisation de la caféine marquée a permis d'être très spécifique vis à vis du substrat, et de ne pas tenir compte de la présence systématique de métabolites de la caféine provenant de l'alimentation. Les deux tests ont montré des différences de sensibilité liées au fait que les RMC sont associés à une ou plusieurs réactions métaboliques alors que le TRC tient compte du métabolisme global. Ainsi, suivant la contribution du CYP1A2 et l'implication d'autres enzymes dans les différentes voies du métabolisme, les RMC choisis sont des marqueurs plus ou moins sensibles aux variations d'activités. Les deux tests ont montré des variations inter-individuelles élevées. Cependant, pour **les études longitudinales au cours de la grossesse**, ces variations n'interviennent pas. Le TRC et les RMC sont donc deux outils de choix pour évaluer de façon **sensible** et **non invasive** les variations d'activité du CYP1A2 chez les femmes enceintes, pour des grossesses normales ou pathologiques. Une toute récente étude chez des femmes enceintes a démontré l'intérêt de mesurer les RMC dans les urines, à différents stades de gestation, pour mettre en évidence des variations d'activité du CYP1A2 non seulement en fin de grossesse mais également en début et milieu de grossesse.

De façon plus générale, les tests respiratoires et la mesure des rapports métaboliques ne se limitent à l'utilisation de la ^{13}C -caféine mais peuvent et doivent être investigués pour d'autres substrats comme le dextrométorphan (CYP2D6) ou l'érythromycine (CYP3A4) de manière à étudier d'autres activités des CYP450 au cours de la grossesse.

En conclusion, les progrès de l'analyse isotopique et le développement de technologies utilisant les isotopes stables ouvrent le domaine de la recherche biomédicale et du diagnostic à ces technologies tout d'abord développées pour les géosciences et l'environnement. Cette évolution permet d'augmenter l'efficacité des protocoles et de

réaliser des protocoles jusqu'alors impossibles, trop complexes ou trop onéreux. Elle permet entre autre d'accéder à des populations extrêmement protégées comme les femmes enceintes et le nouveau-né. L'avenir dans ce domaine est très prometteur.

ANNEXES

ANNEXE 1

PROTOCOLE D'ÉTUDE CLINIQUE ÉTUDE DU PASSAGE DES MEDICAMENTS DANS LE LAIT MATERNEL

TITRE

Étude du passage de molécules médicamenteuses et xénobiotiques dans le lait maternel. Identification et dosage par Chromatographie en phase Gazeuse et Spectrométrie de Masse (GC-MS).

INTRODUCTION

Chez la femme allaitant, la prise de médicaments prescrits ou non est très fréquente. Ceci est vérifié surtout pendant les premières semaines suivant l'accouchement et chez les femmes souffrant d'une pathologie nécessitant un traitement médicamenteux continu, comme c'est le cas pour l'hypertension, le diabète, l'asthme ou l'épilepsie. Ces médicaments peuvent être présents au niveau du lait et leur passage est fonction de nombreux paramètres, liés en particulier à la mère et à la molécule active. Une éventuelle activité pharmacologique ou toxique est alors retrouvée chez le nouveau-né allaité.

Afin de mieux évaluer le risque lié à ce traitement par rapport aux nombreux bénéfices que procure un allaitement maternel, de nombreuses études visant à doser la molécule médicamenteuse dans le lait ont été réalisées. Cependant, l'absence d'information reliée à la prise de l'échantillon de lait ne permet pas de donner une signification pharmacocinétique et clinique à la concentration médicamenteuse trouvée dans le lait. Cette étude a donc pour but d'étudier le passage de différentes molécules médicamenteuses et des xénobiotiques dans le lait maternel, suite au dosage des molécules dans le lait et au recueil des renseignements pertinents en relation avec les échantillons de lait.

HYPOTHESE

Les renseignements recueillis lors du prélèvement des échantillons de lait, permettront de donner une signification pharmacocinétique et clinique aux concentrations médicamenteuses mesurée dans le lait. Les variations de concentration observées seront corrélées en fonction de la journée, de la tétée, du stade de lactation et de plusieurs autres facteurs qui affectent la composition du lait.

OBJECTIFS

Objectifs principaux

- Identification et dosage dans le lait des molécules médicamenteuses et xénobiotiques étudiées,
- Évaluation du passage des médicaments dans le lait en fonction des différents paramètres de variation, à l'aide de données recueillies lors des prélèvements.

Objectif secondaire

- Fournir des données servant de base pour une future recherche sur la cinétique des médicaments chez la mère allaitant et chez le nouveau-né.

BIBLIOGRAPHY

Actuellement, de plus en plus de femmes choisissent l'allaitement maternel pour ses qualités et ses propriétés nutritives (American Academy of Pediatrics, 1982)

La prise de médicaments prescrits ou non chez la femme allaitant est très fréquente, surtout dans les premières semaines après son accouchement ou si elle est atteinte d'une pathologie nécessitant une thérapie médicamenteuse continue (*Matheson et al., 1990*).

Les médicaments administrés à la mère peuvent être distribués au niveau du lait : leur passage est modulé par de très nombreux paramètres, liés en particulier à la mère et à la molécule active. Une éventuelle activité pharmacologique ou toxique est alors retrouvée chez le nouveau-né (*Kacew, 1993*). Dans ces conditions, Il est important de connaître le passage des médicaments dans le lait et les différents paramètres qui modulent ce passage, afin d'évaluer les risques d'un allaitement maternel pendant un traitement.

Les médicaments sont distribués de la circulation sanguine dans le lait s'ils sont non ionisés, non liés aux protéines plasmatiques et liposolubles (Wilson, 1980). Le passage de molécule active dépend donc de sa liaison aux protéines plasmatiques, sa liposolubilité, son degré d'ionisation et son poids moléculaire.

D'autres facteurs modulent le passage des médicaments dans le lait (Lawrence, 1994):

- Facteurs liés à la mère
 - La posologie, la voie d'administration, l'horaire de la prise du médicament par rapport à l'allaitement.
 - Les paramètres de pharmacocinétique (absorption, distribution, métabolisme, élimination).
- Facteurs liés à la glande mammaire
 - Les Changements morphologiques,
 - Le flux sanguin et le pH,
 - Le mécanisme de passage de la molécule du plasma dans le lait,
 - Le métabolisme de la molécule au niveau de la glande mammaire.
- Facteurs liés au lait
 - La composition,
 - Le pH.
- Facteurs liés à l'enfant
 - Heure de la tétée par rapport à la prise de médicaments.

Pour que la concentration médicamenteuse ait une signification pharmacocinétique et clinique, il sera donc important de recueillir un certain nombre de renseignements pertinents lors du prélèvement de l'échantillon de lait.

PLAN EXPÉRIMENTAL

1. Population étudiée

50 femmes allaitant et prenant au moins un des médicaments étudiés, seront incluses dans l'étude. Les sujets seront distingués en deux groupes : les femmes nourrissant leur enfant au sein et les femmes ayant un enfant prématuré et ne le nourrissant pas au sein.

Critères d'inclusion

- Age : 20-40 ans.
- Sujet ayant d'accouché au service de Gynécologie Obstétrique,
- Sujet dont le dossier patient sera accessible,
- Sujet ayant donné son consentement éclairé et libre par écrit et l'ayant signé,
- Sujet prenant un des médicaments étudiés,
- Sujet nourrissant son enfant au sein ou effectuant une expression de lait dans le but d'alimenter un enfant prématuré,

Critères d'exclusion

- Sujet qui ne répond pas à au moins l'un des critères d'inclusion ci-dessus,
- Sujet ayant un problème de lactation quelconque
- Sujet présentant ou ayant présenté antérieurement une pathologie de la glande mammaire.

2. Prélèvements

Les prélèvements se feront le deuxième jour après l'accouchement. À l'aide du dossier patient, différentes informations pertinentes pour l'étude seront recueillies dans la fiche de renseignements # 1 (annexes). Lors du rendez-vous six semaines après l'accouchement, si la mère allaite encore son enfant, un autre échantillon sera prélevé et les informations seront recueillies dans la fiche de renseignement # 2 (annexes).

Pour le premier prélèvement, une infirmière informera le sujet sur l'utilisation du tire-lait.

Pour les femmes nourrissant leur enfant au sein, il y aura 3 séquences de prélèvements au cours des différentes tétées de la journée. Celles-ci se feront, autant que possible, à intervalles réguliers : matin, midi et après-midi (exemple : 8h00, 12h00 et 16h00). Un minimum de trois heures entre les prises d'échantillons devra toutefois être respecté. Au cours de chaque séquence, 5 mL de lait seront recueillis au début et à la fin de la tétée sur un même sein. Un total de 6 échantillons sera collecté pendant la journée.

Pour les femmes ayant un enfant prématuré et ne le nourrissant pas au sein, le lait produit dans la journée sera prélevé à l'aide d'un tire-lait et conservé pour nourrir l'enfant prématuré. Trois échantillons de 5 mL du même sein, seront mis de côté pour l'étude. L'horaire des prélèvements dépendra des dispositions de la mère tout en

essayant d'espacer les échantillons le plus possible (selon un horaire : matin, midi et après-midi avec un minimum de trois heures d'intervalle).

Différentes informations relatives à la prise d'échantillon de lait et à/aux médicament/s, seront complétées par le sujet à l'aide du questionnaire # 1 ou # 2 (annexes).

Les échantillons seront prélevés par expression avec un tire-lait dans des contenants en polypropylène étiquetés (nom du patient, N° de l'échantillon, heure de prélèvement, date, opérateur) et congelés jusqu'à l'analyse.

3. Analyse des échantillons

La procédure d'analyse des échantillons sera la même pour ceux prélevés le deuxième jour après l'accouchement et ceux prélevés plus tard.

Les médicaments contenus dans le lait seront extraits en phase solide et analysés par Chromatographie en Phase Gazeuse et Spectrométrie de Masse (GC-MS), suivant la méthode préalablement validée.

ASPECT ÉTHIQUE

L'étude sera conduite en respectant les principes de la déclaration d'Helsinki.

Elle nécessitera l'approbation d'un comité d'éthique qui sera avisé de tout problème qui pourrait apparaître au cours de l'étude.

Avant d'être acceptée dans l'étude, chaque participante devra donner son consentement écrit. Le consentement est signé par le sujet, par l'investigateur et par un témoin qui attestera qu'une pleine information a été donnée (voir annexes pour les fiches d'information et de consentement).

Le protocole utilise des moyens non invasifs : le lait sera prélevé par expression avec un tire-lait. 30 ml de lait maternel seront collectés la deuxième journée après l'accouchement et 5 ml de lait seront collectés lors d'un éventuel rendez-vous à l'hôpital dans les mois suivant l'accouchement.

BENEFICES ESCOMPTES

Il n'y a pas de bénéfice direct pour le patient et le groupe de patient étudié.

Des bénéfices indirects seront escomptés au groupe de patients étudié : cette étude permettra de mieux connaître le passage des médicaments dans le lait maternel et à long terme, une mieux évaluer des bénéfices de l'allaitement par rapport aux risques liés à la prise de médicaments. Le clinicien pourra ainsi mieux allier l'allaitement et la prise de médicaments maternelle.

Pour l'équipe soignante, cette étude permettra de mieux connaître le passage des médicaments dans le lait maternel et à long terme, une meilleure évaluation des bénéfices de l'allaitement par rapport aux risques liés à la prise de médicaments.

Ce projet de recherche clinique fournira des données servant de base pour une future recherche sur la cinétique des médicaments chez la mère qui allaite, au niveau du lait et chez le nouveau-né allaité.

RISQUES LIES À L'ETUDE

Il n'y a aucun risque pour le patient.

REFERENCES

American Academy of Pediatrics. Policy statement based on the task Force report: the promotion of breast feeding. *Pediatrics* 69: 654-661(1982).

Kacew S. Adverse effects of drugs and chemicals in breast milk on the nursing infant. *J. Clin. Pharmacol.* 33: 213-221 (1993).

Lawrence R.A. Breastfeeding. A guide for the medical profession. The C.V. Mosby Compagny. St-Louis (1994)

Matheson I., Kristensen K. and Lunde P.K.M. Drug utilization in breast-feeding women. A survey in Oslo. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 38: 453-459 (1990).

Wilson J.T., Don Brown R., Don Cherek R., Dailey J.W., Hilman B., Jobe P.C., Manno B.R., Manno J.E., Redetki H.M., Stewart J.J. Drug excretion in human breast milk. Principles, pharmacokinetics and projected consequences. *Clin. Pharmacokinet.* 5: 1-66 (1980).

ANNEXES

Fiche de renseignement # 1

Fiche de renseignement # 2

Questionnaire # 1

Questionnaire # 2

Formulaire de consentement

Formulaire d'information des sujets

Fiche de renseignements # 1
DEUXIÈME JOURNÉE APRÈS L'ACCOUCHEMENT

Nom : _____	Date d'hospitalisation : _____
Prénom : _____	N° dossier : _____
Date de naissance: _____	Date : _____

Renseignements relatifs à la grossesse

Nombre de grossesses à ce jour : _____

Date de l'accouchement : _____

Grossesse multiple : Oui Non

Précisions : _____

Nombre de semaines de grossesse : _____

Type d'accouchement : Naturel Césarienne

Renseignements relatifs à l'état de santé du sujet

Poids : _____

État général de la patiente :

Renseignements concernant la pathologie

Date du diagnostic: _____

Autre(s) pathologie(s) :

Renseignements relatifs à la médication (Prescrite et/ou non-prescrite)

Molécule à étudier : _____

Voie d'administration : _____

Posologie : _____

Début du traitement : _____

Toute autre médication (schéma thérapeutique) :

Renseignements relatifs à l'enfant

N° de dossier : _____

Sexe : Féminin Masculin

Poids : _____

Score Apgar : _____

Problème quelconque :

Fiche de renseignements # 2
RENDEZ-VOUS APRÈS L'ACCOUCHEMENT

Nom : _____	Date d'hospitalisation : _____
Prénom : _____	N° dossier : _____
Date de naissance: _____	Date : _____

Informations générales

Y a-t-il eu des complications suite à l'accouchement ?

Renseignements relatifs à l'état de santé du sujet

Évolution de la pathologie :

Renseignements relatifs à la médication (prescrite et/ou non prescrite)

Molécule à étudier : _____

Voie d'administration : _____

Posologie : _____

Date du changement de posologie (s'il y a lieu) : _____

Toute autre médication (avec posologie) :

Renseignements relatifs à l'enfant

Poids : _____

État général :

QUESTIONNAIRE # 1

Renseignements relatifs à la prise de médicaments

Médicament(s) prescrit(s) : _____

Médicament	Heure de prise	Dose

Prise de médicaments non prescrits : Oui Non

Si oui, précisez lesquels : _____

Renseignements relatifs aux prélèvements de lait

Heure de prélèvement	N° d'échantillon	Sein (droit ou gauche)	Mode d'expression du lait
Début tétée :			
Fin de tétée :			
Début tétée :			
Fin de tétée :			
Début tétée :			
Fin de tétée :			

Renseignements relatifs aux allaitements ou expression de lait

Heure des allaitements ou expressions de lait	Premier sein tété

QUESTIONNAIRE # 2

Renseignements relatifs à la prise de médicaments

└ Renseignements sur la dernière prise du ou des médicament(s):

Heure : _____

Posologie : _____

└ Renseignements sur les autres médicaments prescrits ou non:
(contraceptif oral, acétaminophène, antihistaminique, etc..)

Renseignements relatifs aux prélèvements de lait

Heure des prélèvements	N° d'échantillon	Sein prélevé	Mode d'expression	Renseignements de la tétée précédente
				Heure : Dernier sein tété :

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

De : Mlle, Mme Nom : Prénom : Âge : Adresse :

Titre : Étude du passage des médicaments et des xénobiotiques dans le lait maternel

Le Docteur m'a proposé de participer à une recherche organisée par

Il m'a précisé que je suis libre d'accepter ou de refuser.

J'ai reçu les informations suivantes rédigées dans la notice d'information annexée à cette fiche. J'en ai conservé un exemplaire personnel.

J'ai discuté avec le Docteur du but de cette étude, de ses modalités et des résultats attendus. Il m'a indiqué que le protocole avait été soumis au Comité d'éthique de l'hôpital Sainte- Justine.

Mon consentement ne décharge pas les organisateurs de la recherche de leurs responsabilités. Je conserve tous mes droits consentis par la loi.

Si je le désire, je serai libre à tous moments d'arrêter ma participation sans avoir à justifier de ma décision, sans perdre mes droits ou bénéfices. Je m'engage à en informer le Docteur.....

Les données qui me concernent resteront strictement confidentielles. Je n'autorise leur consultation que par des personnes qui collaborent à la recherche par les organisateurs et éventuellement un représentant des autorités de santé.

Je pourrai à tout moment demander toute information complémentaire au Docteur ou aux collaborateurs..... (tel.....).

Je, soussigné (nom, prénom), donne mon accord pour participer à cette étude dans les conditions précisée ci-dessus.

date Signature

Docteur.....(nom, prénom)
date Signature

Témoin.....(nom, prénom)
date Signature

FORMULAIRE D'INFORMATION DES SUJETS

Sujets du groupe test

Étude du passage des médicaments et des xénobiotiques dans le lait maternel

Cette étude est initiée par

Cette information vous est remise pour vous permettre de mieux comprendre l'intérêt du prélèvement de lait maternel auquel vous serez soumis durant le déroulement de cette étude.

La prise de médicaments prescrits ou non chez la femme allaitant est très fréquente, surtout dans les premières semaines après l'accouchement ou chez les femmes qui sont atteintes d'une maladie nécessitant un traitement continu comme l'hypertension, le diabète, l'asthme ou l'épilepsie. La quantité de médicaments qui passe dans le lait varie en fonction de plusieurs paramètres. Il est important, connaissant le bénéfice de l'allaitement, d'en savoir plus sur ces paramètres afin d'adapter médication et allaitement dans le but d'assurer une alimentation compatible avec la santé de votre enfant.

Le but de ce travail est de mieux connaître le passage des médicaments dans le lait maternel ainsi que les paramètres qui modifient ce passage pour éviter d'éventuels effets toxiques chez l'enfant. Il faut pour cela connaître la quantité de médicament qui passe dans le lait chez des femmes auprès desquelles nous avons recueilli un minimum d'information.

L'étude à laquelle vous serez soumise ne comporte aucun risque, aussi bien pour votre enfant que pour vous.

Pour ce qui est des échantillons de lait, les prélèvements auront lieu le deuxième jour après votre accouchement et lors de votre rendez-vous, six semaines après celui-ci. Pour chaque rendez-vous, vous devrez répondre à un questionnaire nous procurant les informations pertinentes à l'étude. Une personne désignée vous aidera à remplir ces deux formulaires. Le lait sera prélevé à l'aide **d'un tire-lait** à l'hôpital. Vous pourrez donc bénéficier d'informations sur son fonctionnement par le personnel infirmier.

Pour le premier rendez-vous (deuxième journée après l'accouchement) :

Si vous nourrissez votre enfant au sein : lors d'une tétée sur un même sein, il y aura prise de 5 ml de lait au début et de 5 ml à la fin et cela, à trois reprises.

Si vous n'allaites pas votre enfant : 5 ml de lait exprimé d'un même sein seront prélevés au minimum une fois dans la journée et, si possible, jusqu'à trois fois.

Pour le deuxième rendez-vous (lors de votre rendez-vous à l'hôpital, si vous allaitez encore votre enfant)

5 ml seront recueillis pendant **une seule** expression de lait.

Pendant les journées où vous aurez à donner les échantillons, vous pourrez **vaquer à vos activités habituelles sans restriction**.

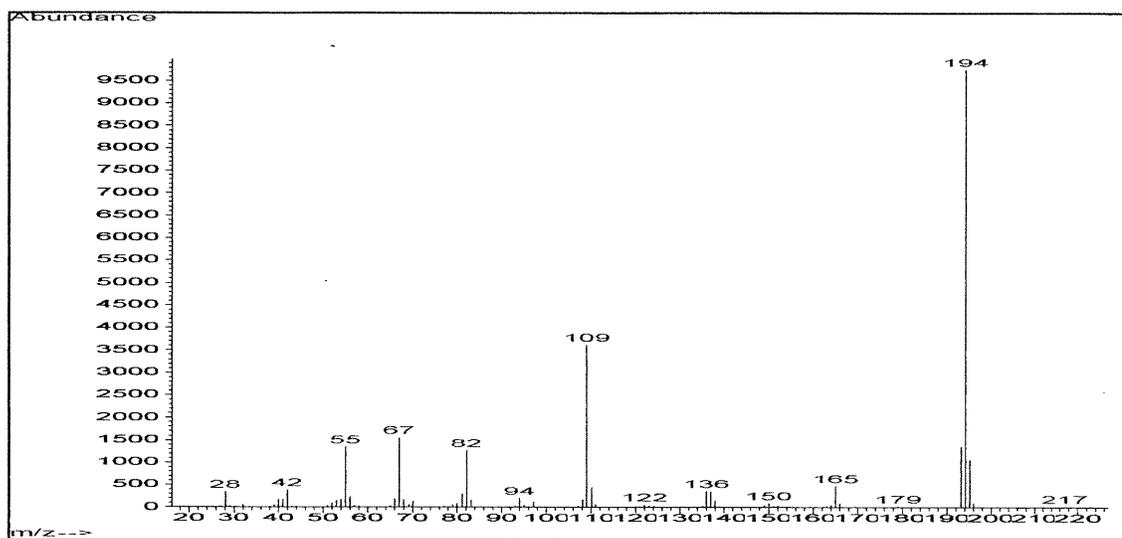
ANNEXE 2

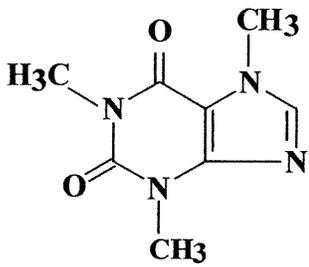
MONOGRAPHIE DES MÉDICAMENTS DOSÉS DANS LE LAIT MATERNEL

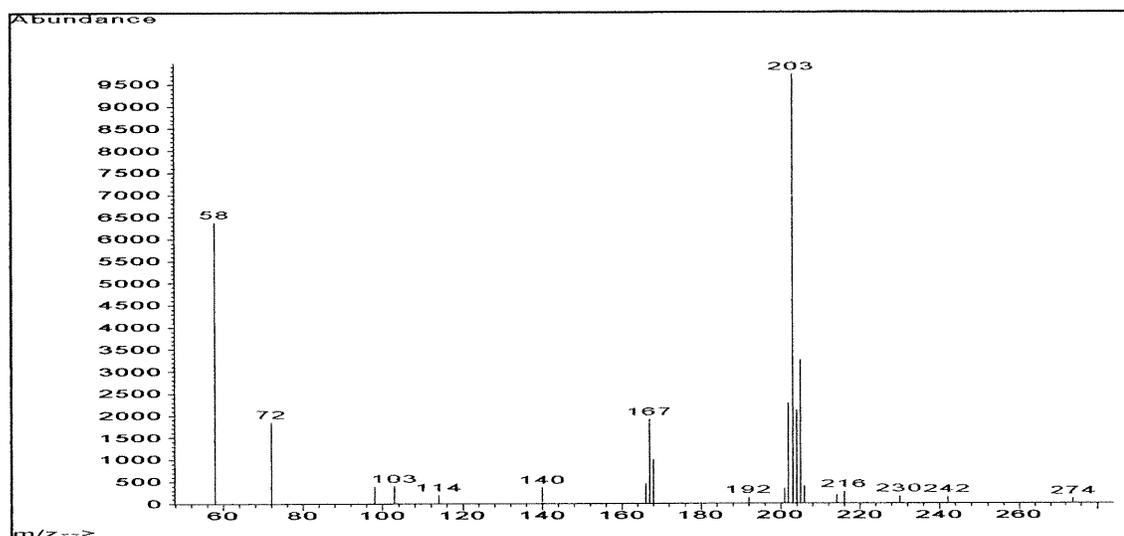
pKa et logP octanol/eau :

Hansch C, Sammes PG, Taylor JB. Comprehensive medicinal chemistry – The rational design, mechanistic study and therapeutic application of chemical compounds. Pergamon press, Oxford Vol. 6 (1990).

CAFEINE

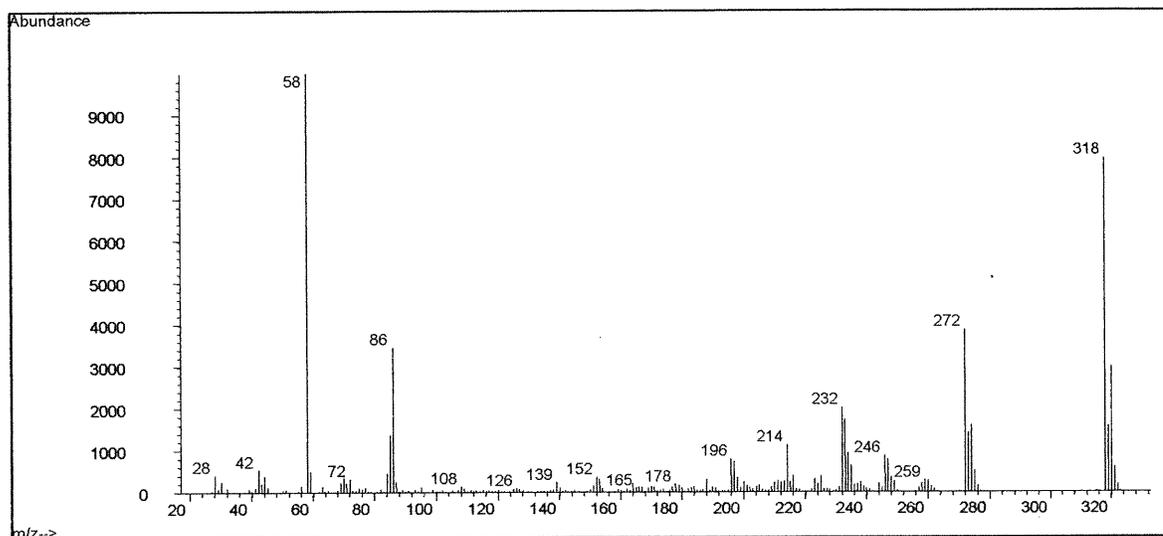


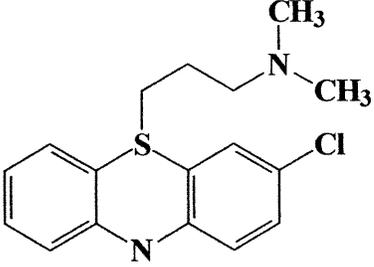
Structure et nom chimique	 <p>1,3,7- triméthylxanthine</p>
Formule brute	$C_8H_{10}N_4O_2$
Poids moléculaire (g/mol)	194.2
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • pKa : 14 (forme HA) et 0.6 (forme BH⁺) • Log P (octanol/eau) : -0.07 • Soluble dans l'eau et les alcools.
Propriétés pharmacologiques	Stimulant, diurétique

CHLORPHENIRAMINE

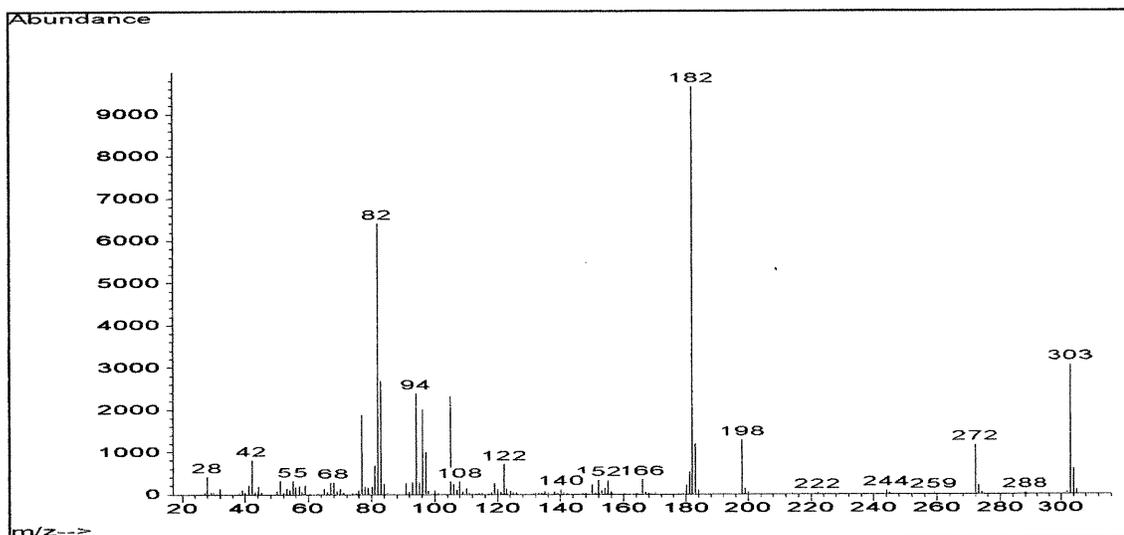
Structure et nom chimique	<p>γ-(4-Chlorophenyl)-N,N-dimethyl-2-pyridinepropanamine</p>
Formule brute	$C_{16}H_{19}ClN_2$
Poids moléculaire (g/mol)	274.79
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • Point d'ébullition : 142°C • pKa : 9.16 (forme HB⁺) • Log P (octanol/eau) : 3.39 • Soluble dans l'eau, le méthanol, le chloroforme et l'éthanol. • Difficilement soluble dans le benzène et l'éther.
Propriétés pharmacologiques	Antihistamic

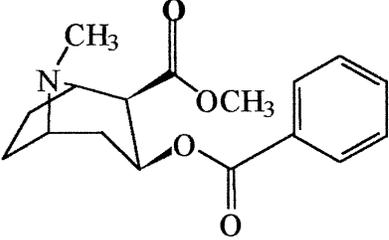
CHLORPROMAZINE



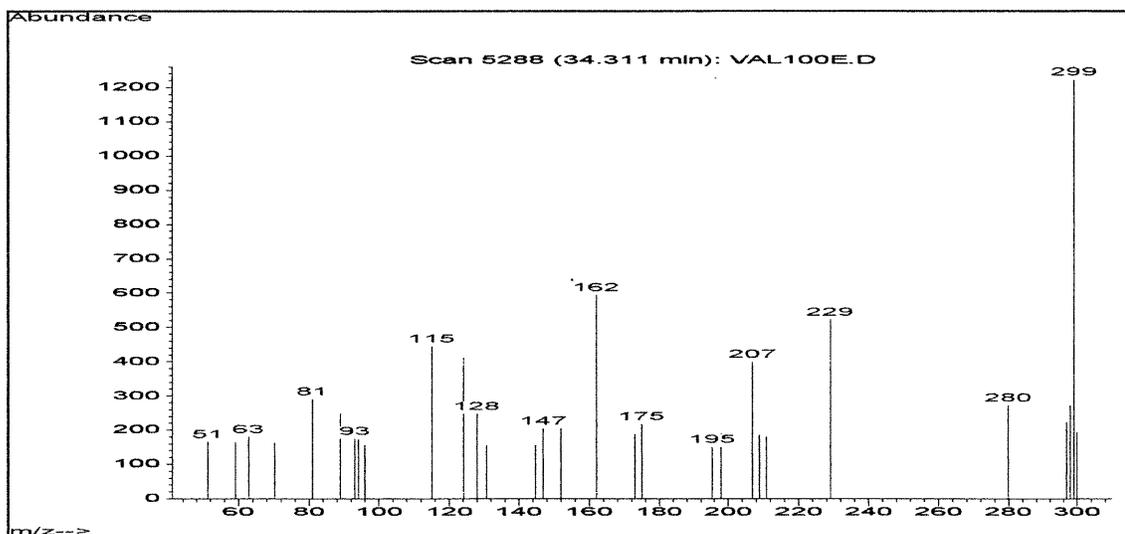
Structure et nom chimique	 <p>2-Chloro-N,N-dimethyl-10H-phenothiazine-propanamine</p>
Formule brute	$C_{17}H_{19}ClN_2S$
Poids moléculaire (g/mol)	318.87
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • pKa : 9.3 (forme BH^+) • log P (octanol / eau) : 5.35 • Point d'ébullition : 200-205°C • Soluble dans le méthanol, l'éthanol et le chloroforme. • Insoluble dans l'éther et le benzène.
Propriétés pharmacologiques	Antipsychotique, antiémétique

COCAINE



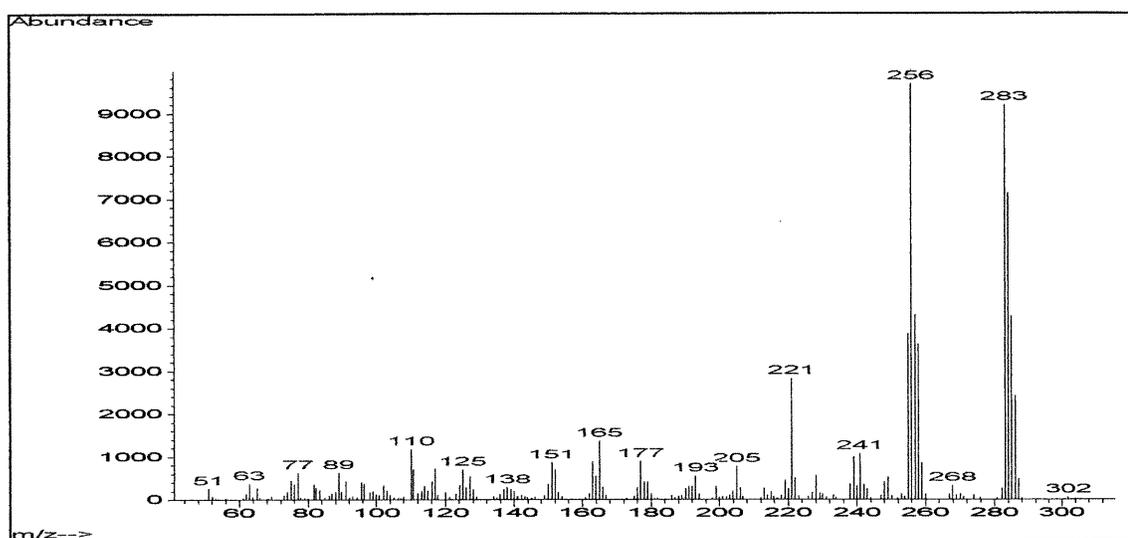
Structure et nom chimique	 <p>[1R-(exo,exo)]-3-(benzoyloxy)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-2-carboxylic acid methyl ester</p>
Formule brute	$C_{17}H_{21}NO_4$
Poids moléculaire (g/mol)	303.26
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • Point d'ébullition : 187-188°C • pKa : 8.65 (forme BH⁺) • Log P (octanol/eau) : 2.30 • Soluble dans l'acétone, et le glycérol • Insoluble dans l'éther et les huiles
Propriétés pharmacologiques	Anesthétique (topical)

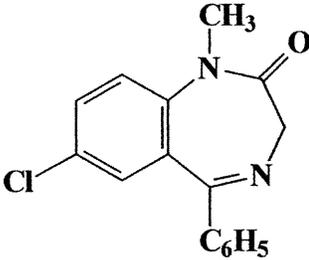
CODEINE



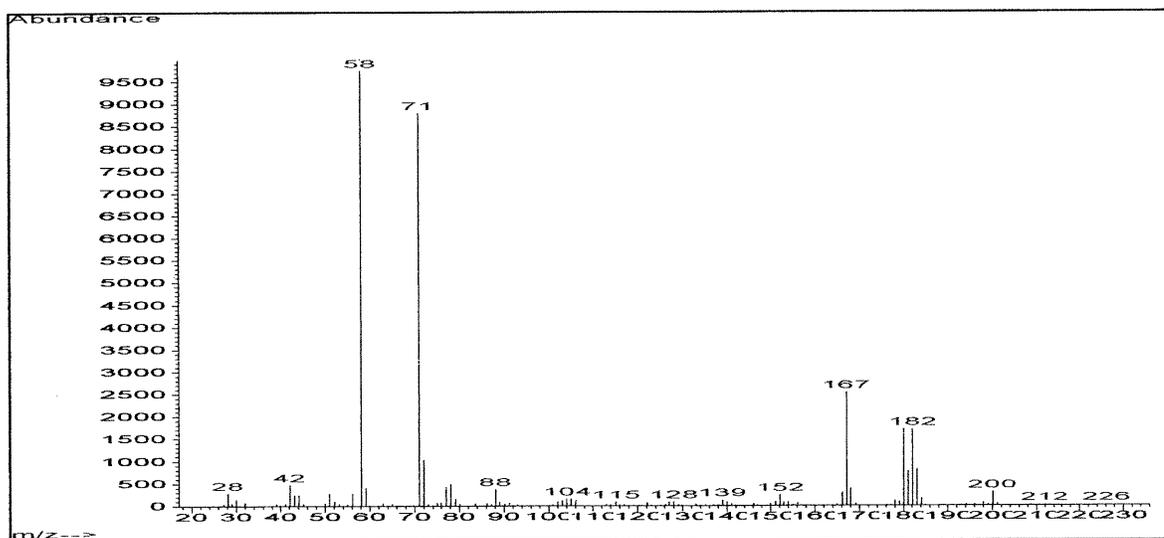
Structure et nom chimique	<p>7,8-Didehydro-4,5α-epoxy-3-methoxy-17-methylmorphinan-6α-ol</p>
Formule brute	$C_{18}H_{21}NO_3$
Poids moléculaire (g/mol)	299.36
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • pKa : 8.21 (forem BH⁺) • log P (octanol / eau - pH = 7.4) : 1.14 • Soluble dans le méthanol • Insoluble dans l'éther de pétrole
Propriétés pharmacologiques	Antitussif, analgésique (narcotique)

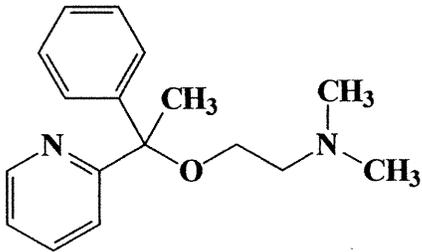
DIAZEPAM



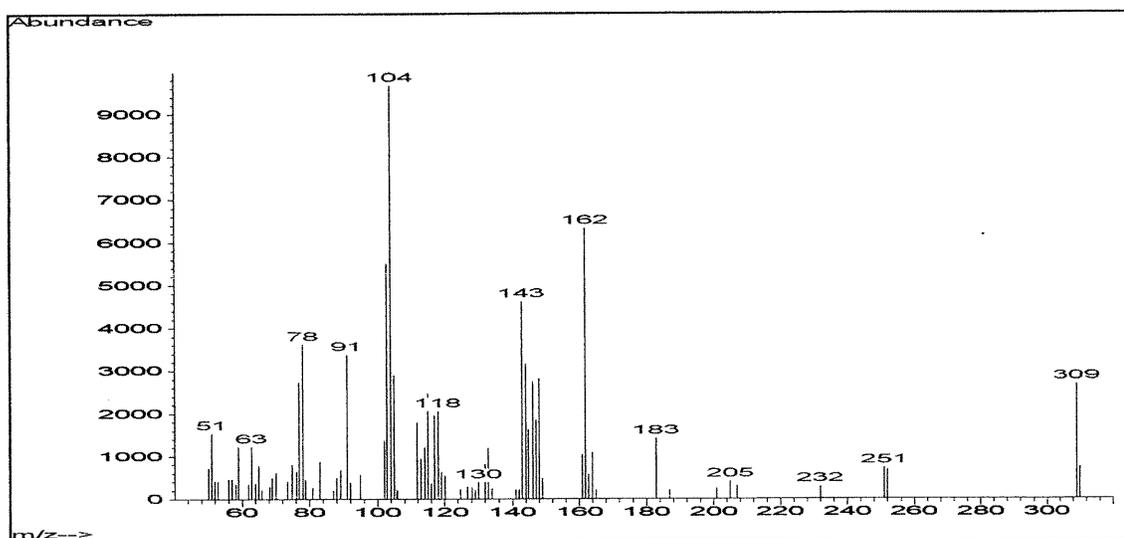
Structure et nom chimique	 <p>7-chloro-1,3-dihydro-1-méthyl-5-phényl-2H-1,4-benzodiazépin-2-one</p>
Formule brute	$C_{16}H_{13}ClN_2O$
Poids moléculaire (g/mol)	284.76
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • pKa : 3.3 (forme BH^+) • log P (octanol / eau) : 2.80
Propriétés pharmacologiques	Hypnotique sédatif, agent anti-anxiété

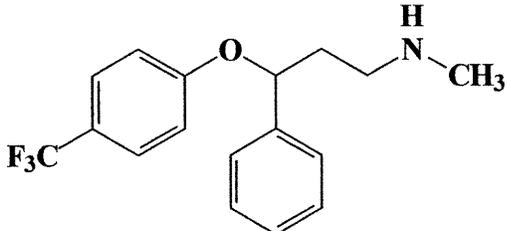
DOXYLAMINE



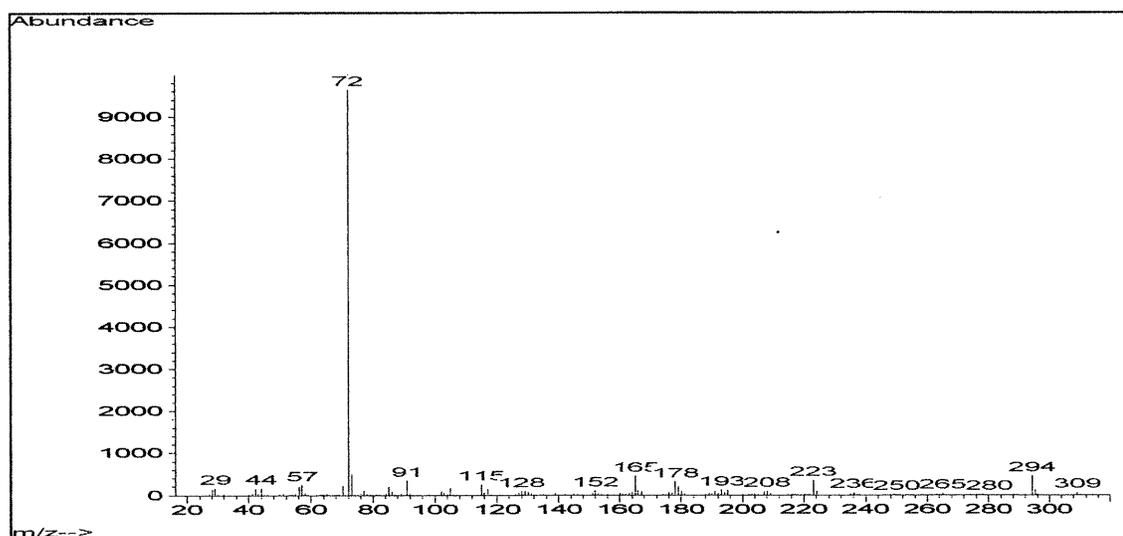
Structure et nom chimique	 <p>N,N-Dimethyl-2-[1-phenyl-1-(2-pyridinyl)ethoxy]ethanamine</p>
Formule brute	$C_{17}H_{22}N_2O$
Poids moléculaire (g/mol)	270.37
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • Point d'ébullition : 137-141°C • pKa : 4.4 et 9.2 (forme BH^+) • Log P (octanol/eau) : 2.28 • Soluble en milieu acide. • Volatile.
Propriétés pharmacologiques	Antihistaminique, anti-cholinergique

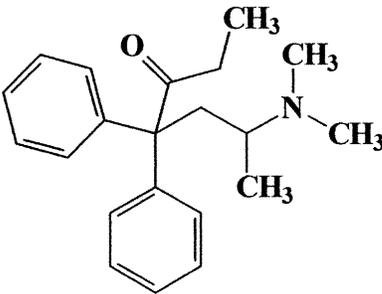
FLUOXETINE



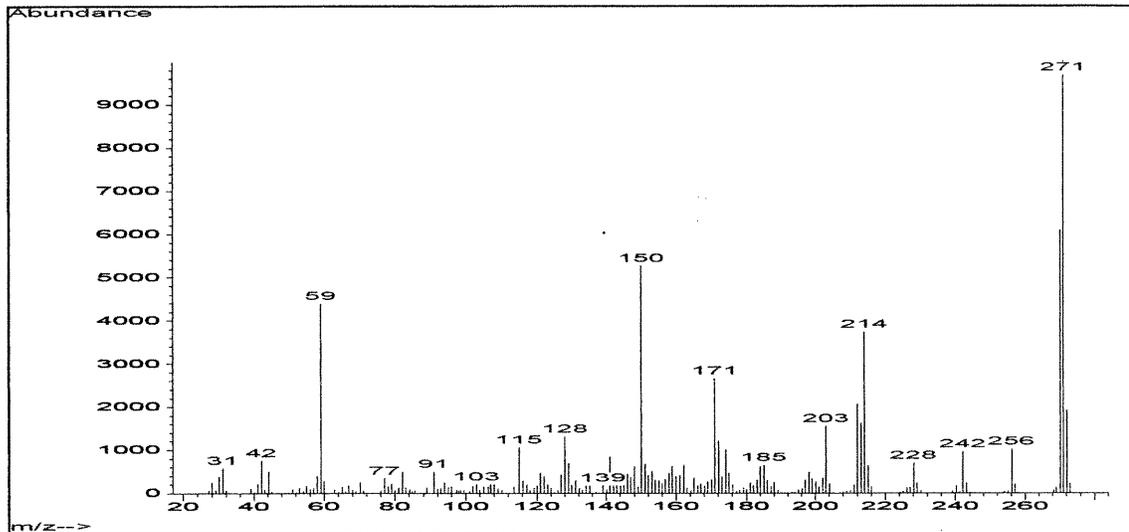
Structure et nom chimique	 <p>N-Methyl-γ-[4-(trifluoromethyl)-phenoxy]benzenepropanamine</p>
Formule brute	$C_{17}H_{18}F_3NO$
Poids moléculaire (g/mol)	309.33
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • Log P (octanol/eau) : 4.05 • Soluble dans le méthanol, l'éthanol, le chloroforme et l'acétone. • Faiblement soluble dans l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et l'eau. • Insoluble dans le toluène, le cyclohexane et l'hexane.
Propriétés pharmacologiques	Antidépresseur

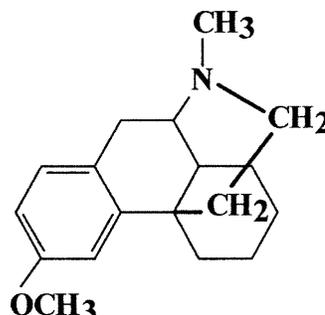
METHADONE



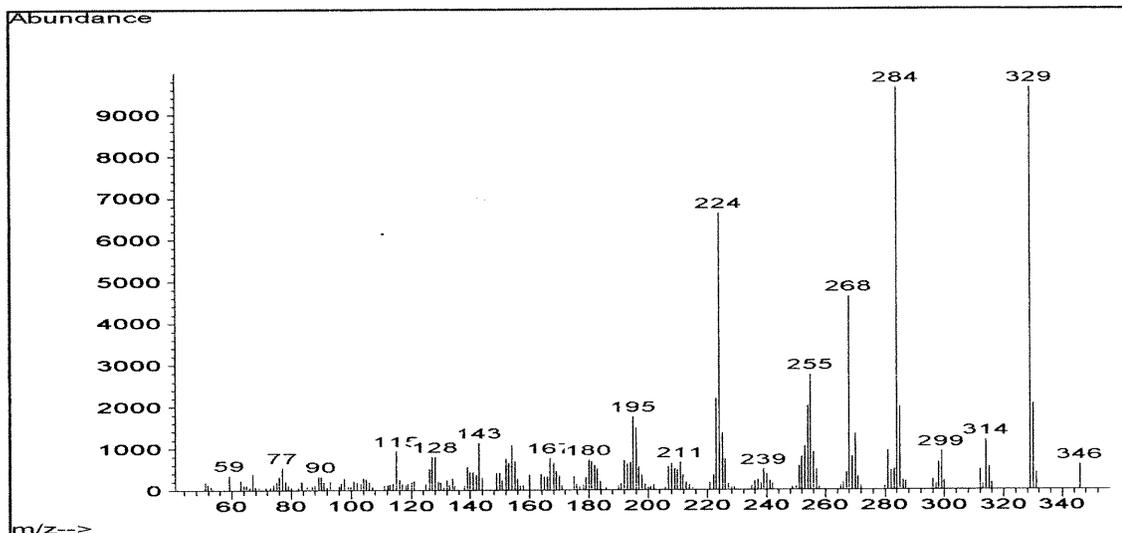
Structure et nom chimique	 <p>6-Diméthylamino-4,4-diphényl-3-heptanone</p>
Formule brute	$C_{21}H_{27}NO$
Poids moléculaire (g/mol)	309.46
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • Insoluble dans l'éther et le glycérol. • pKa : 8.3 (forme BH⁺) • log P (octanol / eau) : 2.07
Propriétés pharmacologiques	Analgésique (narcotique)

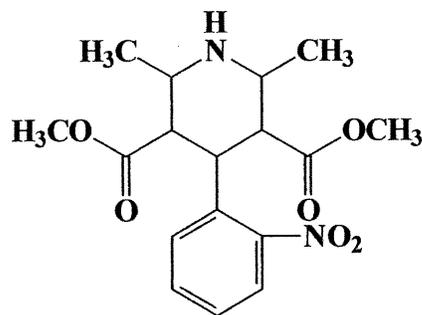
METHORPHAN



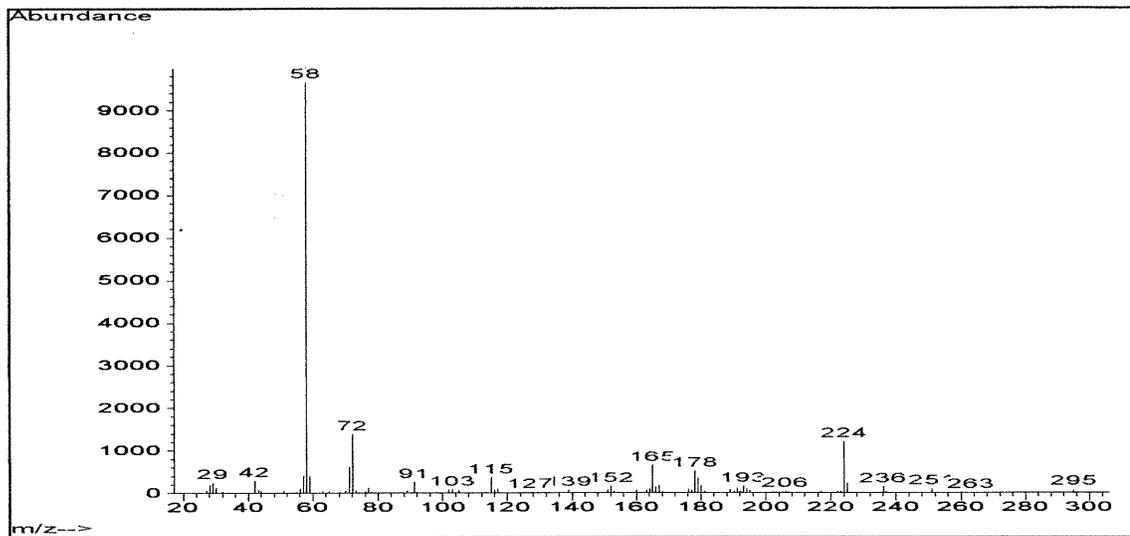
Structure et nom chimique	 <p>(+)-3-méthoxy-9a-méthylmorphinane</p>
Formule brute	$C_{18}H_{25}NO$
Poids moléculaire (g/mol)	271.4
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • pKa : 8.3 forme (HB⁺) • Log P (octanol/eau) : 3.99
Propriétés pharmacologiques	Antitussif

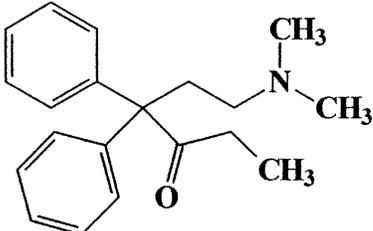
NIFEDIPINE



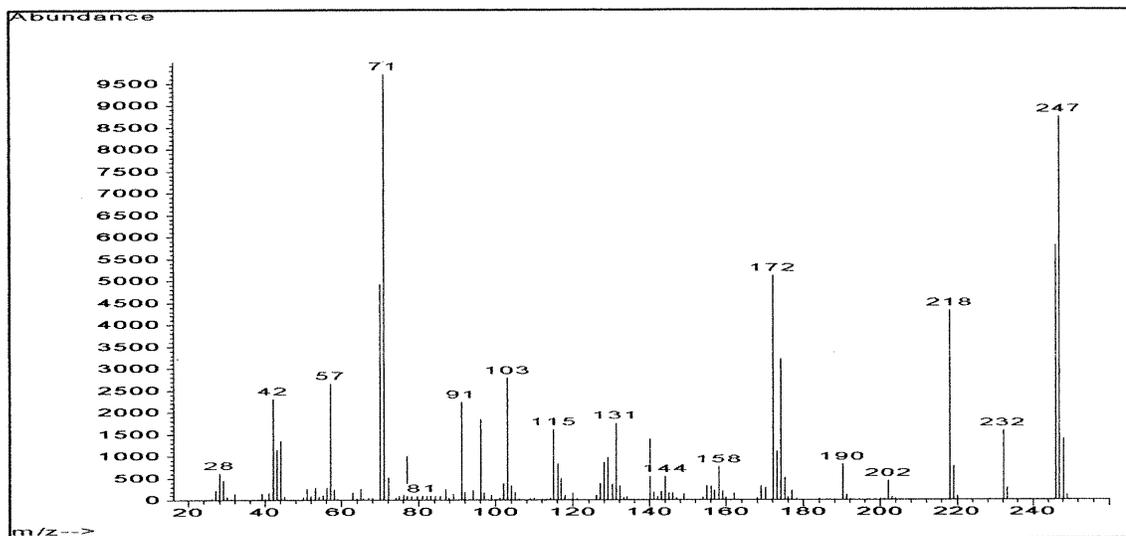
Structure et nom chimique	 <p>1,4-Dihydro-2,6-diméthyl-4-(2-nitrophényl)pyridine-3,5-pyridinedicarboxylic acid dimethyl ester</p>
Formule brute	$C_{17}H_{18}N_2O_6$
Poids moléculaire (g/mol)	346.34
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • Log P (octanol/eau) : 2.40 • Soluble dans le méthanol et l'éthanol. • Très photosensible.
Propriétés pharmacologiques	Vasodilatateur

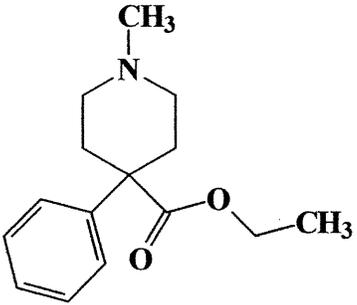
NORMETHADONE



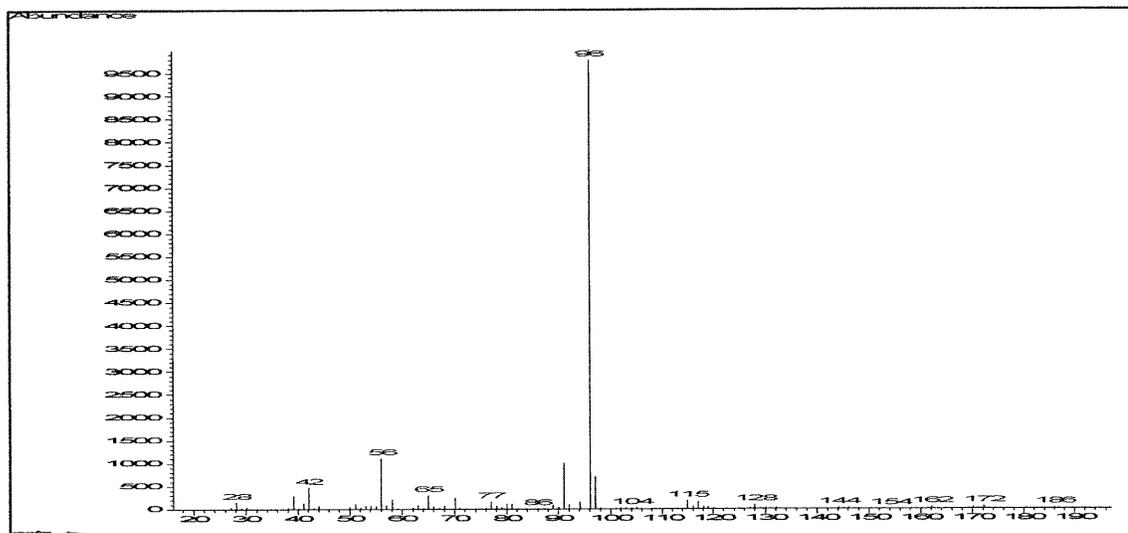
Structure et nom chimique	 <p>6-Dimethylamino-4,4-diphenyl-3-heptanone</p>
Formule brute	C ₂₀ H ₂₅ NO
Poids moléculaire (g/mol)	295.42
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • Log P (octanol/eau) : 2.66 • pKa : 9.2 (formeBH⁺) • Soluble dans l'eau et les alcools.
Propriétés pharmacologiques	Analgésique (narcotique)

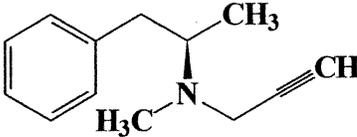
PETHIDINE



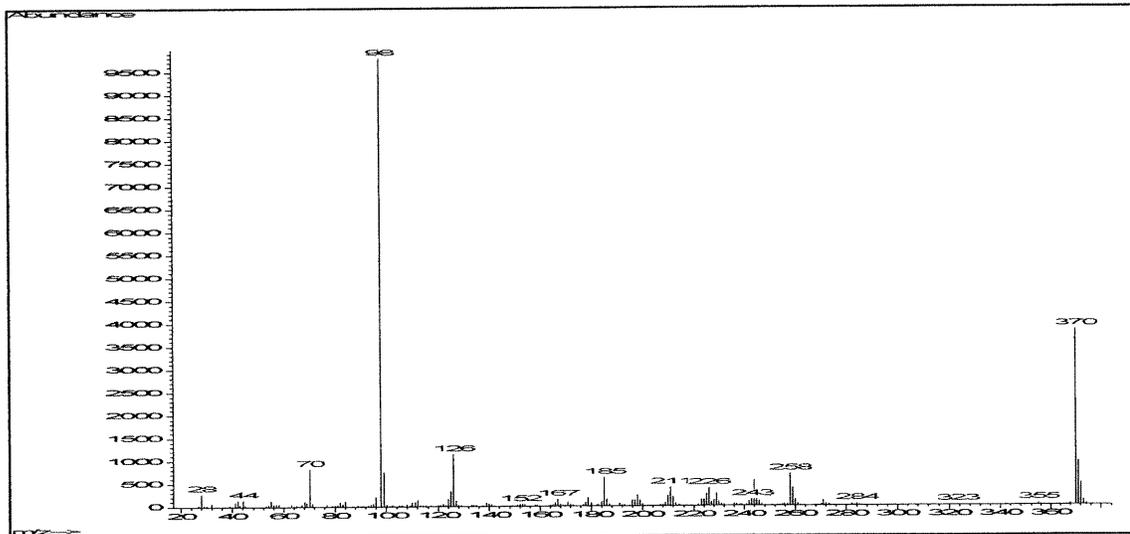
Structure et nom chimique	 <p>6-Diméthylamino-4,4-diphényl-3-heptanone</p>
Formule brute	C ₁₅ H ₂₁ NO ₂
Poids moléculaire (g/mol)	247.34
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • Soluble dans l'eau, l'acétone et l'acétate d'éthyle. • Faiblement soluble dans l'isopropanol et les alcools. • Insoluble dans le benzène et l'éther.
Propriétés pharmacologiques	Analgésique (opioïde)

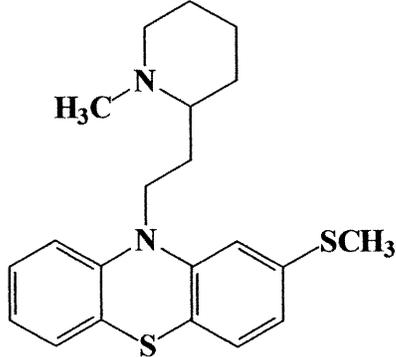
SELEGILINE



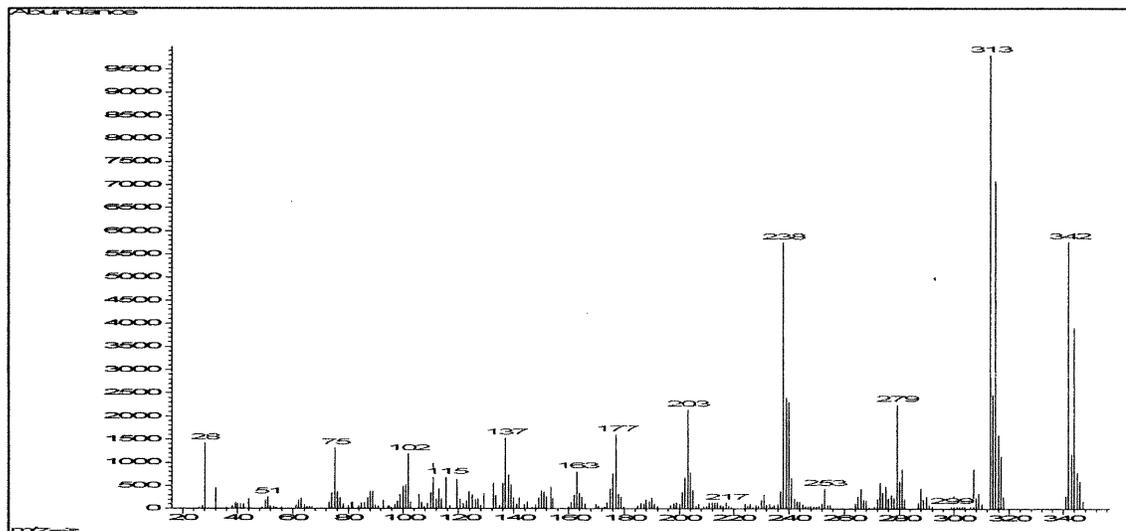
Structure et nom chimique	 <p>(R)-N,α-Dimethyl-N-2-propynylbenzeneethanamine</p>
Formule brute	$C_{13}H_{17}N$
Poids moléculaire (g/mol)	187.28
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • Log (octanol/eau) : 2.2 • Point d'ébullition : 103-110°C.
Propriétés pharmacologiques	Antidépresseur, anti-parkinsonien, MAO inhibiteur

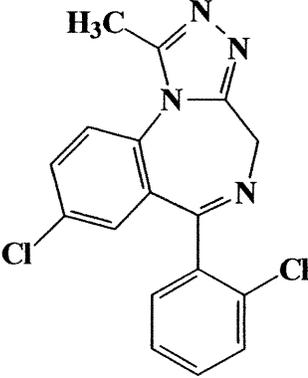
THIORIDAZINE



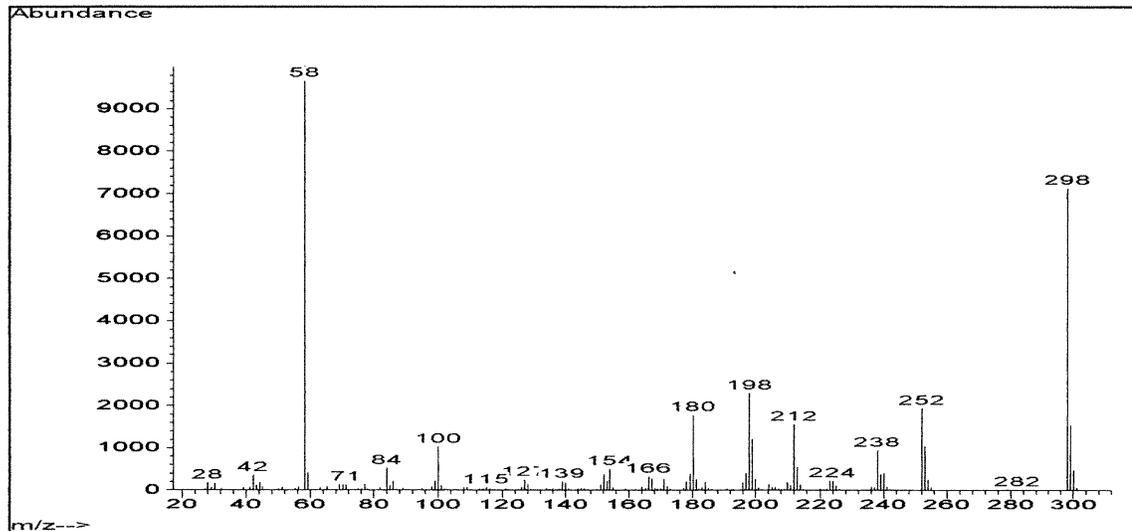
Structure et nom chimique	 <p>10-[2-(1-Methyl-2-piperidiny)éthyle]-2-(methylthio)-10H-phenothiazine</p>
Formule brute	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ S ₂
Poids moléculaire (g/mol)	370.58
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • PKa : 9.50 (forme HB⁺) • Log P (octanol/eau) : 5.90 • Point d'ébullition : 230°C • Soluble dans l'eau, l'éthanol, le méthanol et le chloroforme. • Insoluble dans l'éther.
Propriétés pharmacologiques	Antipsychotique, sédatif

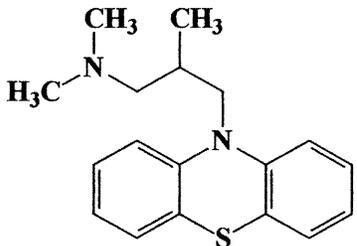
TRIAZOLAM



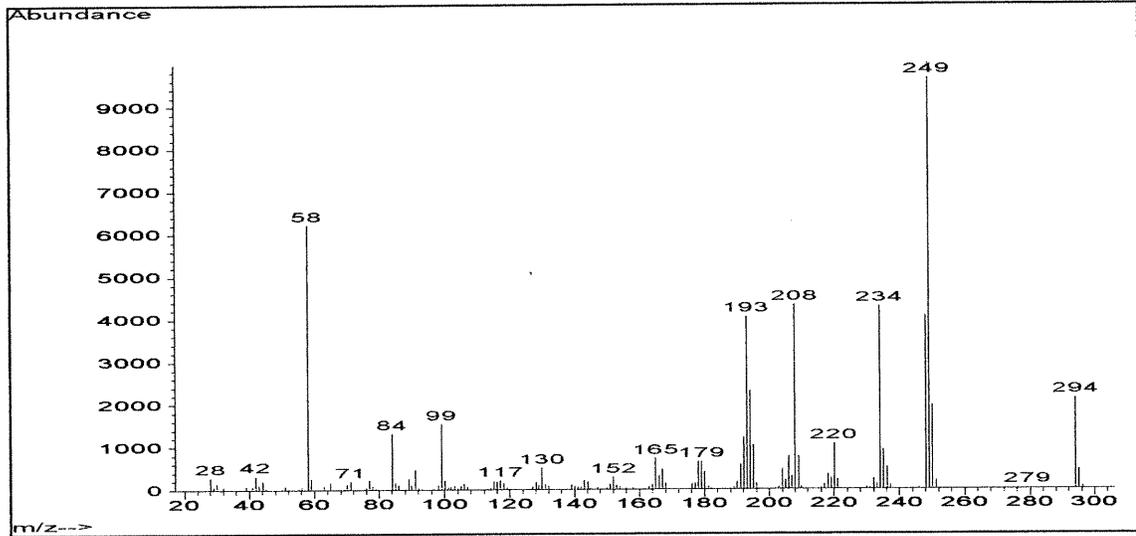
Structure et nom chimique	 <p>8-Chloro-6-(2-chlorophenyl)-1-methyl-4H-[1,2,4]triazolo[4,3,a][1,4]benzodiazepine</p>
Formule brute	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₄
Poids moléculaire (g/mol)	343.21
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • Log P (octanol/eau) : 3.2
Propriétés pharmacologiques	Sédatif, hypnotique

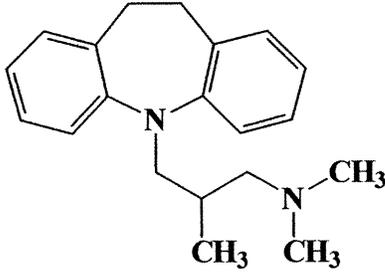
TRIMEPRAZINE



Structure et nom chimique	 <p>N,N,β-Trimethyl-10H-phenothiazin-10-propanamine</p>
Formule brute	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ S
Poids moléculaire (g/mol)	298.45
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • pKa : 9 (forme HB⁺) • Log P (octanol / eau) = 4.59 • Point d'ébullition : 150-175°C. • Soluble dans l'eau. • Faiblement soluble dans l'éthanol.
Propriétés pharmacologiques	Anti-pruritique

TRIMIPRAMINE



Structure et nom chimique	 <p>10,11-Dihydro-N,N,β-trimethyl-5H-dibenz[b,f]azepine-5-propanamine</p>
Formule brute	C ₂₀ H ₂₆ N ₂
Poids moléculaire (g/mol)	294.44
Propriétés physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • pKa : 8 (forme HB⁺) • Log P (octanol/eau) : 4.73 • Soluble dans le chloroforme. • Faiblement soluble dans l'éthanol et l'eau. • Insoluble dans l'éther.
Propriétés pharmacologiques	Antidépresseur