

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Développement et validation de méthodes de dosage du midazolam, un marqueur de l'activité des CYP3A, et de la fexofénadine, un substrat de la glycoprotéine P, dans les milieux biologiques.

par :

Tatiana Stepanova

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

Avec mémoire

Juin 2009

© Tatiana Stepanova, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Faculté de pharmacie
Université de Montréal
Grade octroyé le:

2009-10-08

Ce mémoire intitulé :

Développement et validation de méthodes de dosage du midazolam, un marqueur de l'activité des CYP3As, et de la fexofénadine, un substrat de la glycoprotéine P, dans les milieux biologiques.

présenté par :

Tatiana Stepanova

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Sylvie Marleau
Président – rapporteur

Jacques Turgeon
Directeur de recherche

Patrice Hildgen
Membre du jury

Résumé

La superfamille des cytochromes P450 et les protéines transmembranaires qui possèdent plusieurs substrats, inhibiteurs et inducteurs spécifiques en commun et sont la cible potentielle de plusieurs interactions médicamenteuses. Une meilleure compréhension des mécanismes de ces interactions pourrait permettre de réduire les risques associés aux thérapies médicamenteuses.

Les développements méthodologiques effectués par la présente étude permettront d'évaluer les mécanismes d'interactions possibles entre la clarythromycine, un antibiotique largement utilisé en pratique clinique, et deux médicaments marqueurs: le midazolam, substrat du CYP3A4/5, et la fexofénadine, substrat de la P-glycoprotéine et des OATPs. La réalisation de l'étude clinique anticipée nécessite le développement au préalable de méthodes analytiques pour le dosage des médicaments marqueurs dans les liquides biologiques afin de permettre le suivi de ces médicaments et de leurs principaux métabolites dans l'organisme.

Le dosage de la fexofénadine a été effectué par HPLC avec détection par fluorescence. Une méthode simple et sélective a été développée pour le dosage de la fexofénadine dans le plasma. La préparation de l'échantillon consiste en une précipitation des protéines. Le rendement est supérieur à 90%. La méthode permet le dosage dans l'intervalle de concentrations compris entre 4,7 et 1 864 ng/ml (limites d'acceptation de $\pm 15\%$ et l'intervalle de tolérance de 95%). Une autre méthode de dosage de la fexofénadine fut développée permettant l'analyse des échantillons urinaires dans l'intervalle compris entre 0,9 et 18,6 $\mu\text{g/ml}$ (limites d'acceptation de $\pm 15\%$ et l'intervalle de tolérance de 90%). L'extraction des échantillons en phase solide permet d'obtenir un rendement moyen à 87,5%.

Une méthode de dosage du midazolam, du 1-OH-midazolam et du 4-OH-midazolam dans l'urine par HPLC-UV a été mise au point. L'extraction liquide-liquide permet d'obtenir un rendement de l'ordre de 80% pour tous les analytes. Les intervalles de quantification pour le midazolam et le 1-OH-midazolam sont respectivement de 5 à 100 ng/ml et de 10 à 975 ng/ml. La méthode permet également de quantifier le 4-OH-midazolam en utilisant le signal provenant de son produit de dégradation. L'intervalle de dosage est compris entre 10 et 1 000 ng/ml. La justesse et la fidélité de la méthode pour tous les analytes sont respectivement de 106,5% et 11,2%.

Mots clés : interaction médicamenteuse, cytochromes P450, transporteurs membranaires, midazolam, fexofénadine, clarithromycine, méthode de quantification

Abstract

The cytochrome P450 superfamily and transmembrane proteins, having several specific and common substrats, inhibitors and inductors, are potential targets of many drug interactions. The better understanding of mechanisms of these interactions can allow reducing the risk of side-effects associated with drug therapy.

The present research will facilitate the study of possible interaction mechanisms between clarythromycine, an antibiotic which is widely used in clinical practice, with two probe substrates: midazolam, which is a selective CYP3A4/5 probe, and fexofenadine, a substrat of P-glycoprotein and OATP. In order to conduct the proposed clinical study, it is necessary to develop the analytical methods of quantification of the probe substrates in biological liquids, which are required for tracing these probe substrates and their metabolites in the human body.

The quantification of fexofenadine was performed by HPLC with fluorescence detection. A simple and selective method was developed for quantification of fexofenadine in the blood plasma. Samples were prepared by protein precipitation with a recovery exceeding 90 %. The method allows to quantify plasma concentrations between 4,7 and 1 864 ng/ml (with acceptance limits of ± 15 % and a tolerance interval of 95%). Another quantification method was developed for fexofenadine quantification in urine samples at concentrations ranging from 0,9 and 18,6 $\mu\text{g/ml}$ (with acceptance limits of $\pm 15\%$ and a tolerance interval of 90 %).

A method for the quantification of midazolam, 1-OH midazolam and 4-OH midazolam in urine samples was developed using a HPLC-UV technique. A liquid-liquid extraction procedure allows obtaining a recovery close to 80% for

all analytes. Quantification intervals for midazolam and 1-OH midazolam are between 5 and 100 ng/ml and 10 and 1000 ng/ml, respectively. The selective quantification of midazolam can be performed in the presence of the degradation product of its 4-OH metabolite. The quantification interval of the 4-OH midazolam is between 10 and 1000 ng/ml. The accuracy and precision of the method were found to be 106,5% et 11,2% respectively.

Key words: drug interaction, cytochromes P450, membrane transporters, midazolam, fexofenadine, clarythromycine, method of quantification

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| <u>Tableau 1:</u> Exemple du protocole expérimental de validation d'une procédure de dosage d'une substance chimique dans une matrice complexe. | 43 |
| <u>Tableau 2:</u> Caractéristiques physico-chimiques du chlorhydrate de fexofénadine, et de son standard interne (SI), le chlorhydrate de diphenhydramine. | 49 |
| <u>Tableau 3:</u> Techniques de dosage de la fexofénadine dans les matrices biologiques. | 51 |
| <u>Tableau 4:</u> Techniques d'extraction de la fexofénadine. | 52 |
| <u>Tableau 5:</u> Protocoles expérimentaux de validation des procédures de dosage de la fexofénadine dans le plasma et l'urine. | 59 |
| <u>Tableau 6:</u> Stabilité de la fexofénadine dans le plasma. | 62 |
| <u>Tableau 7:</u> Paramètres des droites d'étalonnage de la fexofénadine construites avec 10 standards d'étalonnage dans le plasma. | 63 |
| <u>Tableau 8:</u> Résultats des calculs du profil d'exactitude pour les standards de validation dans le plasma. | 66 |
| <u>Tableau 9 :</u> Stabilité de la fexofénadine dans l'urine. | 68 |
| <u>Tableau 10:</u> Paramètres des droites d'étalonnage de la fexofénadine construites avec 7 standards d'étalonnage dans l'urine. | 70 |
| <u>Tableau 11:</u> Résultats des calculs du profil d'exactitude pour les standards de validation dans l'urine. | 71 |
| <u>Tableau 12:</u> Caractéristiques physico-chimiques du midazolam, du 1-OH-midazolam, du 4-OH-midazolam et du standard interne, le diazépam. | 74 |
| <u>Tableau 13:</u> Techniques de dosage du midazolam et de ses métabolites dans les matrices biologiques. | 75 |
| <u>Tableau 14:</u> Fragmentation du 4-OH-midazolam et de son produit de dégradation (UdeM, Laboratoire de spectrométrie de masse). | 83 |

| | |
|---|----|
| <u>Tableau 15:</u> Protocole expérimental de pré-validation de la procédure de dosage du midazolam et de ses métabolites dans l'urine. | 90 |
| <u>Tableau 16:</u> Stabilité du 1-OH-midazolam et du midazolam dans l'urine, avec et sans incubation enzymatique en présence de β -glucuronidase. | 92 |
| <u>Tableau 17:</u> Paramètres des droites d'étalonnage pour le midazolam, le 1-OH-midazolam et le 4-OH-midazolam. | 93 |
| <u>Tableau 18:</u> Linéarité de la méthode de dosage pour le midazolam et ses métabolites (1- et 4-OH-midazolam). | 93 |
| <u>Tableau 19:</u> Biais relatifs et fidélités inter- et intra- journalières de la méthode de dosage du midazolam, du 1-OH-midazolam et du 4-OH-midazolam dans l'urine. | 94 |
| <u>Tableau 20:</u> Concentrations du midazolam et du 4-OH-midazolam retrouvées dans les urines des patients traités avec le Versed®. | 96 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| <u>Figure 1:</u> Structure chimique de la clarithromycine. | 11 |
| <u>Figure 2:</u> Métabolisme des macrolides par les CYP3As et formation d'un complexe métabolique intermédiaire. | 13 |
| <u>Figure 3:</u> Structure chimique du midazolam. | 16 |
| <u>Figure 4:</u> Structure chimique de la fexofénadine. | 21 |
| <u>Figure 5:</u> Schéma de l'étude. | 24 |
| <u>Figure 6:</u> Appareil de HPLC. | 30 |
| <u>Figure 7:</u> Principe de l'extraction liquide-liquide. | 32 |
| <u>Figure 8:</u> Principe de l'extraction en phase solide. | 34 |
| <u>Figure 9:</u> Cycle de vie d'une procédure analytique. | 35 |
| <u>Figure 10:</u> Illustration du profil d'exactitude. | 41 |
| <u>Figure 11:</u> Chromatogramme représentatif indiquant les temps de rétention de la fexofénadine et du diphenhydramine, lors d'une élution en mode isocratique. | 54 |
| <u>Figure 12 :</u> Chromatogramme représentatif des échantillons élués en mode gradient (solution-test de la fexofénadine ($t_r = 8$ min) et du SI ($t_r = 12,5$ min) (1), échantillon plasmatique (2) et blanc (3) après précipitation des protéines). | 55 |
| <u>Figure 13:</u> Chromatogramme représentant un échantillon (1) contenant de la fexofénadine et du SI et 5 blancs plasmatiques (2-6). | 60 |
| <u>Figure 14:</u> Droites d'étalonnage de la méthode de dosage de la fexofénadine dans le plasma. | 63 |
| <u>Figure 15:</u> Linéarité de la méthode de dosage de la fexofénadine dans le plasma. | 64 |
| <u>Figure 16:</u> Profil d'exactitude de la méthode de dosage de la fexofénadine dans le plasma. | 65 |
| <u>Figure 17:</u> Chromatogramme d'un standard de validation à 1 $\mu\text{g/ml}$ dans l'urine (1) contenant | |

| | |
|---|----|
| de la fexofénadine et le SI et un blanc après extraction en phase solide (2). | 67 |
| <u>Figure 18:</u> Droites d'étalonnage de la méthode de dosage de la fexofénadine dans l'urine. | 69 |
| <u>Figure 19:</u> Linéarité de la méthode du dosage de la fexofénadine dans l'urine. | 70 |
| <u>Figure 20:</u> Profil d'exactitude de la méthode de dosage de la fexofénadine dans l'urine. | 71 |
| <u>Figure 21:</u> Chromatogramme représentatif d'une solution-test indiquant l'ordre d'élution des substances à analyser: le 4-OH-midazolam, le 1-OH-midazolam, le midazolam, et le diazépam. | 79 |
| <u>Figure 22:</u> Chromatogramme d'une solution aqueuse contenant du 4-OH-midazolam, du 1-OH-midazolam, du midazolam, du produit de dégradation du 4-OH-midazolam et du diazépam. | 81 |
| <u>Figure 23:</u> Dégradation du 4-OH-midazoalm (1 µg/ml) et la formation de son produit de dégradation. | 82 |
| <u>Figure 24:</u> Corrélation entre les ratios des aires sous la courbe du 4-OH-midazolam dégradé / SI et 4-OH-midazolam / diazépam. | 84 |
| <u>Figure 25:</u> Équilibre chimique dépendant du pH entre deux formes de midazolam: ouverte et fermée. | 86 |
| <u>Figure 26:</u> Chromatogramme représentatif montrant les pics obtenus suite à l'analyse d'un standard de validation contenant tous les analytes et du SI (1) et un blanc urinaire (2). | 91 |

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---------------------------|-------------|
| Résumés | i |
| Liste des tableaux | v |
| Liste des figures | viii |
| Table des matières | ix |
| Abréviations | xiii |
| Remerciements | xv |

I. PARTIE THÉORIQUE

| | |
|--|-----------|
| 1. Interactions médicamenteuses | 1 |
| 1.1. Introduction | 1 |
| 1.2. Enzymes | 2 |
| 1.3. Transporteurs | 4 |
| 1.4. Étude des interactions médicamenteuses | 7 |
| 2. Étude des interactions médicamenteuses avec la clarithromycine | 10 |
| 2.1. Problématique | 10 |
| 2.1.1. Clarithromycine | 10 |
| 2.1.2. Interactions avec la clarithromycine au niveau des CYP3As | 12 |
| 2.1.3. Interactions avec la clarithromycine au niveau des transporteurs | 14 |
| 2.2. Choix des marqueurs | 15 |
| 2.2.1. Midazolam | 15 |
| 2.2.2. Fexofénadine | 20 |
| 2.3. Déroulement de l'étude | 23 |
| 2.4. Étapes de réalisation de l'étude | 26 |
| 3. Mise au point des méthodes de dosage | 27 |
| 3.1. Analyse chimique | 28 |
| 3.1.1. Chromatographie liquide à haute performance | 28 |
| 3.1.2. Traitement des échantillons | 31 |
| 3.1.2.1. Extraction liquide/liquide | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.2.2. Extraction sur support solide | 33 |
| 3.1.2.3. Précipitation des protéines | 34 |
| 3.2. Cycle de vie de la méthode analytique | 35 |
| 3.2.1. Sélection | 36 |
| 3.2.2. Développement | 36 |
| 3.2.3. Validation | 36 |
| 3.2.3.1. Définitions | 38 |
| 3.2.3.2. Critères de validation | 38 |
| 3.2.3.3. Protocole de validation | 42 |
| 3.2.3.4. Stabilité en bioanalyse | 43 |

II. PARTIE PRATIQUE

| | |
|---|-----------|
| 1. Objectif du travail | 47 |
| 2. Matériel | 47 |
| 3. Méthodes de dosage de la fexofénadine | 49 |
| 3.1. Sélection | 49 |
| 3.1.1. Caractéristiques physico-chimiques | 49 |
| 3.1.2. Techniques de dosage | 50 |
| 3.2. Mise au point des méthodes de dosage de la fexofénadine | 52 |
| 3.2.1. Préparation des solutions | 53 |
| 3.2.2. Détection et conditions de la séparation chromatographique | 53 |
| 3.2.3. Traitement des échantillons | 55 |
| 3.2.3.1. Extraction sur support solide | 56 |
| 3.2.3.2. Précipitation des protéines | 57 |
| 3.3. Validation des méthodes de dosage de la fexofénadine | 58 |
| 3.3.1. Protocoles expérimentaux de validation | 58 |
| 3.3.2. Validation de la méthode de dosage dans le plasma | 60 |
| 3.3.2.1. Sélectivité | 60 |
| 3.3.2.2. Rendement | 61 |
| 3.3.2.3. Stabilité | 61 |
| 3.3.2.4. Fonction de réponse et linéarité | 62 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.2.5. Justesse, fidélité et exactitude | 64 |
| 3.3.3. Validation de la méthode de dosage dans l'urine | 67 |
| 3.3.3.1. Sélectivité | 67 |
| 3.3.3.2. Rendement | 67 |
| 3.3.3.3. Stabilité | 68 |
| 3.3.3.4. Fonction de réponse et linéarité | 69 |
| 3.3.3.5. Justesse, fidélité et exactitude | 70 |
| 3.3.4. Conclusion | 72 |
| 4. Méthodes de dosage du midazolam et de ses principaux métabolites | 74 |
| 4.1. Sélection | 74 |
| 4.1.1. Caractéristiques physico-chimiques | 74 |
| 4.1.2. Techniques de dosage | 75 |
| 4.2. Mise au point des méthodes de dosage du midazolam et de ses métabolites dans l'urine | 77 |
| 4.2.1. Préparation des solutions | 78 |
| 4.2.2. Détection et conditions chromatographiques | 78 |
| 4.2.3. Extraction liquide-liquide | 80 |
| 4.2.4. Instabilité du 4-OH-midazolam | 81 |
| 4.2.4.1. Étude de l'instabilité du 4-OH-midazolam | 81 |
| 4.2.4.2. Quantification du 4-OH-midazolam | 83 |
| 4.2.4.3. Problèmes d'instabilité du 4-OH-midazolam | 84 |
| 4.3. Pré-validation de la méthode de dosage du midazolam, du 1-OH-midazolam et du 4-OH-midazolam | 89 |
| 4.3.1. Protocole expérimental | 90 |
| 4.3.2. Sélectivité | 91 |
| 4.3.3. Stabilité | 92 |
| 4.3.4. Rendement | 92 |
| 4.3.5. Fonction de réponse et linéarité | 93 |
| 4.3.6. Justesse et fidélité | 94 |
| 4.3.7. Analyse des échantillons réels | 95 |
| 4.3.8. Conclusion | 97 |

| | |
|---|-----------|
| III. DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE | 98 |
| Bibliographie | 101 |
| Annexes | 116 |

Abréviations

ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme, Élimination

AUC : *area under the plasma concentration-time curve*, aire sous la courbe de concentration plasmatique versus temps

AM : *ante meridiem*, matin

b.i.d. : *bis in die*, deux fois par jour

Cl : clairance

C max : concentration sérique maximale

CV : *coefficient of variation*, coefficient de variation

HCl : chlorhydrate

HPLC : *high performance liquid chromatography*, chromatographie liquide à haute performance

i.v. : intraveineuse

LBT : limite basse relative de tolérance

LHT : limite haute relative de tolérance

LLE : *liquid-liquid extraction*, extraction liquide-liquide

logP : coefficient de partage n-octanol/eau

MDR : *multiple drug resistance*, résistance aux médicaments

MIC : *metabolic intermediate complex*, complexe métabolique intermédiaire

OATP : *organic anion transport protein*, polypeptide de transport des anions organiques

P450 (CYP) : cytochrome

P-gp : glycoprotéine P

pH : potentiel hydrogène

pKa : constante d'ionisation

PM : *post meridiem*, soir

p.o. : *per os*, oral

SD : *standard deviation*, déviation standard

SI : standard interne

SPE : *solid phase extraction*, extraction en phase solide

Tmax : temps pour atteindre la concentration sérique maximale

t_{1/2} : demi-vie d'élimination

t_r : temps de rétention

Vd : volume de distribution

Remerciements

J'aimerais remercier le Docteur Jacques Turgeon, mon directeur de maîtrise, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour son aide, ses conseils et sa patience. Je suis extrêmement sensible à la confiance constante que vous avez témoigné à mon égard.

Je voulais également remercier Mme Véronique Michaud, l'auteure de l'étude clinique.

Je remercie Mme le Professeur Sylvie Marleau pour avoir accepté de présider le Jury et M. le Professeur Patrice Hildgen d'avoir gentiment accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à Mme Sylvie Poirier qui m'a épaulée quotidiennement. Merci pour ton aide professionnel, ta très grande disponibilité et ton soutien moral.

Un grand merci à Mme Isabelle Plante pour la correction de mon français et surtout pour son amitié.

J'exprime toute ma reconnaissance à M. François Bélanger pour sa gentillesse et sa grande disponibilité.

Je veux aussi exprimer ma reconnaissance envers le Groupe de recherche universitaire sur le médicament et la compagnie AstraZeneca pour leur soutien financier.

Finalement, mes remerciements infinis et ma plus sincère gratitude vont aux personnes les plus proches, mes parents, ma sœur, mon mari et mon fils, pour leur amour et leur soutien constant.

I. PARTIE THÉORIQUE

1. Interactions médicamenteuses

1.1. Introduction

Les organismes vivants sont en permanence exposés à des xénobiotiques et substances exogènes d'origines diverses (aliments, médicaments, polluants, *etc.*). Parmi ceux-ci, les médicaments sont des substances bioactives qui exercent des effets bénéfiques (thérapeutiques) ou nocifs (indésirables, toxiques) sur l'organisme. Si deux médicaments sont administrés simultanément, il n'est pas impossible qu'ils interagissent l'un envers l'autre. Cliniquement, l'observation d'effets indésirables reliés à la coadministration des médicaments est très fréquente. Des interactions médicamenteuses peuvent ainsi entraîner des effets indésirables qui vont de douleurs banales jusqu'au décès. Les interactions médicamenteuses peuvent influencer tous les processus reliés à la pharmacocinétique (ADME ou Absorption, Distribution, Métabolisme, Élimination) ou à la pharmacodynamique d'un médicament. Les interactions pharmacocinétiques entraînent des changements dans les effets désirés ou indésirables en raison de variations dans la relation dose-concentration du médicament. Quant aux interactions pharmacodynamiques, elles s'expliquent par des variations dans la relation concentration-effet observée.

Plusieurs facteurs (physiologiques, environnementaux, génétiques) peuvent régir la pharmacocinétique des médicaments : l'état de l'organisme, la médication concomitante, l'alimentation, *etc.* L'impact de ces facteurs n'est pas toujours constant dans le temps. Les interactions pharmacocinétiques au niveau des enzymes de biotransformation, des systèmes de transport membranaire, de liaison aux protéines *etc.*, peuvent induire de brusques changements dans le devenir et le métabolisme des

médicaments et de leurs métabolites. Ainsi, la compréhension des mécanismes d'interactions au niveau des différents tissus de l'organisme permet de mieux maîtriser les risques et l'efficacité d'une thérapie médicamenteuse.

1.2. Enzymes

Au cours du processus évolutif, les organismes ont développé différents mécanismes leur permettant de maintenir l'homéostasie. Le devenir d'une substance exogène dans l'organisme (ADME) est déterminé premièrement par ses propriétés physicochimiques qui conditionnent ses relations avec les différentes structures biologiques de l'organisme. D'une façon générale, un xénobiotique hydrophile (ionisé dans l'organisme, polaire) présent dans l'organisme sera éliminé facilement via les liquides biologiques (urines, bile, salive, *etc.*). A l'inverse, un xénobiotique lipophile a la possibilité de diffuser à-travers les membranes cellulaires. Il est donc facilement absorbé et a tendance à s'accumuler dans les phases lipidiques de l'organisme. Pour empêcher toute accumulation, l'organisme a développé un mécanisme d'élimination qui se fait soit par excrétion (foie, reins, *etc.*), soit par biotransformation (foie, parois intestinale, *etc.*).

La biotransformation des xénobiotiques s'effectue par des réactions d'oxydation (phase I) qui impliquent la création ou la modification de groupements fonctionnels et /ou par des réactions de conjugaison (phase II) qui impliquent le transfert d'un groupement polaire. Ainsi, les enzymes de phases I et II facilitent l'élimination des xénobiotiques (Bechtel et Testa, 1988).

Les cytochromes P450 (CYP) forment une superfamille d'enzymes ubiquitaires impliquées dans le métabolisme oxydatif des substances endo- et exogènes. Ils représentent une famille multigénique de monooxydases localisées sur le réticulum endoplasmique. Les cytochromes sont des hémoprotéines, composées d'une partie

protéique, l'apoprotéine, et d'un groupement prosthétique constitué d'une protoporphyrine (IX) liée à un atome de fer par quatre liaisons covalentes. Avant d'être métabolisé, le substrat se fixe dans une poche hydrophobe de l'apoprotéine. La fixation particulière d'une substance est essentielle pour déclencher l'activité enzymatique.

Un grand nombre de séquences de CYP450 a été identifié et classifié. Les CYP450 sont classés en familles et sous-familles en se basant sur l'identité des séquences protéiques. L'appartenance à la même sous-famille nécessite 55% d'homologie. Les séquences identiques à plus de 97% sont considérées comme variants alléliques. La structure primaire de la partie protéique (apoprotéine) est donc propre à chaque isoenzyme.

Les CYP450s impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques possèdent des spécificités larges et croisées pour nombreux substrats/inhibiteurs/inducteurs. En effet, un CYP450 peut métaboliser plusieurs substrats et un substrat peut être métabolisé par plusieurs CYP450.

Chez l'homme, les sous-familles CYP1A, CYP2C et CYP3A sont prépondérantes (Wilkinson, 2005). Parmi ces sous-familles, le CYP3A est le plus important grâce à son abondance dans le foie et l'intestin et grâce à son pouvoir de métaboliser un large spectre de médicaments. La sous-famille CYP3A comprend 4 isoenzymes connues chez l'homme : CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43 (Lamba *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2004).

L'isoenzyme CYP3A4 joue un rôle majeur dans la biotransformation des médicaments. Il représente 25% de toutes les isoformes chez l'homme et catalyse le métabolisme oxydatif de plus de 50% des médicaments, parmi lesquels on retrouve des antagonistes calciques, des inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase, des immunosuppresseurs, des corticostéroïdes, des anesthésiques, des antihistaminiques,

des benzodiazépines (Rendic *et al.*, 2002). Le large spectre des substrats du CYP3A4 est à l'origine de plusieurs interactions médicamenteuses.

Le métabolisme médié par les CYP3A est généralement caractérisé par une variabilité intra- et interindividuelle importante, ce que complique l'utilisation thérapeutique de plusieurs substrats du CYP3A, surtout pour ceux ayant une marge thérapeutique étroite. Cette variabilité semble attribuable, entre autres, à des facteurs génétiques (Lamba *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2004). Les gènes codant pour les CYP450 ont des formes alléliques différentes qui peuvent être à l'origine de la variabilité de l'expression et de l'activité d'un CYP450. Par conséquent, le devenir et l'effet de ces substrats peuvent être influencés par des polymorphismes génétiques (variants alléliques dans 1% de la population) si ces derniers ont des conséquences phénotypiques. Le CYP3A5, identique à 83% au CYP3A4, métabolise la plupart des substrats du CYP3A4 (Xie *et al.*, 2004). L'allèle CYP3A5*3 crée une faible expression de l'isoenzyme CYP3A5 chez les individus homozygotes pour cette allèle. Le CYP3A5 n'est exprimé que chez un tiers des populations caucasienne et asiatique et chez 50% des afro-américains (Lee *et al.*, 2003). Lorsque exprimé, il représente environ un quart de l'activité du CYP3A4 (Paine *et al.*, 1997). L'expression des CYP3A4/5 est important pour le phénomène d'ADME, surtout au niveau du foie et du tractus gastro-intestinal (Paine *et al.*, 2006). Les CYP3A sont un déterminant majeur du métabolisme de premier passage des médicaments administrés par voie orale.

1.3. Transporteurs

En plus d'une panoplie d'enzymes de biotransformation, l'organisme possède différents systèmes de transport (phase III) grâce auxquels les xénobiotiques et/ou leurs métabolites traversent les membranes cytoplasmiques. Les protéines de transport les plus connues sont la glycoprotéine P (P-gp), les transporteurs des anions

organiques (OAT, *organic anion transporter*), les polypeptides de transport des anions organiques (OATP, *organic anion transport proteins*), les transporteurs de cations organiques (OCT, *organic cation transporter*), les MRP (*multidrug resistance associated proteins*) et les BCRP (*breast cancer resistant proteins*). On distingue deux types de transporteurs : les transporteurs d'influx (par exemple, la famille des SLC (*Solute Carrier*)) et les transporteurs d'efflux (par exemple, la famille des ABC (*Adenosine Tri-Phosphate (ATP) Binding Cassette*)) (Ayrton et Morgan, 2001; Hediger *et al.*, 2004, Mikkaichi *et al.*, 2004).

La P-gp est une protéine membranaire qui a été identifiée en 1975 par Juliano et Ling et qui appartient à la famille des transporteurs ABC. Ces derniers sont des transporteurs actifs, qui consomment de l'ATP (Juliano et Ling, 1976). À l'origine, la P-gp a été associée à un phénotype de résistance croisée aux médicaments anticancéreux. Chez l'homme, la structure primaire de cette protéine, qui contient 1 280 acides aminés, est codée par les gènes MDR1 et MDR3 (*multiple drug resistance*). La P-gp codée par le gène MDR1 est impliquée dans le transport des xénobiotiques (Ling, 1997, Ambudcar *et al.*, 1999). La P-gp est constituée de deux composantes de six segments transmembranaires formant un pore à-travers la membrane cytoplasmique. Le fonctionnement de cette structure exige la fixation d'un substrat et de l'ATP, l'hydrolyse de l'ATP et l'expulsion du substrat de la cellule à-travers le pore (Rosenberg *et al.*, 2003).

La P-gp est localisée à la surface apicale des entérocytes, des hépatocytes, des cellules tubulaires rénales, des cellules endothéliales des capillaires cérébraux, *etc.* (Ito *et al.*, 2005). Ainsi, la P-gp interfère avec l'absorption intestinale de nombreux médicaments, contribue à la sécrétion biliaire et rénale des médicaments et s'oppose à la pénétration de plusieurs médicaments dans le cerveau (Sun *et al.*, 2004).

L'activité de la P-gp est génétiquement variable. Les modifications de sa structure et/ou de son expression, et par conséquent de son activité, sont associées aux substitutions d'un ou plusieurs nucléotides (SNP, *single nucleotide polymorphism*) au niveau de l'exon 26 (C3435) du gène MDR1. Trois variants alléliques du gène MDR1 ont été décrits : 3435CC, 3435CT et 3435TT. Il existe une différence phénotypique entre les individus homozygotes 3435CC et 3435TT, le deuxième génotype mentionné (3435TT) donnant lieu à un niveau d'expression de la P-gp diminué par rapport au premier (3435CC) (Hoffmeyer *et al.*, 2000). La répartition des variantes alléliques dépend de l'ethnie. La fréquence du polymorphisme 3435CC/3435TT chez les caucasiens est d'environ 30%/30%, tandis qu'elle est de 70%/5% chez les afro-américains (Floyd *et al.*, 2003; Wandel *et al.*, 2000).

La P-gp peut transporter des médicaments de structures variables (Seelig *et al.*, 2000; Schinkel *et al.*, 2003). Plusieurs de ses substrats sont aussi métabolisés par les CYP3As (Wacher *et al.*, 1995, Zhang *et al.*, 2001). Les CYP3A et la P-gp étant localisés au niveau du tractus gastro-intestinal, ils s'opposent tous deux à la pénétration des médicaments dans l'organisme lors du phénomène de premier passage. De plus, ces protéines ont plusieurs inhibiteurs et inducteurs en commun.

Les transporteurs d'influx sont habituellement des cotransporteurs échangeant un médicament contre l'entrée ou la sortie d'un anion ou d'un cation. Les OATP (les Oatp chez le rat et la souris) appartiennent à la famille de transporteurs membranaires SLC et à la sous famille SLC21 ou SLCO (Hagenbuch et Meier, 2004, Mikkaichi *et al.*, 2004). La structure commune de ces protéines de transport possède douze domaines transmembranaires, une large boucle extracellulaire, et de nombreux sites de N-glycosylation et de phosphorylation présents sur les domaines extracellulaires.

Les OATPs sont localisés entre autres au pôle basolatéral des cellules épithéliales des organes excrétoires (Ito *et al.*, 2005). On les retrouve dans les

membranes des entérocytes, des hépatocytes et des cellules tubulaires rénales. Ces transporteurs facilitent la capture des xénobiotiques dans la lumière intestinale et la circulation sanguine. Ainsi, les xénobiotiques sont exposés aux enzymes de biotransformation des entérocytes et hépatocytes et aux transporteurs d'efflux apicaux. Les OATPs, tout comme certains autres transporteurs d'influx et en collaboration avec des transporteurs d'efflux, jouent un rôle important dans l'absorption intestinale et la sécrétion biliaire et rénale des médicaments. Les transporteurs OATP identifiés à ce jour au niveau du tractus gastro-intestinal sont OATP-B, OATP-D et OATP-E. Les OATP qui fonctionnent au niveau des hépatocytes humains sont OATP-A, OATP-B, OATP-C et OATP8 (Sai *et al.*, 2006).

1.4. Étude des interactions médicamenteuses

Il existe plusieurs méthodes *in vitro* et *in vivo* qui permettent d'étudier le rôle des enzymes et des protéines transmembranaires impliquées dans les processus pharmacocinétiques, dont, par exemple, l'utilisation des microsomes hépatiques humains pour l'exploration des effets médicamenteux sur les CYP; l'investigation du transport et/ou du métabolisme des médicaments à l'aide de cultures cellulaires ou de préparations tissulaires; l'étude du métabolisme d'un médicament sous l'effet d'une isoforme d'enzyme spécifique ou de la capacité d'un médicament à inhiber le métabolisme d'un substrat par cette isoforme à l'aide de modèles recombinants; l'utilisation des animaux transgéniques pour étudier le rôle d'enzymes et de systèmes de transporteurs spécifiques; *etc.* Les études effectuées chez l'humain permettent quant à elles d'investiguer les propriétés pharmacocinétiques des médicaments et d'étudier les interactions médicamenteuses observées *in vitro* ou dans un modèle animal (Rodrigues *et al.*, 1997A; Li *et al.*, 1997, Yee *et al.*, 1999, Crespi *et al.*, 1997; McKinnon *et al.*, 1998). En général, les interactions médicamenteuses sont d'abord

étudiées chez des volontaires sains. Comme les interactions médicamenteuses dépendent parfois de polymorphismes génétiques particuliers au niveau d'une isoenzyme ou d'une protéine de transport particulière, certaines études incluent une phase de présélection en fonction d'un phénotype ou génotype (Guidance for Industry : DIS, 2006).

Les études d'interactions médicamenteuses *in vivo* se basent sur l'estimation de l'activité enzymatique (ou de l'activité d'un transporteur) avant et après une interaction médicamenteuse. L'estimation de l'activité, quant à elle, est basée sur l'administration d'un substrat marqueur d'activité approprié qui correspond, idéalement, à un cytochrome (un transporteur) spécifique. Il s'agit de comparer la pharmacocinétique du substrat marqueur choisi en présence et en absence d'un autre médicament susceptible d'interférer avec la pharmacocinétique du substrat marqueur. L'administration de substances marqueurs par voie orale permet de prendre en compte les activités intestinales et hépatiques des systèmes étudiés (Bjornsson *et al.*, 2003).

Les substrats spécifiques et sensibles à la fois aux CYP3A4 et 3A5 recommandés pour les études d'interactions médicamenteuses *in vivo* sont, à titre d'exemple, le midazolam, le triazolam, le buspirone, la féléodipine, la lovastatine, la simvastatine, l'életriptane et le sildénafil (Guidance for Industry : DIS, 2006). Dans la mesure du possible, il est souhaitable que la pharmacocinétique du substrat marqueur d'activité enzymatique choisi soit indépendante du débit hépatique et de la liaison aux protéines plasmatiques.

L'étude des interactions médicamenteuses *in vivo* se complique entre autres par le fait que la pharmacocinétique des médicaments est souvent influencée à la fois par la présence d'enzymes et de transporteurs. Afin de distinguer l'impact d'un isoenzyme de celui des transporteurs sur les différents processus de la pharmacocinétique, il est possible d'utiliser, d'une part, une substance marquant l'activité enzymatique qui n'est

pas un substrat des transporteurs et, d'autre part, une substance spécifique aux transporteurs qui n'est pas métabolisée par l'isoenzyme à l'étude. Par exemple, la digoxine, le talinolol et la fexofénadine sont cités parmi les substances recommandées pour les études de transport *in vitro* médiées par la P-gp (Guidance for Industry : DIS, 2006). En effet, ces trois médicaments étant peu métabolisés dans l'organisme, ils permettent en théorie d'obtenir une bonne estimation de l'impact des transporteurs sur la disposition des médicaments chez l'humain (Kharasch *et al.*, 2005).

L'échantillonnage des liquides biologiques correctement planifié et exécuté permet d'estimer adéquatement les changements dans la pharmacocinétique (*i.e.* AUC, Cmax, Tmax; CL, Vd, $t_{1/2}$, *etc.*) des médicaments administrées avec ou sans modulateurs du fonctionnement des systèmes enzymatiques et/ou de transport. De telles études permettent d'évaluer les mécanismes en cause dans les changements de pharmacocinétique observés et, surtout, d'estimer la signification clinique des interactions étudiées. Néanmoins, l'interprétation des données *in vivo* ainsi obtenues se complique par plusieurs facteurs, tels les niveaux d'expression régionale variables des isoenzymes et des transporteurs, la direction du transport, l'affinité, la concentration locale des médicaments en interaction, le degré d'absorption, la distribution et/ou l'élimination, *etc* (Lin, 2007).

2. Étude des interactions médicamenteuses avec la clarithromycine

Le projet décrit ci-dessous porte sur l'investigation des interactions médicamenteuses de la clarithromycine chez des volontaires sains.

2.1. Problématique

Le médicament faisant l'objet de la présente étude est la clarithromycine, un antibiotique largement utilisé en pratique clinique. Plusieurs auteurs ont documenté les interactions médicamenteuses entre la clarithromycine et certains composés métabolisés par le CYP3A4/5. Dans chacun des cas rapportés, ces interactions ont donné lieu à une modification des concentrations plasmatiques de la clarithromycine et des autres composés mis en interactions (Demange, 1997). Il est admis que le mécanisme général expliquant cette interaction est commun pour les antibiotiques de la classe des macrolides. Il s'agit de l'inhibition quasi-irréversible des cytochromes CYP3A4/5 suite à la formation d'un complexe avec un métabolite nitroso-alcane (Westphal, 2000). Certaines interactions ont été observées, *in vivo*, entre la clarithromycine et des médicaments dont le devenir dans l'organisme est indépendant des CYP. D'autre part, il a été démontré, *in vitro*, que la clarithromycine pouvait influencer le fonctionnement des systèmes de transport en plus de celui des enzymes. Ainsi, le but de l'étude présente est donc d'investiguer les mécanismes d'interactions médicamenteuses de la clarithromycine chez l'humain.

2.1.1. Clarithromycine

La clarithromycine est un antibiotique de la classe des macrolides, dérivé de l'érythromycine, qui agit en inhibant la synthèse des protéines intracellulaires des

bactéries à Gram (+), telles *Legionella p.*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium avium*, *Chlamydia sp.*, etc (Peters, 1992). La structure chimique de la clarithromycine est représentée à la Figure 1.

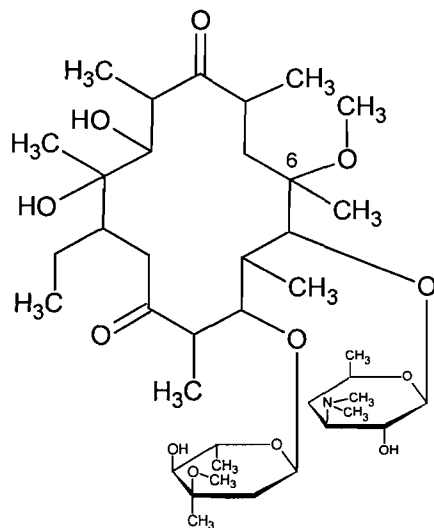


Figure 1 : Structure chimique de la clarithromycine.

Cet antibiotique est constitué d'un cycle lactonique de 14 atomes contenant un groupement -OCH₃ en position C6 et deux sucres, dont un sucre aminé comportant une fonction tertiaire (N (CH₃)₂).

Chez l'homme, la clarithromycine est majoritairement métabolisée en 14-hydroxy clarithromycine, qui possède le même mécanisme d'action que la molécule-mère (Adachi *et al.*, 1988). La clarythromycine se transforme également, mais dans une moindre mesure, en descladinosyl-clarithromycine et en N-déméthyl-clarithromycine (Rodrigues *et al.*, 1997B).

Suite à une prise par voie orale, la clarithromycine et son dérivé hydroxylé présentent un pic plasmatique en 2 à 3 heures et une biodisponibilité de 55%. La fraction de clarithromycine et de son métabolite actif liée aux protéines plasmatiques est de 70% et 50%, respectivement. Entre 30 et 40% de la dose de clarithromycine

administrée *per os* sont éliminés sous forme de métabolites par voie rénale et 40% par les fèces (AHFS Drug Information® (2009).

2.1.2. Interactions avec la claritromycine au niveau des CYP3As

Plusieurs cas d'interactions médicamenteuses *in vivo* entre des substrats des CYP3A et des macrolides ont été rapportés (Westphal *et al.*, 2000). L'augmentation de la biodisponibilité de ces substrats a été associée avec l'inhibition des CYP3A intestinales et hépatiques. À titre d'exemple, les clairances orales et systémiques du midazolam, un substrat spécifique des CYP3A, diminuent respectivement de 7 et 3 fois suite à un traitement avec la clarithromycine (Pinto *et al.*, 2005). La formation *in vivo* d'un complexe métabolique intermédiaire (MIC, *metabolic intermediate complex*) avec les CYP3As, lors d'une utilisation prolongée de la claritromycine à des concentrations thérapeutiques, a été proposée (Ito *et al.*, 2003, Williams *et al.*, 2002, Pinto *et al.*, 2005, Quinney *et al.*, 2008). Il est également possible que l'inhibition compétitive contribue à l'inhibition totale des CYP3As (Ito *et al.*, 2003; Quinney *et al.*, 2008).

La clarithromycine, comme les autres macrolides, subit une oxydation grâce aux CYP3A, ce qui se traduit par une N-démétylation de l'amine conduisant à la formation d'un métabolite nitroso-alcane (R-N=O). Ce métabolite se fixe sur l'atome de fer (Fe^{3+}) des CYP3A qui, en présence de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), est alors réduit en fer ferreux (Fe^{2+}) avec formation d'un MIC inactif et stable. Ce complexe est formé en raison de l'absence de régénération de fer ferrique Fe^{3+} (Perity *et al.*, 1992; Demange, 1997). Les étapes de l'oxydation de la clarithromycine sont illustrées à la Figure 2.

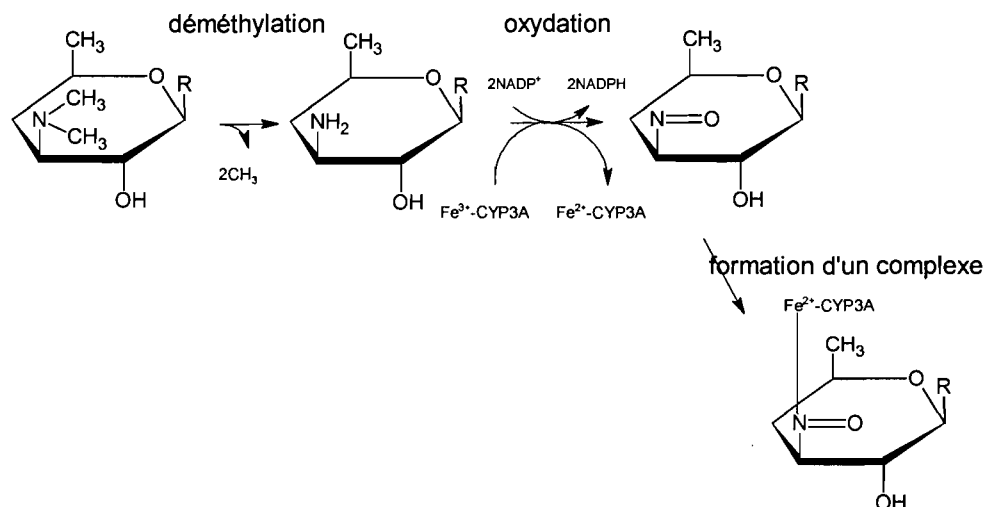


Figure 2 : Métabolisme des macrolides sur les CYP3As et formation d'un complexe métabolique intermédiaire.

Cette réaction d'oxydation a lieu, par exemple, avec l'érythromycine comme avec la clarithromycine. Cependant, elle est défavorisée, en présence de cette dernière, dû à l'encombrement stérique (Van Bambeke, 2001).

La formation du MIC avec la clarithromycine est possible *in vitro* comme *in vivo* (Thummel et Wilkinson, 1998, Pinto *et al.*, 2005). L'inactivation concentration-dépendante de l'activité catalytique des CYP3As des microsomes hépatiques humains, suite à la formation du MIC, a été observée à l'aide de méthodes spectroscopiques (Mayhew *et al.*, 2000). L'inhibition n'a lieu qu'après une préincubation avec le macrolide. Le degré de cette inhibition dépend du temps d'exposition et de la concentration (Ito *et al.*, 2003). Les données *in vitro* obtenues dans notre laboratoire confirment en partie la formation de MIC avec la clarithromycine. La confirmation de ce mécanisme d'inhibition peut être effectuée, *in vivo*, de façon indirecte. Pour ce faire, il s'agit d'observer la diminution de la formation des métabolites du midazoalme dans des homogénats de tissus prélevés au niveau de l'intestin grêle de volontaires sains traités durant 7 jours avec de la clarithromycine (Pinto *et al.*, 2005). L'effet

inhibiteur, qui est dû à la stabilité du MIC, demeure même après l'élimination du macrolide de l'organisme. Ceci peut entraîner une intoxication plus importante que celle qu'on observe dans le cas d'une inhibition réversible compétitive ou non compétitive (Ito *et al.*, 2003).

2.1.3. Interactions avec la claritromycine au niveau des transporteurs

Plusieurs études démontrent l'existence d'une relation entre certains macrolides et des protéines de transport. Certains macrolides, tels l'érythromycine et l'azithromycine, sont recommandés comme inhibiteurs des protéines de transport pour des études d'interactions médicamenteuses (Bjornsson *et al.*, 2003). On a ainsi pu mettre en évidence, par exemple, que l'érythromycine augmentait la biodisponibilité du talinolol via l'inhibition de la P-gp (Schwarz *et al.*, 2000). De plus, de nombreuses observations en clinique ont démontré que les concentrations sériques de la digoxine, un glycoside digitalique transporté par la P-gp et les OATPs, s'élèvent lors d'un traitement concomitant avec des macrolides, dont, particulièrement, la clarithromycine (Nawarskas *et al.*, 1997, Bizjak *et al.*, 1997, Drescher *et al.*, 2003, Kullak-Ublick *et al.*, 2001, Noe *et al.*, 1997). Selon une étude, la digoxine atteint des concentrations plasmatiques toxiques dans un délai de 3 à 13 jours lorsqu'elle est administrée en concomitance avec la clarithromycine (Xu *et al.*, 2001). Un des mécanismes possibles de cette interaction médicamenteuse est l'augmentation de la biodisponibilité orale de la digoxine suite à l'altération de la flore gastrointestinale normale (*Eubacterium lentum*). Cette dernière est partiellement responsable, $\approx 40\%$, de l'inactivation de la digoxine (Lindsay *et al.*, 1987, Bizjak *et al.*, 1997). L'autre cause possible est une diminution de la sécrétion tubulaire de la digoxine par inhibition de la P-gp. Deux essais *in vitro* (*monolayer efflux* (BA/AB ratio = 31,3) et activité ATPase) ont en effet démontré que la clarithromycine est transportée par la P-gp (Polli *et al.*, 2001). Une

étude *in vitro* a mis en évidence que la clarithromycine pouvait inhiber le transport de la digoxine dans une culture de cellules épithéliales rénales transfectées avec le gène MDR1 (Wakasugi *et al.*, 1998). D'un autre côté, il a été démontré que la clarithromycine diminuait la clairance non rénale, mais n'avait aucun effet sur la clairance rénale (Kurata *et al.*, 2002). Il a également été démontré que la clarithromycine inhibait le recaptage de la digoxine par les Oatp2, dans des hépatocytes de rat, de façon dépendante de la concentration (Ito *et al.*, 2007). La clarithromycine, tout comme certains autres macrolides, inhibe les OAPT1B et 3B, *in vitro*, en relation avec de la concentration (Seithel *et al.*, 2007, Jacobson *et al.*, 2004).

L'altération de la disposition des substrats des transporteurs, suite à une interaction à ce niveau, peut produire de brusques changements de leurs concentrations systémiques et/ou locales aussitôt après la coadministration des médicaments en interaction. Ces changements peuvent ensuite être masqués par la formation du MIC, qui se développe plus lentement.

2.2. Choix des substrats marqueurs

La mesure du fonctionnement des entités responsables de la biotransformation et de la disposition des médicaments dans l'organisme est basée sur l'administration de substrats marqueurs d'activité appropriés. Les substrats marqueurs d'activité doivent correspondre, dans le cas idéal, à une entité spécifique.

2.2.1. Midazolam

Le midazolam (Versed®), largement utilisé comme marqueur d'activité du CYP3A4/5, est un médicament de la famille des imidazobenzodiazépines, qui exerce son activité au niveau des récepteurs centraux GABA-A (Bolon *et al.*, 2002). Le

midazolam est utilisé en clinique pour ses propriétés sédatives, hypnotiques, amnésiantes et myorelaxantes.

Le métabolisme du midazolam est spécifique des CYP3A (Thummel *et al.*, 1998). L'activité intestinale et hépatique du CYP3A4/5 peut être estimée suite à une prise orale de midazolam, tandis que l'administration intraveineuse permet d'estimer l'activité hépatique. Une des qualités du midazolam, comme marqueur des CYP3As, est le fait qu'il ne soit pas un substrat de la P-gp (Gorski *et al.*, 1998, Thummel *et al.*, 1996, Polli *et al.*, 2001). De plus, on a démontré, *in vitro*, que ces deux métabolites principaux, le 1-OH-midazolam et le 4-OH-midazolam, n'inhibent pas le transport de la digoxine et de la daunorubicine, des substrats spécifiques de la P-gp (Katoh *et al.*, 2001).

Le nom chimique du midazolam est 8-chloro-6-(2-fluorophényl)-1-méthyl-4H-imidazo-[1,5-a]-[1,4]-benzodiazépine et son poids moléculaire est de 325,77 g/mole. Sa faible basicité (pKa 6,15) est due à l'atome d'azote en position 2 du cycle d'imidazole et sa solubilité dans l'eau dépend fortement du pH (Figure 3). À pH 4, le cycle d'azométhine s'ouvre de façon réversible au niveau des positions 4 et 5, permettant la formation d'un dérivé stable très soluble dans l'eau.

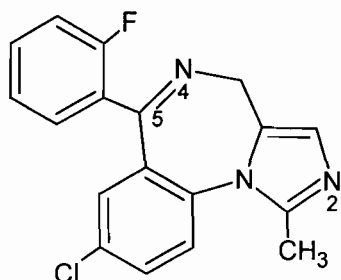


Figure 3: Structure chimique du midazolam.

À un pH supérieur à 4, le cycle diazépine se ferme rapidement, avec une demi-vie de dix minutes. C'est la forme fermée du midazolam qui, de par sa très grande lipophilicité, est responsable de l'activité thérapeutique (Bolon *et al.*, 2002).

Le midazolam est une benzodiazépine de courte durée d'action (10-30 min), dont le temps de demi-vie, après une prise orale, est de 1 à 2 heures. Le midazolam n'est métabolisé que par le CYP3A4/5, au niveau, principalement, de l'intestin et du foie. Les métabolites du midazolam, le 1-OH-midazolam (= α -OH-midazolam) et le 4-OH-midazolam, sont retrouvés dans le plasma et l'urine (Heizmann *et al.*, 1983). Il semble que le CYP3A5 catalyse préférentiellement la formation du 1-OH-midazolam (Kuehl *et al.*, 2001, Huang *et al.*, 2004). Ce dernier participe à l'effet pharmacologique du midazolam (Driessen *et al.*, 1991). Le temps de demi-vie de l'élimination du 1-OH-midazolam, chez le volontaire sain, est de 60 minutes. On retrouve environ 90% de la dose administrée de midazolam dans les urines après 24 heures, sous la forme du 1-OH-midazolam (Heizmann *et al.*, 1983, Smith *et al.*, 1981). L'autre métabolite formé, le 1,4-diOH-midazolam, est détecté à l'état de trace. Chaque métabolite formé subit ensuite une glucuroconjugaison en vue de son élimination. L'élimination du midazolam s'effectue essentiellement par voie rénale, sous la forme de 1-OH-midazolam glucuroconjugué, ce qui représente 60 à 80% de l'hydroxylation totale. De faibles proportions de 4-OH-midazolam et de 1,4-diOH-midazolam conjugués (3 et 1% respectivement) sont également retrouvées dans les urines. Moins de 0.5% de la dose de midazolam administrée est excrétée sous forme inchangée au niveau rénal, alors que 2 à 4% sont éliminés dans les fèces (Heizmann *et al.*, 1983).

Il existe une forte variabilité interindividuelle dans la pharmacocinétique et la pharmacodynamie du midazolam, qui dépend à la fois de facteurs génétiques et environnementaux. En pratique clinique, un ajustement posologique individualisé permet donc une utilisation plus efficace et sécuritaire du midazolam (Bolon *et al.*,

2002). Une étude a démontré que l'absorption du midazolam était presque complète suite à une administration de ce médicament par voie orale (Gorsky *et al.*, 1998). Selon différentes études, la biodisponibilité du midazolam, suite à une prise orale, peut être en moyenne de 30% (avec une variabilité interindividuelle de 12 à 50%) ou 50% (variant entre 31 et 72%) (Heizmann *et al.*, 1983, Smith *et al.*, 1981). Cette variabilité a été associée à l'activité des CYP3A intestinaux (Gorsky *et al.*, 1998, Thummel *et al.*, 1996).

La pharmacocinétique et la pharmacodynamie du midazolam sont influencées par des inducteurs et des inhibiteurs du CYP3A4/5, en particulier suite à une administration orale. Cette influence a été largement étudiée (Yuan *et al.*, 1999, Bolon *et al.*, 2002). Par exemple, une diminution importante des concentrations, de la demi-vie d'élimination et des effets sédatifs du midazolam a été rapportée lors de l'administration concomitante de midazolam et de médicaments inducteurs du CYP3A4, tels que la rifampicine, la carbamazépine ou la phénytoïne (Backman *et al.*, 1998). À l'opposé, une sédation profonde et prolongée a été observée lors de l'association du midazolam aux macrolides, inhibiteurs du CYP3A4, tels que l'érythromycine, la clarithromycine ou la roxithromycine administrés oralement (Yeates *et al.*, 1997, Gorsky *et al.*, 1998). La biodisponibilité absolue du midazolam augmente significativement (de 31 à 75%) suite à un traitement de 8 jours avec la clarithromycine. En effet, cette dernière fait tripler la concentration plasmatique d'équilibre d'une dose orale de 4 mg de midazolam et diminue la clairance orale du midazolam (de 103 à 15 l/h). Également, en présence de clarithromycine, l'excrétion urinaire du 1-hydroxyméthyl-midazolam diminue de 25% (Gorsky *et al.*, 1998). Une augmentation des effets du midazolam a également été observée lors de la prise concomitante, par voie orale, des antifongiques comme l'itraconazole, le kétoconazole et le fluconazole, inhibiteurs puissants du CYP3A4, confirmant le rôle du métabolisme

intestinal dans les interactions médicamenteuses décrites (Tsunoda *et al.*, 1999, Ahonen *et al.*, 1997). Par ailleurs, une augmentation des concentrations plasmatiques de midazolam, attribuable à une diminution de sa métabolisation au niveau hépatique, se produit lorsque ce médicament est donné en association avec de la cimétidine, du diltiazem ou du vérapamil (Wang *et al.*, 1999).

Certains facteurs physiologiques peuvent aussi influencer la pharmacocinétique du midazolam. Par exemple, la posture du patient, en modifiant le flux sanguin hépatique, a une influence sur le métabolisme et l'élimination de ce médicament. Le rythme circadien semble quant à lui en modifier la clairance totale (Koopmans *et al.*, 1991). Il a été démontré le facteur responsable de la diminution de la clairance du midazolam lorsqu'utilisée en association avec le fentanyl, était une réduction du flux sanguin hépatique provoquée par l'hypotension (Oda, 1999).

Il n'existe actuellement aucun marqueur parfait pour les CYP3As. Cependant, le midazolam semble être un bon choix, car il n'est métabolisé que par ce type de cytochrome. Il est d'ailleurs bien décrit comme étant un marqueur des CYP3As, il n'est pas transporté par la P-gp, il est éliminé rapidement et il a un métabolite majeur excrété dans l'urine. Par contre, l'utilisation du midazolam comme marqueur des CYP3As est limitée, chez l'humain, par ses effets indésirables. Le plus grave de ces effets est la modification de la réponse au CO₂, correspondant à un état de détresse respiratoire. Néanmoins, des doses orales sous-thérapeutiques demeurent sécuritaires et sont largement utilisées lors des études de pharmacocinétique. À titre d'exemple, l'utilisation d'une dose de 2 mg *per os* de midazolam est recommandé pour évaluer l'effet inhibiteur *in vivo* d'autres médicaments (Bjornsson *et al.*, 2003). Le midazolam est aussi un médicament ayant un coefficient d'extraction hépatique intermédiaire (ratio d'extraction moyen de 35%). Son degré de liaison aux protéines plasmatiques est

de 95%. Ainsi, la pharmacocinétique du midazolam dépend du flux sanguin hépatique et de son degré de liaison aux protéines plasmatiques.

2.2.2. Fexofénadine

La fexofénadine (Allegra®) est un métabolite acide de la terféndine (Seldane®), antagoniste des récepteurs histaminiques de type H1 de deuxième génération. Il a été démontré que la fexofénadine était transportée par la P-gp et des OATPs (Cvetkovic *et al.*, 1999, Perloff *et al.*, 2003, Putnam *et al.*, 2002). À l'heure actuelle, la fexofénadine est admise, par les autorités gouvernementales, comme étant le substrat de la P-gp par excellence pour les études *in vitro* effectuées sur ce transporteur d'efflux (Guidance for Industry : DIS, 2006). En effet, le métabolisme de la fexofénadine dans l'organisme est négligeable ce qui permet de l'utiliser comme marqueur du fonctionnement de la P-gp et des OATPs *in vivo* (Lippert *et al.*, 1997, Drescher *et al.*, 2002).

La fexofénadine, ou acide 2-[4-[1-hydroxy-4-[4-(hydroxy-diphényl-méthyl)-1-pipéridyl]butyl]phényl]-2-méthyl-propanoïque, est un zwitterion contenant un groupement acide (carboxylique) de pKa de 4,25 et un groupement basique (N de pipéridine) de pKa de 9,53. La masse molaire du sel hydrochloré de la fexofénadine est de 538,12 g/mole. Le logarithme de son coefficient de partage n-octanol/eau (logP) est relativement constant entre les pH de 3 et 8, variant entre 2,6 à 2 (SciFinder Scholar, *substance information*). Sa structure chimique est représentée à la Figure 4.

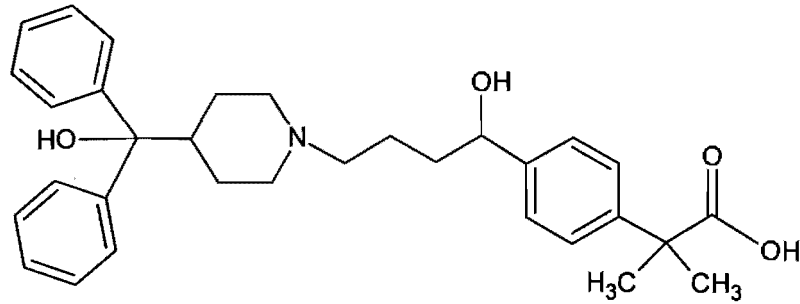


Figure 4 : Structure chimique de la fexofénadine.

La fexofénadine n'est presque pas métabolisée dans l'organisme. En effet, entre 92 et 95% de la dose administrée *per os* est excrété dans l'urine et les fèces sous forme inchangée (Lippert *et al.*, 1997), contre environ 5% qui est métabolisé en azacyclonol. La biodisponibilité absolue de la fexofénadine chez l'homme (33%), a été établie par comparaison avec celle de la terféfenadine, étant donné qu'aucune formulation IV injectable n'est présentement disponible pour ce médicament (Matsushma *et al.*, 2008). Les résultats d'études de bilan de masse effectuées en présence de [¹⁴C]-fexofénadine HCl administrée chez des volontaires sains ont montré qu'environ 8-18% et 80% de la dose administrée *per os* ont été retrouvés dans l'urine et les fèces, respectivement (Russel *et al.*, 1998.; Robbins *et al.*, 1998; Simpson *et al.*, 2000; Lippert *et al.*, 1995).

Il a été démontré que certains inhibiteurs et inducteurs de la P-gp influencent les taux plasmatiques de fexofénadine (Wang *et al.*, 2002; Hamman *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 2000; Dresser *et al.*, 2003). La moitié de la variabilité de la biodisponibilité observée pour ce médicament est attribuable à la P-gp intestinale (Hamman *et al.*, 2001). La littérature démontre, en effet, que la biodisponibilité de la fexofénadine est affectée par des polymorphismes retrouvés dans le gène MDR1 (Kim *et al.*, 2001). Certains modèles *in vitro* ont par ailleurs démontré que la fexofénadine était un substrat des OATPs (OATP1A2 et OATP2B1), tout comme de la P-gp

(Dresser *et al.*, 2002, Drescher *et al.*, 2002, Tannegren *et al.*, 2003). La pharmacocinétique de ce médicament est d'ailleurs affectée par la prise de jus de pamplemousse, un inhibiteur des OATPs (OATP-B) (Drescher *et al.*, 2002, Nosava *et al.*, 2004, Tannegren *et al.*, 2004).

Ainsi, les deux types de transporteurs (P-gp et OATPs) agissent potentiellement sur l'absorption de la fexofénadine (Kharasch *et al.*, 2005). Pour ce qui est de l'excrétion biliaire de la fexofénadine, une étude a rapporté qu'elle était affectée par la présence concomitante d'érythromycine, un inhibiteur des protéines de transport (Milne *et al.*, 2000). Sa clairance rénale, quant à elle, est diminuée de 27% lors d'une interaction médicamenteuse avec le probenecide, un inhibiteur de l'excrétion rénale d'acides faibles (Yasui-Furukori *et al.*, 2005). Ceci témoigne de l'implication des transporteurs, au niveau des reins, dans l'élimination de la fexofénadine.

Il existe également des évidences que des transporteurs autres que la P-gp et les OATPs peuvent influencer l'élimination de la fexofénadine chez des rongeurs et chez l'humain (Matsushima *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2008; Tannegren *et al.*, 2003).

Malgré toutes les interactions médicamenteuses rapportées pour la fexofénadine, celle-ci peut être administrée *per os* de façon concomitante avec le midazolam sans influence réciproque (Garret *et al.*, 2005). De plus, l'usage de la fexofénadine est sécuritaire chez l'humain. La fexofénadine a été développée à partir de la terfénadine. Elle en est en fait un substitut, mais qui a l'avantage, contrairement à la terfénadine, de ne pas allonger l'intervalle QT à l'électrocardiogramme, et ce même à très fortes doses (Russel *et al.*, 1998).

2.3. Déroulement de l'étude

Le but de l'étude envisagée est d'investiguer les mécanismes d'interactions possibles entre la clarithromycine et d'autres médicaments, chez l'humain, et de vérifier si certains transporteurs tels la P-gp et ceux de la famille des OATPs jouent un rôle dans ces interactions.

Pour les besoins de l'étude, 24 sujets volontaires sains de la population caucasienne seront recrutés, dont 12 d'entre eux seront porteurs du gène MDR13435TT. Ce dernier a en effet été associé à des niveaux d'expression et de fonction réduits de la P-gp dans l'épithélium intestinal (Hoffmeyer *et al.*, 2000). Ceci permettra de distinguer l'impact de la P-gp de celui des OATPs dans les interactions médicamenteuses potentielles avec la clarithromycine.

Le midazolam et la fexofénadine seront choisis comme substrats sélectifs des CYP3As et des transporteurs (OATPs et P-gp), respectivement. Les deux médicaments seront administrés en dose unique en trois occasions : seuls, en concomitance avec la première dose de clarithromycine et après 9 jours de traitement avec la clarithromycine. Des prélèvements de sang et d'urine seront effectués afin de mesurer les concentrations des médicaments et de leurs métabolites dans chacun de ces liquides biologiques. La création des courbes de concentrations en fonction du temps, pour les médicaments et leurs métabolites permettra d'obtenir, dans chacun des cas étudiés, le profil d'exposition intégrale de l'organisme au médicament, c'est-à-dire l'aire sous la courbe. Celle-ci sera utilisée dans l'approche non-compartmentale pour l'estimation de paramètres pharmacocinétiques tels les clairances apparentes, rénales et métaboliques, le C max et la $t_{1/2}$. Le dosage des métabolites dans l'urine, par rapport à la dose administrée, sera également estimé. Ces paramètres seront déterminés dans trois conditions différentes, puis comparés entre eux : 1) prise des médicaments en

l'absence de l'inhibiteur, la clarithromycine; 2) prise concomitante des médicaments à l'étude et d'une seule dose d'inhibiteur; 3) prise des médicaments suite à un prétraitement avec l'inhibiteur.

Au jour 1, début du premier volet de l'étude, les volontaires se présenteront à 7:00 AM à l'unité de recherche clinique de l'hôpital, à jeun depuis au moins 12 heures, où ils recevront des doses orales uniques de chacun de ces médicaments : fexofénadine (120 mg) et midazolam (2 mg). Des prélèvements sanguins seront ensuite effectués de 8 à 18 heures (Figure 5).

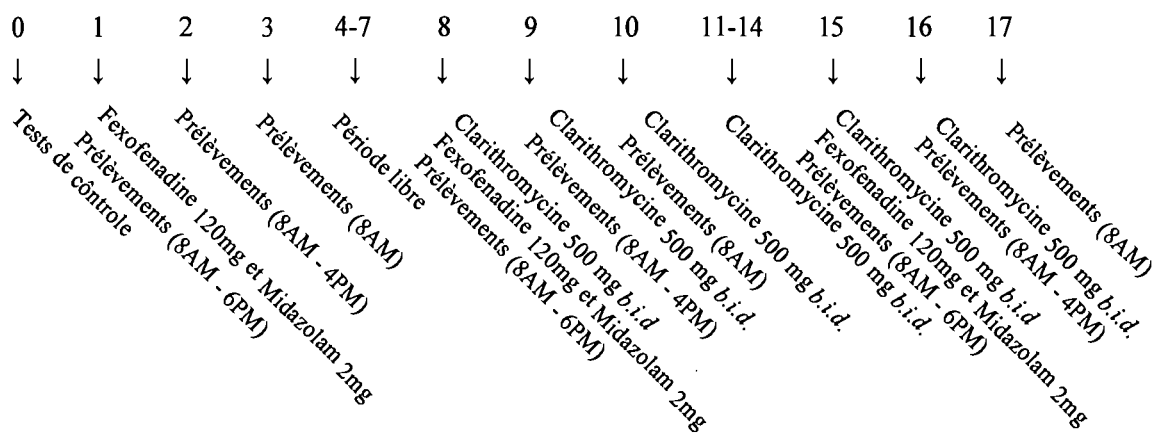


Figure 5 : Schéma de l'étude.

Pour faciliter les prélèvements sanguins, un cathéter sera installé dans une veine de l'avant bras. Les échantillons sanguins, de 7,5 ml chacun, seront collectés dans des tubes de verre contenant de l'EDTA immédiatement après l'administration des médicaments (temps zéro) et après 15, 30, 45 minutes, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8 et 10 heures. Le plasma sera par la suite séparé du sang total par centrifugation.

Au jour 2 de l'étude, des prélèvements seront effectués 24, 26, 28, 30, 32 et 48 heures après l'administration des médicaments. Enfin, un dernier prélèvement sera

effectué à 8 heures le jour 3, c'est-à-dire 48 heures après la prise des médicaments à l'étude. Toutes les urines seront quant à elles collectées pour une période de 48 heures. Des aliquots d'urine seront conservés après l'enregistrement du volume et du pH urinaire. Tous les échantillons de sang et d'urine seront conservés à -80°C. Une période libre de 4 jours (jours 4, 5, 6 et 7) aura lieu afin d'assurer une élimination complète des médicaments administrés.

Le deuxième volet de l'étude débutera au jour 8, lors duquel un traitement continu avec la claritromycine (500 mg *b.i.d.*) sera amorcé, pour une durée de 9 jours. Au cours de cette période du traitement, les volontaires recevront une dose orale unique de fexofénadine et une dose de midazolam. Durant les jours 8 et 9, des prélèvements sanguins et urinaires seront effectués de la même façon qu'aux jours 1 à 3. Au jour 10, un seul prélèvement sera effectué, à 8 heures AM. Aux jours 11 à 14, le traitement avec clarithromycine 500 mg *b.i.d.* sera poursuivi, mais sans prélèvement sanguin.

Enfin, le troisième volet débutera au jour 15, lors duquel le traitement avec la clarithromycine sera poursuivi de la même façon que précédemment. Cependant, les volontaires auront également reçu des doses orales uniques de fexofénadine (120 mg) et de midazolam (2 mg). Des prélèvements de sang et d'urine seront exécutés aux jours 15, 16 et 17, de la même façon qu'aux jours 1 à 3.

La consommation d'autres médicaments, de jus de pomme, et d'alcool sera interdite jusqu'à 2 semaines avant de débiter l'étude et au cours de sa durée complète. La consommation de jus de pamplemousse sera également été interdite durant l'étude, de même qu'au cours des 4 semaines précédentes.

2.4. Étapes de réalisation de l'étude

La phase pré-analytique s'est déroulée entre le développement du protocole de l'étude et la réalisation proprement dite de l'analyse. Le succès de la phase analytique, c'est-à-dire du dosage des substances à analyser, était conditionnel à la bonne conduite de la phase pré-analytique (Lavit et Houin, 1999). L'analyse des résultats de dosage et la prise de décision constituera la phase post-analytique.

Phase pré-analytique :

- rédaction du protocole ainsi que du formulaire de consentement et approbation par le comité d'éthique
- recrutement et sélection des volontaires sains
- réalisation de l'étude
- développement et validation des méthodes analytiques de dosage

Phase analytique :

- dosage des médicaments et de leurs métabolites dans les échantillons de sang et d'urine

Phase post-analytique :

- analyse des données
- confirmation ou infirmation des hypothèses de départ
- rédaction d'un rapport

L'approbation du protocole de l'étude et du formulaire de consentement par le comité d'éthique est l'étape permettant de procéder au recrutement et à la sélection des volontaires sains. Les prélèvements sanguins et les collectes d'urine seront effectués

durant l'étude et les échantillons seront stockés dans des conditions prédéterminées jusqu'à l'analyse. Le développement et la validation des méthodes analytiques peuvent être réalisés indépendamment de la réalisation des trois premières étapes de la phase pré-analytique. Enfin, l'analyse des résultats du dosage des médicaments et métabolites, dans les échantillons collectés, permet de vérifier si les hypothèses émises au début de l'étude étaient valides.

L'objectif du travail présenté dans la partie pratique de ce mémoire consistait à mettre au point et valider des méthodes de quantification des médicaments marqueurs (midazolam et fexofénadine) dans le plasma et dans les urines collectées dans le cadre de l'étude décrite ci-haut.

3. Mise au point des méthodes de dosage

Pour permettre le suivi du médicament et de ses principaux métabolites dans l'organisme, il est indispensable de développer des méthodes analytiques et de les valider afin de démontrer leur spécificité, leur fidélité, leur sensibilité et leur justesse. L'étude du devenir d'un médicament dans l'organisme est donc, avant tout, un problème analytique englobant la préparation de l'échantillon (élimination des constituants interférents et augmentation de la concentration des substances à analyser), la séparation chromatographique des substances analysées, leur identification et leur dosage (cf. section 3.1). Le dosage du médicament et de ses métabolites de routine s'effectue qu'après une phase de validation de la méthode de dosage développée. Cette phase permet de contrôler le risque associé à l'utilisation de la méthode. Les critères de la validation couramment utilisés en bioanalyse ainsi que la description d'une nouvelle stratégie de la validation basée sur le profil d'exactitude sont décrites dans la section 3.2 et repris généralement des lignes directrices de la

Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) (Hubert *et al.*, 2003 et 2006A et B).

3.1. Analyse chimique

L'analyse chimique rassemble plusieurs méthodes et techniques permettant l'identification et le dosage des substances d'origines diverses (médicaments, métabolites, *etc.*). Il arrive très souvent qu'un même composé puisse être dosé et libéré de la matrice par des méthodes différentes. Le choix de la méthode utilisée doit être fait en fonction de la nature de la substance à analyser, de sa concentration dans l'échantillon prélevé, du type de matrice utilisée, du degré de précision nécessaire, de la fiabilité des résultats de la méthode envisagée et de l'instrumentation disponible (Rouessac, 2002).

3.1.1. Chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie est une procédure physico-chimique de séparation des constituants d'un mélange. Cela permet d'identifier et de doser les substances présentes dans une phase liquide ou gazeuse. Parmi les techniques analytiques connues jusqu'à maintenant, la méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC, *high performance liquid chromatography*) en phase inversée, couplée à des modes de détection appropriés, permet de déterminer des concentrations de l'ordre du ng/ml et de quantifier simultanément les médicaments et leurs métabolites (Kazakevich et LoBrutto, 2007). La technique analytique de HPLC a été mise au point à la fin des années 1960. Depuis, ses performances, en terme de sélectivité et de résolution, se sont améliorées progressivement grâce à la miniaturisation de son appareillage et à l'utilisation de phases stationnaires de plus en plus élaborées. La

technique de HPLC a donc, aujourd'hui, un grand pouvoir de résolution en plus d'être fiable et rapide. Elle permet de traiter des échantillons thermiquement instables, de séparer des énantiomères et elle peut aussi être couplée à de nouvelles techniques automatisées d'extraction.

Cette technique est basée sur la migration forcée d'une phase liquide en contact avec une phase stationnaire solide, qui est immobilisée à l'intérieur d'une colonne en acier inoxydable. Les analytes (*i.e.* substances recherchées ou déterminées dans un échantillon), qui sont dissouts dans la phase mobile, interagissent avec la phase stationnaire par des mécanismes de partage et d'adsorption. Ils traversent la colonne à des vitesses différentes, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Ainsi, les constituants sont séparés à différents moments et peuvent être recueillis ou détectés un à un en continu, dans le flux sortant de la colonne.

Les phases stationnaires greffées (composées de gels de silice chimiquement modifiés en surface avec des chaînes hydrophobes), dont la polarité est facilement ajustable, sont à l'origine de la chromatographe en phase inversée. Une des silices modifiées les plus utilisées est la C-18. Le gel de silice chimiquement modifié ayant les propriétés d'un liquide favorise plutôt le partage des analytes à l'interface entre deux phases (mobile et stationnaire). La forme sphérique, le petit diamètre (de 2 à 5 μm) et la porosité des particules de la phase stationnaire permettent une grande surface d'échange.

La phase mobile, quant à elle, est choisie en fonction de sa polarité, de la polarité de la phase stationnaire et de la nature des analytes à séparer. En phase inversée (*i.e.* phase stationnaire apolaire), le pouvoir éluant augmente quand la proportion de solvant organique, dans la phase mobile, augmente. Les conditions de séparation sont optimisées par l'emploi de mélanges de solvants et l'utilisation de gradients.

Un appareil de HPLC comporte divers modules aux fonctions définies, reliés entre eux comme les maillons d'une chaîne (Figure 6). Les modules principaux sont le dégaseur, la pompe à haute pression, l'auto-injecteur et la boucle d'injection, la colonne chromatographique et le(s) détecteur(s). La circulation de la phase mobile entre ces modules s'effectue par l'intermédiaire de tubulures courtes dont le diamètre interne est très petit.

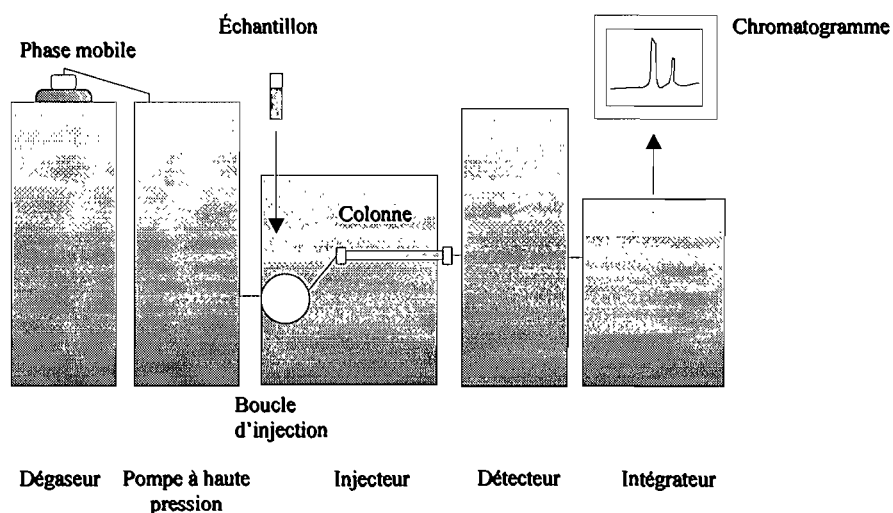


Figure 6 : Appareil de HPLC.

Les colonnes analytiques sont compactes, c'est-à-dire que la phase stationnaire occupe tout l'espace interne. Dans de tels cas, une forte pression de phase mobile est nécessaire afin d'éluer les composés à-travers la colonne. Cette pression importante est obtenue grâce à la pompe à haute pression, qui peut atteindre $3,5 \times 10^7$ Pa. Celle-ci permet d'obtenir un débit de 0,2 à 5 ml/min de phase mobile. La pompe doit maintenir une alimentation stable et reproductible en phase mobile, même lors d'un gradient. Le dégaseur sert à éliminer les gaz ambiants de la phase mobile. Ces derniers pourraient

en effet former des bulles, perturber la séparation des analytes, endommager la phase stationnaire et influencer la réponse d'un détecteur. La boucle d'injection, qui fait partie de l'auto-injecteur, permet quant à elle d'introduire un volume constant d'échantillon au sommet de la colonne, sans perturbation significative du débit de la phase mobile. Les modes de détection les plus courants reposent sur les propriétés optiques des substances à analyser, telles l'absorption de la lumière et la fluorescence. Les détecteurs, placés après la colonne chromatographique, permettent de mesurer soit l'intensité de l'absorption, avec un détecteur UV (ultraviolet et visible), soit l'intensité de la lumière émise, avec un détecteur à fluorescence. La réponse du détecteur étant linéaire (proportionnelle à la concentration de la substance à analyser), il est donc possible de quantifier la substance à analyser avec une courbe d'étalonnage.

3.1.2. Traitement des échantillons

L'échantillon à analyser doit être sous une forme compatible avec la méthode d'analyse choisie. La préparation des échantillons représente généralement une fraction importante (~ 60%) du temps total consacré à l'analyse. Pour augmenter la sélectivité et la sensibilité de la méthode d'analyse, il est souvent nécessaire, préalablement à la prise de mesures, d'éliminer tout ce qui pourrait conduire à des interférences. Cette étape est d'autant plus importante quand la substance à doser est à l'état de trace dans un échantillon biologique. Les trois méthodes les plus utilisées, pour la préparation des échantillons, sont l'extraction liquide-liquide (LLE, *liquid-liquid extraction*), l'extraction en phase solide (SPE, *solid phase extraction*) et la précipitation des protéines. Cependant, toutes ces méthodes ont leurs avantages et désavantages.

3.1.2.1. Extraction liquide/liquide

Le principe de la méthode LLE repose sur la distribution des constituants de l'analyte, entre deux solvants non miscibles (phase aqueuse/phase organique), en fonction de la solubilité de ces constituants dans chacun d'eux. L'analyte est généralement extrait dans la phase organique, sous forme non-ionisée, après ajustement du pH. L'extrait ainsi obtenu peut être enrichi par des extractions multiples. Il est ensuite évaporé pour augmenter la concentration en composés d'intérêt (Figure 7).

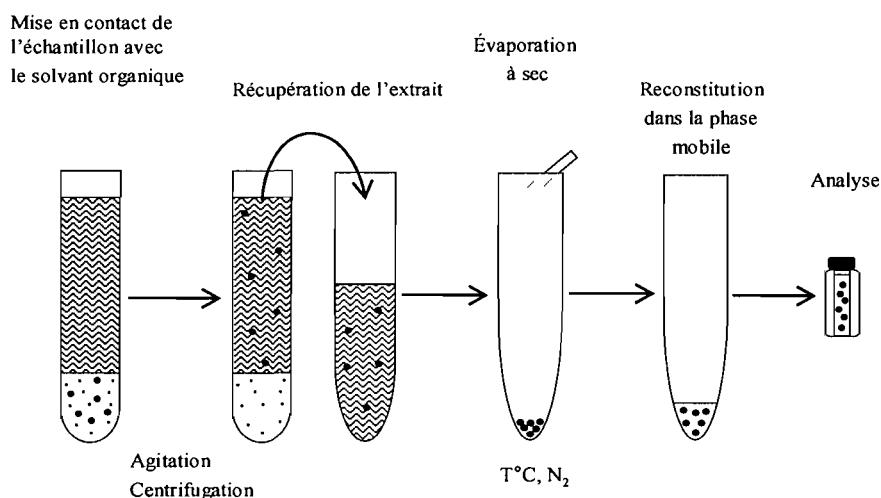


Figure 7 : Principe de l'extraction liquide-liquide.

Cette technique est fastidieuse et il s'agit là de son principal désavantage. De plus, la formation de l'émulsion entre les deux phases ne permet pas la récupération complète de l'extrait et diminue ainsi le rendement. Souvent, la seule façon d'améliorer le rendement est d'effectuer des extractions multiples. De plus, étant donné que l'LLE implique l'utilisation de grands volumes de solvants organiques, l'extrait doit être concentré par évaporation. Malheureusement, par le fait même, on concentre

également les impuretés contenues dans l'extrait et dans le solvant. De plus, les pertes de molécules volatiles et/ou thermiquement instables sont également possibles. Dans certains cas, il est nécessaire de procéder à l'extraction en retour afin d'améliorer la sélectivité de la méthode.

3.2.1.2. Extraction sur support solide

Ce procédé consiste à percoler l'échantillon liquide sur un adsorbant (support solide) placé dans une colonne de petite dimension (cartouche). L'interaction analyte-support est réversible. Ayant une affinité importante pour le support solide, les analytes sont retenus par celui-ci alors qu'une grande partie des contaminants sont élués avec la matrice. Le reste des contaminants peut être éliminé à l'aide de lavages sélectifs. Enfin, les analytes sont récupérés à l'aide de solvants organiques appropriés, qui seront ensuite évaporés pour permettre une concentration adéquate de l'échantillon final (Figure 8).

Ainsi, en résumé, l'extraction sur support solide comporte les étapes suivantes :

- activation de l'absorbant et rinçage de la colonne avant utilisation (1)
- dépôt et percolation de l'échantillon sur l'adsorbant (2 et 3)
- élimination des interférences (rinçage) (4)
- récupération des analytes par percolation (5)
- évaporation de l'échantillon purifié à sec (6)
- reconstitution de l'échantillon dans la phase mobile (7)
- analyse (8)

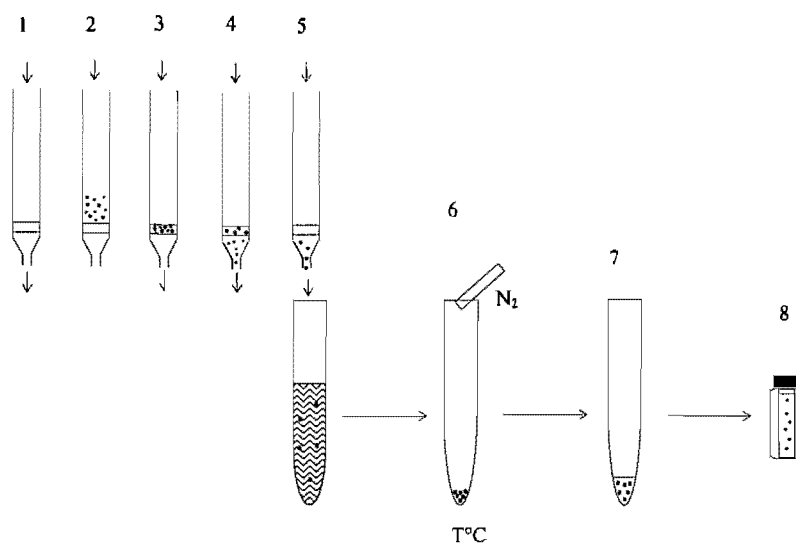


Figure 8 : Principe de l'extraction en phase solide.

Les avantages de cette technique, par rapport à l'LLE, sont la rapidité relative de la procédure et l'absence d'émulsion pouvant occasionner des pertes de matériel. Le large éventail d'adsorbants disponibles permet de choisir le support qui sera le plus susceptible de donner le rendement d'extraction optimal en fonction des interactions spécifiques analyte-support. Par contre, la cartouche est à usage unique et la reproductibilité de l'extraction dépend de qualité du lot de celle-ci. On peut utiliser qu'un pH de 2 à 8 en présence des silices greffées, qui sont les plus courantes, tandis qu'une gamme de pH beaucoup plus large peut être utilisée avec la méthode de LLE.

3.1.2.3. Précipitation des protéines

La dénaturation des protéines est une technique non sélective visant à éliminer les protéines de l'échantillon plasmatique. Cette dénaturation résulte de la modification des caractéristiques physicochimiques des protéines sous l'effet de la chaleur ou de différents réactifs, entraînant leur précipitation. La dénaturation des protéines peut en

effet être provoquée par un chauffage à 50-60°C, par l'addition de solvants organiques miscibles à l'eau (entraînant de ce fait la modification de leur constante diélectrique), par l'ajout d'un sel neutre (qui réduit leur degré d'hydratation) ou par la modification du pH.

Les principaux inconvénients de cette technique sont cependant l'élimination incomplète des protéines, qui n'est effectuée qu'à 95%, la coprécipitation possible du médicament avec certaines protéines et la surcharge de réactifs dans l'échantillon.

3.2. Cycle de vie de la méthode analytique

La mise en point d'une procédure de dosage s'effectue en quatre étapes successives, telles que présentées à la Figure 9 (Hubert *et al.*, 2003) :

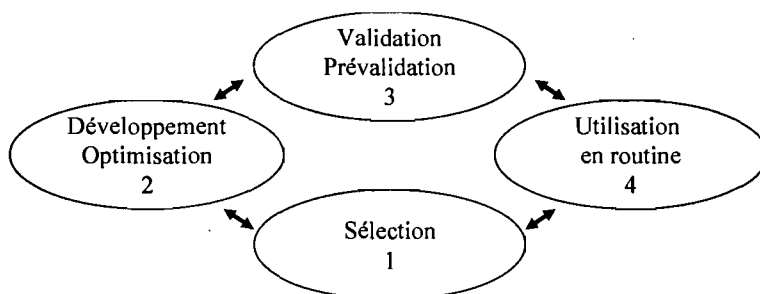


Figure 9 : Cycle de vie d'une procédure analytique.

- 1) Sélection, qui permet de définir les objectifs et les conditions opératoires initiales;
- 2) Développement de la méthode avec ou sans optimisation, au moyen de plans d'expériences;
- 3) Validation de la méthode développée, qui peut être précédée d'une phase de pré-validation;
- 4) Application de la méthode validée, incluant le plus souvent des validations additionnelles : une validation de routine et, parfois, une validation partielle.

3.2.1. Sélection

L'étape de sélection nécessite de bien cerner et anticiper les problèmes qui seront potentiellement rencontrés lors de l'analyse des échantillons. Ainsi, le choix des analytes et de la méthode d'analyse doit être fait en fonction des objectifs de l'étude et des possibilités du laboratoire.

3.2.2. Développement

Le développement d'une méthode consiste en fait en l'optimisation de la procédure analytique. Au cours de ce processus, il convient d'effectuer des expérimentations qui permettront d'obtenir des informations sur les performances de la méthode analytique, notamment : le rendement d'extraction, les limites de quantification et de détection, la stabilité, la spécificité, la sélectivité, la linéarité et le modèle de régression, l'intervalle de dosage possible et la variabilité des résultats. Ces informations préparent à l'étape de validation et permettent de rédiger un protocole de validation détaillé.

3.2.3. Validation

La fiabilité des données obtenues à l'aide d'une procédure analytique est essentielle à l'interprétation adéquate des résultats d'études de pharmacologie, notamment celles qui portent sur la pharmacocinétique, le métabolisme, la biodisponibilité et la bioéquivalence. Les réglementations internationales relatives aux bonnes pratiques (BPL, BPC, FDA, ICO, ICH, *etc.*) mentionnent que, pour être jugées acceptables, les données analytiques des études doivent obligatoirement répondre à certains critères pré-établis. De fait, la procédure analytique développée se doit d'être validée et un système de contrôle de qualité des analyses effectuées en routine doit être mis en place. Cependant, les documents réglementaires ne proposent pas d'approche

expérimentale et se limitent le plus souvent aux concepts généraux. Ainsi, l'exécution de la procédure de validation, en bioanalyse, est basée sur ces directives, mais elle dépend largement de l'expérience de l'analyste, de son jugement et de la stratégie et des méthodes utilisées au laboratoire d'analyse (Chapuzet *et al.*, 1997). À l'heure actuelle, les professionnels de la bioanalyse et de la biostatistique tentent de créer un guide pratique tenant compte de leur expérience dans le domaine ainsi que des particularités liées aux milieux biologiques (Hubert *et al.*, 2003 et 2006A et B, Lavit et Houin, 1999, Peters, 2007).

La validation, en bioanalyse, permet de démontrer la performance de la procédure analytique développée de même que sa possibilité de produire des résultats qui sont fiables et qui démontrent que la procédure est conforme à l'usage pour lequel elle est prévue. En termes statistiques, la validation permet d'obtenir, pour une méthode de dosage donnée, deux estimés : celui d'une erreur systématique (aussi appelé "vrai biais") et celui d'une erreur aléatoire mesurée par une variance (aussi appelée "vraie fidélité"). Ces estimés servent à évaluer l'aptitude de la méthode à doser chaque échantillon inconnu avec une exactitude suffisante (Hubert *et al.*, 2003 et 2006A et B).

Les guides de validation récents rassemblent les définitions des principaux critères de validation, précisent la terminologie employée dans ce domaine, proposent des stratégies de planification expérimentale et des méthodes d'analyse statistique qui, tous ensemble, permettent de tirer le maximum d'information des résultats obtenus lors des études et, en conséquence, de minimiser le risque de devoir réanalyser ces résultats.

3.2.3.1. Définitions

Les définitions qui seront utilisés dans le texte par la suite (analyte, matrice, échantillon, standard d'étalonnage, courbe d'étalonnage, standard de validation, blanc) sont rapportées en Annexe I.

3.2.3.2. Critères de validation

Les critères de validation les plus spécifiques à la bioanalyse sont le rendement d'extraction, l'effet de dilution et la stabilité des médicaments dans la matrice biologique (Hubert *et al.*, 2006). Ces critères doivent être établis séparément pour chaque type de milieu biologique analysé (sang, plasma, urine, *etc.*). Il est conseillé de s'assurer que la validation soit effectuée avec des échantillons dont la matrice représente le mieux possible celle des échantillons à analyser (*i.e.* même espèce animale, même état de l'organisme, même anticoagulant, *etc.*). Toute modification de la procédure d'analyse entraîne automatiquement une revalidation, qui sera effectuée en fonction de la nature des modifications apportées et des critères potentiellement affectés par celles-ci.

Les critères de validation couramment utilisés en bioanalyse sont les suivants :

1) Spécificité – sélectivité

Une méthode est spécifique si elle produit une seule réponse pour un analyte donné. Les techniques de chromatographie utilisées en bioanalyse sont sélectives plutôt que spécifiques. Une méthode sélective permet de doser, même en présence d'autres constituants potentiellement présents, uniquement la substance à analyser. Très souvent, la spécificité/sélectivité se fonde sur une absence d'interférences, qui peut être démontrée par différents moyens, tels des techniques chromatographiques par

exemple (comparaison visuelle des chromatogrammes obtenus en analysant, d'une part, le blanc, et, d'autre part, des standards de validation).

2) Seuil de détection – seuil de quantification – intervalle de quantification

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité d'analyte pouvant être détectée dans un échantillon, mais non quantifiable. Les limites de quantification inférieure et supérieure sont, respectivement, la plus petite et la plus grande quantité de l'analyte pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites, avec une exactitude définie. L'intervalle de dosage possible de la méthode analytique s'étend entre ces deux limites.

3) Fonction de réponse – linéarité

La fonction de réponse (courbe d'étalonnage) d'une procédure d'analyse illustre, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existant entre la réponse (signal du détecteur) et la concentration de la substance à doser dans l'échantillon. Le choix de la fonction de réponse dépend du type de méthode (bioanalytique, immunodosage, etc.). Dans le cas d'une méthode bioanalytique, le choix s'arrête souvent sur la droite. L'équation de la droite d'étalonnage (= droite de calibration) est déterminée à l'aide de la méthode des moindres carrés.

La linéarité d'une procédure d'analyse représente sa capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage, d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans l'échantillon.

4) Rendement d'extraction absolu

Le rendement d'extraction absolu est égal au rapport entre le signal obtenu après extraction et analyse d'une matrice chargée avec une quantité connue d'analyte

et celui obtenu suite à l'injection d'une solution de référence contenant une concentration équivalente d'analyte. Ce critère intervient directement dans l'évaluation du seuil de quantification de la méthode. Le rendement doit aussi permettre une quantification reproductible aux concentrations représentant l'intervalle de dosage.

5) Fidélité

La fidélité (écart type, *precision*) exprime le degré de dispersion entre les résultats obtenus suite à plusieurs mesures effectuées sur un même échantillon, dans des conditions définies. Celle-ci représente en fait le degré de reproductibilité entre les résultats obtenus lors d'essais indépendants et elle met en évidence les erreurs aléatoires. La fidélité peut être évaluée à trois niveaux: la répétabilité (variations intra-jour), la fidélité intermédiaire (variations inter-jour) et la reproductibilité (variations d'un laboratoire à l'autre). Elle décrit la distribution des erreurs aléatoires et est indépendante de la "valeur vraie" (μ) ou d'une valeur de référence acceptée.

6) Justesse

On parle de justesse (biais, *trueness*) lorsqu'on observe peu d'écart entre la valeur moyenne obtenue d'une série de résultats d'essais et une "vraie valeur" (μ) ou une valeur de référence acceptée. Ce paramètre reflète les erreurs systématiques.

7) Exactitude – profil d'exactitude

L'exactitude représente l'erreur totale, c'est-à-dire la somme des erreurs systématiques et aléatoires. Il s'agit, en d'autres termes, du niveau de similitude entre le résultat obtenu suite à la mesure d'un échantillon réel (résultat d'essai) et la valeur de référence acceptée. L'exactitude de la méthode analytique peut être représentée par le profil d'exactitude, un outil permettant de prendre en compte

l'erreur totale sur tout le domaine d'analyse (Hubert *et al.*, 2006A). Plus précisément, le profil d'exactitude intègre, de façon statistiquement correcte et dans un seul graphique, l'ensemble des paramètres déterminés au cours de la validation : le biais, la fidélité, le risque et les limites de quantification (Figure 10).

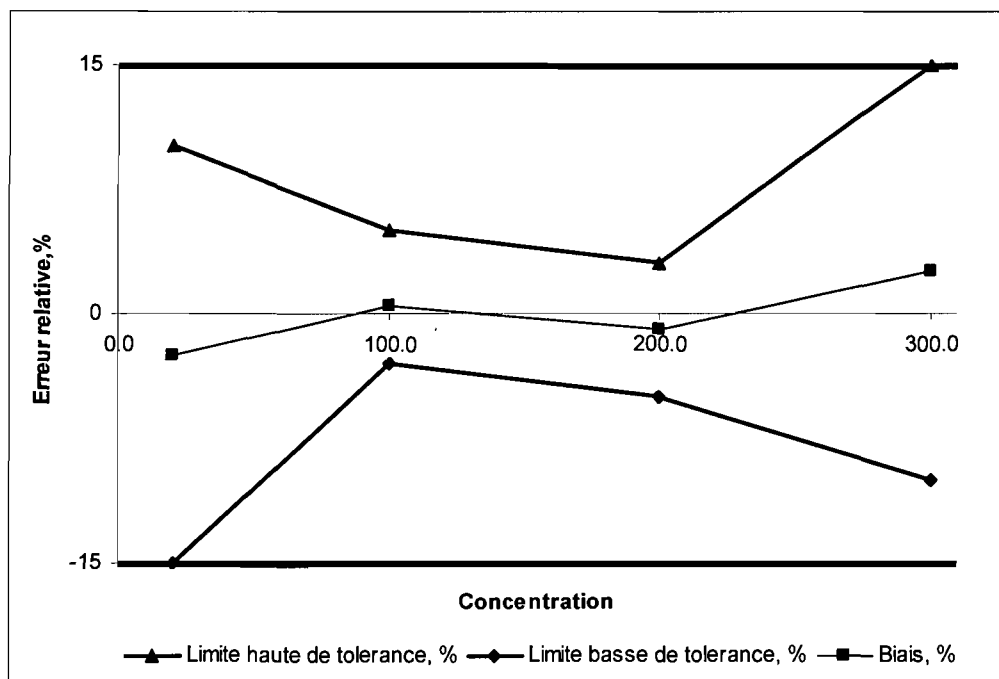


Figure 10 : Illustration du profil d'exactitude.

Le profil d'exactitude permet d'évaluer si une procédure analytique est en mesure de fournir des résultats qui seront inclus à l'intérieur de limites de tolérance acceptables ($\pm 15\%$ en bioanalyse). Le profil d'exactitude s'obtient en calculant l'intervalle de tolérance β (*β expectation tolerance interval*) (Mee, 1984). Ce dernier permet d'évaluer la proportion attendue de mesures qui se situeront dans les limites d'acceptation de la méthode de bioanalyse. L'intervalle de tolérance, quant à lui, est calculé avec les standards de validation pour chaque niveau de concentration envisagé. En se basant sur le profil d'exactitude, l'analyste peut estimer la proportion de mesures qui seront comprises dans les limites d'acceptation de la méthode d'analyse. Pour ce

faire, il doit d'abord déterminer un risque d'erreur, qu'il établit le plus souvent à 5%. Dans de telles conditions, il peut estimer que, 95 fois sur 100, les mesures obtenues seront comprises dans les limites d'acceptation de la méthode, avec un risque d'erreur de 5%. Ainsi, cet outil permet de contrôler le risque associé à l'utilisation de la méthode analytique développée, à la condition que le plan de validation intègre les principales sources de variation d'une série de mesures à l'autre.

8) Stabilité des médicaments dans la matrice biologique

La stabilité de la substance à analyser doit être testée pendant la phase de développement de la méthode analytique et confirmée, au terme de la validation de la procédure de dosage, puisqu'elle conditionne la validité des autres critères de validation. Le critère d'acceptabilité pour les essais de stabilité est $\pm 15\%$.

3.2.3.3. Protocole de validation

Un protocole de validation détaillé doit être rédigé avant de procéder à la validation. Il doit contenir le mode opératoire standardisé de la procédure d'analyse telle qu'elle sera utilisée en routine ainsi que la description des étapes à franchir pour effectuer la vérification. Ces dernières doivent intégrer les principales sources de variation d'une série de mesures à l'autre (Hubert *et al.*, 2006). La vérification des performances de la procédure analytique (*i.e.* la validation) se fait à l'aide :

- d'un protocole expérimental de validation décrivant la simulation du dosage en routine à l'aide des standards de validation (Tableau 1);
- des critères de validation et de leurs limites d'acceptation.

| Standard | Niveau de concentration | Protocole V5 |
|---|-------------------------|--------------|
| Standards d'étalonnage dans la matrice | Bas | 2 |
| | Médian | 2 |
| | Haut | 2 |
| Standards de validation dans la matrice | Bas | 3 |
| | Médian | 3 |
| | Haut | 3 |
| Nombre minimum séries (jours) | | 3 |

Tableau 1 : Exemple de protocole expérimental de validation d'une procédure de dosage d'une substance chimique dans une matrice complexe (adapté de Hubert et al.).

La simulation du dosage de routine s'effectue selon un protocole expérimental choisi en fonction des contraintes et des spécificités liées à la procédure de dosage. Ces dernières doivent avoir été préalablement déterminées pendant l'optimisation de la procédure de dosage.

3.2.3.4. Stabilité en bioanalyse

L'instabilité de l'analyte, dans l'échantillon, est le facteur de variabilité le plus important de la phase pré-analytique. La majorité des erreurs d'analyse (*i.e.* 61,9%) survient d'ailleurs lors de cette phase, qui englobe les étapes de prélèvements, de transport et d'entreposage des échantillons jusqu'à l'analyse (Plebani et Carraro, 1997; Witte *et al.*, 1997). Il est également possible d'observer de l'instabilité lors de la phase analytique, tel que durant la préparation des échantillons en vue de l'analyse instrumentale ou même lors de l'attente des résultats de l'analyse.

La prise en compte de l'instabilité est primordiale si l'on veut faire une bonne interprétation des résultats. Il est en effet possible de sous-estimer la concentration d'un médicament dans un échantillon si une part de celui-ci a été dégradée ou

reconvertie. À l'inverse, il y a des risques de surestimer cette concentration s'il y a des interférences entre le médicament en solution et les constituants de matrices complexes qui peuvent aussi se dégrader (Clauwaert *et al.*, 2001; Peters, 2007). Ainsi, l'analyste ou le biologiste doit d'abord déterminer quelles sont les conditions dans lesquelles les substances à analyser peuvent se retrouver. Il doit ensuite estimer la stabilité de ces substances dans toutes ces conditions. Enfin, s'il observe de l'instabilité dans certaines conditions, il doit tenter d'optimiser les conditions défavorables et/ou modifier sa méthode analytique pour permettre le dosage de la substance instable.

La littérature rapporte plusieurs cas où des substances ont démontré de l'instabilité dans différentes matrices et conditions d'analyse, particulièrement dans le cas des médicaments d'abus, des substances toxiques ou des médicaments de monitoring thérapeutique (Levin *et al.*, 1990, Holmgren *et al.*, 2004, Peters *et al.*, 2007, Kratzsch *et al.*, 2004, Baranda *et al.*, 2006). On a donc démontré, jusqu'à maintenant, plus d'intérêt pour l'analyse des substances toxiques ou des médicaments dont la posologie doit être adaptée. De plus, ces informations concernant les bioanalyses sont souvent données ou résumées pour un champ d'application particulier ce qui en complique la recherche. Par exemple, il est parfois difficile de trouver l'information relative à la stabilité de métabolites mineurs, peu ou pas actifs, qui ne représentent pas d'intérêt thérapeutique et/ou toxicologique. Dans ce cas il faut procéder par essais et erreurs, à l'aide de tests de stabilité.

Parfois, également, l'information sur la stabilité d'un médicament est contradictoire. Par exemple, la littérature mentionne que l'olanzapine, un neuroleptique atypique, est très instable à la température ambiante. En effet, dans ces conditions, ce médicament se dégrade à raison de 60 à 100% en seulement 14 jours (Heller *et al.*, 2004). Une dégradation modérée (13%) se produit, quant à elle, lorsque l'olanzapine est entreposée à -20°C (Zhou *et al.*, 2004). Cependant, selon les autres

sources, l'instabilité de l'olanzapine n'a été observée ni à -20°C, ni suite à plusieurs cycles de congélation-décongélation (Dusci *et al.*, 2002; Bogusz *et al.*, 1999). De plus, la comparaison des résultats rapportés dans la littérature est parfois difficile à interpréter dû aux différences méthodologiques d'une publication à l'autre. Il est donc souhaitable d'effectuer nos propres tests de stabilité, même quand l'information recherchée est disponible.

La connaissance des particularités de la structure chimique d'une molécule étudiée (*i.e.* présence de groupements labiles, de structures instables, d'énantiomères) est essentielle pour pouvoir estimer la réactivité de cette molécule dans différentes conditions. Le plus simple est de s'appuyer sur les groupements labiles, qui sont facilement oxydables et réductibles, ou sur les groupements hydrolysables (tel que, par exemple, l'ester dans la molécule de cocaïne). L'instabilité peut être observée dans des conditions semblables pour une classe de médicaments ayant une structure générale commune. Ainsi, par exemple, les anticalciques du groupe de la dihydropyridine sont sensibles à la lumière. De plus, certains d'entre eux (nifédipine, nisoldipine) se décomposent dans l'eau (79%), dans le méthanol ou dans le plasma (62%). Cependant, la décomposition de ces deux médicaments est beaucoup moins prononcée dans le sang total, soit seulement 11% (Baranda *et al.*, 2006). L'instabilité potentielle devient moins facile à prédire lorsque les phénomènes stériques entrent en jeu. Le méthylphénidate, un psychotrope de la classe des phényléthylamines, est instable dans le plasma à la température ambiante. Cette instabilité est due à l'(+)-énantiomère, dont la dégradation est probablement attribuable à des interactions entre cet énantiomère et des protéines et/ou des enzymes des cellules sanguines (Ramos *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1999).

La stabilité de la substance à analyser doit être testée pendant la phase de développement et confirmée au terme de la validation de la procédure de dosage étant

donné qu'elle conditionne la validité des autres critères (Hubert *et al.*, 2003). Selon les directives réglementaires générales, le contrôle de la stabilité de l'analyte s'effectue en fonction de l'intervalle de dosage, à deux ou trois niveaux de concentrations représentatives de cet intervalle.

La stabilité de la substance à analyser doit être évaluée dans tous les types de solutions utilisés, notamment dans les solutions-mères, la matrice et le liquide de reconstitution. La stabilité du standard interne doit aussi être estimée.

Il est important de s'assurer, avant tout, que l'analyte soit bien soluble dans les solvants que l'on souhaite utiliser afin de distinguer un problème de solubilité d'un problème d'instabilité. Il est souvent utile d'évaluer si la réinjection des échantillons est possible, au cas où des problèmes instrumentaux survientraient, tel que des pannes d'électricité. La possibilité de réinjection témoigne de la stabilité des analytes, au moment de l'injection et par la suite, dans un contenant non-hermétique. S'il y a instabilité dans un tel cas, celle-ci peut être attribuable au contact de l'air, à l'évaporation ou à la contamination.

Malgré la tendance générale à uniformiser certains documents réglementaires, l'application, l'acceptabilité et l'interprétation des normes de stabilité restent à ce jour propres à chaque laboratoire (Hubert *et al.*, 2003; Peters, 2007). Il n'existe pas de protocole unique dû à l'hétérogénéité des manipulations avec l'échantillon avant et pendant l'analyse. Cependant, les études de stabilité essentielles (*i.e.* dans la matrice, lors de plusieurs cycles de congélation/décongélation, stabilité à long terme, sur la paillasse et avant injection) sont couramment pratiquées dans les laboratoires de bioanalyse. Ainsi, le protocole expérimental des études de stabilité, doit être établi en fonction des conditions dans lesquelles les substances à analyser pourront se retrouver dans le cadre d'une étude concrète.

II. PARTIE PRATIQUE

1. Objectifs du travail

Les objectifs du présent travail consistaient à mettre au point et à valider des méthodes de dosage :

- 1) de la fexofénadine, un substrat des transporteurs membranaires, dans deux liquides biologiques, soit le plasma et les urines;
- 2) du midazolam, un substrat des CYP3As, dans le plasma et des métabolites du midazolam dans les urines.

Ces méthodes développées devaient permettre de quantifier ces substrats marqueurs dans les échantillons obtenus de volontaires sains dans le cadre d'une étude future portant sur les interactions médicamenteuses entre le midazolam, la fexofénadine et la clarithromycine.

2. Matériel

Lors de la présente étude, un système de chromatographie liquide de modèle FinniganTM Spectra SYSTEM (Thermo Electron Corporation, USA) a été utilisé. Celui-ci inclut un dégazeur (SCM 1000), une pompe à gradient quaternaire (P 4000) et un auto-injecteur (AS 3000). Ce type de système comprend également un détecteur UV (UV 6000 LP) et un détecteur de fluorescence (FL 3000), également couplés au système de chromatographie. Le contrôle et l'acquisition des données obtenues avec ce système de chromatographie ont été faits à l'aide d'un contrôleur (SN 4000) et du logiciel Chrom QuestTM 4.2.

Les solvants utilisés pour la chromatographie furent l'acétonitrile (JT Baker, USA) et le méthanol (Fischer, USA), de niveau de pureté HPLC. Le chlorhydrate de

fexofénadine (fexofénadine (HCl)), le chlorhydrate de diphenhydramine (diphenhydramine (HCl)), le midazolam, le 4-OH-midazolam, le 1-OH-midazolam, le diazépam, la β -glucuronidase (Type H-5, *Helix pomatia*) ainsi que l'éther diéthylique anhydre (pureté $\geq 99,7\%$) provenaient de Sigma-Aldrich (USA). Le plasma humain, anticoagulé par EDTA, provenait de Bioreclamation Inc.

3. Méthodes de dosage de la fexofénadine

3.1. Sélection

3.1.1. Caractéristiques physico-chimiques

Les caractéristiques propres à la fexofénadine et au standard interne (SI) choisi, le diphenhydramine, sont mentionnées au tableau 2 : nom et structure chimique des composés, formule brute, masse moléculaire, point isoélectrique, coefficient de partage et solubilité.

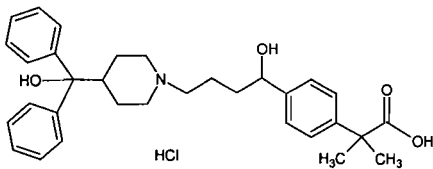
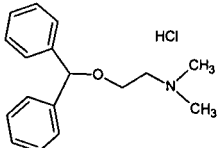
| | |
|--|--|
| <p>Fexofénadine·HCl, C₃₂H₃₉NO₄·HCl</p>  | <p>2-[4-[1-hydroxy-4-[4-(hydroxy-diphenyl-methyl)-piperidyl]butyl]phenyl]-2-methyl-propanoic acid</p> <p>Masse molaire 538,12 g/mole</p> <p>pKa 4,25; pKa 9,53</p> <p>LogP 2,6-2,0</p> <p>Faiblement soluble dans l'eau Librement soluble dans le méthanol</p> |
| <p>Diphenhydramine HCl, C₁₇H₂₁NO·HCl</p>  | <p>2-diphenylmethoxy-N,N-dimethylethylamine hydrochloride, N-(2-diphenylmethoxyethyl)-N,N-dimethylamine hydrochloride</p> <p>Masse molaire 291,82 g/mole</p> <p>pKa 8,98</p> <p>logP 3,27</p> <p>Librement soluble dans l'eau et l'alcool</p> |

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques du chlorhydrate de fexofénadine, et de son standard interne (SI), le chlorhydrate de diphenhydramine.

3.1.2. Techniques de dosage

L'objectif était de quantifier la fexofénadine après l'administration par voie orale d'une dose de 120 mg. La C_{max} attendue de la fexofénadine, après administration d'une telle dose, est d'environ 350 ng/mL (Chen, 2006). La quantité de fexofénadine excrétée dans l'urine 48 heures après une dose de 120 mg est d'environ 11 mg (Yasui-Furukori *et al.*, 2005, Russel *et al.*, 1998, Shimisu *et al.*, 2006). L'administration concomitante d'un inhibiteur de la P-gp et des CYP3As élève de 2 à 3 fois la C_{max} de même que la quantité excrétée de la fexofénadine (Shimisu *et al.*, 2006). Ainsi, la méthode de dosage de la fexofénadine utilisée dans le cadre de cette étude devait permettre sa quantification pour des concentrations allant aux environs de 5 à 1 200 ng/mL dans le plasma et de 10 à 20 µg/mL dans l'urine.

Plusieurs techniques de dosage de la fexofénadine, dans différentes matrices, sont décrites dans la littérature. Ces dernières sont rapportées dans le tableau 3. Il s'agit de méthodes séparatives par chromatographie liquide (HPLC ou LC) couplées à la détection par ultraviolet (HPLC-UV), à la détection par fluorescence (HPLC-fluorescence) et à la détection par spectrométrie de masse (LC-MS, LC-MS/MS).

| Technique | Matrice | Limite de quantification | Référence |
|-------------------|---------------|--------------------------|--|
| HPLC-UV | plasma, urine | 1-25 ng/mL | Coutant <i>et al.</i> , 1991; Chan <i>et al.</i> , 1991; Surapaneni <i>et al.</i> , 1994; Ramenskaya <i>et al.</i> , 2006; Miura <i>et al.</i> , 2007; Breier <i>et al.</i> , 2008 |
| HPLC-Fluo | plasma, urine | 1-10 ng/mL | Robbins <i>et al.</i> , 1998; Uno <i>et al.</i> , 2004; Nosawa <i>et al.</i> , 2003; Pathak <i>et al.</i> , 2008; Yasui-Furukori <i>et al.</i> , 2005; Dresser <i>et al.</i> , 2005; Russel <i>et al.</i> , 1998; Shimisu <i>et al.</i> , 2006; Hamman <i>et al.</i> , 2001; Shon <i>et al.</i> , 2005 |
| LC-MS LC-MS/MS | plasma | 0,17 -1 ng/mL | Radhakrishna <i>et al.</i> , 2002; Fu <i>et al.</i> , 2004; Nirogi <i>et al.</i> , 2006; Yamane <i>et al.</i> , 2007; Tannegren <i>et al.</i> , 2003 |

Tableau 3: Techniques de dosage de la fexofénadine dans les matrices biologiques.

La plupart des méthodes rapportées utilisent la détection par fluorescence. La sensibilité, en fluorescence, est souvent entre 100 et 1 000 fois supérieure à celle que l'on obtient en absorption UV/Visible (Ruessac, 2002). La fluorescence est plus sélective que la spectroscopie UV, car peu de composés présentent les mêmes spectres d'excitation et d'émission. L'analyse par spectrométrie de masse permet une meilleure sensibilité et spécificité, mais demande cependant un appareillage coûteux et souvent inaccessible. Ainsi, la détection par fluorescence est moins sensible aux interférences pouvant affecter les mesures et permet d'obtenir une sensibilité suffisante pour doser la fexofénadine dans le cadre de l'étude (limite de quantification est de 1 à 5 ng/mL).

Pour isoler la fexofénadine des matrices biologiques, la technique d'extraction sur phase solide est la plus utilisée. Celle-ci est décrite dans le Tableau 4.

| Technique | Matrice | Rendement | Référence |
|--------------------------------|------------------|---|---|
| SPE | plasma, urine | 78-88% 73-77% (C18, Bond Elute) 58-92% (C18, OASIS HLB) | Coutant <i>et al.</i> , 1991; Robbins <i>et al.</i> , 1998; Uno <i>et al.</i> , 2004; Nirogi <i>et al.</i> , 2006; Miura <i>et al.</i> , 2007; Dresser <i>et al.</i> , 2005; Yasui-Furukori <i>et al.</i> , 2005; Yamane <i>et al.</i> , 2007; Russel <i>et al.</i> , 1998; Tannegren <i>et al.</i> , 2003; Shimisu <i>et al.</i> , 2006; Hamman <i>et al.</i> , 2001 |
| LLE | plasma, urine | 81-93% | Chan <i>et al.</i> , 1991; Surapaneni <i>et al.</i> , 1994; Shon <i>et al.</i> , 2005 |
| Précipitation des protéines | plasma | 84 % | Pathak <i>et al.</i> , 2008 |

Tableau 4 : Techniques d'extraction de la fexofénadine des matrices biologiques.

Le rendement d'extraction de la fexofénadine des matrices biologiques est cependant variable. Selon le type de cartouches et la procédure choisie, celui-ci peut en effet s'étendre de 58 à 92 %.

3.2. Mise au point des méthodes de dosage de la fexofénadine

Le développement d'une méthode de dosage consiste en la mise au point de la détection, de la séparation chromatographique et de la préparation de l'échantillon à doser.

Deux méthodes de dosage de la fexofénadine ont été développées, soit une dans le plasma et une autre dans l'urine, et ce, afin de permettre des quantifications adéquates après l'administration d'une dose orale de 120 mg. Les étapes expérimentales permettant d'obtenir la séparation chromatographique, pour ces deux méthodes, sont décrites dans la section 3.2.2. Pour ce qui est des principales différences à prendre en compte, au niveau des méthodes d'extraction pour les deux matrices biologiques, elles sont présentées dans la section 3.2.3.

3.2.1. Préparation des solutions

Le fexofénadine (HCl) et le diphenhydramine (HCl) ont été dissous dans des mélanges constitués de méthanol et d'eau, dans les proportions respectives de 50/50 et 60/40 (v/v). Dans les deux cas, la concentration de la solution-mère était de 1 mg/mL. Des dilutions successives ont été réalisées, à partir de la solution-mère de fexofénadine, en vue d'obtenir des solutions-filles aux concentrations suivantes : 500, 200, 100, 10, 1 et 0,1 µg/mL. Toutes les solutions ont été conservées à -20°C.

3.2.2. Détection et conditions de la séparation chromatographique

La séparation chromatographique de la fexofénadine et du diphenhydramine (SI) a été réalisée en phase inverse, sur une colonne YMCTM ODS-AQ C18 (4,6 ×150 mm *i.d.*, YMC Waters). Pour ce faire, la phase mobile utilisée était constituée d'un tampon phosphate de sodium 10 mM de pH 3 et d'acétonitrile. L'élution a été effectuée à un débit de 0,4 mL/min. La détection a pour sa part été effectuée par fluorescence. Le meilleur couple de longueurs d'ondes excitation/émission trouvé pour la fexofénadine fut 220 et 282 nm, respectivement. L'élution des constituants d'échantillons urinaires extraits a été réalisée en mode isocratique. Le système d'élution était constitué de tampon phosphate et d'acétonitrile, dans les proportions 55/45 (v/v). Les temps de retentions de la fexofénadine et de son SI étaient de 11,8 et 8,3 min, respectivement (Figure 11). La résolution et la forme des pics des deux substances étaient parfaites.

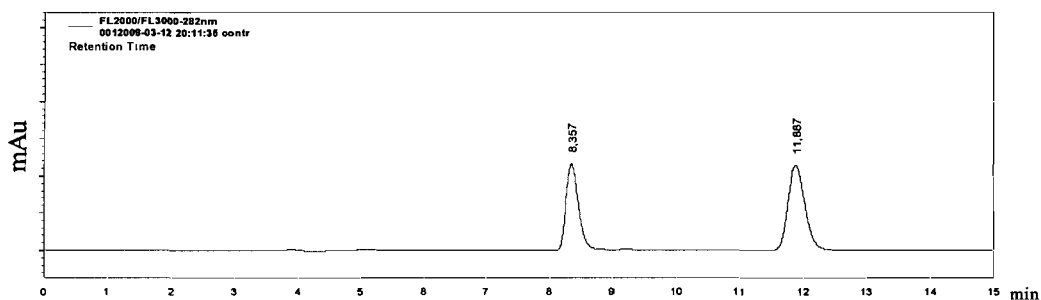


Figure 11 : Chromatogramme représentatif indiquant les temps de rétention de la fexofénadine et du diphenhydramine, lors d'une élution en mode isocratique.

Ces conditions chromatographiques ont permis de séparer autant les pics des constituants hydrophiles de la matrice, sortant au début de la colonne, que ceux des constituants à analyser.

Lors de la séparation des échantillons plasmatiques, un gradient croissant de solvants organiques a été utilisé afin de nettoyer la colonne entre les injections et d'assurer la reproductibilité des paramètres chromatographiques. La procédure de séparation des échantillons a été effectuée comme suit :

- 0-8 min : 64% de tampon phosphate /36% d'acétonitrile, (v/v)
- 8,1-15 min : 50% de tampon phosphate /50% d'acétonitrile, (v/v)
- 15,1-25 min : 64% de tampon phosphate /36% d'acétonitrile, (v/v)

Les constituants plasmatiques étant moins hydrophiles que la fexofénadine, ils ont été élués entre 14 et 20 minutes grâce à l'augmentation de la proportion d'acétonitrile dans la phase mobile, entre les minutes 8,1 et 15 de l'analyse. Enfin, les conditions d'élution initiales ont été restaurées par la ré-équilibrage de la colonne à l'aide des solutions initiales, entre les minutes 15,1 et 25 (Figure 12).

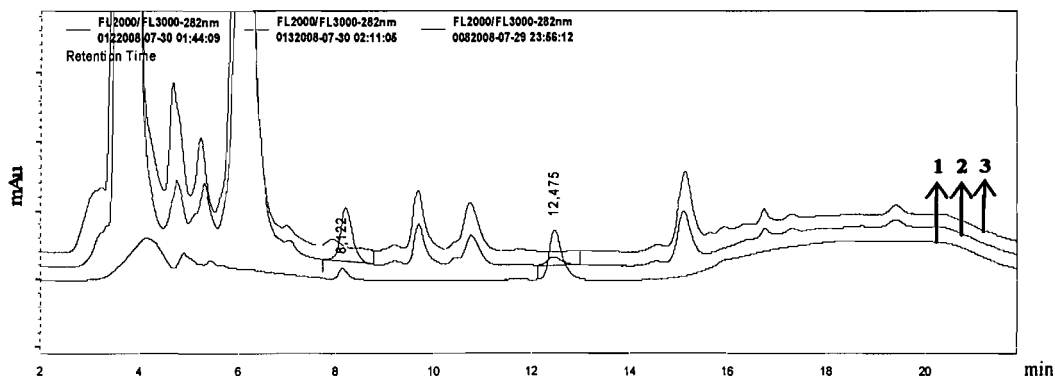


Figure 12 : Chromatogramme représentatif des échantillons élués en mode gradient (solution-test de la fexofénadine ($t_r = 8$ min) et du SI ($t_r = 12,5$ min) (1), échantillon plasmatique (2) et blanc (3) après précipitation des protéines).

Les temps de rétention de la fexofénadine et de son SI, élués en mode gradient, étaient, respectivement, de 12 et 8 minutes.

En cours de procédure, une contamination inter-échantillons du système d'injection par la fexofénadine (effet mémoire) a été remarquée. Ce problème a été résolu par l'utilisation d'une solution de rinçage constituée d'eau et d'acétonitrile (1 :1) et contenant de l'acide phosphorique (0,1%).

3.2.3. Traitement des échantillons

Plusieurs techniques d'extraction ont été testées pour extraire la fexofénadine des échantillons plasmatiques et urinaires. L'extraction en phase solide est la technique la plus utilisée dans le cas de la fexofénadine (Tableau 4). Une des techniques d'extraction en phase solide a été choisie pour extraire la fexofénadine des échantillons urinaires (Dresser *et al.*, 2005). Cependant, cette même technique n'a pas donné des résultats très reproductibles en présence des échantillons plasmatiques.

L'extraction liquide-liquide de la fexofénadine est moins utilisée que celle en phase solide. Plusieurs solvants et tampons de différents pH ont été testés afin d'atteindre des niveaux de quantification et de sélectivité satisfaisants. Cependant, cet objectif n'a pu être atteint.

Une technique de purification des échantillons plasmatiques utilisant la précipitation des protéines a été récemment rapportée dans la littérature (Pathak *et al.*, 2008). Cette méthode a été testée et validée avec succès lors la présente étude, mais avec des changements mineurs comparativement à celle qui est décrite dans la littérature.

3.2.3.1. Extraction sur support solide

L'hydrolyse enzymatique par la β -glucuronidase peut être requise avant le dosage des médicaments dans l'urine. Cette étape permet de libérer le médicament (ou ses métabolites) lorsqu'il est conjugué avec l'acide glucuronique, et donc de doser la concentration totale du médicament : conjugué et libre. L'hydrolyse enzymatique permet également de diminuer la variabilité interindividuelle liée à la glucuronoconjugaison. Le pH permettant une déglucuronidation optimale varie de 5 à 6,8. Le pH 5 est optimal pour la β -glucuronidase provenant de *Helix pomatia*.

Avant l'extraction, les échantillons urinaires (150 μ L) ont été incubés dans une solution de β -glucuronidase (1 mL, 1 000 unités/mL dans un tampon acétate à 0,1 M, pH 5) à 37°C, pendant 17 heures. Les échantillons hydrolysés ont ensuite été mélangés avec 40 μ L de solution de SI à 10 μ g/mL. Le mélange a par la suite été transféré sur une cartouche C18 Sep-Pak®Vak (Waters, USA), préalablement conditionnée avec 1 mL de méthanol, 1 mL d'eau purifiée, puis avec 1 mL d'acide phosphorique à 1%. Après le chargement, la phase stationnaire a été rincée deux fois avec 1 mL de solution aqueuse à pH acide contenant 10% de méthanol (eau / méthanol / acide acétique glacial 88/10/2

(v/v/v)) et avec 1 mL de solution à pH basique (eau / méthanol / ammonium hydroxyde concentré 88/10/2 (v/v/v)). Les analytes ont ensuite été élués avec 1 mL de méthanol contenant de la triéthanolamine à 0,2%. Afin de préparer l'échantillon pour l'injection HPLC, l'éluat recueilli a été séché sous courant d'azote à 40°C, puis reconstitué dans 300 µL de phase mobile. Enfin, *un aliquot* de 10 µL de l'échantillon ainsi préparé a été injectée.

3.2.3.2. Précipitation des protéines

La purification des échantillons plasmatiques a été effectuée à l'aide d'une procédure de précipitation des protéines par un solvant organique et un acide fort. L'acétonitrile contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique a été utilisée comme réactif de dénaturation et de précipitation des protéines. Pour effectuer la dénaturation/précipitation des protéines, deux millilitres de cette solution glacée ont lentement été ajoutés à chaque échantillon plasmatique (500 µL) agité à l'aide d'un agitateur à vortex. Chaque échantillon a été préalablement mélangé avec 40 µL de solution de SI à 1 µg/mL. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 5 minutes à 2 500 rpm, puis la fraction représentant les protéines précipitées a été congelée à l'aide d'un bain de glace carbonique/acétonitrile. Le surnageant a, quant à lui, été transféré dans un tube propre par décantation, évaporé à sec sous courant d'azote à 55°C, puis reconstitué dans 125 µL de phase mobile. Enfin, *un aliquot* de 40 µL de ce surnageant reconstitué a été injectée.

3.3. Validation des méthodes de dosage de la fexofénadine

La stratégie de validation appliquée pour les deux méthodes de dosage développées lors de la présente étude s'est basée sur la construction des profils d'exactitude permettant la prise en compte de l'erreur totale (biais + fidélité) sur le domaine d'analyse, comme le montrent les intervalles de tolérance. Les autres critères de validation évalués furent la sélectivité, le rendement d'extraction, la stabilité, la fonction de réponse et linéarité (cf. Partie Théorique : section 3.2.3.2).

La section 3.3.1 décrit les protocoles expérimentaux de validation pour les deux méthodes développées. Les résultats obtenus lors de la validation de ces méthodes sont discutés séparément dans les sections 3.3.2 et 3.3.3.

3.3.1. Protocoles expérimentaux de validation

Afin d'évaluer les performances des méthodes de dosage de la fexofénadine développées (cf. section 3.2), deux types d'échantillons ont été préparés : les standards d'étalonnage et les standards de validation. Tous les standards ont été préparés dans l'urine et le plasma. La fortification des matrices, pour les standards d'étalonnage et de validation, a été effectuée de façon indépendante à l'aide des solutions intermédiaires préparées à partir des solutions-filles (section 3.2.1). Les concentrations des solutions intermédiaires ont permis d'assurer un volume de fortification (*i.e.* volume de la solution non-aqueuse ajoutée à la matrice) faible et constant afin de réduire la dilution et, par conséquent, les variations dans les caractéristiques de la matrice. Le volume de fortification était égal à 2% du volume total des matrices.

Les standards d'étalonnage dans le plasma ont été préparés en duplicata, aux 10 niveaux de concentrations de la fexofénadine, pour 3 jours. Ces concentrations variaient entre 4,7 et 466 ng/mL. Pour ce qui est des standards d'étalonnage dans l'urine, ils ont

été réalisés en duplicata à 7 niveaux de concentrations de fexofénadine pour 3 jours, concentrations variant entre 0,9 et 18,6 µg/mL (Tableau 5).

| | Plasma | Urine | Nombre de répétitions par jour |
|---------------------------------------|---------------|-----------|--------------------------------|
| | Concentration | | |
| | ng/mL | µg/mL | |
| Standards d'étalonnage | 0 (blanc) | 0 (blanc) | 2 |
| | 4,7 | 0,9 | 2 |
| | 9,3 | 2,8 | 2 |
| | 46,6 | 5,6 | 2 |
| | 93,2 | 8,4 | 2 |
| | 139,8 | 11,7 | 2 |
| | 186,4 | 15,4 | 2 |
| | 233,0 | 18,6 | 2 |
| | 279,6 | - | 2 |
| | 372,8 | - | 2 |
| | 466,0 | - | 2 |
| Standards de validation | 55,9 | 3,3 | 4 |
| | 223,7 | 10,3 | 4 |
| | 419,4 | 14,9 | 4 |
| Standards de validation dilués 5 fois | 745,6 | - | 2 |
| | 1 864,0 | - | 2 |
| | 1 304,8 | - | 2 |
| Nombre de jours | | | 3 |

Tableau 5 : Protocoles expérimentaux de validation des procédures de dosage de la fexofénadine dans le plasma et l'urine.

Les standards de validation, pour leur part, ont été préparés aux 3 niveaux de concentrations de fexofénadine : 56, 224 et 419 ng/mL pour le plasma et 3,3, 10,3 et 14,9 µg/mL pour l'urine. Enfin, des standards de validation additionnels (*i.e.* 746, 1 305 et 1 864 ng/mL) ont également été préparés, afin de tester la possibilité de dilution des échantillons plasmatiques. Ces standards de validation ont été dilués 5 fois avec le plasma avant d'être extraits.

3.3.2. Validation de la méthode de dosage dans le plasma

3.3.2.1. Sélectivité

Les 5 différents lots de plasma utilisés lors de cette étude ont été analysés afin de vérifier l'absence d'interférences aux niveaux du temps de rétention de la fexofénadine et du SI. Les 5 blancs plasmatiques (échantillons qui ne contiennent pas la substance à analyser), ainsi que des standards de validation au niveau de concentration 250 ng/mL, ont été purifiés par précipitation de protéines. La sélectivité de la méthode a ensuite été vérifiée par comparaison des chromatogrammes obtenus en analysant, d'une part, les blancs, et, d'autre part, des standards de validation (Figure 13).

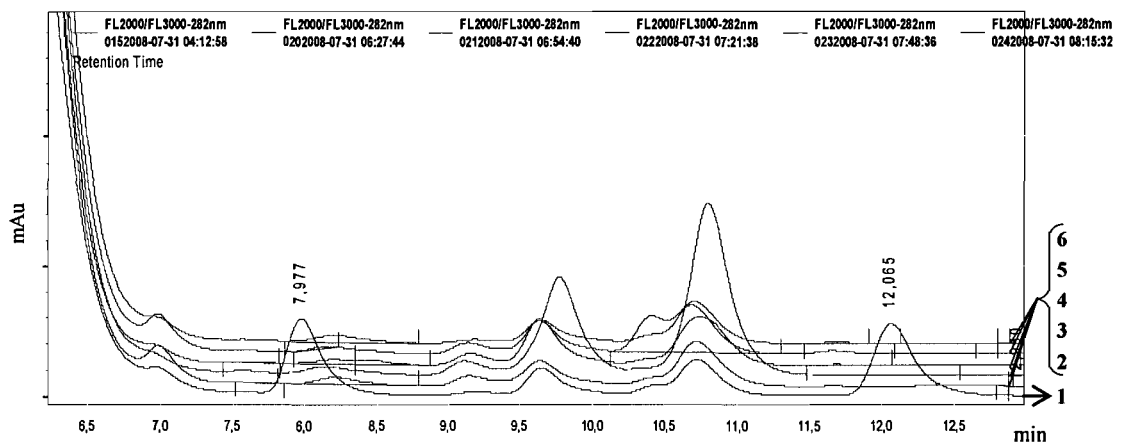


Figure 13 : Chromatogramme représentant un échantillon (1) contenant de la fexofénadine ($t_r = 7,9$ min) et du SI ($t_r = 12$ min) et les 5 blancs plasmatiques (2-6).

Les chromatogrammes obtenus avec les différents plasmas ont montré un profil similaire. Les pics d'intensité importante, provenant des constituants plasmatiques, ont été élués dans un intervalle de temps de 9 à 11,5 minutes. Aucun pic interférant n'a été observé aux temps de rétention correspondant à la fexofénadine et au SI.

3.3.2.2. Rendement

Le rendement d'extraction est le rapport entre les signaux mesurés après extraction des échantillons fortifiés avec une quantité connue de fexofénadine et ceux qui sont mesurés suite à l'injection directe, dans le système analytique, d'une solution de référence contenant une concentration équivalente de fexofénadine. Le signal obtenu avec la solution de référence est considéré comme étant de 100%.

Le rendement d'extraction a été testé aux trois niveaux de concentrations. Les échantillons fraîchement reconstitués dans la matrice ont été purifiés et analysés. Le rendement d'extraction de la fexofénadine par précipitation des protéines a été égal à $(90,8 \pm 3,9)\%$ (CV=4,3%), $(90,6 \pm 3,8)\%$ (CV=4,2%) et $(93,7 \pm 1,0)\%$ (CV=1,1%) à 60, 240 et 450 ng/mL, respectivement. On a pu constater que le rendement a été stable et supérieur à 90% pour toutes les concentrations testées.

3.3.2.3. Stabilité

Le contrôle de la stabilité de la fexofénadine a été effectué à deux niveaux de concentrations représentatifs de l'intervalle de dosage (Tableau 6). Les solutions fraîchement reconstituées dans le plasma ont d'abord été réparties en aliquotes. La stabilité a ensuite été évaluée sur trois échantillons et mesurée dans différentes conditions. La première série de tests consistait à effectuer trois cycles de congélation à -20°C /décongélation avant d'extraire et reconstituer les échantillons dans la phase mobile. Ensuite, d'autres échantillons ont été extraits et reconstitués dans la phase mobile, puis ont été laissés en attente dans l'autoinjecteur pendant 48 heures et à 10°C . La stabilité de la fexofénadine, dans ces différents échantillons, a alors été évaluée par rapport à celle observée dans les échantillons fraîchement préparés. Les concentrations de fexofénadine, dans tous les échantillons évalués, ont été calculées à l'aide d'une courbe d'étalonnage.

| | Contrôle | Congélation/ décongélation | Autoinjecteur 48 h, 10°C |
|----------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| C nominale, ng/mL | Concentration ± SD, ng/mL (CV, %) | | |
| 56 | 56 ± 1,4 (2,3) | 53 ± 0,8 (1,9) | 54 ± 0,9 (1,7) |
| 419 | 421 ± 4,0 (1,1) | 419 ± 1,7 (0,4) | 417 ± 8,5 (2,0) |

Tableau 6 : Stabilité de la fexofénadine dans le plasma.

Les résultats obtenus ont démontré que la fexofénadine est demeurée stable après trois cycles de congélation/décongélation des échantillons plasmatiques, tout comme suite à une période de 48 heures d'attente des échantillons reconstitués dans l'autoinjecteur.

3.3.2.4. Fonction de réponse et linéarité

La fonction de réponse et la linéarité de la méthode développée ont été étudiées à l'aide des standards d'étalonnage analysés pendant trois jours.

La fonction de réponse, dans un intervalle de concentrations concret, est aussi ce qu'on appelle la courbe (la droite) d'étalonnage. Cette dernière exprime la relation entre la réponse (signal du détecteur) et la concentration en analyte dans l'échantillon, à l'intérieur de l'intervalle de dosage. La courbe d'étalonnage permet de calculer, selon le signal détecté, la concentration d'un échantillon. L'intervalle de dosage de la méthode utilisée pour la présente étude allait de 4,7 à 466 ng/mL.

Le modèle de régression utilisé pour la méthode de dosage de la fexofénadine dans le plasma était linéaire avec pondération ($1/X$). La droite de régression était la suivante : $Y = AX + B$, où Y était le signal de détection de la fexofénadine normalisé selon celui du SI, X était la concentration calculée, A la pente et B , l'ordonnée à l'origine. Les paramètres des droites de régression ont été déterminés selon la méthode des moindres carrés (Tableau 7, Figure 14).

| | Pente, <i>A</i> | Ordonnée à l'origine, <i>B</i> | Coefficient de détermination, R^2 |
|--------|--------------------|-----------------------------------|--|
| Jour 1 | 0,0045 | 0,0005 | 0,9957 |
| Jour 2 | 0,0048 | - 0,0023 | 0,9998 |
| Jour 3 | 0,0047 | - 0,0036 | 0,9980 |

Tableau 7 : Paramètres des droites d'étalonnage de la fexofénadine construites avec 10 standards d'étalonnage dans le plasma.

Ainsi, la droite d'étalonnage de la méthode pouvait être décrite par l'équation moyenne suivante : $Y = 0,0047 (\pm 0,0002) X - 0,0018 (\pm 0,002)$, Y étant le ratio des aires sous les pics de fexofénadine et du SI et X , la concentration plasmatique de fexofénadine.

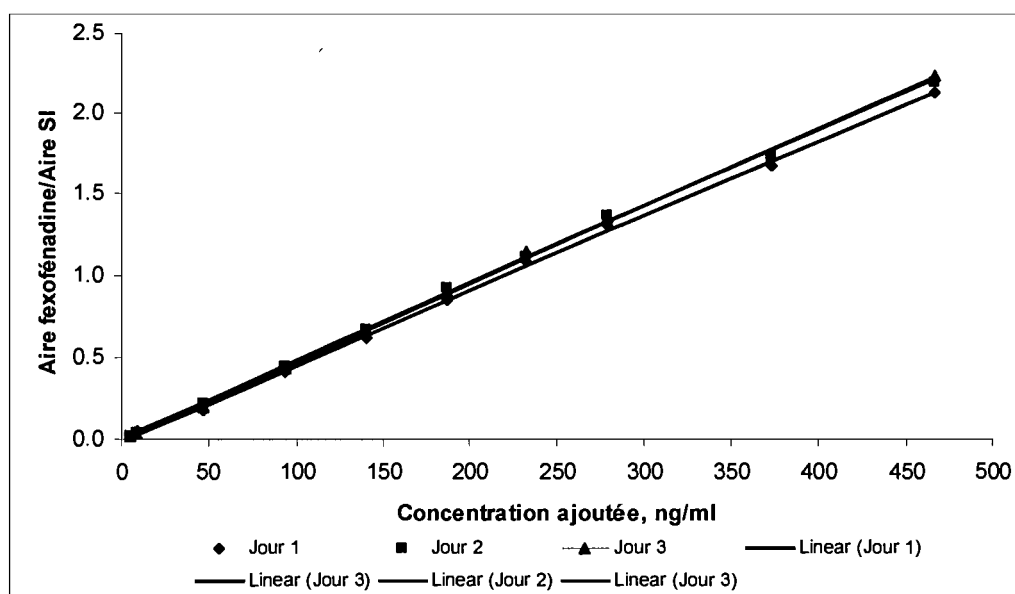


Figure 14 : Droites d'étalonnage de la méthode de dosage de la fexofénadine dans le plasma.

Le coefficient de détermination (R^2) mesure le degré d'association entre deux variables X et Y . Le R^2 moyen de la courbe de calibration était de 0,9978. La corrélation est positive et de très bonne qualité (s'approche à 1).

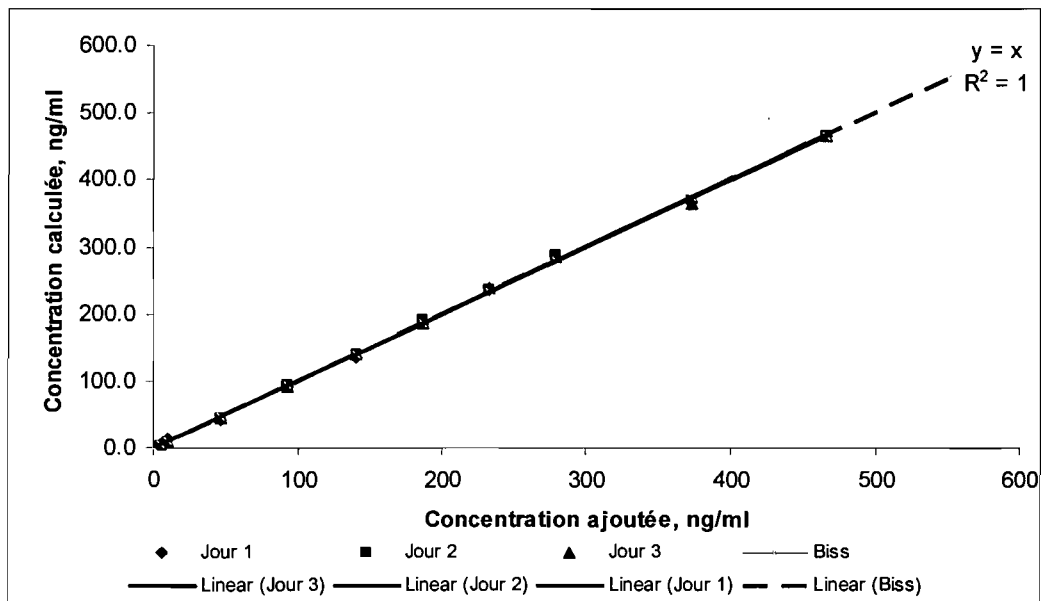


Figure 15 : *Linéarité de la méthode du dosage de la fexofénadine dans le plasma.*

La relation entre les concentrations ajoutée et calculée de la fexofénadine représentée sur la figure 15 a permis de constater que la méthode développée était linéaire.

3.3.2.5. Justesse, fidélité et exactitude

Le profil d'exactitude de la méthode développée, illustré sur la figure 16, intègre l'ensemble des éléments de la validation : le biais relatif moyen, la fidélité, les limites d'acceptation ($\pm 15\%$) et l'intervalle de tolérance.

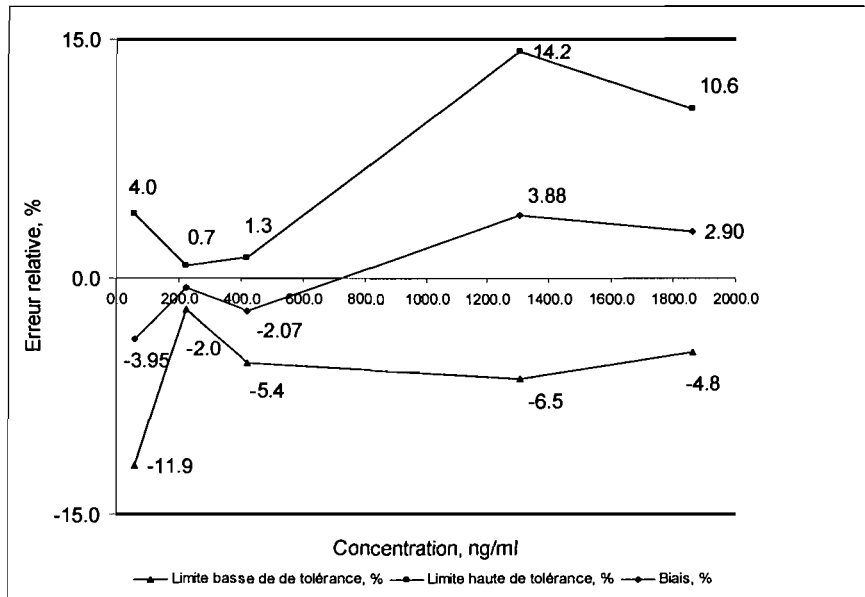


Figure 16 : Profil d'exactitude de la méthode de dosage de la fexofénadine dans le plasma.

Le tableau 8 contient les divers paramètres statistiques qui sont inclus dans la figure 16. Ceux-ci ont été calculés pour chaque niveau de concentration. Toutes les équations nécessaires pour calculer ces statistiques se trouvent dans l'Annexe II. La fidélité (relative) est exprimée par le coefficient de variation (CV), la répétabilité et la fidélité intermédiaire. Elle a été évaluée à l'aide d'une analyse de variance effectuée sur les résultats intra- et inter-jours obtenus avec le calcul selon la droite d'étalonnage des standards de validation. La fidélité intermédiaire a été évaluée selon les résultats des mesures prises entre les trois jours. Le biais relatif de la méthode représente quant à lui la différence (en %) entre la moyenne des concentrations introduites et celle des concentrations calculées selon la courbe standard. Les bornes de l'intervalle de tolérance (limite haute relative de tolérance et limite basse relative de tolérance) ont été calculées avec un risque de 5% pour chaque niveau de concentration.

| Critère de performance | Niveau 1 | Niveau 2 | Niveau 3 | Niveau 4 | Niveau 5 |
|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| C ajoutée, ng/mL | 55,9 | 223,7 | 419,4 | 1864,0 | 1 304,8 |
| LHT, %* | 4,0 | 0,7 | 1,3 | 14,2 | 10,6 |
| LBT, %** | - 11,9 | -2,0 | - 5,4 | - 6,5 | - 4,8 |
| Biais relatif, % | - 3,95 | - 0,63 | - 2,07 | 3,88 | 2,90 |
| CV, répétabilité, % | 1,62 | 0,83 | 1,44 | 0,64 | 0,34 |
| CV, fidélité intermédiaire, % | 1,58 | 0,69 | 0,00 | 2,23 | 1,69 |

*LHT, % - limite haute relative de tolérance

**LBT, % - limite basse relative de tolérance

Tableau 8 : Résultats des calculs du profil d'exactitude pour les standards de validation dans le plasma.

La gamme d'étalonnage de la méthode était comprise entre 4,7 et 1 864 ng/mL. Une gamme assez vaste a été choisie, car les taux plasmatiques observables, après une administration de la fexofénadine seule et après son administration concomitante avec un inhibiteur de la P-gp, varient considérablement.

Les bornes de l'intervalle de tolérance à 95% ont été incluses dans la limite d'acceptation, fixée à $\pm 15\%$. On a pu constater, sur la figure 16, que la zone comprise dans l'intervalle de tolérance était plus large pour les standards de validation de hautes concentrations (*i.e.* niveaux 4 et 5) dilués avant la purification. Cependant, les mesures, pour ces niveaux, ont été réalisées en duplicata. L'élargissement de l'intervalle de tolérance pourrait donc être dû à l'augmentation du nombre de degrés de liberté. Les biais relatifs, quant à eux, étaient légèrement négatifs aux concentrations des niveaux 1 à 3 de la gamme d'étalonnage (Tableau 8). On a également pu constater une tendance à surestimer les concentrations de fexofénadine, avec les standards de validation dilués (Tableau 8, niveaux 4 et 5).

La fidélité de la méthode était très bonne, puisque les coefficients de variation de répétitivité variaient entre 0,34 et 1,62% et que ceux de fidélité intermédiaire ne

dépassaient pas 2,2 %. Le CV de fidélité intermédiaire au niveau de concentration 3 était égal à 0, ce qui pourrait signifier que le degré de dispersion des résultats des mesures intra-jours était plus grand que celui des mesures inter-jour.

3.3.3. Validation de la méthode de dosage dans l'urine

3.3.3.1. Sélectivité

Afin de déterminer la sélectivité de la méthode, des standards de validation à 1 µg/mL et un blanc urinaire ont été analysés. Les chromatogrammes obtenus ont alors été comparés dans le but d'identifier d'éventuelles interférences (Figure 17).

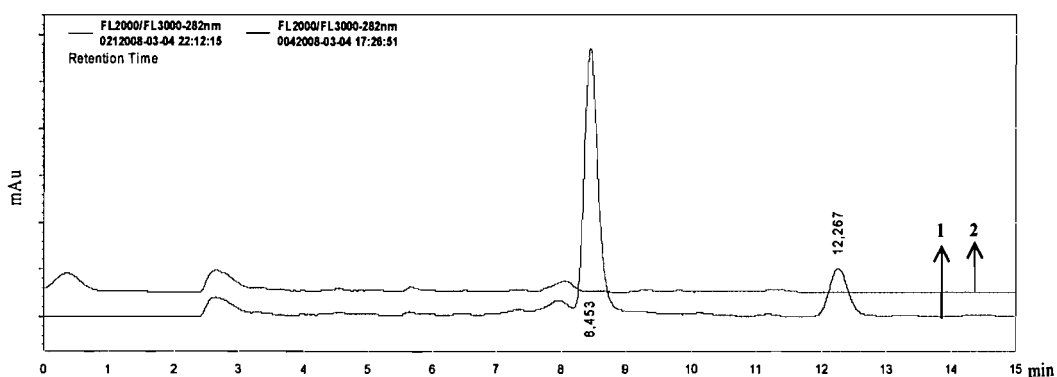


Figure 17 : Chromatogramme d'un standard de validation à 1 µg/mL dans l'urine (1) contenant de la fexofénadine ($t_r = 8,4$ min) et le SI ($t_r = 12,3$ min) et un blanc après extraction en phase solide (2).

Cependant, aucun pic interférant avec ceux de la fexofénadine et de son SI n'a été observé.

3.3.3.2. Rendement

Le rendement d'extraction des échantillons reconstitués dans l'urine en phase solide a été testé aux trois niveaux de concentrations représentatifs de l'intervalle de

dosage. Celui-ci (n=5) était de (88,1 ± 7,9)% (CV=8,9%), (91,1 ± 2,6)% (CV=2,9%) et (83,3 ± 2,2)% (CV=2,7%) à 3,3, 10,3 et 14,9 µg/mL, respectivement.

3.3.3.3. Stabilité

Le contrôle de la stabilité de la fexofénadine dans l'urine a été effectué à deux niveaux de concentrations (Tableau 9). Les mesures ont été faites en triplicate. La stabilité de la fexofénadine a été évaluée après une incubation de 17 heures en présence de la β-glucuronidase. Ensuite, une partie des échantillons a été analysée immédiatement, tandis qu'une autre ne l'a été que suite à une attente de 20 heures dans l'auto-injecteur, à 10°C.

| | Contrôle | Incubation, 17h | Incubation, 17h et auto-injecteur, 20h |
|----------------------|-----------------------------------|--------------------|---|
| C nominale, µg/mL | Concentration ± SD, ng/mL (CV, %) | | |
| 0,5 | 0,49 ± 0,16 (3,6) | 0,52 ± 0,19 (3,64) | 0,51 ± 0,19 (3,79) |
| 2,5 | 2,46 ± 0,15 (0,6) | 2,48 ± 0,58 (2,32) | 2,50 ± 0,77 (3,08) |

Tableau 9 : Stabilité de la fexofénadine dans l'urine.

Les valeurs moyennes des concentrations mesurées après les tests de stabilité ont été comprises dans les limites de ± 15% autour des valeurs des concentrations de contrôle. Ainsi, les conditions d'incubation enzymatique (température, pH, enzyme *etc.*) de même que l'attente de 20 heures dans l'auto-injecteur à 10°C n'ont pas eu d'influence significative sur la stabilité de la fexofénadine.

3.3.3.4. Fonction de réponse et linéarité

Les fonctions de réponse et la linéarité de la méthode ont été déterminées à partir des résultats obtenus avec les standards d'étalonnage, sur les trois jours. La fonction de réponse la mieux adaptée, pour une gamme de concentrations allant de 1 à 20 µg/mL, était la régression linéaire passant par 0 (Figure 18).

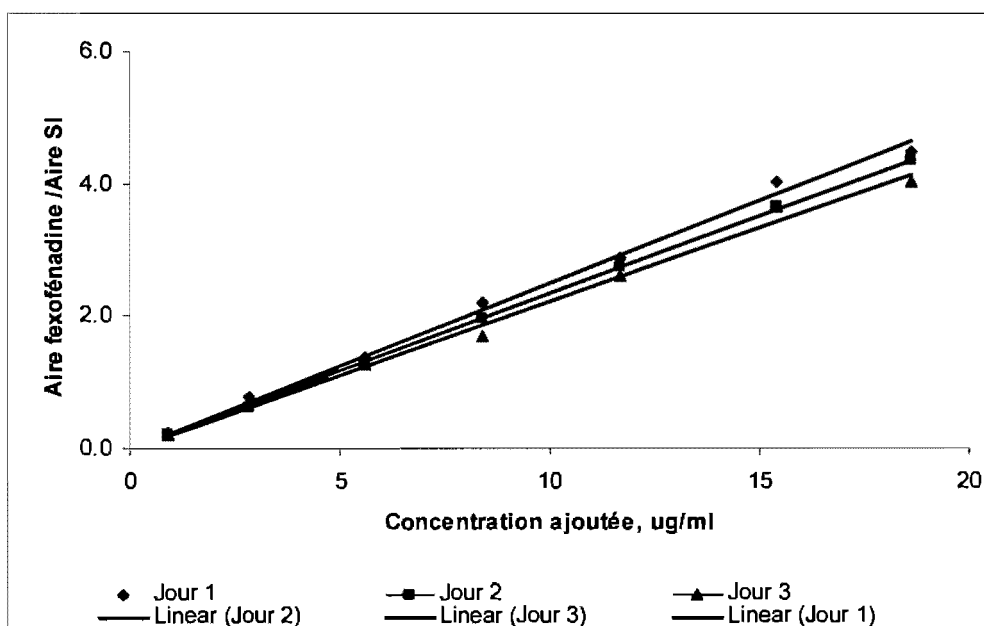


Figure 18 : Droite d'étalonnage de la méthode du dosage de la fexofénadine dans l'urine.

L'équation générale de cette droite de régression est $Y = AX$. Les paramètres des droites de régression obtenues lors de la validation de la méthode de dosage de la fexofénadine dans l'urine sont indiqués dans le tableau 10 qui suit.

| | Pente, A | Coefficient de détermination, R^2 |
|--------|------------|-------------------------------------|
| Jour 1 | 0,2579 | 0,9980 |
| Jour 2 | 0,2335 | 0,9996 |
| Jour 3 | 0,2222 | 0,9920 |

Tableau 10 : Paramètres des droites d'étalonnage de la fexofénadine construites avec 7 standards d'étalonnage dans l'urine.

L'équation moyenne de la courbe d'étalonnage était : $Y = (0,2379 \pm 0,018) X$. Une valeur de R^2 de 0,9965 (coefficient de détermination moyen) indique que 99,65% de la variabilité de Y s'explique par la variabilité de X.

La relation entre les concentrations calculées et ajoutées était linéaire. On peut voir, sur la figure 19, que les points se retrouvent, de façon générale, sur la ligne d'identité ($Y=X$).

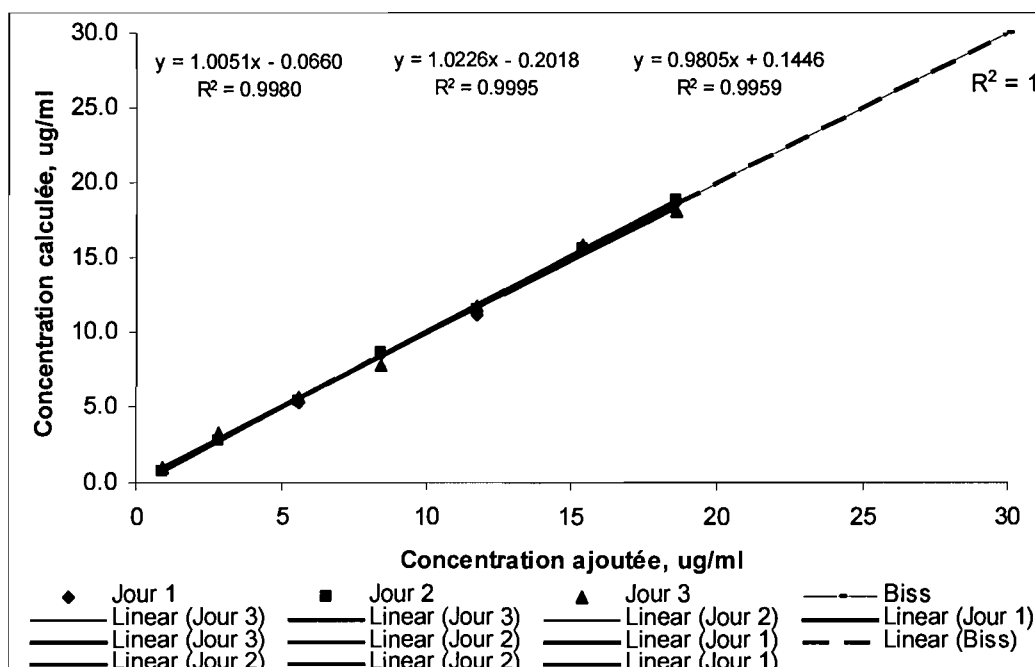


Figure 19 : Linéarité de la méthode du dosage de la fexofénadine dans l'urine.

La pente et l'ordonnée à l'origine moyennes, déterminées d'après les valeurs indiquées sur la figure 19, étaient, respectivement, de 0,9960 et 0,1375. Une légère dispersion des valeurs autour de la ligne d'identité a été observée. Elle est attribuable à l'erreur expérimentale.

3.3.3.5. Justesse, fidélité et exactitude

Le profil d'exactitude a été évalué pour trois niveaux de concentrations (3,3, 10,3 et 14,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), avec un modèle linéaire passant par zéro (Figure 20).

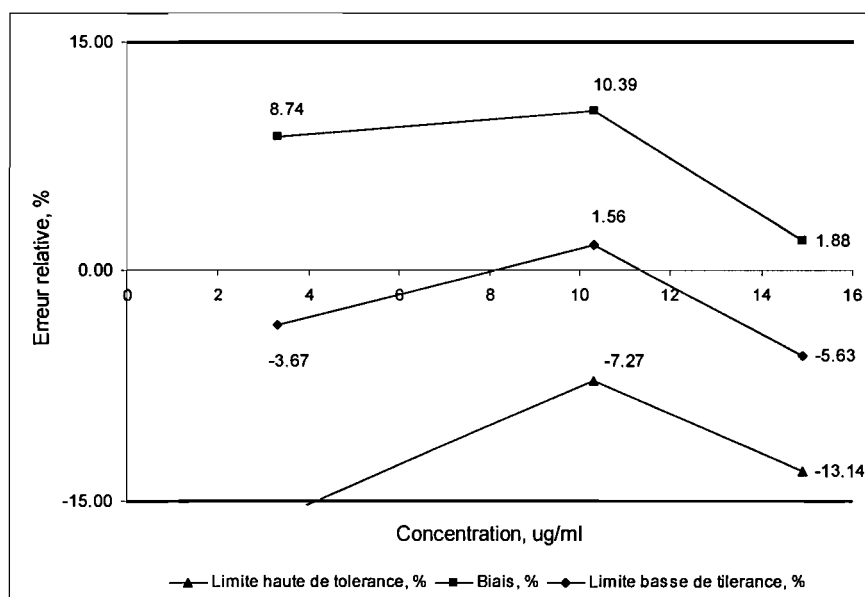


Figure 20 : Profil d'exactitude de la méthode de dosage de la fexofénadine dans l'urine.

La gamme d'étalonnage de la méthode allait de 0,9 à 18,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. L'intervalle de tolérance à 90% (risque de 10%), quant à lui, était compris dans les limites d'acceptation de $\pm 15\%$, excepté au niveau de concentration inférieur à 3,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tel qu'indiqué dans le tableau 11, la limite basse de tolérance, pour ce niveau de concentration, était de -16,8%.

| Critère de performance | Niveau 1 | Niveau 2 | Niveau 3 |
|-------------------------------|----------|----------|----------|
| C ajoutée, µg/mL | 3,3 | 10,3 | 14,9 |
| LHT, % | 8,74 | 10,39 | 1,88 |
| LBT, % | -16,80 | -7,27 | -13,14 |
| Biais relatif, % | -3,67 | 1,56 | -5,63 |
| CV, répétabilité, % | 1,99 | 3,77 | 3,24 |
| CV, fidélité intermédiaire, % | 3,82 | 1,71 | 2,87 |

Tableau 11 : Résultats des calculs du profil d'exactitude pour les standards de validation dans l'urine.

En considérant le risque de 12%, les mesures, à ce niveau de concentration, seront incluses dans l'intervalle de tolérance. En effet, dans un tel cas, la valeur de la limite basse de tolérance est 14,81%. En prenant en considération la complexité de la méthode analytique et la présence des matrices organiques, on peut considérer ces niveaux de risque comme étant acceptables. Ainsi, la proportion des mesures comprises dans les limites d'acceptation de la méthode de validation sera supérieure ou égale à 90%, pour la gamme de concentrations supérieures à 4,2 µg/mL, tel que déterminé graphiquement. Les mesures des concentrations inférieures à cette valeur seront fournies avec un risque d'erreur de 12%.

Les valeurs de la fidélité intra- et inter- journalière démontrent une bonne précision des mesures, pour tous les niveaux de concentrations. En effet, les coefficients de variation maximaux de répétitivité et de fidélité intermédiaire sont, respectivement, de 3,77 et 3,82%.

3.3.4. Conclusion

Les méthodes de dosage de la fexofénadine dans le plasma et dans l'urine ont été développées et validées à l'aide d'une nouvelle stratégie basée sur l'intervalle de tolérance d'espérance β de l'erreur totale des mesures.

Une méthode simple et sélective, pour le dosage de la fexofénadine dans le plasma, permet de travailler dans l'intervalle de concentrations compris entre 4,7 et 1 864 ng/mL. La préparation de l'échantillon, dans le cadre de cette méthode, consiste à précipiter les protéines par l'acétonitrile acidifié. Le rendement de cette procédure est supérieur à 90% et relativement constant à toutes les concentrations testées. De plus, la fexofénadine s'est montrée stable durant toute la procédure analytique. La stratégie de validation permet de garantir, avec un risque fixé à 5%, que 95% des mesures obtenues avec la méthode de quantification de la fexofénadine dans le plasma seront incluses dans la limite de tolérance. Celle-ci vaut 15%, ce qui est un choix classique pour les procédures bioanalytiques.

Une méthode de dosage de la fexofénadine dans l'urine a aussi été développée et validée. Cette dernière permet de travailler avec des échantillons dont les concentrations en fexofénadine sont comprises entre 0,9 et 18,6 µg/mL. Le rendement moyen de la procédure d'extraction en phase solide est de 87,5%. La stabilité de la fexofénadine, durant toute la procédure analytique, s'est par ailleurs montrée suffisante. Le risque d'erreur associé à l'utilisation de la méthode développée est quant à lui de 10% pour la gamme de concentrations supérieure à 4,2 µg/mL et 12% pour les concentrations inférieures.

4. Méthodes de dosage du midazolam et de ses principaux métabolites

4.1. Sélection

4.1.1. Caractéristiques physico-chimiques

Les noms, structures chimiques, formules brutes, masses molaires, pKa et coefficients de partage du midazolam, de ses métabolites (1-OH- et 4-OH-midazolam) et du diazépam (SI), sont indiqués ci-bas, au tableau 12.

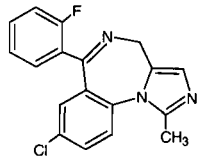
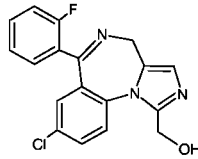
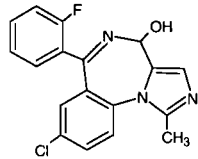
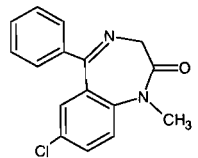
| | |
|--|--|
| <p>Midazolam, C₁₆H₁₅ClFN₃</p>  | <p>8-Chloro-6-(2-fluorophenyl)-1-methyl-4H-imidazo-[1,5-a]-[1,4]-benzodiazepine</p> <p>325,77 g/Mole</p> <p>pKa : 6,15</p> <p>logP : 3,932</p> |
| <p>1-OH-midazolam, C₁₈H₁₃ClFN₃O</p>  | <p>8-Chloro-6-(2-fluorophenyl)-4H-imidazo-[1,5-a]-[1,4]-benzodiazepine-1-methanol</p> <p>341,7 g/Mole</p> <p>pKa 1 : 4,4; pKa 2 : 13,6</p> <p>log P : 3,137</p> |
| <p>4-OH-midazolam, C₁₈H₁₃ClFN₃O</p>  | <p>8-Chloro-6-(2-fluorophenyl)-1-methyl-4H-imidazo-[1,5-a]-[1,4]-benzodiazepine-4-ol</p> <p>341,77 g/Mole</p> <p>pKa 1 : 5,05; pKa 2 : 12,69</p> <p>log P : 2,68</p> |
| <p>Diazepam, C₁₆H₁₃ClN₂O</p>  | <p>7-Chloro-1-methyl-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-2(1H)-one</p> <p>284,74 g/Mole</p> <p>pKa : 3,4-3,3</p> <p>logP : 2,80 (expérimental) logP : 3,18 (calculé)</p> |

Tableau 12 : Caractéristiques physico-chimiques du midazolam, des 1-OH et 4-OH-midazolam et du standard interne, le diazépam.

4.1.2. Techniques de dosage

Plusieurs techniques de dosage du midazolam, seul ou avec ses métabolites et dans différentes matrices, ont été décrites dans la littérature. Elles ont été utilisées, à titre d'exemple, dans le cadre de monitoring thérapeutique, d'analyses toxicologiques et d'études du métabolisme. Ces différentes techniques de dosage sont énumérées au tableau 13.

Tableau 13 : Techniques de dosage du midazolam et de ses métabolites dans les matrices biologiques.

| Technique | Analytes | Matrice | Limite de quantification | Références |
|-----------------------|--|--|--------------------------|---|
| HPLC-UV | Midazolam; 1-OH- midazolam; 4-OH- midazolam | plasma, tissus, humeur vitrée, urine, microsomes hépatiques, | 0,5-50 ng/mL | <i>Juřika et al., 2007; Yasui-Furukori et al., 2004; Jerdi et al., 2004; Ma et al., 1996; Sautou et al., 1991; Mastey et al., 1994; Uchida et al., 2006; Perloff et al., 2003; Patki et al., 2003; Ito et al., 2003; Ferslew et al., 1989; Casas et al., 1993; Chan et al., 1993; Bittner et al., 2003; Lauber et al., 1994; Puglisi et al., 1985; Zhang et al., 2007</i> |
| LC-MS LC- MS/MS | Midazolam; 1-OH- midazolam; 4-OH- midazolam | plasma, sérum, urine | 0,5-2 ng/mL | <i>Kumar et al., 2007; Shiran et al., 2003; Sano et al., 2001; Chen et al., 2006; Pecking et al., 2002; Wang et al., 2001; Kirby et al., 2006; Streetman et al., 2000; Galetin et al., 2005; Floyd et al., 2003</i> |
| GC-MS GC/ECD | Midazolam; 1-OH- midazolam; 4-OH- midazolam; 1,4-OH- midazolam | plasma, sérum, urine | 0,01-10 ng/mL | <i>Eap et al., 2003; Frison et al., 2001; Rubio et al., 1982; Arendt et al., 1984; de Kroon et al., 1989; Thummel et al., 1996; Gorski et al., 1998</i> |

Le dosage du midazolam et de ses métabolites peut être effectué à l'aide de méthodes séparatives par chromatographie liquide couplées à la spectrophotométrie d'absorption dans l'ultra-violet (HPLC-UV) ou à la spectrométrie de masse (LC-MS, LC-MS/MS). Pour ce faire, il est également possible d'utiliser des méthodes séparatives par chromatographie en phase gazeuse (GC, *gas chromatography*), couplées principalement à la spectrométrie de masse (GC-MS), ou encore des dosages immunologiques de type Emit (*enzyme multiplied immunoassay technique*) ou FPIA (*fluorescence polarization immunoassay*). La plupart de ces méthodes sont destinées au dosage du midazolam dans le sang complet, le sérum ou le plasma.

Ces méthodes présentent différents avantages et inconvénients. En ce qui concerne les avantages, l'analyse par spectrométrie de masse permet une meilleure spécificité ainsi qu'une limite de quantification plus basse, soit de l'ordre du pg/mL. De plus, les procédures de préparation des échantillons peuvent être simplifiées et le volume de l'échantillon diminué, tout comme le temps de séparation chromatographique. Le couplage de la GC avec la MS permet également une bonne sensibilité, mais demande cependant une dérivation des analytes afin de les rendre plus volatiles et stables. Contrairement au couplage GC-MS, la méthode GC couplée au détecteur à capture d'électrons (ECD, *electron capture detector*) permet de quantifier le midazolam et ses métabolites avec une bonne sensibilité, mais sans l'étape supplémentaire de la dérivation. Cependant, les outils d'analyse par le GC-MS et GC-ECD sont très coûteux et, par conséquent, souvent inaccessibles.

Plusieurs méthodes ont été développées pour la quantification du midazolam et ses métabolites par HPLC-UV. Selon la littérature, la limite de quantification de 0,5 ng/mL est atteinte par une méthode de dosage du midazolam dans le plasma humain (Yasui-Furukori *et al.*, 2004). Dans cette étude, les échantillons ont été purifiés à l'aide de deux techniques : la LLE et l'utilisation d'un système à commutation de colonne

(*column switching*). Cependant, un rendement plutôt faible (75%) a été obtenu pour les deux analytes (midazolam et 1-OH-midazolam), ce qui laisse croire que la sensibilité de la méthode pourrait être due au grand volume de plasma prélevé pour l'analyse (2 mL) et à une bonne purification des échantillons (diminution du bruit de fond) par le complément automatisé. La littérature rapporte une seule méthode utilisant le HPLC-UV assez efficace pour permettre le dosage du midazolam dans des échantillons plasmatiques prélevés de 0 à 4 heures après l'administration d'une dose orale de 2 mg. Les meilleurs seuils de quantification obtenus par les méthodes de dosage du midazolam utilisant le HPLC-UV sont d'environ 1-1,25 ng/mL (Jerdí *et al.*, 2003; Uchida *et al.*, 2006). Cependant, pour être en mesure de construire une courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps après l'administration d'une dose orale de 2 mg de midazolam, il est essentiel d'utiliser une méthode analytique dont le seuil de détection est de l'ordre du pg/mL (Thummel *et al.*, 1996; Wandel *et al.*, 2000). Le dosage des métabolites du midazolam dans l'urine, où le 1-OH-midazolam se retrouve dans des proportions de 50 à 98% de la dose administrée, peut être effectué par HPLC-UV (Thummel *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2001).

Les méthodes les plus employées pour l'extraction du midazolam et de ses métabolites sont la LLE et, parfois, la SPE. Ces deux types d'extraction donnent un recouvrement semblable, de l'ordre de 80 à 90% pour tous les analytes.

4.2. Mise au point des méthodes de dosage du midazolam et de ses métabolites dans l'urine

Le développement de la méthode de dosage du midazolam et de ses métabolites (1-OH- et 4-OH-midazolam) dans les échantillons urinaires consistait à mettre au point la détection et la séparation chromatographique de ces analytes par HPLC/UV ainsi que l'extraction liquide-liquide. Le 4-OH-midazolam s'est cependant montré instable.

montré instable. L'influence de cette instabilité sur les résultats d'analyse est discutée dans la section 4.2.3.2.

4.2.1. Préparation des solutions

Les solutions-mères du midazolam (25 et 2,5 µg/mL), du 1-OH-midazolam (75 µg/mL) et du 4-OH-midazolam (500 µg/mL) ont été préparées dans le méthanol. Les solutions-filles ont pour leur part été réalisées dans une solution constituée de méthanol et d'eau (80/20 (v/v)) afin de faciliter le pipetage. Pour la même raison, le diazépam (SI) a été dilué dans du méthanol contenant 50% d'eau. En ce qui concerne les solutions des métabolites du midazolam, elles ont été préparées dans le méthanol. Enfin, immédiatement après avoir été préparées, toutes les solutions ont été conservées à -20°C.

4.2.2. Détection et conditions chromatographiques

Les conditions de séparation chromatographique ont été déterminées de façon empirique. Pour ce faire, plusieurs essais ont été réalisés avec différentes colonnes, pour lesquelles différentes phases mobiles, températures, débits et gradients ont été testés. La meilleure séparation chromatographique pour le midazolam et ses métabolites a été obtenue sur une colonne Luna C18 (2) (250 x 4,6 mm, 5 µm), avec une phase mobile contenant un mélange de tampon acétate 10 mM à pH 5 et d'acétonitrile en proportion 60/40, v/v. Dans ces conditions optimales, le débit était constant à 1 mL/min. Dans un tel système, l'ordre d'élution est fonction des coefficients de partage du midazolam et de ses métabolites. Par exemple, le 4-OH-midazolam étant l'analyte le plus hydrophile, il a été le premier à éluer de la colonne chromatographique ($t_r = 7,7$ min). Un chromatogramme montrant l'ordre d'élution du midazolam et de ses

métabolites ainsi que du standard interne, dans les conditions mentionnées ci-haut, est montré à la Figure 21.

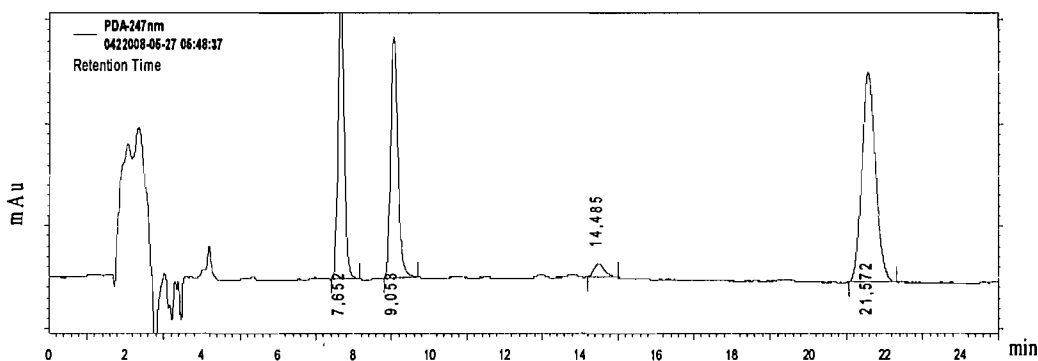


Figure 21 : Chromatogramme représentatif d'une solution-test indiquant l'ordre d'élution des substances à analyser: le 4-OH-midazolam ($t_r = 7,7$ min), le 1-OH-midazolam ($t_r = 9$ min), le midazolam ($t_r = 14$ min) et le diazépam ($t_r = 21,5$ min).

La Figure 21 montre que le 1-OH-midazolam a été élué après 9 minutes. Le midazolam, pour sa part, comme il est moins hydrophile que ses métabolites, est sorti de la colonne après 14 minutes. C'est le diazépam, qui a été retenu le plus longtemps dans la phase stationnaire dû à sa plus forte lipophilicité. Cela pourrait être dû au pH de la phase mobile (pH 5). À un pH de 5, le midazolam (pKa 6,15) est ionisé et donc moins retenu par la phase stationnaire apolaire que sa forme neutre. Le diazépam (pKa 3,4-3,3), quant à lui, est totalement neutre à un tel pH. Il est donc retenu par la phase stationnaire. Les pics des analytes et du standard interne étaient bien séparés et parfaitement symétriques. La proportion du solvant organique de la phase mobile a été légèrement diminuée, lors du développement de la méthode, afin de permettre de bien séparer les pics respectifs du midazolam et d'une autre substance (produit de la dégradation du 4-OH-midazolam), apparue dans l'échantillon suite à l'incubation enzymatique. Ainsi, la durée totale de l'analyse chromatographique d'un échantillon préparé dans les conditions

expérimentales décrites plus haut était de 25 minutes. Enfin, la détection des signaux à la longueur d'onde de 247 nm permettait un bon compromis entre la sélectivité et la sensibilité.

4.2.3. Extraction liquide-liquide

L'extraction des médicaments de l'urine a été précédée d'une étape d'hydrolyse enzymatique par la β -glucuronidase (1 000 unités/mL) dans un tampon acétate 0,1 M à pH 5, à 37°C et pendant 24 heures. Ensuite, *un aliquot* d'un mL d'urine a été mélangée avec 40 μ L de solution de SI à 10 μ g/mL et 1 mL de tampon carbonate de sodium à 0,5 M et à pH 9. Le mélange a ensuite été agité au vortex pendant 5 secondes. L'extraction des analytes a alors été réalisée à deux reprises, en mélangeant l'urine à un volume de 4 mL d'éther diéthylique et en agitant ensuite le tout à 5 rpm pendant 5 minutes. Les échantillons ont par la suite été centrifugés à 3 000 rpm, pendant 5 minutes. Les phases organiques assemblées ont alors été transférées dans des tubes propres et acidifiées par l'acide chlorhydrique à 1 M (1 mL), puis la phase aqueuse a été lavée avec 4 mL d'éther diéthylique. Après centrifugation et élimination de la phase organique, la phase aqueuse a été rendue basique à l'aide du NaOH à 1 M (1,1 mL), vortexée et extraite deux fois avec 4 mL d'éther diéthylique. L'éther a ensuite été évaporé à sec sous courant d'azote, à 37°C. Enfin, le résidu sec a été remis en solution dans 200 μ L de méthanol et *un aliquot* de 25 μ L de cette solution a été injecté.

En bref, l'extraction liquide-liquide des analytes, à partir des échantillons urinaires, a été effectuée à l'aide des trois étapes suivantes :

- 1 - double extraction des formes moléculaires des analytes de l'urine basifiée, à l'aide d'éther diéthylique;
- 2 - lavage des analytes par solubilisation dans la phase aqueuse acidifiée et élimination de la matrice restante à l'aide d'éther diéthylique;

3 - double extraction des analytes de la phase aqueuse basifiée, encore à l'aide d'éther diéthylique.

Les deuxième et troisième étapes d'extraction ont été ajoutées afin d'éliminer les substances interférentes provenant de la matrice et de la solution de β -glucuronidase. Ces étapes ont permis une élimination efficace des interférences et une diminution significative du bruit de fond. L'utilisation de l'acide chlorhydrique, à la deuxième étape de l'extraction, provoquait la dégradation immédiate du 4-OH-midazolam. Ceci a permis de supprimer la longue étape de dégradation à pH 5. Par contre, la procédure d'extraction est ainsi devenue assez fastidieuse.

4.2.4. Instabilité du 4-OH-midazolam

4.2.4.1. Étude de l'instabilité

Le 4-OH-midazolam s'est montré instable à pH bas. Un produit de dégradation s'est formé et a été détecté sur chromatogramme, à 16,7 minutes (Figure 22).

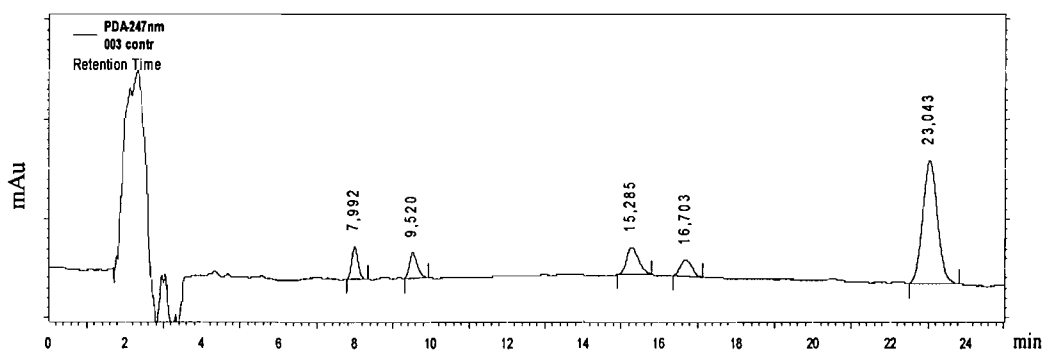


Figure 22 : Chromatogramme d'une solution aqueuse contenant du 4-OH-midazolam ($t_r = 7,9$ min), du 1-OH-midazolam ($t_r = 9,5$ min), du midazolam ($t_r = 15,3$ min), le produit de dégradation du 4-OH-midazolam ($t_r = 16,7$ min) et du diazépam ($t_r = 23$ min).

Lors de la première étape de l'extraction, le 4-OH-midazolam est resté stable et est passé dans la phase organique dans son état initial. Cela a permis de mesurer la diminution des concentrations de ce composé dans l'échantillon, qui ont été observées en raison de la dégradation qui a eu lieu durant l'étape d'hydrolyse enzymatique (tampon acétate 0,1M à pH 5, à 37°C). La dégradation complète du 4-OH-midazolam a été observée après un délai de 24 heures, tel que montré sur la Figure 23.

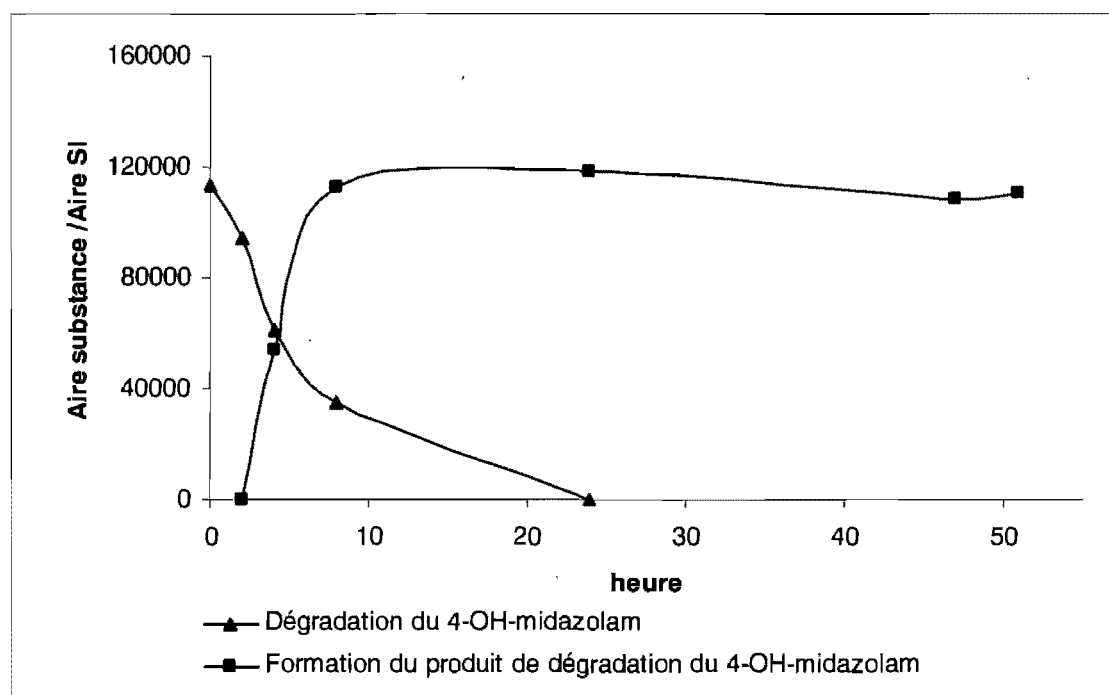


Figure 23 : Dégradation du 4-OH-midazolam (1 $\mu\text{g/mL}$) et formation de son produit de dégradation.

L'origine du produit de dégradation a été confirmée par la spectrométrie de masse (Tableau 14).

| Substance | Ion moléculaire m/z | Ion fragment m/z | Formule de l'ion fragment |
|---------------------------|------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| 4-OH-midazolam | 342,05 | 122,04 | C ₇ H ₅ N F |
| Produit de dégradation | 343,07 | 123,04 | C ₇ H ₄ O F |

Tableau 14 : Fragmentation du 4-OH-midazolam et de son produit de dégradation (UdeM, Laboratoire de spectrométrie de masse).

En se basant sur la fragmentation des ions moléculaires, la différence d'une unité entre les valeurs des rapports masse/charge (m/z) du 4-OH-midazolam et du produit de dégradation peut être expliquée par le remplacement d'un groupement -NH-, dans la structure du 4-OH-midazolam, par un atome d'oxygène. Ainsi, le produit de dégradation était différent du 4-OH-midazolam, mais le noyau moléculaire de chacune des deux substances était similaire.

Le 4-OH-midazolam s'est montré instable à pH bas. En effet, celui-ci s'est dégradé dans l'eau et dans l'urine à pH 5 et, également, dans le tampon acétate de sodium 0,1M de pH 6,8, à 37°C. La dégradation du 4-OH-midazolam a eu lieu en présence et en absence de la β -glucuronidase. La dégradation totale du 4-OH-midazolam a été observée après 48 heures à pH 5, ou instantanément lorsque le produit a été mis en contact avec de l'acide chlorhydrique 1M.

4.2.4.2. Quantification du 4-OH-midazolam

La disparition de 4-OH-midazolam de l'urine par suite de sa dégradation ainsi que l'apparition de son produit de dégradation ont été étudiées pour une large gamme de concentration afin de trouver une possibilité de dosage indirect du 4-OH-midazolam.

Pour des concentrations allant de 40 à 4 000 ng/mL, le signal analytique (*i.e.* l'intensité de l'absorbance) provenant du produit de dégradation normalisé à l'aide du SI corrélait parfaitement avec celui du 4-OH-midazolam. Cette corrélation est illustrée à la Figure 24.

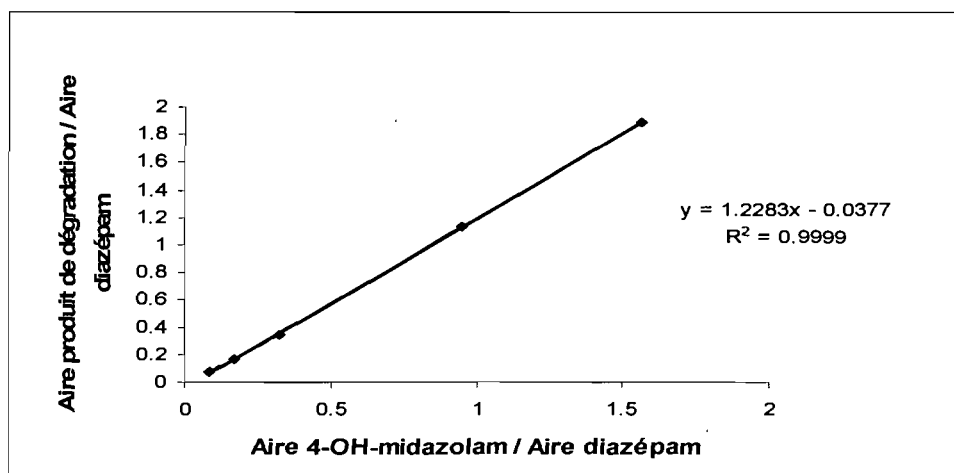


Figure 24 : Corrélation entre les ratios des aires sous la courbe du 4-OH-midazolam dégradé / diazépam et 4-OH-midazolam / diazépam.

Ainsi, elle permet de quantifier le 4-OH-midazolam d'une façon indirecte, en utilisant le signal analytique de son produit de dégradation.

4.2.4.3. Problèmes d'instabilité du 4-OH-midazolam

La littérature rapporte que les 4-OH-métabolites des composés de type 1,4-benzodiazépines sont instables. Par exemple, l'instabilité du 4-OH-alprazolam, un des métabolites de l'alprazolam, a été observée lors du développement d'une méthode de dosage de l'alprazolam et de ses métabolites (Schmith *et al.*, 1991). L'alprazolam est un composé de la classe des 1,4-benzodiazépines qui a un effet anti-anxiolytique. Suite à la découverte de l'instabilité du 4-OH-alprazolam, les études d'analyse quantitative et de pharmacocinétique effectuées sur ce composé ont été modifiées en conséquence

(Allqvist *et al.*, 2004; Greenblatt *et al.*, 1993). L'instabilité du 4-OH-midazolam et du 1,4-OH-midazolam a aussi été observée, lors du développement des méthodes de dosage du midazolam par LC-MS et LC-MS/MS. Ces métabolites se sont montrés instables dans une phase mobile composée de tampon acétate d'ammonium à 10 mM de pH 8 et d'acétonitrile (95/5 (v/v)), dans des solutions à base de méthanol ou aqueuses à pH 8 et dans l'acide acétique dilué. Il a également été démontré que la température élevée accélérerait la dégradation des métabolites du midazolam (Link *et al.*, 2007; Kuhn *et al.*, 2003).

Le problème d'instabilité du 4-OH-midazolam pourrait être lié à une réaction chimique ayant lieu en présence de plusieurs benzodiazépines. Il s'agit d'une réaction d'hydrolyse en milieu acide, donnant lieu à la formation des benzophénones correspondantes (Drummer *et al.*, 1998). Par exemple, la solubilité de la molécule-mère, le midazolam, est diminuée de 0,1 mg/mL à pH neutre et augmente aux pH acides. En présence de pH acides, le midazolam (forme fermée) est converti en 2-amino-5-chloro-2-fluoro-benzophénone (forme ouverte). En fait, la formation de la forme ouverte du midazolam conduit à l'augmentation de la solubilité du midazolam aux pH acides. (Schütz, 1985; Anderson *et al.*, 1991) (Figure 25).

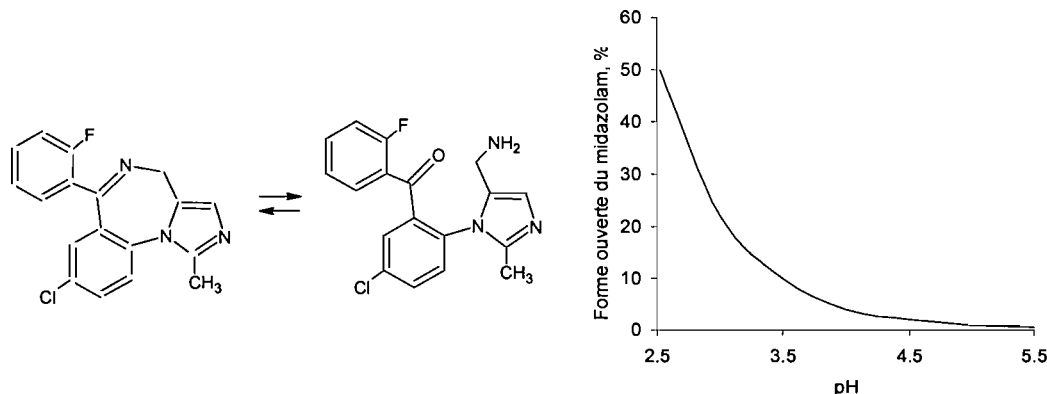


Figure 25 : Équilibre chimique dépendant du pH entre deux formes du midazolam: ouverte et fermée.

Par analogie au midazolam, les deux formes de 4-OH-midazolam peuvent exister soient, ouverte et fermée, qui se trouvent en équilibre dynamique à n'importe quel pH donné. À pH supérieur à 4, le cycle de diazépine se referme et la proportion de la forme fermée tend vers 100% (www.drugs.com). Dans le cas des 4-OH-métabolites, la présence d'un groupement hydroxyle, en position 3 du cycle 1,4-diazépine, peut être à l'origine de l'instabilité de ces composés. Leur décomposition immédiate, dans les milieux fortement acides (HCl, 1 M), laisse croire que la forme ouverte est très instable et que la vitesse de dégradation du 4-OH-midazolam dépend de la proportion de la forme ouverte en solution, qui est maximale aux pH fortement acides. Lorsque le pH est supérieur à 4, la forme fermée est prépondérante et la dégradation du 4-OH-midazolam a également lieu, mais beaucoup plus lentement. Même instable, la forme ouverte est toujours présente dans la solution. Ainsi, la décomposition du 4-OH-midazolam, aux pH supérieurs à 4, pourrait être due à la dégradation de sa forme ouverte, qui a lieu au fur et à mesure de sa formation à partir de la forme fermée. La température pourrait également accélérer ce processus de dégradation.

Seuls quelques articles consacrés au développement des méthodes analytiques traitent de l'instabilité du 4-OH-midazolam. Cependant, aucune étude ne traite ni des facteurs qui pourraient être en cause dans cette instabilité, ni des moyens de doser le 4-OH-midazolam malgré sa rapidité à se dégrader. Dans certains travaux cités dans la littérature, le 4-OH-midazolam a même été dosé dans des conditions favorisant sa dégradation. Les deux cas de quantification de 4-OH-midazolam dans les conditions défavorisantes qui suivent sont décrits à titre d'exemples.

Le premier de ces deux cas présente le dosage de 4-OH-midazolam dans le cadre d'un travail dans le domaine de la toxicologie médico-légale (Sano *et al.*, 2001). En toxicologie médico-légale, les concentrations mesurées sont égales ou, le plus souvent, supérieures aux concentrations thérapeutiques. Une procédure analytique très sensible (HPLC/FAB-MS) et sélective, permettant de doser une concentration aussi petite que 300 pg/mL, a été mise en place afin d'identifier et de doser le midazolam et ses métabolites dans les fluides biologiques. Des échantillons sériques et urinaires obtenus d'un sujet qui est mort après avoir pris une dose de midazolam ont été analysés à l'aide de cette technique. Les échantillons ont été purifiés par extraction en phase solide (SPE cartouches Bond Elut SCX). Il a été démontré que l'utilisation du tampon acétate à pH 4 améliorait le rendement d'extraction du midazolam. Dans de telles conditions, le rendement d'extraction du 4-OH-midazolam était égal à 70%. Cela pourrait signifier que cette molécule reste complètement ou partiellement intacte lors d'expositions de courte durée aux conditions favorisant sa dégradation. Les résultats de cette étude ont démontré que dans les échantillons sériques du sujet mentionné ci-haut, le midazolam a été dosé à la concentration thérapeutique, soit 163 ng/mL. Cependant, le 4-OH-midazolam n'a été détecté ni dans l'urine, ni dans le sérum. À l'inverse de ce dernier, l'urine avait été incubée en présence de la β -glucuronidase pendant 24 heures, à pH 5 avant l'extraction. L'absence du 4-OH-midazolam dans les échantillons urinaires et

sériques pourrait être expliquée par plusieurs facteurs, tels l'élimination rapide du métabolite et un prélèvement trop tardif, le stockage de l'échantillon dans des conditions inappropriées (-20°C), un rendement d'extraction relativement faible et le traitement des échantillons dans des conditions favorisant la dégradation.

Le deuxième cas de dosage de 4-OH-midazolam dans des conditions défavorisantes a été trouvé dans une étude visant à évaluer la possibilité d'utiliser un ratio métabolique du midazolam, afin de prédire l'activité des CYP3A (Streetman *et al.*, 2001). Les mesures du midazolam ainsi que des 1-OH- et 4-OH-midazolam dans l'urine ont été exercées suite à l'administration intraveineuse du midazolam (0,025 mg/kg). Les échantillons urinaires ont été incubés avec la β -glucuronidase à 37°C durant 18 heures avant d'être analysés. La méthode d'analyse utilisée (LC-MS/MS) a permis le dosage jusqu'à une concentration de 250 pg/mL. Cependant, les concentrations du 4-OH-midazolam n'ont pu être déterminées que pour 69% des échantillons analysés. Il a été considéré, en conclusion, que l'utilisation du ratio métabolique urinaire du midazolam incluant le 4-OH-midazolam ne permettait pas de prédire précisément l'activité des CYP3A au niveau du foie. Ceci pourrait être dû à un faible recouvrement urinaire du 4-OH-midazolam ou au fait que la collecte urinaire n'ait été effectuée que sur une durée trop courte (6 heures). L'instabilité du 4-OH-midazolam n'a pas été prise en considération.

L'instabilité du 4-OH-midazolam peut se produire à n'importe quelle étape, lors de la réalisation d'une étude. Par exemple, la dégradation de ce métabolite peut débuter immédiatement après sa formation dans le corps et continuer lors du prélèvement, de l'entreposage et du traitement des échantillons biologiques. L'instabilité du 4-OH-midazolam se manifeste souvent lors de l'étape d'hydrolyse enzymatique des échantillons, quand plusieurs des facteurs favorisant la dégradation sont présents, tels la température, le temps d'incubation et le pH acide. Pour que la dégradation du 4-OH-

midazolam soit complète, dans les conditions d'incubation enzymatique, une période de temps d'incubation prolongée peut être nécessaire. De plus, ce métabolite est considérablement stable dans la phase mobile, même aux pH acides, probablement grâce aux composants organiques (acétonitrile, méthanol). Le 4-OH-midazolam supporte également assez bien les procédures d'extractions (SPE, LLE) lorsqu'elles sont effectuées dans des conditions non extrêmes (par exemple, quand la procédure d'extraction est rapide et se passe aux pH faiblement acides) (Chan *et al.*, 1993; Jurica *et al.*, 2007). Ainsi, il est facile de ne pas remarquer l'instabilité de la molécule, lors du développement d'une méthode analytique, et d'effectuer ensuite son dosage alors qu'elle est partiellement ou totalement dégradée.

Un autre problème lié à l'instabilité du 4-OH-midazolam est la possibilité d'interférences analytiques entre son produit de dégradation et le midazolam. En effet, le produit de dégradation du 4-OH-midazolam possède possiblement des caractéristiques physicochimiques similaires à celles du midazolam. D'ailleurs, le temps de rétention de ces deux molécules, par la phase stationnaire inverse, peut être très proche. Ainsi, en cas de coélution, il est possible de surestimer la concentration du midazolam si la méthode de détection n'est pas suffisamment sélective.

4.3. Pré-validation de la méthode de dosage du midazolam, du 1-OH-midazolam et du 4-OH-midazolam

Avant de commencer la validation, il est souhaitable de recueillir des informations de base sur les performances de la méthode développée, notamment l'établissement de la fonction de réponse, de la variabilité des résultats et de l'intervalle de dosage (Hubert *et al.*, 2003). Les critères de validation à évaluer pour la méthode développée sont la justesse (biais) et la fidélité intra- et inter-journalières, ainsi que la sélectivité, le rendement d'extraction, la stabilité et la linéarité.

4.3.1. Protocole expérimental

Les trois analytes (midazolam et ses deux métabolites, le 1-OH- et 4-OH-midazolam) ont été dosés simultanément. La pré-validation a été effectuée à l'aide de 7 niveaux de concentrations pour les standards d'étalonnage et 3 pour les standards de validation. Pour ces derniers, les mesures ont été répétées 5 fois (Tableau 15).

| | Midazolam | 1-OH-midazolam | 4-OH-midazolam | Nombre de répétitions par jour |
|-------------------------|------------------------------|----------------|----------------|--------------------------------|
| | Concentration ajoutée, ng/mL | | | |
| Standards d'étalonnage | 0 (blanc) | 0 (blanc) | 0 (blanc) | 1 |
| | 5 | 10 | 10 | 1 |
| | 25 | 175 | 175 | 1 |
| | 40 | 350 | 350 | 1 |
| | 55 | 525 | 525 | 1 |
| | 70 | 700 | 700 | 1 |
| | 85 | 825 | 850 | 1 |
| | 100 | 975 | 1000 | 1 |
| Standards de validation | 10 | 100 | 100 | 5 |
| | 50 | 500 | 500 | 5 |
| | 95 | 900 | 900 | 5 |
| Nombre de jours | | | | 2 |

Tableau 15 : Protocole expérimental de pré-validation de la procédure de dosage du midazolam et de ses métabolites dans l'urine.

La fortification de la matrice (urine), pour les deux types de standards, a été faite de façon indépendante. Le volume total de fortification, qui inclut les volumes de fortification employés pour tous les analytes, n'a pas dépassé 24% du volume de la matrice.

4.3.2. Sélectivité

La sélectivité de la méthode de dosage du midazolam et de ses métabolites a été démontrée en comparant des chromatogrammes représentatifs (Figure 26) d'un standard de validation et d'un blanc urinaire, obtenus après à une extraction liquide-liquide. Sur ces chromatogrammes, le standard de validation contenait du 1- et du 4-OH-midazolam ainsi que du midazolam à 100, 100 et 10 ng/mL, respectivement, de même qu'un standard interne concentré à 10 ng/mL. Pour ce qui est du blanc urinaire, il s'agissait de l'urine dépourvue de midazolam et de ses métabolites.

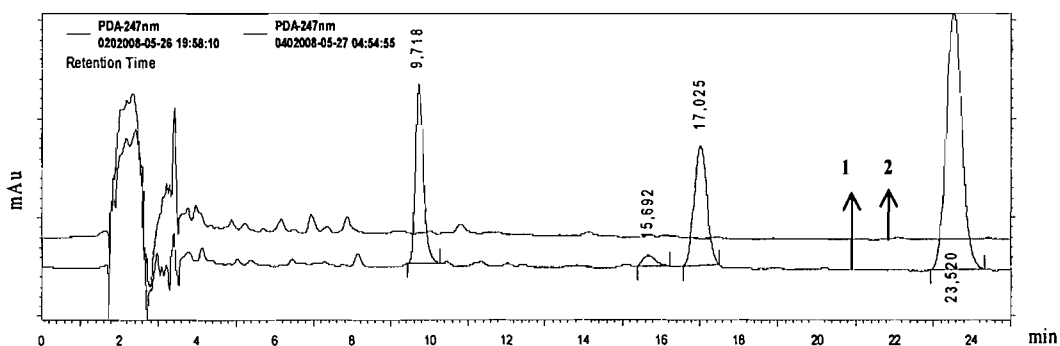


Figure 26 : Chromatogramme représentatif montrant les pics obtenus suite à l'analyse d'un standard de validation contenant tous les analytes (midazolam, le 1-OH et le 4-OH-midazolam) et son SI (le diazépam) (1) et un blanc urinaire analysés (2).

Les temps de rétention du 1-OH-midazolam, du midazolam, du produit de dégradation du 4-OH-midazolam et du SI ont été, respectivement, de 9,7, 15,7, 17 et 23,5 minutes. Aucun pic provenant de la matrice n'a pas été élué à ces temps de rétention.

4.3.3. Stabilité

La stabilité du 1-OH-midazolam et du midazolam a été évaluée, au niveau d'une concentration de 100 ng/mL (n=3), sans exposition à la β -glucuronidase et suite à une période de 48 heures d'incubation, à 37°C et à un pH de 5, en présence de cette enzyme. Les résultats de ce test de stabilité sont montrés au tableau 16.

| Substance | Concentration ajoutée, ng/mL | Contrôle (sans incubation avec la β -glucuronidase) | Avec incubation en présence de β -glucuronidase, 37°C, pH 5, 48 h |
|----------------|------------------------------|---|---|
| | | Concentration \pm SD, ng/mL (CV, %) | |
| Midazolam | 100 | 101,9 \pm 0,1 (0,1) | 106,4 \pm 6,6 (6,6) |
| 1-OH-midazolam | 100 | 100,2 \pm 5,1 (5,1) | 91,8 \pm 0,9 (0,9) |

Tableau 16 : Stabilité du 1-OH-midazolam et du midazolam dans l'urine, avec et sans incubation enzymatique en présence de β -glucuronidase.

Les deux substances ont été considérées stables sous les conditions indiquées, car les déviations des valeurs obtenues par rapport aux valeurs de référence n'ont pas dépassé 15%.

4.3.4. Rendement

Pour le 1-OH-midazolam, le rendement moyen d'extraction par LLE était de (83 \pm 4)% à 100 ng/mL et (85 \pm 5) % à 900 ng/mL. Pour ce qui est du midazolam, ce rendement a été de (82 \pm 16) % à 10 ng/mL et de (80 \pm 4) % à 95 ng/mL. Le rendement du produit de dégradation du 4-OH-midazolam n'a pas pu être estimé, la substance pure n'ayant pu être obtenue.

4.3.5. Fonction de réponse et linéarité

Les intervalles de dosage s'étendaient de 5 à 100, 10 à 975 et 10 à 1 000 ng/mL pour le midazolam, le 1-OH-midazolam et 4-OH-midazolam, respectivement. Les courbes d'étalonnage de tous ces analytes étaient linéaires (droite d'étalonnage : $Y = AX + B$). Les paramètres de ces droites d'étalonnage sont montrés au Tableau 17.

| Analyte | Jour | Pente (A) | Ordonnée à l'origine (B) | Coefficient de détermination (R^2) |
|----------------|------|-----------|--------------------------|--|
| 1-OH-midazolam | 1 | 0,0031 | 0,0295 | 0,9966 |
| | 2 | 0,0035 | - 0,0252 | 0,9978 |
| Midazolam | 1 | 0,0040 | 0,0087 | 0,9928 |
| | 2 | 0,0039 | - 0,0067 | 0,9983 |
| 4-OH-midazolam | 1 | 0,0041 | - 0,0383 | 0,9833 |
| | 2 | 0,0041 | - 0,0862 | 0,9928 |

Tableau 17 : Paramètres des droites d'étalonnage pour le midazolam, le 1-OH-midazolam et le 4-OH-midazolam.

La relation entre les concentrations calculées et ajoutées était également linéaire, car toutes les pentes estimées se rapprochaient de 1 et les ordonnées à l'origine, de zéro. Cette linéarité est représentée au Tableau 18.

| Analyte | Jour | Pente (A) | Ordonnée à l'origine (B) | Coefficient de détermination (R^2) |
|----------------|------|-----------|--------------------------|--|
| 1-OH-midazolam | 1 | 1,0155 | - 0,0072 | 0,9936 |
| | 2 | 0,9924 | 0,0097 | 0,9987 |
| Midazolam | 1 | 0,9944 | 0,0097 | 0,9928 |
| | 2 | 1,0027 | 0,0040 | 0,9983 |
| 4-OH-midazolam | 1 | 1,0044 | - 0,0590 | 0,9833 |
| | 2 | 1,0053 | 0,0032 | 0,9928 |

Tableau 18 : Linéarité de la méthode de dosage pour le midazolam et ses métabolites (1- et 4-OH-midazolam).

Ainsi, l'utilisation de la régression linéaire était appropriée pour l'établissement d'une relation entre la concentration et la réponse du détecteur, pour ces analytes.

1.3.6. Justesse et fidélité

Le tableau 19 regroupe les résultats de l'étude de fidélité et de justesse obtenus pour les cinq standards de validation des trois niveaux de concentrations. La fidélité inter-journalière a été calculée comme étant le coefficient de variation des concentrations moyennes calculées de chaque jour. La fidélité intra-journalière a été déterminée, quant à elle, comme étant le coefficient de variation moyen des concentrations journalières calculées. La justesse a pour sa part été exprimée en termes de biais.

| Concentration ajoutée (ng/mL) | Fidélité inter-journalière | | | Fidélité intra-journalière | |
|----------------------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------|----------------------------|---------------------------------|
| | Écart-type (ng/mL) | Coefficient de variation (%) | Biais relatif (%) | Écart-type (ng/mL) | Coefficient de variation (%) |
| 1-OH-midazolam | | | | | |
| 100 | 0,23 | 0,23 | 6,47 | 5,32 | 5,32 |
| 500 | 55,64 | 10,90 | 2,11 | 29,94 | 5,99 |
| 900 | 55,36 | 6,11 | 0,62 | 64,38 | 7,15 |
| Midazolam | | | | | |
| 10 | 0,57 | 5,86 | - 1,94 | 1,00 | 10,03 |
| 50 | 5,89 | 11,15 | 5,65 | 3,54 | 7,07 |
| 95 | 0,34 | 0,36 | - 1,54 | 6,09 | 6,41 |
| 4-OH-midazolam | | | | | |
| 100 | 0,50 | 0,47 | 6,04 | 8,15 | 8,15 |
| 500 | 22,22 | 4,18 | 6,23 | 31,08 | 6,22 |
| 900 | 5,24 | 0,57 | 2,30 | 40,48 | 4,50 |

Tableau 19 : Biais relatif et fidélités inter- et intra- journalières de la méthode de dosage du midazolam, du 1-OH-midazolam et du 4-OH-midazolam dans l'urine.

Les données obtenues selon le protocole de validation (*i.e.* nombre de répétitions = 5, nombre de jours = 2) n'ont pas permis de présenter les statistiques nécessaires pour la construction d'un profil d'exactitude. Néanmoins, il a été possible d'observer que l'essentiel de la variabilité provenait généralement de la répétabilité, c'est-à-dire de la fiabilité intra-journalière. La variabilité des mesures prises entre deux séries était généralement moins grande. La justesse et la fidélité obtenues aux différents niveaux de concentrations, pour tous les analytes, ont pu être jugées acceptables, car aucune des valeurs n'a excédé de plus de 15% (limites de tolérance).

1.3.7. Analyse des échantillons réels

Des échantillons urinaires provenant de sept personnes recevant du midazolam (Versed®) ont été analysés à l'aide de la méthode développée lors de la présente étude. L'objectif de cette partie de l'étude était de déterminer le niveau de concentration du 4-OH-midazolam dans l'urine afin d'optimiser la courbe d'étalonnage et d'évaluer la performance de la méthode de dosage développée avec des échantillons provenant de patients réels traités au midazolam. Les échantillons utilisés dans le cadre de ce projet de maîtrise provenaient de patients traités à l'Unité des soins intensifs de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. Les urines ont été collectées pendant les six heures suivant le début de l'administration intraveineuse de midazolam (bolus ou perfusion). Les échantillons récupérés ont été stockés à -20°C.

Selon les valeurs d'absorbance obtenues, les concentrations du 1-OH-midazolam retrouvées dans l'urine des patients à l'étude se situaient en dehors de la gamme de concentrations prédite pour ce métabolite. Il a donc été impossible de quantifier le 1-OH-midazolam chez cette population de patients. Ce résultat était attendu, compte tenu du fait que la méthode utilisée n'était pas adaptée au dosage des concentrations plasmatiques obtenues pour cette substance après l'administration de doses

thérapeutiques de midazolam. Pour ce qui est du midazolam et du 4-OH-midazolam, les concentrations calculées dans l'urine de chacun des patients sont rapportées au tableau 20.

| Patient | Concentrations mesurées (ng/mL) | |
|---------|---------------------------------|----------------|
| | Midazolam | 4-OH-midazolam |
| 1 | 626,7 | non détecté |
| 2 | 119,3 | 134,8 |
| 3 | 81,1 | 274,5 |
| 4 | 12,3 | non détecté |
| 5 | 60,7 | 104,0 |
| 6 | 80,2 | 94,3 |
| 7 | 67,0 | 249,4 |

Tableau 20 : Concentrations du midazolam et du 4-OH-midazolam retrouvées dans les urines des patients traités avec le Versed®.

Le midazolam a été détecté et quantifié dans tous les échantillons urinaires. La concentration maximale trouvée était de 626,7 ng/mL. Cependant, comme aucun échantillon urinaire n'a été prélevé chez aucun des patients avant la prise du médicament (blanc), il est difficile de prouver que le signal mesuré provenait uniquement du midazolam. Il est donc possible que les concentrations mesurées aient été surestimées.

Pour ce qui est du métabolite 4-OH-midazolam, il a été quantifié dans cinq des sept échantillons d'urine. Les concentrations calculées pour ce métabolite étaient en général légèrement supérieures à celles du midazolam (*i.e.* 1,1 à 4 fois supérieures). Les concentrations mesurées s'étendaient de 94 à 275 ng/mL. L'ordre de grandeur attendu des concentrations urinaires du 4-OH-midazolam, après administration orale d'une dose de 2 mg de midazolam, a été estimé en considérant les doses thérapeutiques intraveineuses moyennes (0,15-0,35 mg/kg), le poids moyen des patients (75 kg) et la biodisponibilité (50%). Selon cette estimation, les concentrations urinaires attendues de

4-OH-midazolam peuvent varier de 1 à 20 ng/mL. Ainsi, à la lumière des résultats montrés au tableau 20, la limite de quantification imposée à la méthode de dosage employée pour quantifier ce métabolite devrait être diminuée et la gamme d'étalonnage, rétrécie.

4.4. Conclusion

Une méthode de dosage par HPLC-UV du midazolam et de ses métabolites, le 1- et le 4-OH-midazolam, a été mise au point lors de ce projet de recherche de maîtrise. L'extraction liquide-liquide en milieu basique incluant une étape de lavage par extraction en milieu acide a permis d'obtenir un rendement de l'ordre de 80% pour tous les analytes. Les intervalles de dosage, pour le midazolam et le 1-OH-midazolam, ont été de 5 à 100 et de 10 à 975 ng/mL, respectivement, avec la méthode qui a été mise au point. Le dosage sélectif du midazolam a également pu être effectué en présence du produit de dégradation du 4-OH-midazolam. La méthode a également permis de quantifier ce métabolite dans des conditions favorisant sa dégradation, en utilisant justement le signal de détection provenant du produit de dégradation du 4-OH-midazolam. L'intervalle de dosage de la méthode mise au point était, quant à lui, compris entre 10 et 1 000 ng/mL. La justesse et la fidélité de la méthode, pour tous les analytes, ne dépassaient pas 106,5% et 11,2%, respectivement.

Dans un autre ordre d'idées, le développement d'une méthode de dosage du midazolam dans le plasma, après l'administration d'une dose orale de 2 mg de ce médicament, demande un mode de détection qui permet la quantification de concentrations de l'ordre du pg/mL. Il faudrait dans un tel cas utiliser la spectrométrie de masse, par exemple, technique qui n'a malheureusement pas été disponible lors de ces études de maîtrise.

III. DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

La compréhension des mécanismes d'interactions médicamenteuses permet de maîtriser les risques et l'efficacité d'une thérapie médicamenteuse. Certains travaux scientifiques publiés, ainsi que les tests *in vitro* réalisés dans notre laboratoire suggèrent que les interactions médicamenteuses observées avec la clarithromycine, un antibiotique largement utilisé, pourraient se produire au niveau des transporteurs membranaires et des CYP3As. Cette hypothèse sera testée tout au long de l'étude planifiée et présentée dans la partie théorique, qui est conçue pour étudier des interactions médicamenteuses chez l'homme aux niveaux des transporteurs membranaires et des CYP3As. Les deux médicaments à l'étude, le midazolam et la fexofénadine, ont été choisis pour leurs interactions connues et documentées avec la clarithromycine aux niveaux des CYP3As et des transporteurs membranaires, respectivement. Les changements de concentrations des médicaments-marqueurs et de leurs métabolites observés dans les fluides biologiques reflètent les modifications de l'activité des transporteurs et des enzymes correspondantes engendrées par les interactions médicamenteuses.

L'objectif du présent travail consistait à mettre au point et valider des méthodes de dosage de la fexofénadine, un substrat des transporteurs membranaires, et du midazolam, qui lui est un substrat du CYP3As, afin de permettre l'analyse de leurs interactions médicamenteuses avec la clarithromycine à partir d'échantillons plasmatiques et urinaires de patients obtenus dans le cadre de l'étude.

Au cours de ce travail, trois méthodes de dosage ont été mises au point. L'une d'entre-elles sert au dosage des métabolites du midazolam (1- et 4-OH-midazolam) dans l'urine. Lors de l'étape de développement de cette méthode, l'instabilité d'un des métabolites, le 4-OH-midazolam, a été observée et étudiée. Le produit de dégradation du 4-OH-midazolam et le midazolam lui-même étant co-élués, il y a eu interaction de

l'un envers l'autre. La méthode développée a quand même permis d'estimer la concentration du 4-OH-midazolam, dans des conditions favorisant sa dégradation et en présence des autres analytes, en utilisant le signal provenant de son produit de dégradation. Cette méthode a également permis le dosage sélectif du midazolam. Les résultats de la pré-validation de la procédure développée au cours du présent travail ont démontré son potentiel de quantification des substances à analyser avec une exactitude et une fidélité suffisantes. L'analyse des échantillons provenant des patients traités avec le midazolam a cependant démontré qu'il serait nécessaire d'adapter la zone de concentrations mesurées pour le 4-OH-midazolam. Le développement d'une méthode de dosage du midazolam dans le plasma demande quant à lui un mode de détection plus sensible permettant de détecter des concentrations de l'ordre du pg/mL.

La méthode de dosage développée lors de ce projet de maîtrise, pour la fexofénadine dans le plasma humain, inclut la purification des échantillons par précipitation des protéines et la détection des analytes en fluorescence. À l'origine, cette méthode a été développée pour l'analyse des échantillons plasmatiques provenant de rats (Pathak *et al.*, 2008). Cette même méthode, moyennant certaines modifications, a été appliquée au dosage de la fexofénadine dans le plasma humain au cours de la présente étude. Elle comporte plusieurs avantages, notamment d'être assez spécifique, simple, rapide et économique en termes de consommation de solvants. Au niveau urinaire, l'analyse quantitative de la fexofénadine a été réalisée à l'aide d'une méthode d'extraction en phase solide.

Une nouvelle stratégie de validation basée sur le profil d'exactitude a été appliquée pour démontrer les performances des méthodes développées. Le profil d'exactitude est un outil visuel qui intègre les statistiques nécessaires, permet une interprétation aisée des résultats et une prise de décision adéquate quant à la validation de la méthode. Les intervalles de tolérance β des mesures attendues ont été calculés

pour les deux méthodes de dosage de la fexofénadine. Les risques associés à l'utilisation de ces méthodes étaient de 5 et 10% pour les méthodes de dosage dans le plasma et dans l'urine, respectivement.

Bibliographie

Adachi T, Morimoto S, Kondoh H, Nagate T, Watanabe Y, Sota K. 14-Hydroxy-6-O-methylerythromycins A, active metabolites of 6-O-methylerythromycin A in human. *J Antibiot.* 1988; 41(7):966-75.

Ahonen J, Olkkola KT, Neuvonen PJ. Effect of route of administration of fluconazole on the interaction between fluconazole and midazolam. *Eur J Clin Pharmacol.* 1997; 51(5):415-9

Allqvist A, Wennerholm A, Svensson JO, Mirghani RA. Simultaneous quantification of alprazolam, 4- and alpha-hydroxyalprazolam in plasma samples using liquid chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005; 814(1):127-31.

Ambudcar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999; 39: 361-98.

Anderson BJ, Exarchos H, Lee K, Brown TC. Oral premedication in children: a comparison of chloral hydrate, diazepam, alprazolam, midazolam and placebo for day surgery. *Anaesth Intensive Care.* 1990; 18(2):185-93.

Arendt RM, Greenblatt DJ, Garland WA. Quantitation by gas chromatography of the 1- and 4-hydroxy metabolites of midazolam in human plasma. *Pharmacology.* 1984; 29(3):158-64.

Ayrton A, Morgan P. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica.* 2001; 31(8-9):469-97.

Backman JT, Kivistö KT, Olkkola KT, Neuvonen PJ. The area under the plasma concentration-time curve for oral midazolam is 400-fold larger during treatment with itraconazole than with rifampicin. *Eur J Clin Pharmacol.* 1998; 54(1):53-8.

Baranda AB, Alonso RM, Jiménez RM, Weinmann W. Instability of calcium channel antagonists during sample preparation for LC-MS-MS analysis of serum samples. *Forensic Sci Int.* 2006; 156(1):23-34.

Bechtel B, Testa B. Biotransformation des médicaments : voies biomoléculaires et pharmacologie clinique. In : *Pharmacologie clinique - Bases de la thérapeutique.* Ed. Giroud 2e édition, Expansion Scientifique Française, Paris 1988; pp 25-55

Bittner B, González RC, Isel H, Flament C. Impact of Solutol HS 15 on the pharmacokinetic behavior of midazolam upon intravenous administration to male Wistar rats. *Eur J Pharm Biopharm.* 2003; 56(1):143-6

Bizjak ED, Mauro VF. Digoxin-macrolide drug interaction. *Ann Pharmacother.* 1997; 31(9):1077-9.

Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fischer V, Gan L, Grimm S, Kao J, King SP, Miwa G, Ni L, Kumar G, McLeod J, Obach RS, Roberts S, Roe A, Shah A, Snikeris F, Sullivan JT, Tweedie D, Vega JM, Walsh J, Wrighton SA. The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug Metab Dispos.* 2003; 31(7):815-32.

Bogusz MJ, Krüger KD, Maier RD, Erkwoh R, Tuchtenhagen F. Monitoring of olanzapine in serum by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999; 732(2):257-69.

Bolon M, Bouliou R, Flamens C, Paulus S, Bastien O. [Sedation induced by midazolam in intensive care: pharmacologic and pharmacokinetic aspects] *Ann Fr Anesth Reanim.* 2002; 21(6):478-92.

Breier AR, Nudelman NS, Steppe M, Schapoval EE. Isolation and structure elucidation of photodegradation products of fexofenadine. *J Pharm Biomed Anal.* 2008; 46(2):250-7.

Casas M, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F. Solid-phase extraction of 1,4-benzodiazepines from biological fluids., *J Pharm Biomed Anal.* 1993 Apr-May; 11(4-5):277-84.

Chan KY, George RC, Chen TM, Okerholm RA. Direct enantiomeric separation of terfenadine and its major acid metabolite by high-performance liquid chromatography, and the lack of stereoselective terfenadine enantiomer biotransformation in man. *J Chromatogr.* 1991; 571(1-2):291-7.

Chan K, Jones RD. Simultaneous determination of flumazenil, midazolam and metabolites in human biological fluids by liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1993; 619(1):154-60.

Chapuzet E, Mercier N, Méthodes chromatographiques de dosage dans le milieu biologique : stratégies de validation. Rapport d'une commission SFST, *STP Pharma Pratiques* 73 (1997), pp. 169–194.

Chen C. Some pharmacokinetic aspects of the lipophilic terfenadine and zwitterionic fexofenadine in humans. *Drugs R D.* 2007; 8(5):301-14.

Chen M, Nafziger AN, Bertino JS Jr. Drug-metabolizing enzyme inhibition by ketoconazole does not reduce interindividual variability of CYP3A activity as measured by oral midazolam. *Drug Metab Dispos.* 2006; 34(12):2079-82.

Clauwaert KM, Van Bocxlaer JF, De Leenheer AP. Stability study of the designer drugs "MDA, MDMA and MDEA" in water, serum, whole blood, and urine under various storage temperatures. *Forensic Sci Int.* 2001; 124(1):36-42.

Coutant JE, Westmark PA, Nardella PA, Walter SM, Okerholm RA. Determination of terfenadine and terfenadine acid metabolite in plasma using solid-phase extraction

and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr.* 1991 Sep 18;570(1):139-48.

Crespi, CL, Penman BW. Use of cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes to study potential drug-drug interactions. *Adv. Pharmacol.* 1997; 43:171-188.

Cvetkovic M, Leake B, Fromm MF, Wilkinson GR, Kim RB. OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofénadine., *Drug Metab Dispos.* 1999; 27(8):866-71.

De Kroon IF, Langendijk PN, De Goede PN. Simultaneous determination of midazolam and its three hydroxy metabolites in human plasma by electron-capture gas chromatography without derivatization. *J Chromatogr.* 1989; 491(1):107-16.

Demange C. Interactions avec les nouveaux macrolides - New macrolides interactions. *Journal de pharmacie clinique* 1997; 16 (2) : 82-89

Drescher S, Glaeser H, Mürdter T, Hitzl M, Eichelbaum M, Fromm MF. P-glycoprotein-mediated intestinal and biliary digoxin transport in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2003; 73(3):223-31.

Drescher S, Schaeffeler E, Hitzl M, Hofmann U, Schwab M, Brinkmann U, Eichelbaum M, Fromm MF. MDR1 gene polymorphisms and disposition of the P-glycoprotein substrate fexofenadine. *Br J Clin Pharmacol.* 2002; 53(5):526-34

Driessen JJ, Vree TB, Guelen PJ. The effects of acute changes in renal function on the pharmacokinetics of midazolam during long-term infusion in ICU patients. *Acta Anaesthesiol Belg.* 1991; 42(3):149-55

Dresser GK, Bailey DG, Leake BF, Schwarz UI, Dawson PA, Freeman DJ, Kim RB. Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther.* 2003; 73(1):41-50.

Dresser GK, Kim RB, Bailey DG. Effect of grapefruit juice volume on the reduction of fexofenadine bioavailability: possible role of organic anion transporting polypeptides. *Clin Pharmacol Ther.* 2005; 77(3):170-7

Drummer OH. Methods for the measurement of benzodiazepines in biological samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998; 713(1):201-25.

Dusci LJ, Peter Hackett L, Fellows LM, Ilett KF. Determination of olanzapine in plasma by high-performance liquid chromatography using ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002; 773(2):191-7.

Eap CB, Bouchoux G, Powell Golay K, Baumann P. Determination of picogram levels of midazolam, and 1- and 4-hydroxymidazolam in human plasma by gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004; 802(2):339-45.

Ferslew KE, Hagardorn AN, McCormick WF. Postmortem determination of the biological distribution of sufentanil and midazolam after an acute intoxication. *J Forensic Sci.* 1989; 34(1):249-57.

FDA, Guidance for Industry, Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling, September 2006.

[<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072101.pdf>]

Floyd MD, Gervasini G, Masica AL, Mayo G, George AL Jr, Bhat K, Kim RB, Wilkinson GR. Genotype-phenotype associations for common CYP3A4 and CYP3A5 variants in the basal and induced metabolism of midazolam in European- and African-American men and women. *Pharmacogenetics.* 2003; 13(10):595-606

Frison G, Tedeschi L, Maietti S, Ferrara SD. Determination of midazolam in human plasma by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2001; 15(24):2497-501.

Fu I, Woolf EJ, Matuszewski BK. Determination of fexofenadine in human plasma using 96-well solid phase extraction and HPLC with tandem mass spectrometric detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2004; 35(4):837-46.

Galetin A, Ito K, Hallifax D, Houston JB. CYP3A4 substrate selection and substitution in the prediction of potential drug-drug interactions. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314(1):180-90.

Garret M, Smeraglia J, Lin X, Tan L, Tran J. A pilot study to assess simultaneous administration of oral midazolam (MDZ) and fexofenadine (FEX) for the evaluation of Cytochromes (CYP) 3A4 et p-glycoprotein (P-GP) activities. *Congress of American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics. Clin Pharmacol Ther.* 2005; 77: 45.

Gorski JC, Jones DR, Haehner-Daniels BD, Hamman MA, O'Mara EM Jr, Hall SD. The contribution of intestinal and hepatic CYP3A to the interaction between midazolam and clarithromycin. *Clin Pharmacol Ther.* 1998; 64(2):133-43.

Greenblatt DJ, Wright CE. Clinical pharmacokinetics of alprazolam. Therapeutic implications. *Clin Pharmacokinet.* 1993; 24(6):453-71.

Ha HR, Rentsch KM, Kneer J, Vonderschmitt DJ. Determination of midazolam and its alpha-hydroxy metabolite in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Ther Drug Monit.* 1993 Aug; 15(4):338-43.

Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch.* 2004; 447(5):653-65.

Hamman MA, Bruce MA, Haehner-Daniels BD, Hall SD. The effect of rifampin administration on the disposition of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69(3):114-21

- Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins Introduction. *Pflugers Arch.* 2004; 447(5):465-8.
- Heizmann P, Eckert M, Ziegler WH. Pharmacokinetics and bioavailability of midazolam in man. *Br J Clin Pharmacol.* 1983; 16 Suppl 1:43S-49S.
- Heller S, Hiemke C, Stroba G, Rieger-Gies A, Daum-Kreysch E, Sachse J, Härtter S. Assessment of storage and transport stability of new antidepressant and antipsychotic drugs for a nationwide TDM service. *Ther Drug Monit.* 200; 26(4):459-61.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johné A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(7):3473-8.
- Holmgren P, Druid H, Holmgren A, Ahlner J. Stability of drugs in stored postmortem femoral blood and vitreous humor. *J Forensic Sci.* 2004; 49(4):820-5.
- Huang W, Lin YS, McConn DJ 2nd, Calamia JC, Totah RA, Isoherranen N, Glodowski M, Thummel KE. Evidence of significant contribution from CYP3A5 to hepatic drug metabolism. *Drug Metab Dispos.* 2004; 32(12):1434-45.
- Hubert P, N'guyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C et Valat L. Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches Rapport d'une Commission SFSTP. *STP Pharma Pratiques.* 2003; 13(3):101-138.
- Hubert P, N'guyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C et Valat L. Validation des procédures analytiques quantitatives. Harmonisation des démarches. Partie II – Statistiques. *STP Pharma Pratiques.* 2006 (A); 16(1): 28 – 58 .
- Hubert P, N'guyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C et Valat L. Validation des procédures analytiques quantitatives. Harmonisation des démarches. Partie III – Exemples d'application . *STP Pharma Pratiques.* 2006 (B); 16(2): 87 – 121.
- Ito K, Ogihara K, Kanamitsu S, Itoh T. Prediction of the in vivo interaction between midazolam and macrolides based on in vitro studies using human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 2003; 31(7):945-54.
- Ito K, Suzuki H, Horie T, Sugiyama Y. Apical/basolateral surface expression of drug transporters and its role in vectorial drug transport. *Pharm Res.* 2005; 22(10):1559-77.

Ito S, Nasu R, Tsujimoto M, Murakami H, Ohtani H, Sawada Y. Effect of macrolide antibiotics on uptake of digoxin into rat liver. *Biopharm Drug Dispos.* 2007; 28(3):113-23.

Jacobson TA. Comparative pharmacokinetic interaction profiles of pravastatin, simvastatin, and atorvastatin when coadministered with cytochrome P450 inhibitors. *Am J Cardiol.* 2004; 94(9):1140-6.

Jerdi MC, Daali Y, Oestreicher MK, Cherkaoui S, Dayer P. A simplified analytical method for a phenotyping cocktail of major CYP450 biotransformation routes. *J Pharm Biomed Anal.* 2004; 35(5):1203-12.

Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976; 455(1):152-62.

Jurica J, Dostálek M, Konečný J, Glatz Z, Hadasová E, Tomandl J. HPLC determination of midazolam and its three hydroxy metabolites in perfusion medium and plasma from rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 852(1-2):571-7.

Katoh M, Nakajima M, Yamazaki H, Yokoi T. Inhibitory effects of CYP3A4 substrates and their metabolites on P-glycoprotein-mediated transport. *Eur J Pharm Sci.* 2001; 12(4):505-13.

Kazakevich Y and LoBrutto R. Reserved-Phase HPLC. In : *HPLC for Pharmaceutical Scientists.* Ed. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey 2007; pp 1-22, 139-228.

Kharasch ED, Walker A, Hoffer C, Sheffels P. Evaluation of first-pass cytochrome P4503A (CYP3A) and P-glycoprotein activities using alfentanil and fexofenadine in combination. *J Clin Pharmacol.* 2005; 45(1):79-88.

Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG, Wilkinson GR. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 70(2):189-99.

Kirby B, Kharasch ED, Thummel KT, Narang VS, Hoffer CJ, Unadkat JD. Simultaneous measurement of in vivo P-glycoprotein and cytochrome P450 3A activities. *J Clin Pharmacol.* 2006; 46(11):1313-9.

Koopmans R, Dingemans J, Danhof M, Horsten GP, van Boxtel CJ. The influence of dosage time of midazolam on its pharmacokinetics and effects in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 1991; 50(1):16-24.

Kratzsch C, Tenberken O, Peters FT, Weber AA, Kraemer T, Maurer HH. Screening, library-assisted identification and validated quantification of 23 benzodiazepines, flumazenil, zaleplone, zolpidem and zopiclone in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J Mass Spectrom.* 2004; 39(8):856-72.

- Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; 27:383-91.
- Kuhn F, Oehme M, Schleimer M. Performance and reliability of splitless microliter gradient pumps in a metabolic stability study using cytochrome P450/3A4 and capillary liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2003;1018(2):203-12
- Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ, Hagenbuch B. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology*. 2001; 120(2):525-33.
- Kumar A, Mann HJ, Rimmel RP. Simultaneous analysis of cytochrome P450 probes-dextromethorphan, flurbiprofen and midazolam and their major metabolites by HPLC-mass-spectrometry/fluorescence after single-step extraction from plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007; 853(1-2):287-93.
- Kurata Y, Ieiri I, Kimura M, Morita T, Irie S, Urae A, Ohdo S, Ohtani H, Sawada Y, Higuchi S, Otsubo K. Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther*. 2002; 72(2):209-19
- Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv. Drug Deliv*. 2002; 54: 1271–1294.
- Lauber R, Mosimann M, Bühler M, Zbinden AM. Automated determination of midazolam in human plasma by high-performance liquid chromatography using column switching. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1994; 654(1):69-75.
- Lavit M, Houin G. Concidérations pré-analytiques pour le dosage des médicaments. *Revue Française des laboratoires*. 1999; 317 : 83-88.
- Lee SJ, et al. Genetic findings and functional studies of human CYP3A5 single nucleotide polymorphisms in different ethnic groups. *Pharmacogenetics* 2003; 13:461-72.
- Levine BS, Smith ML, Froede RC. Postmortem forensic toxicology. *Clin Lab Med*. 1990; 10(3):571-89.
- Li AP. Primary hepatocyte cultures as an in vitro experimental system for the evaluation of pharmacokinetic drug-drug interactions. *Adv. Pharmacol*. 1997; 43:103-130.
- Lindsay L, Dobkin JF, Wang TC, Butler VP Jr, Saha JR, Lindenbaum J. Digoxin inactivation by the gut flora in infancy and childhood. *Pediatrics*. 1987; 79(4):544-8
- Lin JH, Lu AY. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 1998; 35(5):361-90.

- Link B, Haschke M, Wenk M, Krähenbühl S. Determination of midazolam and its hydroxy metabolites in human plasma and oral fluid by liquid chromatography/electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007; 21(9):1531-40.
- Lin SN, Andrenyak DM, Moody DE, Foltz RL. Enantioselective gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry for methylphenidate in human plasma. *J Anal Toxicol.* 1999 Oct;23(6):524-30.
- Lippert C, Ling J, Brown P et al. Mass balance and pharmacokinetics of fexofenadine HCl in healthy, male volunteers. *Pharm. Res.* 1995; 12:8253.
- Ling V. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1997; 40 Suppl: S3-8.
- Ma F, Lau CE. Determination of midazolam and its metabolites in serum microsomes by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetics in rats. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996; 682(1):109-13.
- McEvoy GK (ed), *AHFS Drug Information.* [online] Bethesda, MD: American Society of Health-System Pharmacists
<<http://www.medicinescomplete.com/>> (Accessed on [December 2008]).
- Mastey V, Panneton AC, Donati F, Varin F. Determination of midazolam and two of its metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1994; 655(2):305-10.
- Matsushima S, Maeda K, Hayashi H, Debori Y, Schinkel AH, Schuetz JD, Kusunoha H, Sugiyama Y. Involvement of multiple efflux transporters in hepatic disposition of fexofenadine. *Mol Pharmacol.* 2008; 73(5):1474-83.
- Mayhew BS, Jones DR, Hall SD. An in vitro model for predicting in vivo inhibition of cytochrome P450 3A4 by metabolic intermediate complex formation. *Drug Metab Dispos.* 2000; 28(9):1031-7.
- Mee RW. β -expectation and β -content tolerance limits for balanced one-way ANOVA random model. *Technometrics* 26, 1984; 251-254.
- McKinnon RA & Nebert DW. Cytochrome P450 knockout mice: New toxicological models. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1998; 25:783-787.
- Mikkaichi T, Suzuki T, Tanemoto M, Ito S, Abe T. The organic anion transporter (OATP) family. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2004; 19(3):171-9.
- Milne RW, Larsen LA, Jørgensen KL, Bastlund J, Stretch GR, Evans AM. Hepatic disposition of fexofenadine: influence of the transport inhibitors erythromycin and dibromosulphothalein. *Pharm Res.* 2000; 17(12):1511-5.
- Miura M, Uno T, Tateishi T, Suzuki T. Pharmacokinetics of fexofenadine enantiomers in healthy subjects. *Chirality.* 2007; 19(3):223-7.

- Nawarskas JJ, McCarthy DM, Spinler SA. Digoxin toxicity secondary to clarithromycin therapy. *Ann Pharmacother.* 1997; 31(7-8):864-6.
- Noé B, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ. Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(19):10346-50.
- Nozawa T, Imai K, Nezu J, Tsuji A, Tamai I. Functional characterization of pH-sensitive organic anion transporting polypeptide OATP-B in human. *Clin Pharmacol Ther.* 2003; 74(5):423-36
- Nirogi RV, Kandikere VN, Shukla M, Mudigonda K, Maurya S, Komarneni P. Quantification of fexofenadine in human plasma by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry using mosapride as internal standard. *Biomed Chromatogr.* 2007; 21(2):209-16.
- Oda Y, Mizutani K, Hase I, Nakamoto T, Hamaoka N, Asada A. Fentanyl inhibits metabolism of midazolam: competitive inhibition of CYP3A4 in vitro. *Br J Anaesth.* 1999; 82(6):900-3.
- Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC. The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab. Dispos.* 2006; 34:880–886.
- Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, Perkins JD, and Thummel KE Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 283:1552–1562.
- Pathak SM, Kumar AR, Musmade P, Udupa N. A simple and rapid high performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the estimation of fexofenadine in rat plasma--application to preclinical pharmacokinetic. *Talanta.* 2008; 76(2):338-46.
- Patki KC, Von Moltke LL, Greenblatt DJ. In vitro metabolism of midazolam, triazolam, nifedipine, and testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochromes p450: role of cyp3a4 and cyp3a5. *Drug Metab Dispos.* 2003; 31(7):938-44.
- Pecking M, Montestruc F, Marquet P, Wodey E, Homery MC, Dostert P. Absolute bioavailability of midazolam after subcutaneous administration to healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 2002; 54(4):357-62.
- Perloff MD, Von Moltke LL, Greenblatt DJ. Differential metabolism of midazolam in mouse liver and intestine microsomes: a comparison of cytochrome P450 activity and expression. *Xenobiotica.* 2003; 33(4):365-77.
- Periti P, Mazzei T, Mini E, Novelli A. Pharmacokinetic drug interactions of macrolides. *Clin Pharmacokinet.* 1992; 23(2):106-31.
- Peters DH, Clissold SP. Clarithromycin. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential. *Drugs.* 1992; 44(1):117-64.

- Peters FT. Stability of analytes in biosamples - an important issue in clinical and forensic toxicology? *Anal Bioanal Chem.* 2007; 388(7):1505-19.
- Pinto AG, Wang YH, Chalasani N, Skaar T, Kolwankar D, Gorski JC, Liangpunsakul S, Hamman MA, Arefayene M, Hall SD. Inhibition of human intestinal wall metabolism by macrolide antibiotics: effect of clarithromycin on cytochrome P450 3A4/5 activity and expression. *Clin Pharmacol Ther.* 2005; 77(3):178-88.
- Plebani M. and Carraro P. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. *Clinical Chemistry* 1997;43(8):1348-1351.
- Polli JW, Wring SA, Humphreys JE, Huang L, Morgan JB, Webster LO, Serabjit-Singh CS. Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 299(2):620-8.
- Puglisi CV, Pao J, Ferrara FJ, de Silva JA. Determination of midazolam (Versed) and its metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1985; 344(8):199-209.
- Putnam WS, Ramanathan S, Pan L, Takahashi LH, Benet LZ. Functional characterization of monocarboxylic acid, large neutral amino acid, bile acid and peptide transporters, and P-glycoprotein in MDCK and Caco-2 cells. *J Pharm Sci.* 2002; 91(12):2622-35.
- Quinney SK, Haehner BD, Rhoades MB, Lin Z, Gorski JC, Hall SD. Interaction between midazolam and clarithromycin in the elderly. *Br J Clin Pharmacol.* 2008; 65(1):98-109.
- Radhakrishna T, Om Reddy G. Simultaneous determination of fexofenadine and its related compounds by HPLC. *J Pharm Biomed Anal.* 2002; 29(4):681-90.
- Ramenskaya GV, Skuridina EA, Krasnykh LM. Developing a method for the quantitative determination of the P-glycoprotein activity marker fexofenadine in blood plasma. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2006; 40(12): 686-689.
- Ramos L, Bakhtiar R, Majumdar T, Hayes M, Tse F. Liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry enantiomeric separation of dl-threo-methylphenidate, (Ritalin) using a macrocyclic antibiotic as the chiral selector. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1999; 13(20):2054-62.
- Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab.* 2002; 34:83-448.
- Robbins DK, Castles MA, Pack DJ, Bhargava VO, Weir SJ. Dose proportionality and comparison of single and multiple dose pharmacokinetics of fexofenadine (MDL 16455) and its enantiomers in healthy male volunteers. *Biopharm Drug Dispos.* 1998; 19(7):455-63.

- Rodrigues AD, Wong SL. Application of human liver microsomes in metabolism-based drug drug interactions. *Adv. Pharmacol.* 1997(A); 43: 65-101.
- Rodrigues AD, Roberts EM, Mulford DJ, Yao Y, Ouellet D. Oxidative metabolism of clarithromycin in the presence of human liver microsomes. Major role for the cytochrome P4503A (CYP3A) subfamily. *Drug Metab Dispos.* 1997 (B); 25(5):623-30.
- Rosenberg MF, Kamis AB, Callaghan R, Higgins CF, Ford RC. Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding. *J Biol Chem* 2003; 278: 8294-9.
- Rubio F, Miwa BJ, Garland WA. Determination of midazolam and two metabolites of midazolam in human plasma by gas chromatography--negative chemical-ionization mass spectrometry. *J Chromatogr.* 1982; 233:157-65.
- Russell T, Stoltz M, Weir S. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerance of single- and multiple-dose fexofenadine hydrochloride in healthy male volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* 1998; 64(6):612-21.
- Rouessac F, *Analyse Chimique : Méthodes Et Techniques Instrumentales Modernes - Cours Et Exercices Résolus*, 5ème édition, Masson, 2002; pp 1-3, 55-74.
- Sai Y, Kaneko Y, Ito S, Mitsuoka K, Kato Y, Tamai I, Artursson P, Tsuji A. Predominant contribution of organic anion transporting polypeptide OATP-B (OATP2B1) to apical uptake of estrone-3-sulfate by human intestinal Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos.* 2006; 34(8):1423-31.
- Sano T, Sato K, Kurihara R, Mizuno Y, Kojima T, Yamakawa Y, Yamada T, Ishii A, Katsumata Y. Sensitive determination of midazolam and identification of its two metabolites in human body fluids by column-switching capillary high-performance liquid chromatography/fast atom bombardment-mass spectrometry. *Leg Med* .2001; 3(3):149-56.
- Sautou V, Chopineau J, Terrisse MP, Bastide P. Solid-phase extraction of midazolam and two of its metabolites from plasma for high-performance liquid chromatographic analysis. *J Chromatogr.* 1991; 571(1-2):298-304.
- Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003; 55(1):3-29.
- Schmith VD, Cox SR, Zemaitis MA, Kroboth PD. New high-performance liquid chromatographic method for the determination of alprazolam and its metabolites in serum: instability of 4-hydroxyalprazolam. *J Chromatogr.* 1991; 568(1):253-60.
- Schütz H. [Analytic data of the new benzodiazepine derivative midazolam (Dormicum) and its metabolites], *Z Rechtsmed.* 1985;94(3):197-205.

Schwarz UI, Gramatté T, Krappweis J, Oertel R, Kirch W. P-glycoprotein inhibitor erythromycin increases oral bioavailability of talinolol in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2000; 38(4):161-7.

Shimizu M, Uno T, Sugawara K, Tateishi T. Effects of single and multiple doses of itraconazole on the pharmacokinetics of fexofenadine, a substrate of P-glycoprotein. *Br J Clin Pharmacol.* 2006; 62(3):372-6.

Shimizu M, Uno T, Sugawara K, Tateishi T. Effects of single and multiple doses of itraconazole on the pharmacokinetics of fexofenadine, a substrate of P-glycoprotein. *Br J Clin Pharmacol.* 2006; 62(3):372-6.

Shon JH, Yoon YR, Hong WS, Nguyen PM, Lee SS, Choi YG, Cha IJ, Shin JG. Effect of itraconazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of fexofenadine in relation to the MDR1 genetic polymorphism. *Clin Pharmacol Ther.* 2005; 78(2):191-201.

Shiran MR, Gregory A, Rostami-Hodjegan A, Tucker GT, Lennard MS. Determination of midazolam and 1'-hydroxymidazolam by liquid chromatography-mass spectrometry in plasma of patients undergoing methadone maintenance treatment. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; 783(1):303-7

Simpson K, Jarvis B. Fexofenadine: a review of its use in the management of seasonal allergic rhinitis and chronic idiopathic urticaria. *Drugs.* 2000; 59(2):301-21.

Smith MT, Eadie MJ, Brophy TO. The pharmacokinetics of midazolam in man. *Eur J Clin Pharmacol.* 1981; 19(4):271-8.

Streetman DS, Kashuba AD, Bertino JS Jr, Kulawy R, Rocci ML Jr, Nafziger AN. Use of midazolam urinary metabolic ratios for cytochrome P450 3A (CYP3A) phenotyping. *Pharmacogenetics.* 2001; 11(4):349-55.

Streetman DS, Bertino JS Jr, Nafziger AN. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics.* 2000; 10(3):187-216.

Sun J, He ZG, Cheng G, Wang SJ, Hao XH, Zou MJ. Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. *Med Sci Monit.* 2004; 10(1):RA5-14.

Surapaneni S, Khalil SKW. A Sensitive HPLC Method for the Determination of Terfenadine and Its Metabolite in Human Plasma. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.* 1994; 17 (11) :2419 – 2428.

Tannergren C, Petri N, Knutson L, Hedeland M, Bondesson U, Lennernäs H. Multiple transport mechanisms involved in the intestinal absorption and first-pass extraction of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther.* 2003; 74(5):423-36.

Thummel KE, O'Shea D, Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Perkins JD, Wilkinson GR. Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 1996; 59(5):491-502.

Thummel KE, Wilkinson GR. In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998; 38:389-430.

Tian X, Zamek-Gliszczynski MJ, Li J, Bridges AS, Nezasa K, Patel NJ, Raub TJ, Brouwer KL. Multidrug resistance-associated protein 2 is primarily responsible for the biliary excretion of fexofenadine in mice. *Drug Metab Dispos.* 2008; 36(1):61-4.

Tsunoda SM, Velez RL, von Moltke LL, Greenblatt DJ. Differentiation of intestinal and hepatic cytochrome P450 3A activity with use of midazolam as an in vivo probe: effect of ketoconazole. *Clin Pharmacol Ther.* 1999; 66(5):461-71.

Uchida S, Yamada H, Li XD, Maruyama S, Ohmori Y, Oki T, Watanabe H, Umegaki K, Ohashi K, Yamada S. Effects of Ginkgo biloba extract on pharmacokinetics and pharmacodynamics of tolbutamide and midazolam in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2006; 46(11):1290-8.

Uno T, Yasui-Furukori N, Takahata T, Sugawara K, Tateishi T. Liquid chromatographic determination of fexofenadine in human plasma with fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2004; 35(4):937-42.

Van Bambeke F, Verhaegen J, Tyteca D, Auckenthaler R, Tulkens PM. Erythromycine et néomacrolides actuels, usages cliniques et perspectives : Maladies infectieuses - Erythromycin and current neomacrolides: clinical uses and perspectives. *Médecine et hygiène.* 2001; 59(2369): 2316-2323.

Wacher VJ, Wu CY, Benet LZ. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol Carcinog.* 1995; 13(3):129-34.

Wakasugi H, Yano I, Ito T, Hashida T, Futami T, Nohara R, Sasayama S, Inui K. Effect of clarithromycin on renal excretion of digoxin: interaction with P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther.* 1998; 64(1):123-8.

Wandel C, Witte JS, Hall JM, Stein CM, Wood AJ, Wilkinson GR. CYP3A activity in African American and European American men: population differences and functional effect of the CYP3A4*1B5'-promoter region polymorphism. *Clin Pharmacol Ther.* 2000; 68(1):82-91.

Wang Z, Gorski JC, Hamman MA, Huang SM, Lesko LJ, Hall SD. The effects of St John's wort (*Hypericum perforatum*) on human cytochrome P450 activity. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 70(4):317-26.

Wang Z, Hamman MA, Huang SM, Lesko LJ, Hall SD. Effect of St John's wort on the pharmacokinetics of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther.* 2002; 71(6):414-20.

Wang JS, Wen X, Backman JT, Taavitsainen P, Neuvonen PJ, Kivistö KT. Midazolam alpha-hydroxylation by human liver microsomes in vitro: inhibition by calcium channel blockers, itraconazole and ketoconazole. *Pharmacol Toxicol.* 1999; 85(4):157-61.

Westphal JF, Macrolide – induced clinically relevant drug interactions with cytochrome P-450A (CYP) 3A4: an update focused on clarithromycin, azithromycin and dirithromycin. *British Journal of Clinical Pharmacology.* 2000; 50 (4): 285–295.

Wilkinson GR, Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med.* 2005; 352: 2211–2221

Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, Hamman MA, Hall SD, Wrighton SA. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos.* 2002; 30(8):883-91.

Witte DL, VanNess SA, Angstadt DS, Pennell BJ. Errors, mistakes, blunders, outliers, or unacceptable results : how many? *Clinical Chemistry.* 1997; 43(8): 1352-1356.

Yasui-Furukori N, Inoue Y, Tateishi T. Sensitive determination of midazolam and 1'-hydroxymidazolam in plasma by liquid-liquid extraction and column-switching liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection and its application for measuring CYP3A activity. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004; 811(2):153-7.

Yasui-Furukori N, Uno T, Sugawara K, Tateishi T. Different effects of three transporting inhibitors, verapamil, cimetidine, and probenecid, on fexofenadine pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.* 2005; 77(1):17-23.

Yamane N, Tozuka Z, Sugiyama Y, Tanimoto T, Yamazaki A, Kumagai Y. Microdose clinical trial: quantitative determination of fexofenadine in human plasma using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 858(1-2):118-28.

Yuan R, Flockhart DA, Balian JD. Pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences of metabolism-based drug interactions with alprazolam, midazolam, and triazolam. *J Clin Pharmacol.* 1999; 39(11):1109-25.

Yeates RA, Laufen H, Zimmermann T, Schumacher T. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction study between midazolam and the macrolide antibiotics, erythromycin, clarithromycin, and the azalide azithromycin. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1997; 35(12):577-9.

Yee S, Day WW, Application of Caco-2 cells in drug discovery and development. In "Handbook of Drug Metabolism" (T.F. Woolf ed.,1999), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 507-522.

Zhang Y, Benet LZ, The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin Pharmacokinet.* 2001; 40(3):159-68.

Zhang W, Tan TM, Lim LY. Impact of curcumin-induced changes in P-glycoprotein and CYP3A expression on the pharmacokinetics of peroral celirolol and midazolam in rats. *Drug Metab Dispos.* 2007; 35(1):110-5.

Zhou Z, Li X, Li K, Xie Z, Cheng Z, Peng W, Wang F, Zhu R, Li H. Simultaneous determination of clozapine, olanzapine, risperidone and quetiapine in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004; 802(2):257-62.

Xie HG, Wood AJ, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics.* 2004; 5:243-272.

Xu H, Rashkow A. Clarithromycin-induced digoxin toxicity: a case report and a review of the literature. *Conn Med.* 2001; 65(9):527-9.

Annexe I

Définitions

Analyte est l'objet de la procédure d'analyse; une substance recherchée ou déterminée dans l'échantillon.

Matrice est un ensemble des constituants de l'échantillon autre que l'analyte. Certains entre ces constituants, des interférences, peuvent causer des erreurs en augmentant ou en diminuant la grandeur mesurée par l'analyse.

Échantillons sont des portions de matériau (matrice et analyte) qui sont approximativement égales et qui subissent simultanément le même traitement analytique.

Standards d'étalonnage

Aussi appelés standards de calibration, les standards d'étalonnage sont des échantillons avec matrices de concentrations connues en analyte qui permettent d'établir les points de la courbe d'étalonnage.

Courbe d'étalonnage est une courbe décrivant, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation expérimentale existante entre la réponse (absorbance de la lumière, fluorescence, *etc.*) et la concentration en analyte dans l'échantillon. La courbe d'étalonnage est utilisée pour calculer la concentration inconnue en analyte dans l'échantillon analysé.

Standards de validation et échantillons de contrôle de qualité

Les standards de validation doivent être des échantillons indépendants préparés dans la matrice. Leur composition doit se rapprocher le plus possible de celle des échantillons que la procédure analytique devra quantifier et on les utilise pour valider la procédure d'analyse. Les échantillons de contrôle de qualité sont, quant à eux, préparés de la même façon que les standards de validation, mais on les utilise

lors des tests de contrôle de la qualité effectués de routine.

Blanc est un échantillon qui ne contient pas la substance à analyser. Celui-ci doit être traité et analysé exactement de la même façon que le sont les autres échantillons. Le blanc est utilisé pour exercer une surveillance de la sélectivité ou de la spécificité de la méthode analytique (Hubert *et al.*, 2003; Skoog *et al.*, 1997)

Annexe II

Calculs pour la construction du profil d'exactitude

1. Calcul de la justesse et de la fidélité

1.1. Fidélité

Modèle statistique :

$$X_{ijk} = \mu_j + \alpha_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

où X_{ijk} est la k-ème concentration du niveau j de la i-ème série,

μ_j est la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration j,

α_{ij} est, au niveau j, l'écart entre la moyenne de la i-ème série et la moyenne (variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance inter-série $\sigma_{B,j}^2$) et

ε_{ijk} est l'erreur expérimentale (supposée indépendante de la série; variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance intra-série $\sigma_{W,j}^2$).

Estimation des paramètres du modèle à chaque niveau de concentration j :

$$\text{Estimation de la } \mu_j : \quad \hat{\mu}_j = \frac{1}{\sum_{i=1}^p n_{ij}} \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^{n_{ij}} x_{ijk,calc}$$

$$\text{Estimation de la } \sigma_{B,j}^2 : \quad MSM_j = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p n_{ij} (\bar{x}_{ij,calc} - \bar{x}_{j,calc})^2$$

$$\text{Estimation de la } \sigma_{W,j}^2 : \quad MSE_j = \frac{1}{\sum_{i=1}^p n_{ij} - p} \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^{n_{ij}} (x_{ijk,calc} - \bar{x}_{ij,calc})^2$$

Si $MSM_j < MSE_j$, alors :

$$\hat{\sigma}_{W,j}^2 = MSE_j$$

$$\hat{\sigma}_{B,j}^2 = \frac{MSM_j - MSE_j}{n}$$

Si $MSM_j \geq MSE_j$, alors :

$$\hat{\sigma}_{W,j}^2 = \frac{1}{pn-1} \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^k (x_{ijk} - \bar{x}_{j,calc})^2$$

$$\hat{\sigma}_{B,j}^2 = 0$$

1.2. Justesse

$$\text{Biais}_j(\%) = 100 \times \frac{\hat{\mu}_j}{\bar{x}_j}$$

2. Calcul des bornes de l'intervalle de tolérance (L_j et U_j) pour chaque niveau de concentration

$$L_j = \text{biais}(\%)_j - Q_t\left(\nu; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} CV_{F.I.,j} \quad \text{Limite basse de tolérance}$$

$$U_j = \text{biais}(\%)_j + Q_t\left(\nu; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} CV_{F.I.,j} \quad \text{Limite haut de tolérance}$$

où

$$\hat{\sigma}_{F.I.,j}^2 = \hat{\sigma}_{w,j}^2 + \hat{\sigma}_{B,j}^2$$

$$R_j = \frac{\hat{\sigma}_{B,j}^2}{\hat{\sigma}_{w,j}^2}$$

$$B_j = \sqrt{\frac{R_j + 1}{nR_j + 1}}$$

$$\nu = \frac{(R+1)^2}{\left(R + \frac{1}{n}\right)^2 + \frac{1-\frac{1}{n}}{p-1}}$$

$$Q_t\left(\nu; \frac{1+\beta}{2}\right) - \text{le quantile } \beta \text{ de la distribution t de Student à } \nu \text{ degrés de liberté}$$