

THESE

94 / TOU3 / 128

présentée devant

L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE (SCIENCES)

en vue de l'obtention du Doctorat de l'Université Paul Sabatier
Spécialité : PHARMACOCINETIQUE

présentée et soutenue publiquement le 29 juin 1994

par

Maria-Bernadete DE SOUZA MAIA



ETUDE DE LA LIAISON DES MEDICAMENTS AUX PROTEINES CIRCULANTES PAR LA METHODE DU POINT D'ANNULATION EN SPECTROPHOTOMETRIE DERIVEE ET MICRODIALYSE

JURY

M. le Professeur G. HOUIN	Président
M. le Docteur J. BARRE	Assesseur, Rapporteur
M. le Professeur P. LEVILLAIN	Assesseur, Rapporteur
M. le Professeur J. OUSTRIN	Assesseur
M. le Docteur M. ALVINERIE	Assesseur

Travail réalisé à l'Unité de Pharmacocinétique Clinique – Centre Hospitalier Universitaire de PURPAN
31059 TOULOUSE CEDEX et le Laboratoire de Pharmacologie-Pharmacocinétique,
Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Paul Sabatier,
Chef de Service, Professeur G. HOUIN - TOULOUSE, FRANCE

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I: ETUDE DE LA FIXATION PROTEIQUE DE LA MITOXANTRONE PAR SPECTROPHOTOMETRIE DERIVEE ET ULTRAFILTRATION	
INTRODUCTION	4
REVUE DE LA LITTERATURE	
1 - Fixation des médicaments aux protéines plasmatiques: intérêt et importance dans les études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques.	6
2 - Principales protéines fixatrices de médicaments	9
2.1 - Sérum albumine humaine	9
2.2 - Alpha-1-glycoprotéine acide	10
3 - Méthodes d'études de la fixation des médicaments aux protéines plasmatiques	11
3.1 - Généralités, principes et inconvénients	11
4 - Rappel sur les deux méthodes retenues dans cette étude	15
4.1 - Dialyse à l'équilibre	15
4.1.1 - Principe, avantages et inconvénients	15
4.2 - Ultrafiltration	19
4.2.1 - Principe, avantages et inconvénients	19
5 - Méthode du point d'annulation en spectrophotométrie dérivée	22
5.1 - Définition	22
5.2 - Fondements théoriques	22
5.3 - Choix des conditions optimales de dérivation	26
5.3.1 - Choix de l'ordre de la dérivée	26
5.3.2 - Choix de la fenêtre de lissage	26
5.4 - Innovation de la spectrophotométrie dérivée par rapport à la spectrophotométrie classique	28
5.5 - Développement et domaines d'applications de la spectrophotométrie dérivée	29
5.6 - Application à l'étude de la fixation protéique des médicaments	30

5.6.1 - Avantages et inconvénients	33
6 - Rappel sur les propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques de la mitoxantrone	35

MATERIELS ET METHODES

1 - Identification du produit	41
2 - Réactifs	41
2.1 - La mitoxantrone	41
2.2 - La sérum albumine humaine (HSA)	41
2.3 - L'alpha-1-glycoprotéine (AAG)	41
2.4 - Le plasma humain	41
3 - Etude de la fixation de la mitoxantrone par spectrophotométrie dérivée	42
3.1 - Appareillage	42
3.2 - Procédures	42
3.2.1 - Spectre d'ordre zéro	42
3.2.2 - Gammes d'étalonnages	42
3.2.2.1 - Forme libre	43
3.2.2.2 - Forme liée aux protéines plasmatiques	43
3.2.2.3 - Forme liée à l'HSA	43
3.2.2.4 - Forme liée à l'AAG	43
3.2.3 - Fixation de la mitoxantrone aux protéines plasmatiques	44
3.2.4 - Fixation de la mitoxantrone à l'HSA	44
3.2.5 - Fixation de la mitoxantrone à l'AAG	44
3.2.6 - Calcul des formes libre et liée en mélange	45
4 - Etude de la fixation de la mitoxantrone par dialyse à l'équilibre	46
4.1 - Appareillage	46
4.2 - Dialyse à l'équilibre: Cinétique d'équilibre	46
4.2.1 - Calcul du pourcentage de la fraction liée de la mitoxantrone	47
5 - Essais de stabilité	47
6 - Etude de la fixation de la mitoxantrone par ultrafiltration	48
6.1 - Calcul du pourcentage de la fraction liée de la mitoxantrone	49

7 - Méthode de dosage de la mitoxantrone dans les dialysats et les ultrafiltrats	50
7.1 - Préparation des gammes d'étalonnage	51
7.2 - Appareillage HPLC	52
7.3 - Conditions chromatographiques	52
7.4 - Autre matériel	52
8 - Analyses statistiques	53

RESULTATS

1 - Spectrophotométrie dérivée	55
1.1 - Spectre d'absorption de la mitoxantrone	55
1.2 - Courbes d'étalonnage	55
1.3 - Calcul des formes libre et liée de la mitoxantrone aux protéines plasmatiques	57
1.3.1 - Caractéristiques de la fixation	59
1.4 - Calcul des formes libre et liée de la mitoxantrone à l'HSA	59
1.4.1 - Caractéristiques de la fixation	60
1.5 - Calcul des formes libre et liée de la mitoxantrone à l'AAG	61
1.5.1 - Caractéristiques de la fixation	63
2 - Dialyse à l'équilibre: Cinétique d'équilibre	64
3 - Essais de stabilité	65
4 - Ultrafiltration	66
4.1 - Conditions optimales d'ultrafiltration	66
4.2 - Fixation apparente non spécifique	67
4.3 - Fixation de la mitoxantrone aux protéines plasmatiques	68
4.4 - Fixation de la mitoxantrone à l'HSA	69
4.5 - Fixation de la mitoxantrone à l'AAG	70
5 - Méthode de dosage de la mitoxantrone dans les dialysats et les ultrafiltrats	74
5.1 - Rendement d'extraction	74
5.2 - Précision et justesse	74

5.3 - Linéarité	75
5.4 - Temps de rétention	75
DISCUSSION	77
CONCLUSION	86
 CHAPITRE II: ETUDE DE LA FIXATION PROTEIQUE DU METHOTREXATE IN VIVO ET IN VITRO PAR MICRODIALYSE	
INTRODUCTION	88
REVUE DE LA LITTERATURE	90
1 - Microdialyse	90
1.1 - Définition	90
1.2 - Historique	90
1.3 - Principes de base	92
1.4 - Méthodes pour la calibration et estimation des concentrations extracellulaires de composants exogènes et endogènes par microdialyse	95
1.5 - Microdialyse dans les études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques	99
2 - Rappel sur les propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques du méthotrexate	103
MATERIELS ET METHODES	
1 - Identification du produit	107
2 - Réactifs	107
2.1 - Le méthotrexate	107
2.2 - Le plasma de rat	107
2.3 - Les animaux	107
2.4 - L'HSA et le plasma humain	107
3 - Etude de la fixation protéique du méthotrexate par microdialyse	108
3.1 - Appareillage	108
3.1.1 - Sondes de microdialyse	108
3.1.2 - Pompes de perfusion	108

3.2 - Procédures	108
3.2.1 - Microdialyse in vitro	108
3.2.1.1 - Fixation du méthotrexate à l'HSA et aux protéines plasmatiques humaines.	108
A) Calibration de la sonde de microdialyse	109
B) Estimation de la concentration de méthotrexate libre dans le plasma et dans la solution d'HSA	110
3.2.1.2 - Fixation du méthotrexate aux protéines plasmatiques du rat.	111
A) Calibration de la sonde de microdialyse	112
B) Estimation de la concentration de méthotrexate libre dans du plasma de Rat	113
3.2.2 - Microdialyse in vivo	113
3.2.2.1- Fixation du méthotrexate aux protéines plasmatiques chez le Rat.	113
A) Implantation et calibration de la sonde de microdialyse	114
B) Estimation de la concentration plasmatique de méthotrexate libre chez le Rat	115
3.2.2.2 - Estimation des paramètres pharmacocinétiques du méthotrexate libre et total.	116
3.3 - Analyse des dialysats	116
4 - Analyses statistiques	117
RESULTATS	
1 - Microdialyse in vitro	119
1.1 - Méthode "Water recovery"	119
1.2 - Méthode "No net flux"	120
1.3 - Fixation du méthotrexate aux protéines plasmatiques humaines	121
1.4 - Fixation du méthotrexate à l'HSA	122

1.5 - Fixation du méthotrexate aux protéines plasmatiques de Rat	123
1.5.1 - Rendement de la membrane de dialyse	123
2 - Microdialyse in vivo	125
2.1 - Estimation du rendement de la membrane de dialyse et de la concentration plasmatique libre du méthotrexate par rétrodialyse.	125
2.2 - Pourcentage de fixation du méthotrexate aux protéines plasmatique du Rat in vivo en fonction du temps.	129
DISCUSSION	132
CONCLUSION	145
CONCLUSIONS GENERALES	147
BIBLIOGRAPHIE	150

ETUDE DE LA LIAISON DES MEDICAMENTS AUX PROTEINES CIRCULANTES PAR LA METHODE DU POINT D'ANNULATION EN SPECTROPHOTOMETRIE DERIVEE ET MICRODIALYSE

Par

Maria Bernadete DE SOUSA MAIA

Dans une première partie nous avons comparé deux techniques d'étude de fixation des médicaments sur les protéines circulantes: la méthode du point d'annulation en spectrophotométrie dérivée, qui permet de déterminer simultanément les formes libre et liée de médicament aux protéines, sans séparation physique préalable, à partir de la différence entre leurs spectres électroniques, et l'ultrafiltration. Pour cela nous avons étudié la fixation de la mitoxantrone à la sérum albumine (600 μM), à l'alpha-1-glycoprotéine (15 μM) et aux protéines plasmatiques humaines. A partir des données obtenues par chaque méthode les modèles de fixation ont été identiques. Les paramètres de fixation, constante d'affinité, nombre de sites de fixation et pourcentage de fixation ne diffèrent pas significativement et sont comparables à ceux trouvés dans la littérature. Les résultats de cette étude suggèrent que les deux techniques sont fiables pour la détermination *in vitro* des caractéristiques de la fixation de la mitoxantrone. Cependant, en raison de sa simplicité, la méthode du point d'annulation en spectrophotométrie dérivée semble être plus appropriée pour les analyses de routine.

La deuxième partie de notre travail rapporte l'utilisation de la technique de microdialyse pour estimer la fixation du méthotrexate à la sérum albumine (600 μM) et aux protéines plasmatiques humaines (*in vitro*), aux protéines plasmatiques du rat (*in vitro et in vivo*) ainsi que pour étudier la pharmacocinétique du méthotrexate libre chez le rat. Les résultats concernant les études *in vitro* s'approchent beaucoup de ceux trouvés en utilisant l'ultrafiltration et la dialyse à l'équilibre ou la méthode du point d'annulation en spectrophotométrie dérivée. Après administration intraveineuse en bolus de 250 mg/Kg la distribution et l'élimination du méthotrexate libre suivent un modèle bi-exponentiel. Les phases alpha et beta ont une demi-vie de 12.27 ± 2.17 et 97.06 ± 27.59 minutes respectivement. Dans le profil pharmacocinétique on observe des fluctuations importantes des concentrations minimales et maximales. Par contre, à la même dose, le méthotrexate totale (libre + lié) se distribue rapidement dans le sang. La distribution et l'élimination du méthotrexate totale suivent un modèle tri-exponentiel. Aucune fluctuation du profil pharmacocinétique n'a été observée. Les temps de demi-vie des phases alpha et beta sont de 3.16 ± 1.17 et 22.53 ± 7.44 minutes. La troisième phase, gamma, dont la demi-vie est de 227.80 ± 108.87 minute peut refléter le processus entéro-hépatique du méthotrexate non observé lors qu'on utilise les concentrations libres pour établir le profil pharmacocinétique. Le pourcentage de fixation établi *in vivo* en fonction du temps pour le méthotrexate a été environ 20 % plus élevé qu'*in vitro*. Bien que de nombreux travaux soient consacrés à la fixation protéique de médicaments certains points sont encore imprécis, notamment les caractéristiques de la fixation *in vivo*. Leur meilleure connaissance devrait permettre d'améliorer l'efficacité et l'acceptabilité des médicaments et diminuer les facteurs de variabilité interindividuelle.

Mots clés: Fixation protéique, ultrafiltration, spectrophotométrie dérivée, microdialyse, mitoxantrone, méthotrexate, pharmacocinétique.