



Thèse

2003

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Stérosélectivité du métabolisme des rotamères et des sulfoxydes analysée par électrophorèse capillaire

Prost, Francine

How to cite

PROST, Francine. Stérosélectivité du métabolisme des rotamères et des sulfoxydes analysée par électrophorèse capillaire. Doctoral Thesis, 2003. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:228

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:228>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:228](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:228)

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

FACULTÉ DES SCIENCES

SECTION DE PHARMACIE

Laboratoire de chimie analytique pharmaceutique

Professeur J.-L. Veuthey

Institut de pharmacologie clinique

Université de Berne

Professeur W. Thormann

**Stéreoélectivité du métabolisme
des rotamères et des sulfoxydes analysée par
électrophorèse capillaire**

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur ès sciences,
mention sciences pharmaceutiques

par

Francine PROST

de Corcelles-Cormondrèche (NE)

Thèse N° 3472

GENÈVE

Atelier de reproduction de la Section de physique

2003

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
ABRÉVIATIONS.....	IV
RÉSUMÉ	VI
1. INTRODUCTION.....	1
1.1. STÉRÉOCHIMIE ET CHIRALITÉ	1
1.1.1. Définition de la stéréoisomérisation de substances médicamenteuses.....	1
1.1.2. Les carbones asymétriques : exemple de la méthadone	5
1.1.3. Les atropoisomères: exemple de la méthaqualone (MQ)	8
1.1.4. Les sulfoxydes : exemple de l'albendazole sulfoxyde.....	9
1.2. ASPECTS STÉRÉOCHIMIQUES DU MÉTABOLISME.....	10
1.2.1. Le métabolisme.....	10
1.2.2. Métabolisme de substances thérapeutiques chirales.....	11
1.2.3. Les enzymes hépatiques.....	12
1.3. SÉPARATION DE MOLÉCULES CHIRALES.....	14
1.3.1. Introduction.....	14
1.3.2. L'électrophorèse capillaire (CE)	15
1.3.2.1. Principes fondamentaux de l'électrophorèse capillaire	15
1.3.2.2. Les sélecteurs chiraux	20
1.3.2.3. Méthodes de détection.....	22
1.3.2.4. Évaluation des résultats	23
2. BUTS DE LA THÈSE.....	26
3. PARTIE EXPÉRIMENTALE	28
3.1. PRODUITS CHIMIQUES ET SYSTÈMES TAMPONS	28
3.2. INSTRUMENTS	29
3.3. PROVENANCE DES FLUIDES BIOLOGIQUES.....	29
3.4. INCUBATIONS IN VITRO	30
3.5. HYDROLYSES	30
3.6. MÉTHODES D'EXTRACTION	31
3.7. ÉVALUATION DES RÉSULTATS	32

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION	35
4.1. ASPECTS DU MÉTABOLISME STÉRÉOSÉLECTIF DE LA MÉPHÉNYTOÏNE ET DE LA MÉTHADONE PAR INCUBATION IN VITRO	35
4.2. ANALYSE PAR CE CHIRALE DU MÉTABOLISME STÉRÉOSÉLECTIF DE LA MÉTHAQUALONE DANS L'URINE	41
4.3. ANALYSE PAR CE CHIRALE DU MÉTABOLISME STÉRÉOSÉLECTIF DE L'ALBENDAZOLE DANS LE PLASMA.....	50
5. CONCLUSIONS	61
6. BIBLIOGRAPHIE.....	65
7. ANNEXES	70
ANNEXE 7.1	71
ANNEXE 7.2	83
ANNEXE 7.3	95
ANNEXE 7.4	106
ANNEXE 7.5	120

Remerciements

Le Professeur Wolfgang Thormann m'a donné la possibilité d'accomplir mon travail de thèse dans les laboratoires de l'Institut de Pharmacologie Clinique de l'Université de Berne. Ses idées et ses critiques amenées lors de fréquentes discussions ont été précieuses pour ce travail.

Le Professeur Jean-Luc Veuthey m'a permis de soutenir ma thèse à l'Université de Genève. Nos rencontres bisannuelles et la semaine que j'ai pu passer dans ses locaux à Genève m'ont permis de découvrir d'autres manières d'aborder la recherche.

Anita m'a initiée au laboratoire à mon arrivée. Par sa manière artistique de résoudre les difficultés, elle a toujours amené une vie, une joie extraordinaire dans le labo, et m'a même initiée au snowboard! Christian a toujours été là quand j'avais des questions et des talks à préparer, il prenait le temps de venir siroter un café pour discuter des problèmes techniques ou me poser des questions et me faire des remarques bienvenues lors de mes séances de préparation aux conférences. Andrea a tout simplement été un chou, son aide a été précieuse! Avec son tempérament italien il sait comment ne pas passer inaperçu, tout en travaillant de façon concise et précise! Son énergie et sa joie de vivre m'ont souvent motivée...

Francis a été mon directeur artistique! Sans connaître le domaine, il a accompli les corrections de manière fabuleuse, ma reconnaissance est sans limite! Et Brigitte m'a mis à disposition son mari, m'a nourrie et logée pour l'accomplissement de ce travail!

La façon dont mes parents arrivent à me guider à travers les différentes étapes de la vie a toujours été une aide précieuse, leur respect pour mes décisions me touche beaucoup. Et finalement Yargo m'a donné la force de faire ce travail. Je n'ai pas de mot pour décrire ton soutien incommensurable, je n'oublierai jamais ce que tu as fait pour moi durant cette période!

Que toutes les personnes citées ci-dessus ainsi que tous les amis qui m'ont soutenue et aidée de près ou de loin pendant ce travail de thèse soient vivement remerciés!

Francine

Abréviations

ABZ	albendazole
ABZSO	albendazole sulfoxyde
ABZSO ₂	albendazole sulfone
Sulfated β -CD	β -cyclodextrine sulfatée (sulfated β -cyclodextrin)
CAFF	caféine
CE	électrophorèse capillaire (capillary electrophoresis)
CZE	électrophorèse capillaire de zone (capillary zone electrophoresis)
CYP450	cytochrome P-450
DH	diphénhydramine
DAD	détecteur à barrette de diodes (diode array detector)
DICLO	diclofénac
DIMEB	heptakis (2,6-di-O-méthyl)- β -cyclodextrine
R-DNBPG	(R)-(-)-N-(3,5-dinitrobenzoyl)- α -phénylglycine
DR	dextrorphan
DX	dextrométhorphan
EDDP	2-éthylidène-1,5-diméthyl-3,3-diphénylpyrrolidine
EM	métaboliseur rapide (extensive metaboliser)
EOF	flux électro-osmotique (electro-osmotic flow)
FMO	flavine monooxygénase (flavine monooxygenase)
IS	standard interne (internal standard)
I.D.	diamètre interne (internal diameter)
LIF	laser induced fluorescence
HLM	microsomes hépatiques humains (human liver microsomes)
HPLC	chromatographie liquide à haute performance (high performance liquid chromatography)
LLE	extraction liquide-liquide (liquid-liquid extraction)
MECC	électrophorèse capillaire électrocinétique micellaire (micellar electrokinetic capillary chromatography)
MEPH	méphénytoïne

MET	méthadone
MQ	méthaqualone
MS	Spectrométrie de masse (mass spectrometry)
2'OH-MQ	2'-hydroxy-méthaqualone
3'OH-MQ	3'-hydroxy-méthaqualone
4'OH-MQ	4'-hydroxy-méthaqualone
2OH-MQ	2-hydroxy-méthaqualone
6OH-MQ	6-hydroxy-méthaqualone
OHP- β -CD	hydroxypropyl- β -cyclodextrine
PM	métaboliseur lent (poor metaboliser)
RSD	déviatiion standard relative (relative standard deviation)
SDS	sodium dodécyl sulfate
SPE	extraction en phase solide (solid phase extraction)
TRIMEB	(2,3,6-triméthyl)- β -cyclodextrine

Résumé

Le but de ce travail de recherche a été d'analyser par électrophorèse capillaire la stéréosélectivité du métabolisme de substances médicamenteuses chirales telles que les rotamères et les sulfoxydes ; ces analyses ont eu lieu dans divers fluides corporels, mais aussi après incubation in vitro. L'objectif était de détecter la substance mère et/ou son ou ses métabolites en une analyse afin d'obtenir l'ensemble du motif métabolique.

Le métabolisme stéréosélectif peut être suivi grâce à l'incubation in vitro d'un principe actif à l'aide de préparations contenant un cytochrome P-450 (CYP450) individuel humain ou un mélange de CYP450 provenant de microsomes hépatiques humains. L'incubation de la méphénytoïne (MEPH) avec le cytochrome CYP2C19 a permis de confirmer le métabolisme hautement stéréosélectif observé in vivo. Ces analyses de MEPH ont été faites à l'aide d'un système d'électrophorèse capillaire électrocinétique micellaire chirale composé d'une solution de phosphate/borate de pH 9 contenant 95 mM de dodécylsulfate de sodium, à laquelle sont ajoutés 40 mM de β -cyclodextrine et 8 % d'isopropanol. La méthadone (MET) a, quant à elle, été incubée avec différents CYP450, tels que le CYP3A4, le CYP2C9, le CYP2C19, le CYP2D6 et le CYP1A2, ainsi que le mélange de microsomes hépatiques. L'enzyme principale responsable de la biotransformation de MET en 2-éthylidène-1,5-diméthyl-3,3-diphénylpyrrolidine (EDDP) est le CYP3A4 ; cette enzyme n'a pas présenté de stéréosélectivité dans la formation des énantiomères d'EDDP par incubation d'une solution racémique de MET. Les incubations de solution racémique avec les CYP2C9, CYP2C19 et CYP2D6 permettent d'observer une formation stéréosélective d'EDDP ; les rapports énantiomériques R/S EDDP obtenus sont respectivement 2.78, 3.03 et 0.39. Le CYP1A2 n'a quant à lui pas produit d'EDDP dans les conditions utilisées. Un système tampon d'électrophorèse capillaire de zone chirale composé d'une solution de phosphate de pH 2.3 contenant 2 mM de heptakis (2,6-di-O-méthyl)- β -cyclodextrine et de 10 % de méthanol a été utilisé pour l'analyse de ces échantillons.

Quant aux processus métaboliques in vivo, ils peuvent être étudiés par l'échantillonnage de fluides corporels comme par exemple l'urine, le plasma ou la salive. Le métabolisme stéréosélectif de la méthaqualone (MQ) a pu être étudié grâce à l'échantillonnage d'urine par trois volontaires sains (dont l'un est un métaboliseur lent et les deux autres des métaboliseurs

rapides pour les cytochromes CYP2D6 et CYP2C19) ayant ingéré une dose unique de Toquilone Compositum[®], contenant 250 mg de MQ et 25 mg de diphénhydramine (DH). La MQ est rapidement métabolisée en cinq métabolites hydroxylés principaux : la 2'-hydroxy-méthaqualone (2'OH-MQ), la 3'-hydroxy-méthaqualone (3'OH-MQ), la 4'-hydroxy-méthaqualone (4'OH-MQ), la 2-hydroxy-méthaqualone (2OH-MQ) et la 6-hydroxy-méthaqualone (6OH-MQ). La résolution des énantiomères de ces métabolites a été effectuée grâce à un tampon phosphate à pH 2.1 contenant 50 mM d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine comme sélecteur chiral. L'utilisation de ce système tampon pour l'analyse des urines, suite à leur extraction liquide-liquide (LLE) ou en phase solide (SPE), a permis d'obtenir les premiers résultats relatifs à la stéréosélectivité du métabolisme de la MQ. La 4'OH-MQ est le principal métabolite observé dans les extraits urinaires des trois volontaires ; la détection met principalement en évidence le deuxième énantiomère, ce qui démontre la stéréosélectivité de ce métabolisme. En outre, le polymorphisme génétique des CYP2D6 et CYP2C19 ne semble pas affecter le motif métabolique observé dans les extraits urinaires des trois volontaires. L'aspect de la stéréosélectivité dans le métabolisme de la MQ a également été étudié à l'aide d'incubations *in vitro* avec des CYP450 individuel ainsi qu'avec des microsomes hépatiques humains. L'incubation de la MQ avec le CYP3A4 et les microsomes hépatiques humains a permis d'observer le métabolisme stéréosélectif de la MQ en 2'OH-MQ et en 2OH-MQ.

Pour l'albendazole sulfoxyde (ABZSO), le métabolisme stéréosélectif a pu être étudié à l'aide d'échantillons provenant de patients traités avec l'albendazole contre l'échinococcose hépatique. Les premiers essais concernant la résolution des énantiomères d'ABZSO ont été effectuées à l'aide d'un sélecteur de Pirkle, plus précisément à l'aide de 50 mM de (R)-(-)-N-(3,5-dinitrobenzoyl)- α -phénylglycine (R-DNBPG) dans 30 mM de tétraborate de sodium décahydraté à pH 9.2. Ce système tampon ne permettait pas d'arriver à une limite de détection assez basse pour la mesure d'échantillons plasmatiques provenant de patients et son utilisation a de ce fait été abandonnée. Un tampon composé de 20 mM de Tris à pH 7 contenant 3 % (m/v) de β -cyclodextrine sulfatée a finalement donné la possibilité d'analyser les échantillons plasmatiques. Pour un lot de 31 patients, la moyenne des rapports énantiomériques obtenus [(-)-ABZSO/(+)-ABZSO] est de 0.31 et la déviation standard relative est de 50.56 %. Une forte variabilité des rapports énantiomériques est observée. Pour la quantification des extraits plasmatiques, la méthode d'électrophorèse capillaire (CE) chirale a été comparée à la méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) achirale. Cette comparaison montre

VIII

une corrélation linéaire entre les deux méthodes. La détection de l'ABZSO par la fluorescence (excitation à 280 nm et émission à 320 nm) a également été prise en considération ; cette méthode a montré des limites de détection semblables à celles obtenues par détection UV à 225 nm. De plus, certains patients du collectif acceptèrent le prélèvement de salive, ce qui a permis de comparer les rapports énantiomériques d'ABZSO dans le plasma et la salive ; ces rapports sont 20 % plus faibles dans la salive.

En conclusion, l'électrophorèse capillaire chirale est une méthode analytique simple et efficace permettant l'étude des métabolismes stéréosélectifs de diverses molécules, tant in vitro qu'in vivo, dans divers fluides corporels tels que l'urine, le plasma ou la salive.

1. Introduction

1.1. Stéréochimie et chiralité

Nos ancêtres déjà avaient réalisé que la vie, les organismes vivants devaient être gérés par des phénomènes complexes. Au 19^{ème} siècle les premiers liens entre l'asymétrie moléculaire et les processus vitaux ont pu être établis. Vers la fin du 19^{ème} siècle, Van't Hoff, Le Bel et Pasteur établirent la théorie des structures moléculaires tridimensionnelles [1, p. 45]. Puis, au milieu du 20^{ème} siècle, les milieux scientifiques acceptèrent le fait que les interactions entre les petites molécules (médicaments, acides aminés, etc.) et les macromolécules biologiques (enzymes, récepteurs) se fassent à l'aide d'un site de liaison spécifique. Comme l'asymétrie est chose commune en biologie, la présence de molécules chirales dans des processus pharmacologiques n'a rien de surprenant [1].

1.1.1. Définition de la stéréoisomérisation de substances médicamenteuses

La symétrie et l'asymétrie sont des aspects intéressants de formes géométriques possédant deux dimensions ou plus [1, p. 1]. En chimie, la molécule asymétrique la plus fréquente est l'atome de carbone possédant quatre ligands différents. Les composés chimiques dont la formule brute est identique mais dont les groupes fonctionnels possèdent des propriétés différentes sont appelés isomères structuraux [2]. Les isomères de structure qui possèdent des arrangements séquentiels de leurs groupes fonctionnels différents sont des isomères constitutionnels, tandis que ceux dont les groupes fonctionnels ont un arrangement séquentiel identique mais une orientation spatiale différente sont appelés stéréoisomères [1, 2]. Ces derniers se classent en deux groupes principaux: les isomères optiques (optiquement actifs) et les isomères géométriques (optiquement inactifs) [1, p. 3].

Les isomères optiques dont l'image et l'image miroir ne sont pas superposables sont appelés énantiomères. La propriété de non-superposition est définie comme chiralité et l'endroit de la molécule qui forme l'asymétrie est défini comme centre chiral [1]. Le terme chiral vient du mot grec « chiros », qui signifie main ; il illustre la chiralité du corps humain ; celle-ci découle du plan de dissymétrie qui divise l'avant et l'arrière du corps, voir fig. 1 [3]. Ce plan de dissymétrie est la cause de la non-superposition de la main gauche et de son image miroir, la main droite. D'autres objets peuvent être chiraux, comme des chaussures, des oreilles, des vis, ou des escaliers en colimaçon. Ces objets peuvent exister soit comme une seule forme

énantiomère, par la collection de chaussures gauches, ou soit sous forme racémique, comme une collection de paire de chaussures [4]. Mais nombre d'objets chiraux ou de molécules, tels que les escaliers en colimaçon ou les atropoisomères, n'ont pas de stéréocentre. Le seul critère de chiralité réside dans la nature non superposable d'un objet vis-à-vis de son image miroir [4]. Quand des stéréoisomères ne sont pas images miroir et qu'ils possèdent au moins deux centres chiraux, ils sont dénommés diastéréoisomères. L'arrangement spatial des différents atomes autour du centre chiral permet la distinction entre les différents stéréoisomères [1]. La fig. 2 représente par un organigramme la relation entre les différents types d'isomères [2].

Les énantiomères possèdent, sous conditions normales, les mêmes propriétés physico-chimiques (point de fusion, solubilité, pression vapeur) [5]. Lorsqu'une paire d'énantiomères est placée dans un environnement chiral, leur interaction avec ce dernier est différente et entraîne de ce fait l'observation de propriétés variables. Le corps humain en tant qu'environnement chiral peut percevoir, par ses récepteurs olfactifs, la différence entre les énantiomères de la molécule de carvone : la (R)-carvone a une odeur de menthe tandis que la (S)-carvone a celle du carvi et des graines de fenouil [4, 5]. D'autre part, les énantiomères de certaines substances médicamenteuses chirales présentent différents effets pharmacologiques ou toxiques.

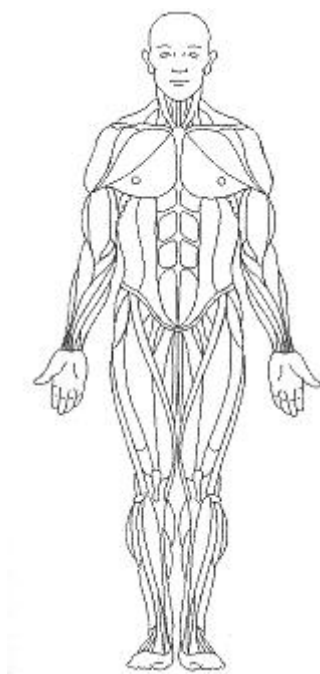


Fig. 1 : Chiralité du corps humain [3].

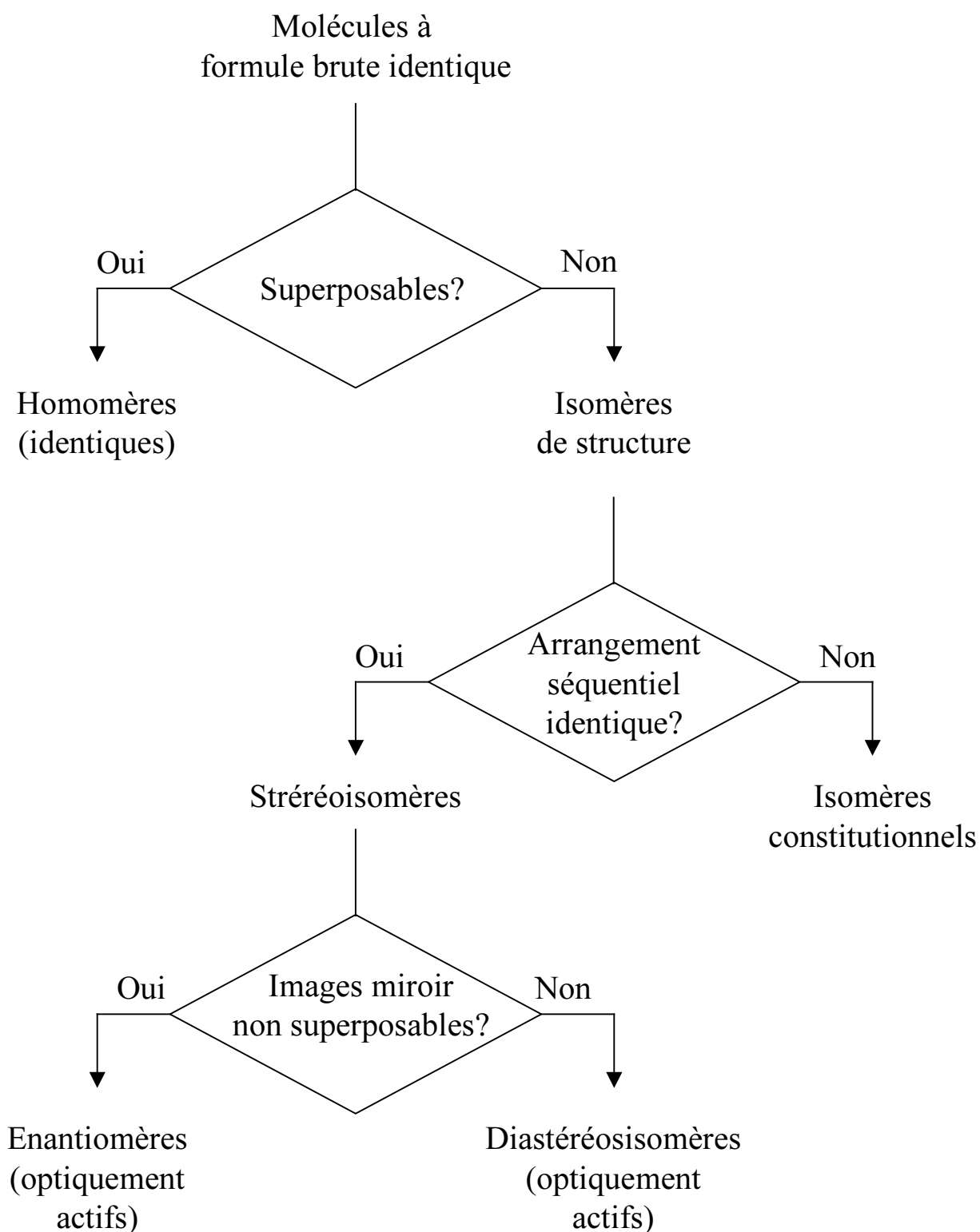


Fig. 2 : Organigramme représentant le lien entre les différents isomères [1, p. 2 ; 2, p. 34]

Les différences d'efficacité thérapeutique des énantiomères proviennent de l'interaction des deux isomères avec un même récepteur ; l'un des énantiomères interagit mieux et obtient une meilleure réponse. Ainsi l'isomère possédant une grande affinité avec le récepteur est appelé eutomère tandis que l'isomère avec une faible affinité est qualifié de distomère [1, p.1 ; 5]. L'eutomère peut posséder différentes activités pharmacocinétiques et pharmacodynamiques ; les exemples ci-dessous illustrent différentes situations rencontrées en pharmacologie :

- L'activité pharmacologique ne réside que dans un des deux énantiomères. Dans le cas du α -métyldopa, l'eutomère possède l'activité antihypertensive tandis que le distomère peut être considéré comme impurité [1].
- Les énantiomères ont une activité pharmacologique qualitativement et quantitativement identique. Les isomères de la prométhazine possèdent des propriétés antihistaminiques et toxiques semblables [1].
- Les énantiomères ont des activités pharmacologiques similaires, mais diffèrent dans leur efficacité. L'eutomère du β -bloquant propranolol est 100 fois plus efficace que le distomère [1].
- Les isomères ont des activités pharmacologiques différentes [1]. Ceci se produit dans la nature (par ex. la quinidine est antiarythmique et la quinine antimalarique) comme dans les substances synthétiques (par ex. le dextrométhorphan est antitussif et le lévométhorphan narcotique) [5].
- Le distomère peut avoir des effets secondaires indésirables [1]. Le tableau 1 énumère quelques exemples.

Tableau 1 : Impact de la chiralité sur les effets toxicologiques de certains principes actifs [1, 3].

Composé	Eutomère	Distomère
Thalidomide	Sédatif (R)	Tératogène (S)
Ethambutol	Tuberculostatique (S)	Induit la cécité (R)
Kétamine	Anesthésique [S(+)]	Hallucinogène [R(-)]
Dopa	Anti-parkinsonien [S]	Granulocytopénie [R] [5a]
Pénicillamine	Antiarthritique [S]	Mutagène [R]

- Certains énantiomères présentent des avantages thérapeutiques. Le distomère uricosurique de l'indacrinone (diurétique) antagonise l'effet secondaire de la rétention d'acide urique provenant de l'eutomère [1].

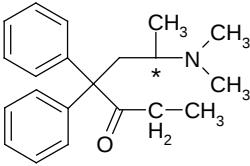
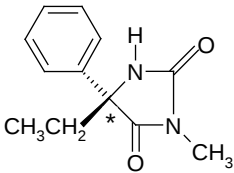
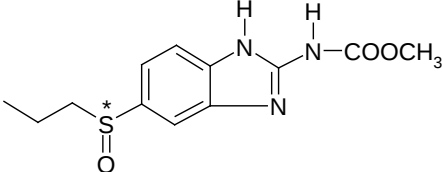
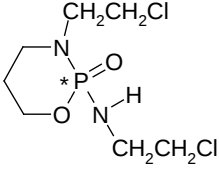
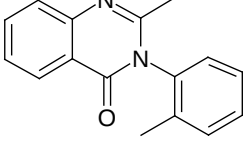
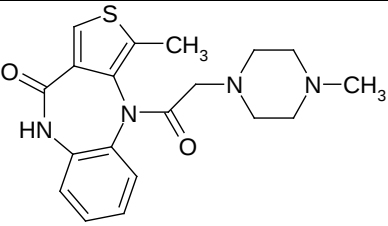
Pour la plupart de ces principes actifs, la chiralité est due à un atome de carbone, comme dans le cas de la méthadone (MET), voir tableau 2. Cette dernière est utilisée dans le traitement de la toxicomanie ; son eutomère possède l'activité pharmacologique ainsi que les effets secondaires, tandis que le distomère est peu actif [6, 7]. L'atome de carbone possédant quatre ligands différents fait partie des molécules dont le centre asymétrique tétravalent possède une structure géométrique tétraédrale [2, p. 44].

D'autres atomes ont la faculté de former des centres chiraux tétravalents, les hétéroatomes. Dans le groupe de ces hétéroatomes, on peut notamment citer les ammoniums quaternaires, les N-oxydes, certains dérivés de silicium et de germanium, ainsi que les ions phosphonium et arsénium [2]. Un exemple dérivé de l'ion phosphonium, l'ifosamide, utilisé en tant que racémate dans le traitement anticancéreux, est représenté dans le tableau 2. Il existe également des hétéroatomes formant des centres chiraux trivalents. Ces derniers ont une géométrie pyramidale [2]. Les ions sulfonium, les sulfoxydes, les phosphines, les arsines et les stibines sont des exemples stables de centres chiraux à trois ligands. Les carbanions, les carbones radicalaires, les ions oxonium et les amines sont des exemples instables, pour lesquels des inversions rapides sont observées [2]. Dans le tableau 2, le sulfoxyde donnant la chiralité à l'albendazole sulfoxyde (ABZSO), représente les atomes à trois ligands. D'autres formes d'énantiomères peuvent être dues à des barrières stériques d'interconversion, comme dans le cas des atropoisomères tels que la méthaqualone ou la télenzépine [1, p. 270]. La méthaqualone (MQ) est un atropoisomère ou rotamère dont les énantiomères présentent une activité hypnotique et anticonvulsante différente [8]. Les structures chimiques de diverses substances thérapeutiques chirales sont représentées dans le tableau 2.

1.1.2. Les carbones asymétriques : exemple de la méthadone

Les énantiomères possédant un atome de carbone tétravalent sont les molécules chirales les plus fréquentes [1]. L'orientation tétraédrique des liaisons de l'atome de carbone tétravalent est telle que quatre substituants différents forment une image et une image miroir non superposables, ainsi la molécule est énantiomérique et chirale. Lorsque deux ligands sont identiques, la molécule possède un plan de symétrie ; elle est superposable à son image miroir et est par conséquent achirale [1, p. 2].

Tableau 2 : Substances thérapeutiques chirales

Type d'énantiomères	Substance, indication thérapeutique	Formule chimique	Méthode(s) analytique(s) [Réf.]
Carbone asymétrique	Méthadone, substitut dans le traitement de la dépendance des opiacés.		CE chirale [6, 9-11], HPLC chirale [7,12-14]
Carbone asymétrique	Méphénytoïne, anti-épileptique.		MECC chirale [15], GLC chirale [16]
Soufre asymétrique	Albendazole sulfoxyde, anti-helminthique		CZE chirale [17], HPLC chirale [18, 19]
Phosphore asymétrique	Ifosfamide, cytostatique.		HPLC chirale [20], GC chirale [21]
Atropoisomères rotamères,	Méthaqualone, hypnotique		CZE chirale [22, 23], HPLC Chirale [24, 25]
Atropoisomères	Télénzépine		Méthode radiochimique [26]

La plupart des propriétés physico-chimiques des énantiomères sont identiques, mis à part l'activité optique qui permet de les distinguer. Lorsque la lumière polarisée traverse un échantillon et que l'énantiomère provoque une rotation dextrogyre (droite), l'énantiomère est désigné comme (+). Si la rotation est lévogyre, l'énantiomère est défini comme (-). Un mélange racémique, c'est-à-dire contenant une quantité égale de (+) et de (-), ne donne lieu à aucune rotation, et par conséquent est optiquement inactif [4]. Le dichroïsme circulaire est une autre méthode spectroscopique qui utilise, comme l'activité optique, de la lumière polarisée pour la détermination de la stéréochimie absolue des molécules [1, p. 493].

Pour les carbones asymétriques, un système de nomenclature fut développé par Cahn, Ingold et Prelog afin de nommer les énantiomères de manière univoque. L'attribution de la priorité des substituants est définie selon certaines règles et permet de définir la configuration absolue R (rectus, ou droit en latin) ou S (sinister, ou gauche en latin) du stéréocentre [1, p. 4 ; 4]. Cette règle peut également être utilisée pour spécifier la configuration des stéréocentres des diastéréoisomères [1].

La méthadone (MET), représentée dans le tableau 2, est une molécule chirale dont le centre d'asymétrie est un atome de carbone. D'après les considérations stéréochimiques évoquées ci-dessus, l'énantiomère R de la méthadone est lévogyre et l'énantiomère S dextrogyre, voir fig. 3.

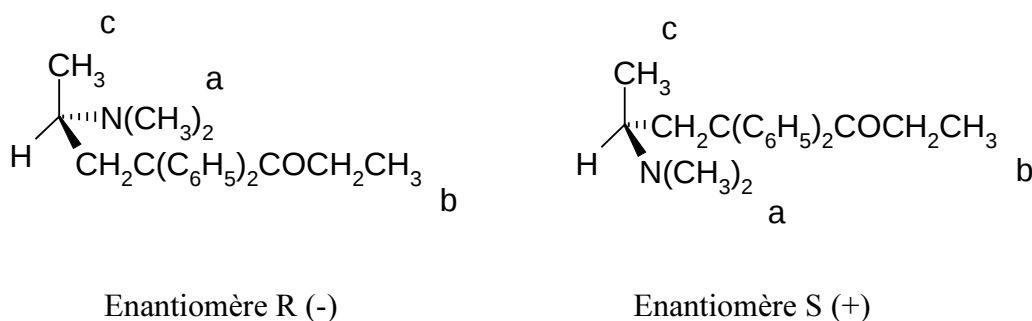


Fig. 3 : Enantiomères de la MET. Les substituants sont nommés a, b, c selon leurs priorités et définissent ainsi la séquence et par conséquent la configuration absolue du centre de chiralité.

1.1.3. Les atropoisomères: exemple de la méthaqualone (MQ)

La méthaqualone est formée d'un cycle quinazoline et d'un groupement tolyl, dont la rotation autour de la liaison C-N est stériquement bloquée par les groupements méthyles et le groupement carbonyle substitués aux alentours [1]. La chiralité de la molécule est due à une barrière stérique d'interconversion entre les deux plans de la molécule et définit les énantiomères comme étant des isomères conformationnels, des rotamères ou des atropoisomères, voir fig. 4. Les deux isomères de la MQ sont définis comme énantiomères (M) et (P), selon l'orientation des plans [8, 27]. Junghänel et al. ont récemment pu attribuer la configuration (M) à l'énantiomère (-) par dichroïsme circulaire [27].

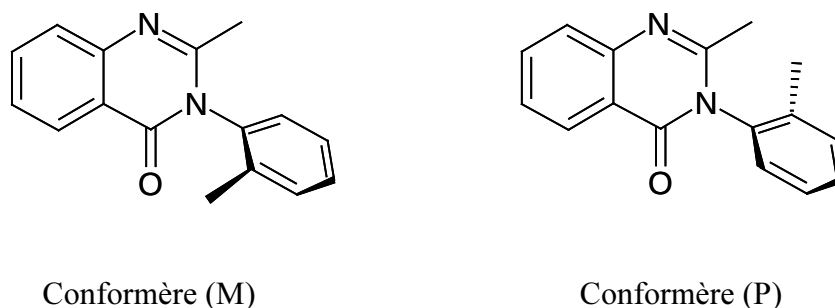


Fig. 4 : Représentation des rotamères de la méthaqualone.

La fig. 5 montre l'énergie d'énantiomérisation nécessaire à l'interconversion des deux molécules, calculée par un programme de mécanisme moléculaire CHARMM ; cette figure révèle une énergie $\Delta G^\ddagger$ d'environ 38 kcal/mol correspondant à approximativement 159 kJ/mol (facteur de conversion de 4.18 [28]) [1, p. 272]. Cette énergie d'énantiomérisation calculée donne une valeur un peu plus élevée que celle obtenue à l'aide d'un calcul ab initio, qui est d'environ 140 kJ/mol [29], et que celle mesurée dans du diphenyléther à 135 °C, déterminée à 131 kJ/mol [8]. Les énantiomères de la MQ doivent exister sous deux formes stables, sachant que l'énantiomérisation des composés, à température ambiante, peut se produire à des énergies de $\Delta G^\ddagger$ d'environ 100 kJ/mol [2].

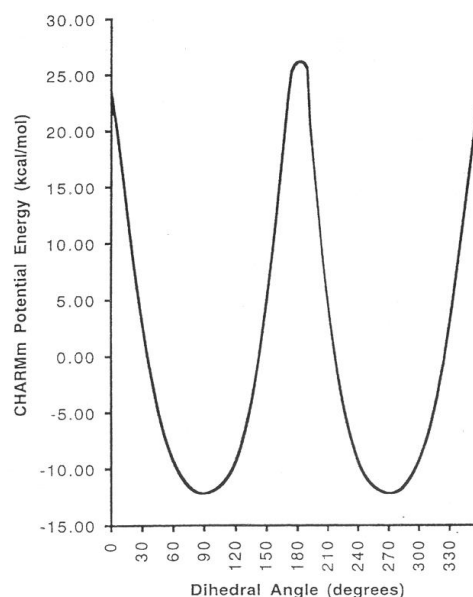


Fig. 5 : Minima d'énergie potentielle correspondant aux deux formes atropisomériques de la MQ [1, p. 271].

D'autres molécules capables de s'énantiomériser sont utilisées en thérapeutique. Une molécule connue est la thalidomide. Sa barrière d'énantiomérisation a été déterminée à 102 kJ/mol [30], ce qui implique des précautions dans les traitements thérapeutiques, car l'eutomère peut s'énantiomériser dans le corps et se transformer en distomère tératogène. Les benzodiazépines font partie d'un autre groupe de molécules qui présentent la faculté de s'énantiomériser. Les barrières énergétiques de l'oxazépam, du témazépam et du lorazépam se situent aux environs de 90 kJ/mol à 25 °C [31] ; ce résultat signifie que les deux formes énantiomériques de ces composés ne sont pas stables à température corporelle.

1.1.4. Les sulfoxydes : exemple de l'albendazole sulfoxyde

Le soufre est un élément de la troisième période et possède des orbitales d. Il peut réaliser une expansion de sa couche de valence de manière à avoir plus d'électrons que ceux qui sont permis par la règle de l'octet et peut dans certaines configurations présenter une chiralité [4]. Lorsque la molécule possède deux ligands, deux paires d'électrons libres sont encore à disposition. Une première oxydation peut transformer la molécule en sulfoxyde. Ainsi l'atome de soufre possédera une double liaison avec un atome d'oxygène et une paire d'électrons libres. La structure géométrique tridimensionnelle permet à l'oxygène de se placer de deux façons différentes, voir fig. 6. La chiralité des sulfoxydes est d'une part due à leur géométrie

non planaire, et d'autre part à leur substitution asymétrique [32, 4]. On peut ainsi observer des énantiomères stables à température ambiante [32]. Une seconde oxydation du soufre, qui résulte en une sulfone, utilise les électrons restants, et rend à la molécule une structure planaire et lui fait perdre sa chiralité.

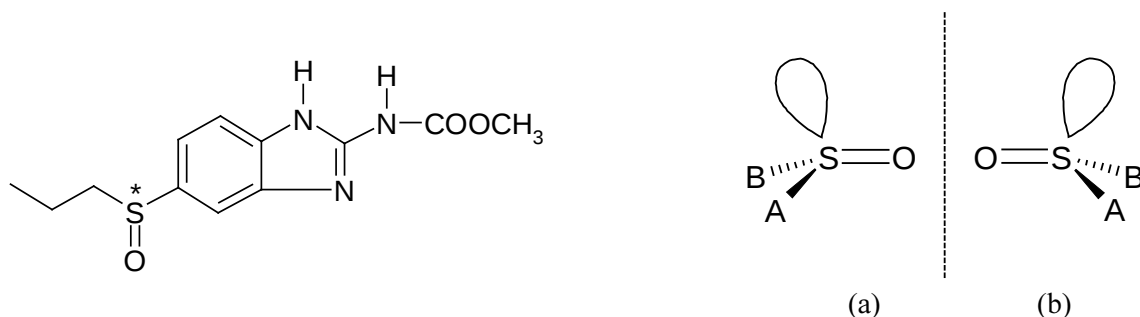


Fig. 6 : Représentation de l'ABZSO et de la chiralité du soufre en trois dimensions. A représente le substituant « benzimidazole » et B le C₃H₇ ; les substituants différents sont nécessaires pour la chiralité de la molécule. La structure (a) montre l'énantiomère S et la structure (b) le R.

1.2. Aspects stéréochimiques du métabolisme

1.2.1. Le métabolisme

Les êtres humains sont confrontés quotidiennement à des substances exogènes pénétrant dans le corps involontairement ou délibérément, comme par exemple les médicaments possédant une activité pharmacologique [33, p. 49]. L'excrétion rénale joue un rôle clé dans l'activité biologique des médicaments, plus spécialement des composés hydrosolubles. La plupart des molécules thérapeutiques sont lipophiles et sont par conséquent métabolisées dans le foie en substances plus hydrosolubles avant d'être éliminées. Un processus biphasique est utilisé par le corps humain pour la biotransformation de ces composés [1, p. 46 ; 33, p. 49].

Les réactions de phase I permettent de convertir la molécule mère en un métabolite suffisamment hydrosolubles pour être éliminé [33, 34]. Diverses sortes de transformations peuvent avoir lieu ; elles sont catalysées par des enzymes situées dans le réticulum endoplasmique des cellules hépatiques ou dans d'autres tissus [33]. La majeure partie des enzymes concernées dans cette première partie du métabolisme font partie de la famille des cytochromes P-450 (CYP450). Elles sont responsables d'hydroxylations aromatiques (cas de

la MQ, de la méphénytoïne [MEPH] et du diclofénac), de N-désalkylations (cas de la caféine), de O-désalkylations (pour le dextrométhorphan), de S-oxydations (cas de l'ABZSO) et de désulfurations, pour ne citer que quelques exemples [33 ; 35, p. 29]. D'autres enzymes sont responsables d'oxydations, comme par exemple la flavine monoamineoxygénase et les amineoxydases [33, p. 54]. La réduction (cas de la MET [33] ou de l'alcool [1, p. 70]) et l'hydrolyse enzymatique [1, p. 71] (estérases) sont aussi des processus survenant lors de ces réactions de phase I [33].

Les réactions de phase II, quant à elles, sont plutôt des réactions de synthèse nécessitant de l'énergie [35, 36]. La conjugaison avec l'acide glucuronique, fréquemment rencontrée, se fait avec des groupements alcools, phénols, des amines aromatiques et des acides carboxyliques [33]. Certaines substances subissent des acétylations, des conjugaisons à la glycine ou encore des méthylations. Grâce à ces nouveaux groupes fonctionnels, ces conjugués deviennent hautement polaires ; ils sont souvent inactifs et sont rapidement excrétés [33].

1.2.2. Métabolisme de substances thérapeutiques chirales

Les processus d'absorption, de distribution et d'élimination, ainsi que la biotransformation du médicament, jouent des rôles primordiaux dans l'étude pharmacocinétique d'une substance médicamenteuse [1, p. 45] ; la stéréosélectivité peut être observée dans toutes ces étapes. Pour le phénomène de l'absorption, certains substrats ressemblent à un nutriment pour lequel un système de transport actif est présent et sont par conséquent absorbés préférentiellement, comme par exemple la L-dopa (Madopar) ou le L-méthotrexate (Méthotrexate Lederle). La distribution peut être influencée par la différence de liaison de chaque énantiomère aux protéines plasmatiques [1]. L'énantiomère S de la méthadone est plus fortement lié aux protéines plasmatiques que l'énantiomère R [37]. Ceci influence indirectement l'excrétion des molécules, qui est également influencée par des processus de sécrétion ou de réabsorption active observés par exemple pour le métoprolol [1, p. 48].

Mais la contribution la plus importante pour des différences pharmacocinétiques est le résultat du métabolisme stéréosélectif. La stéréosélectivité est dans le cas des processus métaboliques plutôt la règle que l'exception [1]. Ceci n'est pas surprenant puisqu'un substrat et une enzyme chirale sont impliqués dans cette étape de transformation. Cette interaction forme une paire de complexes formant des diastéréoisomères dont les énergies sont différentes. Des résultats variables ne sont, par conséquent, pas surprenants lors de processus liés à des complexes enzymatiques [36]. Ce n'est que récemment que ce processus biométabolique a commencé à

susciter l'intérêt des chercheurs, et ce pour deux raisons principales. La première est l'amélioration du seuil de détection des méthodes analytiques [1], qui a permis d'approfondir le domaine du métabolisme et de la pharmacocinétique de composés médicamenteux racémiques par la possibilité de détection des deux énantiomères dans divers fluides corporels. La seconde raison est le fait que la caractérisation, l'isolation puis finalement le clonage des enzymes hépatiques ont permis d'effectuer des études *in vitro* qui éclairent certains mécanismes d'action [1].

Le métabolisme stéréosélectif de composés médicamenteux peut être catégorisé selon les conséquences stéréochimiques que la réaction implique [36].

- Transformation d'une molécule possédant un centre prochiral en une molécule chirale.
Un composé achiral peut devenir chirale par le métabolisme, soit directement sur un centre prochiral par oxydation du soufre, comme par exemple l'oxydation de l'albendazole (ABZ) en ABZSO, soit à un endroit plus éloigné, comme pour l'oxydation aromatique de la phénytoïne.
- Transformation d'une molécule chirale en une autre molécule chirale.
Cette transformation implique des routes différentes pour le métabolisme des énantiomères, mais sans altération de la stéréochimie de la molécule, comme par ex. pour la MET et la MQ.
- Transformation d'une molécule chirale en un diastéréoisomère.
Un diastéréoisomère peut être formé par addition d'un nouveau centre chirale lors d'une réaction de phase I ou par glucuronidation stéréosélective lors de réaction de phase II.
- Transformation d'un centre chirale en un centre achiral.
Cette situation peut survenir lors de l'oxydation d'un alcool secondaire en cétones comme dans le cas de l'oxydation de l'ABZSO en albendazole sulfone (ABZSO₂).
- Inversion métabolique chirale
Cet aspect a été observé pour la molécule de la thalidomide, pour laquelle une racémisation biochimique a été observée *in vitro* et *in vivo*. Ce phénomène est dépendant du pH et pourrait se produire par substitution électrophile de protons comme groupements entrant et partant [37a].

1.2.3. Les enzymes hépatiques

La biotransformation des médicaments est un processus clé dans le profil thérapeutique des substances utilisées [34]. Le premier stade de biotransformation est le processus de

métabolisme, dont le site majeur se trouve dans le foie [34]. Ce processus métabolique est catalysé principalement par une super famille d'hémo protéines appelées les cytochromes P-450 (CYP450), déjà citées antérieurement. Le séquençage de ces protéines chez les eucaryotes a montré une multitude d'isoformes différentes, dont 55 sont humaines [34].

Ces CYP450 sont présents dans divers tissus, p. ex. l'intestin, le poumon, etc., mais la plupart des médicaments métabolisés dans le corps humain subissent leur biotransformation dans le réticulum endoplasmique hépatique [34]. Ces CYP450 sont classifiés par familles (1^{er} chiffre), sous-familles (1^{ère} lettre) et isoformes (2^{ème} chiffre) ; trois de ces familles (CYP1, CYP2 et CYP3) sont responsables de la majeure partie du métabolisme médicamenteux [34]. Certaines enzymes présentent des particularités: le CYP1A1 prédomine en milieu extra-hépatique, le CYP1A2 est exprimé universellement et le CYP3A4 est l'isoforme majeur chez les adultes [34]. Les CYP2C9 et CYP2C19, homologues à 91 %, ont la particularité de faire apparaître leurs polymorphismes génétiques dans le métabolisme de la plupart des substrats. Pour le CYP2C19, notamment responsable de l'hydroxylation extrêmement stéréosélective en position 4 de la substance anti-convulsante S-méphénytoïne, du métabolisme du diazépam et de l'oméprazole, différents allèles sont connus [36]. Le phénotype des métaboliseurs lents (PM) est observé dans moins de 5 % de la population caucasienne et dans 10 à 20 % des populations asiatiques. La notion de métaboliseur lent (PM) s'oppose à celle de métaboliseur rapide (EM). Le CYP2D6 est une autre enzyme connue pour ses modifications génétiques ; elle métabolise une grande variété de substances médicamenteuses comme par ex. la venlafaxine, la codéine, le tramadol et le métoprolol. Pour cette enzyme, on rencontre aussi bien des métaboliseurs lents (ils représentent par exemple environ 7 % de la population caucasienne) que des métaboliseurs ultra-rapides [34].

D'autres enzymes contribuent au métabolisme et sont localisées dans le réticulum endoplasmique de plusieurs tissus tels que le foie, le poumon, le rein, et la peau. Elles sont nommées flavines monooxygénases (FMO) et leur différence avec le CYP450 est leur mécanisme catalytique [1, p. 61].

Plusieurs préparations hépatiques sont utilisées pour étudier les biotransformations in vitro, les plus fréquemment utilisées sont les microsomes hépatiques, qui sont des vésicules fermées de fragments de réticulum endoplasmique [33]. Plus récemment, la technologie génétique a rendu possible la production de cellules d'insectes infectées par des virus contenant le génome d'un cytochrome P-450 humain. Ces préparations sont beaucoup plus actives que des microsomes préparés à partir de tissus vivants et donnent la possibilité d'incuber un principe actif avec un seul cytochrome. Pour sa part, le mélange de différentes préparations

enzymatiques permettrait de mimer la combinaison de leur effets sans recourir à des microsomes hépatiques. L'incubation d'un principe actif par ces processus enzymatiques produit un ou plusieurs métabolites qui vont pouvoir être analysés ou subir une seconde étape métabolique.

1.3. Séparation de molécules chirales

1.3.1. Introduction

Historiquement, la première molécule chirale dont le mélange racémique a été dédoublé en ses deux énantiomères est l'acide tartrique. En 1848, Louis Pasteur découvrit que le sel sodico-ammonique de l'acide tartrique cristallise en deux formes hémihédrales similaires. La séparation des deux types de cristaux, puis leur mise en solution montra que ces derniers possèdent une activité optique en sens opposé, tandis que la solution d'un mélange égal des deux sortes de cristaux ne présentent pas d'activité optique. Ces observations permirent à Van't Hoff et Le Bel de définir quelques années plus tard la structure tridimensionnelle des molécules [4]. Avant que les techniques modernes ne se développent, la résolution des énantiomères se fondait sur la différence des propriétés physiques des diastéréoisomères. Dans le cas d'une formation de diastéréoisomères à partir du mélange racémique par l'accrochage d'une entité énantiomériquement pure sur les énantiomères, les formes R ou S du mélange initial peuvent être séparées par cristallisation fractionnée, distillation ou chromatographie [4]. L'utilisation de cette méthode a diminué dans la deuxième moitié du vingtième siècle, période au cours de laquelle le développement commercial des phases stationnaires pour la chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a permis d'améliorer les séparations chirales. Les améliorations ont par la suite permis l'introduction de ces phases stationnaires en analyse de routine ainsi que le développement d'autres méthodes telles que l'électrophorèse capillaire (CE) ou l'électrochromatographie capillaire (CEC) [3]. Les méthodes préparatives modernes se basent en partie encore sur la séparation de diastéréoisomères.

Une étude de Bressolle et al. a comparé, il y a quelques années, les séparations chirales à l'aide de CD en HPLC et en CE [38]. L'électrophorèse capillaire présentait les avantages suivants : les volumes d'échantillon et de solution tampon nécessaires sont plus faibles qu'en HPLC, le sélecteur chiral est souvent dissous dans la solution tampon, ce qui est moins cher

que les colonnes HPLC chirales, les résolutions sont meilleures, et le capillaire est équilibré en quelques minutes. Quant aux inconvénients, ils résident en une limite de détection plus faible et en un nombre moins élevé de possibilités de séparations préparatives [38].

En 2001, Blaschke et al. décrivaient les futures tendances de différentes méthodes d'électromigration capillaire chirales [39]. Dans la même période, les développements récents des séparations énantiomériques en électrochromatographie capillaire ont été décrits par Fanali et al. [40]. Les applications de ces analyses chirales de composés médicamenteux dans des fluides biologiques, des cheveux ou des incubations microsomales peuvent, quant à elles, permettre l'élucidation de métabolismes stéréosélectifs, des évaluations pharmacocinétiques, ou sont simplement d'intérêt toxicologique [41-48].

1.3.2. L'électrophorèse capillaire (CE)

1.3.2.1. Principes fondamentaux de l'électrophorèse capillaire

La CE est une méthode analytique qui permet de séparer les molécules en solution sous l'influence d'un champ électrique, en fonction de leurs différentes mobilités. La mobilité effective d'une substance dépend de sa taille et de sa charge. Les séparations se font dans des capillaires de silice fondue dont le diamètre interne (I.D.) est compris entre 20 et 100 μm et la longueur, entre 10 et 100 cm. L'échantillon est introduit dans le capillaire de façon hydrodynamique (par pression, aspiration ou effet siphon) ou électrocinétique en appliquant une tension. Quelques dizaines de microlitres d'échantillon sont nécessaires pour l'injection de l'échantillon et seule une dizaine de nanolitres sera injectée et utilisée pour la mesure. En mode normal, l'anode se trouve du côté de l'injecteur et la cathode vers le détecteur, voir fig. 7. Pour fermer le circuit électrique, le capillaire ainsi que les récipients à l'anode et à la cathode sont remplis d'un liquide contenant un électrolyte. La séparation des composés advient lors de la mise sous tension du système. La détection en CE se fait souvent on-column, directement dans le capillaire de séparation. Le capillaire, constitué de silice fondue transparente aux UV/VIS, est recouvert par un film de protection en polyimide qui peut être retiré afin de créer une fenêtre de détection. Par conséquent, la détection des molécules se fait lors de leur migration à travers cette fenêtre [49].

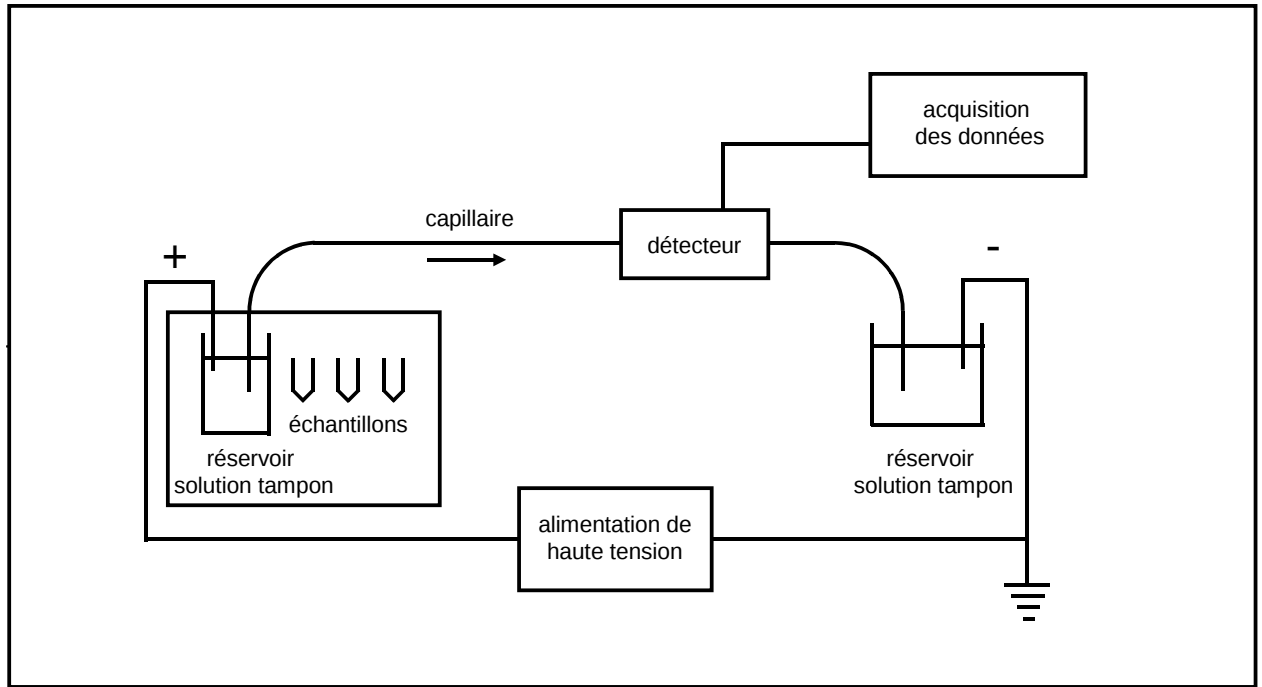


Fig. 7 : Schéma simple de l'électrophorèse capillaire.

Quelques considérations concernant la migration électrophorétique permettent de mieux comprendre les principes fondamentaux de la CE. Celle-ci se base sur la vitesse de migration d'une particule chargée soumise à un champ électrique. La mobilité électrophorétique ou mobilité apparente (μ_{app}) de la particule dépend de la force du champ électrique (E) et de la vitesse (v) à l'intérieur de ce champ:

$$v = \mu_{app} \cdot E = \frac{L_{eff}}{t_m}$$

La vitesse de la particule est déterminée en divisant la longueur effective (L_{eff}) du chemin parcouru jusqu'au détecteur par le temps de migration du pic (t_m) [49]. Cette mobilité apparente (μ_{app}) est la somme de la mobilité effective (μ_{eff}) et de la mobilité électro-osmotique (μ_{EOF}) [50, p. 6]:

$$\mu_{app} = \mu_{eff} + \mu_{EOF}$$

La mobilité effective de la particule est définie par sa charge et sa taille. Un ion plus petit migre plus vite qu'un ion de grande taille possédant la même charge. Ainsi, par la différence

de mobilité apparente, la séparation des composants d'un échantillon est possible. La mobilité électro-osmotique, quant à elle, dépend du flux électro-osmotique.

Le capillaire étant constitué de silice fondue, sa surface interne est recouverte de groupements silanols. En pH basique, les groupements silanols déprotonés vont attirer des cations à la surface interne du capillaire et par conséquent créer un potentiel de surface nommé potentiel zéta. Les cations rassemblés à la surface du capillaire lors de l'application d'un potentiel vont se mettre à migrer vers la cathode et créer un flux qui entraîne le liquide à l'intérieur du capillaire. Ce flux est appelé flux électro-osmotique (EOF). La mobilité électro-osmotique dépend du potentiel zéta, de la constante diélectrique et de la viscosité du système tampon [50, p. 5]. Le profil de l'EOF, extrêmement plat, est nommé profil plug flow, voir fig. 8. Le fait qu'il soit extrêmement plat entraîne une diffusion de zone moins importante qu'avec un profil de Poiseuille, créé par une différence de pression. L'EOF va permettre de détecter non seulement les molécules chargées positivement mais également les substances neutres et anioniques. Son profil plat est dès lors un avantage et permet une grande efficacité [49].

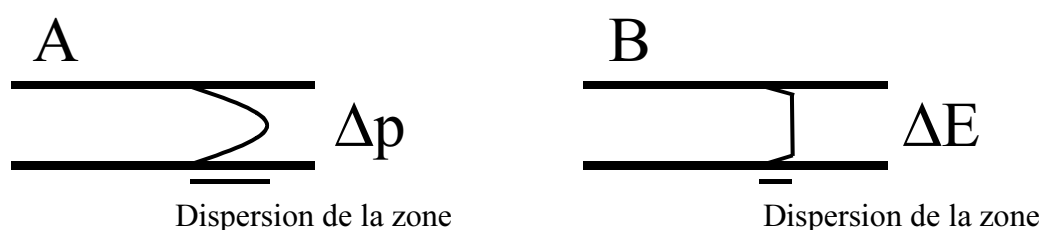


Fig 8 : Représentation d'un profil généré par la pression (A) et d'un profil plat idéal dans le cas de l'électrophorèse capillaire (B). Δp est la différence de pression et ΔE est la différence de champ électrique.

La possibilité de séparation de substances peut en principe être évaluée par leur différence de mobilité [51, p. 58]. Une estimation simple peut être effectuée en se fondant sur la différence relative de mobilité et sur la largeur de la zone de l'échantillon injecté dans le capillaire. Dans le cas idéal la zone est considérée comme une courbe gaussienne, par conséquent symétrique [51]. La résolution de deux pics voisins peut être définie comme le rapport de la distance mutuelle sur la largeur moyenne de la zone. Pratiquement, la résolution (R_s) se calcule par le rapport de la différence des temps de détection t_i sur la somme des zones à la base du pic (w_i) :

$$R_s = 2 \frac{|t_2 - t_1|}{w_1 + w_2}$$

Les pics obtenus sont rarement symétriques, et leur résolution peut par exemple être calculée d'après les paramètres de l'électrophérogramme présenté dans la fig. 9. La largeur de la base des pics est obtenue par leur mesure sur papier en cm ou d'après les paramètres d'évaluation obtenus à l'aide du programme informatique utilisé ; les t_i sont les temps de détection, au maximum du pic, obtenus grâce au programme d'évaluation de l'appareil de mesure.

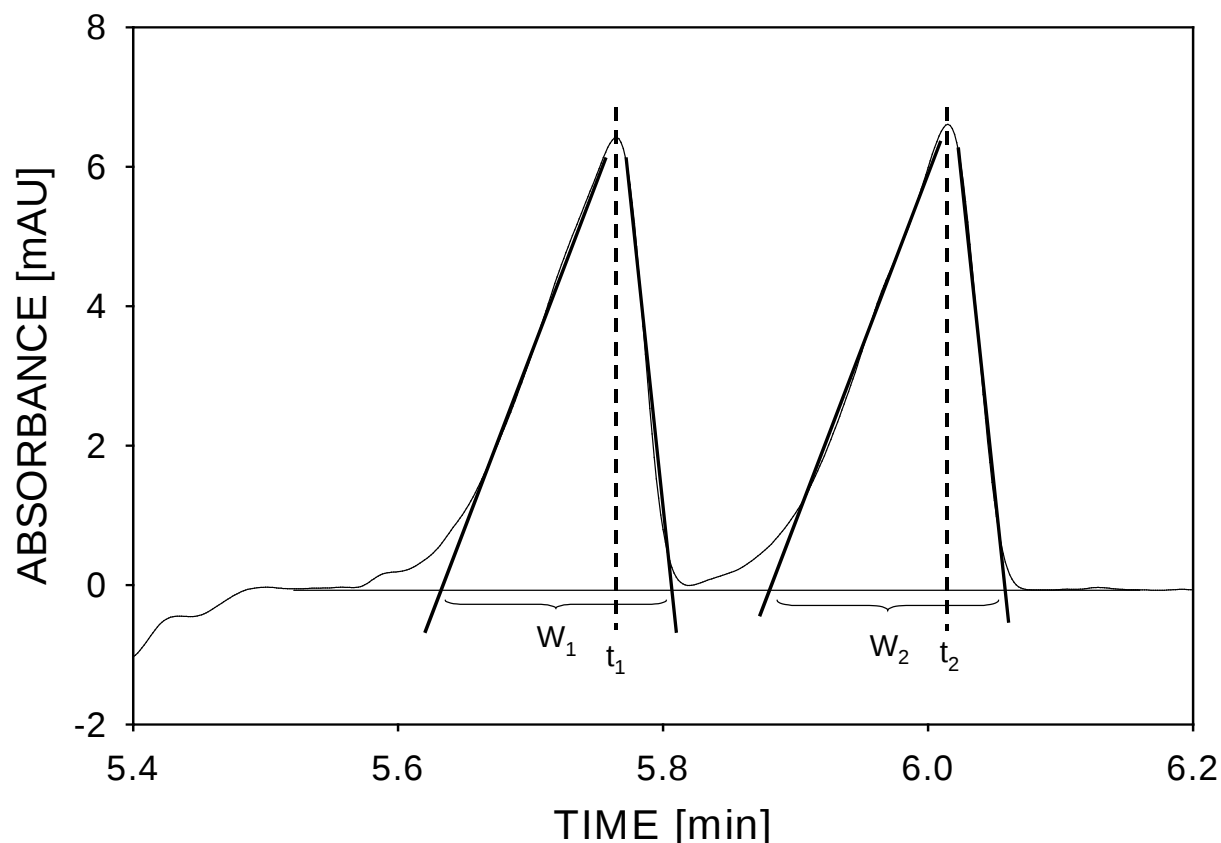


Fig. 9 : Représentation des paramètres utilisés pour le calcul du R_s par l'électrophérogramme d'une solution standard d'ABZSO (50 $\mu\text{g/ml}$) analysée à l'aide d'un système tampon Tris de pH 7 contenant 3 % de sulfated β -CD. Dans le cas de cet électrophérogramme, on obtient un R_s de 1.52.

Cette formule peut s'appliquer pour le calcul de la séparation de deux énantiomères, comme présenté ci-dessus, ainsi que de deux composés différents. La séparation de deux pics est définie comme totale lorsque le R_s est ≥ 1.4 . L'exemple de la fig. 9 présente donc une séparation totale, malgré un effet appelé fronting dû à une mobilité du Tris plus faible que celle de l'ABZSO. L'inverse du fronting est le tailing ; son effet est présent dans le cas où la mobilité du ion présent dans le système tampon est plus grande que celle du composé à analyser. Ces effets donnent des formes asymétriques aux pics détectés.

L'application de l'électrophorèse sous sa forme la plus simple est nommée électrophorèse capillaire de zone (CZE). Dans ce cas seul l'échantillon forme une zone de discontinuité dans le système, tandis que le système tampon, la valeur du pH et la force du champ électrique sont constants dans le reste du capillaire [49]. L'échantillon contenant les différents analytes, qui dans le cas présent est constitué de produits pharmaceutiques, est introduit dans une zone définie à l'embouchure du capillaire. Les analytes en tant que composés pharmaceutiques possèdent principalement des groupements acides et/ou basiques faibles. Dans ce cas, la valeur du pH est non seulement importante pour le EOF, mais également pour la charge de la particule à analyser. Le pKa de la molécule donnera le degré de dissociation de la molécule dans le système tampon utilisé. De ce fait, la mobilité effective de la particule dépendra du degré de dissociation des différents groupement chimiques au pH utilisé [52, p. 68]. Ainsi la séparation des analytes, due à leurs mobilités différentes dépendant de leur taille et de leur charge, par conséquent du pH, formera des zones dans lesquelles se trouveront les molécules identiques. Leur migration à travers le capillaire permettra leur détection lors de leur passage devant le détecteur, qui peut par exemple être un détecteur UV/VIS ou de fluorescence selon le schéma présenté par la fig. 7 [49].

D'autres formes d'électrophorèse peuvent être utilisées, comme l'électrophorèse capillaire électrocinétique micellaire (MECC) par addition d'un détergent, la plupart du temps du sodium dodécyl sulfate (SDS), dans le système tampon. En MECC, la séparation des analytes dépend de leur mobilité effective et de leurs interactions avec les micelles. L'électrophorèse capillaire sur gel (CGE) est une forme de CE contenant un polymère dans le système tampon. La viscosité et l'effet de filtre du système tampon sont influencés par le polymère utilisé. La séparation des analytes en CGE résulte des effets de l'électrophorèse et de la perméation sur gel. Une quatrième sorte de CE est l'électrophorèse à focalisation isoélectrique (CIEF), utilisée pour la séparation des composés amphotères, comme les protéines ou les peptides. La création d'un gradient de pH permet la séparation des amphotères par leur pI, point auquel la migration des composés est bloquée par la neutralité de leur charge. L'isotachophorèse (ITP), quant à elle, est un procédé qui repose sur la discontinuité des systèmes tampons. Comme dernier exemple de CE, l'électrochromatographie capillaire (CEC) combine les principes de séparation de l'HPLC et de la CE [49]. Elle se fait à l'aide d'un capillaire à tube ouvert greffé ou rempli, et de solvants aqueux ou organiques [40].

Les différentes techniques mentionnées ci-dessus nécessitent un volume relativement important d'échantillon, de l'ordre de quelques dizaines de microlitres selon l'instrument utilisé. Les échantillons d'origine biologique de faible volume ont favorisé le développement

des microsystèmes. La CZE et la CGE sont des méthodes qui ont été adaptées à ces microsystèmes électrophorétiques. L'avantage des microélectrophorèses, aussi appelées chips, est la rapidité de l'analyse et les petits volumes d'échantillon nécessaires [53-55].

1.3.2.2. Les sélecteurs chiraux

Les énantiomères sont des composés dont les propriétés physico-chimiques sont identiques et que seul un environnement chiral est à même de distinguer. L'utilisation d'un sélecteur chiral optiquement actif dans le milieu peut former un complexe diastéréoisomérique stable avec les énantiomères. Comme la constante de stabilité diffère pour les complexes des deux diastéréoisomères et que leurs propriétés physico-chimiques diffèrent, les énantiomères pourront être séparés [49, 56].

En CE, les séparations chirales sont possibles par l'utilisation d'un sélecteur chiral. Selon les méthodes décrites ci-dessus, le sélecteur chiral est soit solubilisé dans le système tampon, soit fixé à la paroi du capillaire ou sur une matrice [39, 40, 57]. Les cyclodextrines (CD), les sels biliaires, le SDS en combinaison avec des CD, les antibiotiques macrocycliques [58], ainsi que les éthers de couronne [59], sont quelques classes de sélecteurs chiraux utilisés en CE [49]. La résolution chirale des énantiomères varie avec la concentration du sélecteur chiral. Avec une augmentation de sélecteur chiral la résolution des énantiomères peut augmenter, diminuer ou croître vers un maximum avant de décroître à nouveau [57].

Les bases de Pirkle sont des sélecteurs chiraux fréquemment utilisés en HPLC pour la séparation énantiomérique d'une large gamme d'isomères optiques dont les alcools et les sulfoxydes font partie. La reconnaissance chirale est basée en premier lieu sur les interactions électrostatiques entre groupements chargés, puis secondairement par des interactions d'électrons π ou de ponts hydrogènes [60]. Différents dérivés de 3,5-dinitrobenzoyle-phénylglycine et 3,5-dinitrobenzoyle-leucine sont utilisés. La (R)-(-)-N-(3,5-dinitrobenzoyl)- α -phénylglycine (R-DNBPG), dont la structure est présentée dans la fig. 10, s'est révélé un bon sélecteur chiral pour l'ABZSO à pH 9. Malheureusement, la méthode de CZE utilise la R-DNBPG comme sélecteur chiral en solution dans le système tampon, et sa structure moléculaire présente un inconvénient : la coloration jaune du système tampon lors de sa mise en solution. Cette coloration réduit le signal émis par l'ABZSO et rend ainsi les limites de détection plus difficiles à atteindre dans le cas d'analyse de fluides corporels. D'autres méthodes comme la CEC ou la fixation du sélecteur chiral à la paroi du capillaire seraient des solutions pour résoudre le problème.

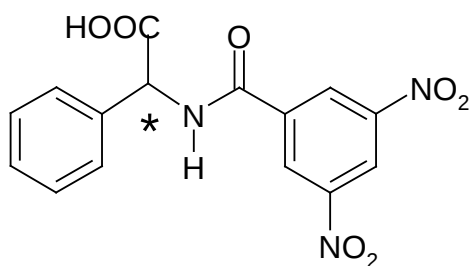


Fig. 10 : N-(3,5-dinitrobenzoyl)- α -phénylglycine.

Les CD, déjà mentionnées précédemment, constituent une autre classe de sélecteurs chiraux ; ces molécules cycliques en forme de cône tronqué, voir fig. 11, sont formées de glucopyranose [61]. Les α -CD, β -CD, γ -CD sont formées de 6, 7 et 8 molécules de glucopyranose respectivement. Elles peuvent également être modifiées, dérivatisées pour transformer leurs caractéristiques [49]. Leur utilisation se retrouve dans diverses techniques chromatographiques telles que la GC, l'HPLC, la chromatographie à fluide supercritique, ainsi que différentes méthodes électrophorétiques [62]. Les CD sont des outils polyvalents dans les séparations d'énantiomères ou d'isomères positionnels, et le développement des techniques ne fait qu'augmenter leur champ d'application. Les développements récents dans diverses techniques telles que les miniaturisations ont permis la séparation énantiomérique d'acides aminés dans des chips [63] ; et les séparations à grande échelle sont largement répandues lors de séparations préparatives ou semi-préparatives d'énantiomères en industrie à l'aide de l'électrophorèse à flux continu [62, 64, 65].

Les CD sont, grâce à leurs propriétés, les sélecteurs chiraux les plus fréquemment utilisés en CE [66]. Mais comme la séparation des énantiomères est due à tellement de différents facteurs, aucune loi générale n'a pu être établie quant à l'utilisation d'une CD pour la séparation de telle substance chirale [67]. Mais un facteur non négligeable est la grandeur de la cavité en fonction du volume de la molécule. La séparation énantiomérique de l'analyte va dépendre de son interaction avec la CD, par formation de complexes d'inclusion [67]. Ces différentes CD α , β et γ possèdent, respectivement, 18, 21 et 24 groupements alcooliques qui peuvent être impliqués lors de liaisons par ponts hydrogène. Les groupements alcooliques peuvent être substitués par des groupements hydroxypropyl, sulfate, acétyl, etc, qui changent la nature de la CD, mais aussi la grandeur de sa cavité. Les facteurs importants qui influencent l'interaction entre la CD et les énantiomères à séparer sont la nature de la CD (neutre, chargée), son degré de substitution, et sa concentration, par conséquent sa solubilité dans le système de séparation [67, 66].

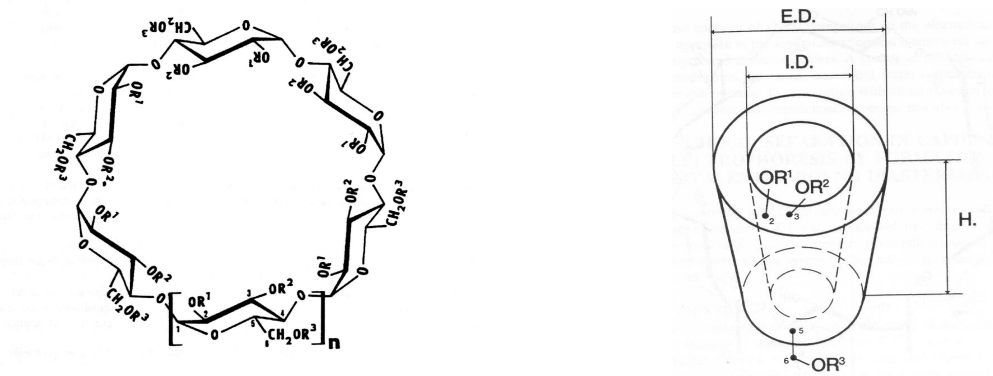


Fig. 11 : La figure de gauche représente une structure moléculaire générale d'une CD dans laquelle $n = 6, 7, 8$ pour les α, β, γ -CD respectivement, tandis que OR^1, OR^2 et OR^3 désignent les endroits qui peuvent être substitués [49]. La figure de droite représente le modèle tri-dimensionnel de la molécule avec ses diamètres externe (E.D.) et interne (I.D.) et sa hauteur (H.) [52, p. 170].

Les exemples suivants montrent la diversité des méthodes analytiques chirales basées sur la CE et les différents sélecteurs chiraux utilisés dans la résolution de composés thérapeutiques dans les fluides corporels. Les CD sont utilisées en CZE, comme pour l'analyse de la warfarine [68] et de la MQ [22, 23]. Elles sont également utilisées en MECC chirale ; elles sont alors additionnées à du SDS [69, premier article de CE chirale analysant un médicament dans un fluide biologique] dans le cas de la ciclétanine ou à un sel biliaire [70] dans le cas de la méphénytoïne. La vancomycine, antibiotique macrocyclique, a été le premier sélecteur chiral utilisé pour l'analyse de la venlafaxine et de son métabolite dans le plasma par CEC [71].

1.3.2.3. Méthodes de détection

Plusieurs modes de détection peuvent être utilisés en CE ; la détection va dépendre de la substance à analyser et du but de l'analyse. En CE, comme déjà mentionné auparavant, la détection des molécules se fait directement dans le capillaire de séparation (on-column), sauf dans certains cas comme par ex. dans l'utilisation d'un spectromètre de masse. Cette possibilité de détection on-column est due à l'UV transparence de la silice fondue des capillaires. La détection optique en CE est restreinte par la courte bande de détection due au petit diamètre du capillaire et aux faibles volumes d'échantillon introduits dans le capillaire.

Ces deux facteurs sont la cause des limites de détection à des concentrations supérieures en CE qu'en HPLC, par injection hydrodynamique [49].

Différents types de détecteurs UV peuvent être utilisés. Ils peuvent avoir des longueurs d'onde fixes ou variables. Pour les détecteurs à longueur d'onde fixe, des sources de radiation linéaires sont utilisées, tandis que des lampes de deutérium sont mises à contribution comme sources continues sur des longueurs d'onde entre 190 et environ 320 nm ; pour les analyses de substances médicamenteuses, ce spectre est suffisant pour la détection de la plupart des composés. Certains détecteurs possèdent des systèmes de scanning rapide, qui collectent le signal à grande vitesse et à intervalles réguliers sur un spectre déterminé, ou des détecteurs à barrette de diodes (DAD). Comme les composés migrent rapidement à travers l'endroit auquel le détecteur est placé, ce scanning doit impérativement être rapide. Ce système permet de récolter les données nécessaires pour un spectre UV/VIS. Des données qualitatives supplémentaires au sujet des substances peuvent ainsi être obtenues.

En dehors de la détection UV/VIS, la détection par la fluorescence est une bonne alternative lorsque les substances à analyser possèdent cette propriété et sont présentes en quantité minime. La détection en fluorescence est effectuée on-column, comme pour l'UV/VIS. Des lampes au xénon-mercure peuvent être utilisées comme source lumineuse, voir annexe 7.5. D'autre part la fluorescence par induction laser (LIF) permet de détecter certaines substances grâce à la haute énergie émise par des lasers et d'être encore plus spécifique.

Dernière méthode de détection énumérée dans le cadre de ce travail, la spectrométrie de masse (MS) est le détecteur de choix dans certains domaines. Le MS se trouve on-line et pas on-column comme les autres détecteurs décrits ; la détection est par conséquent effectuée à la sortie du capillaire. Grâce à de nouvelles techniques d'ionisation en MS, le couplage avec la CE a pu être amélioré. Et comme le MS donne d'importantes informations structurales, la recherche dans les domaines des protéines et des peptides a connu un élan considérable grâce à la CE-MS [49]. Par les informations qu'il fournit, le MS est le détecteur de choix en médecine légale, par exemple. Seuls les résultats obtenus à l'aide d'un MS sont pris en considération lors de litiges au tribunal.

1.3.2.4. Évaluation des résultats

Lors de l'obtention d'un électrophérogramme, divers paramètres doivent être mesurés ou calculés afin d'obtenir les rapports énantiomériques ou de permettre la quantification de l'analyse.

- Le temps de migration d'une substance est défini au temps t_i , mesuré au maximum du pic, voir fig. 12.
- L'aire (a) et la hauteur (h) des pics sont calculées par un programme informatique d'intégration. L'aire du pic est obtenue par l'intégration de la surface sous la courbe entre la ligne de base et la délimitation de l'aire du pic. Sa hauteur est obtenue par le calcul de la hauteur du pic à son maximum jusqu'à la ligne de base. Ces paramètres sont représentés dans la fig. 12.

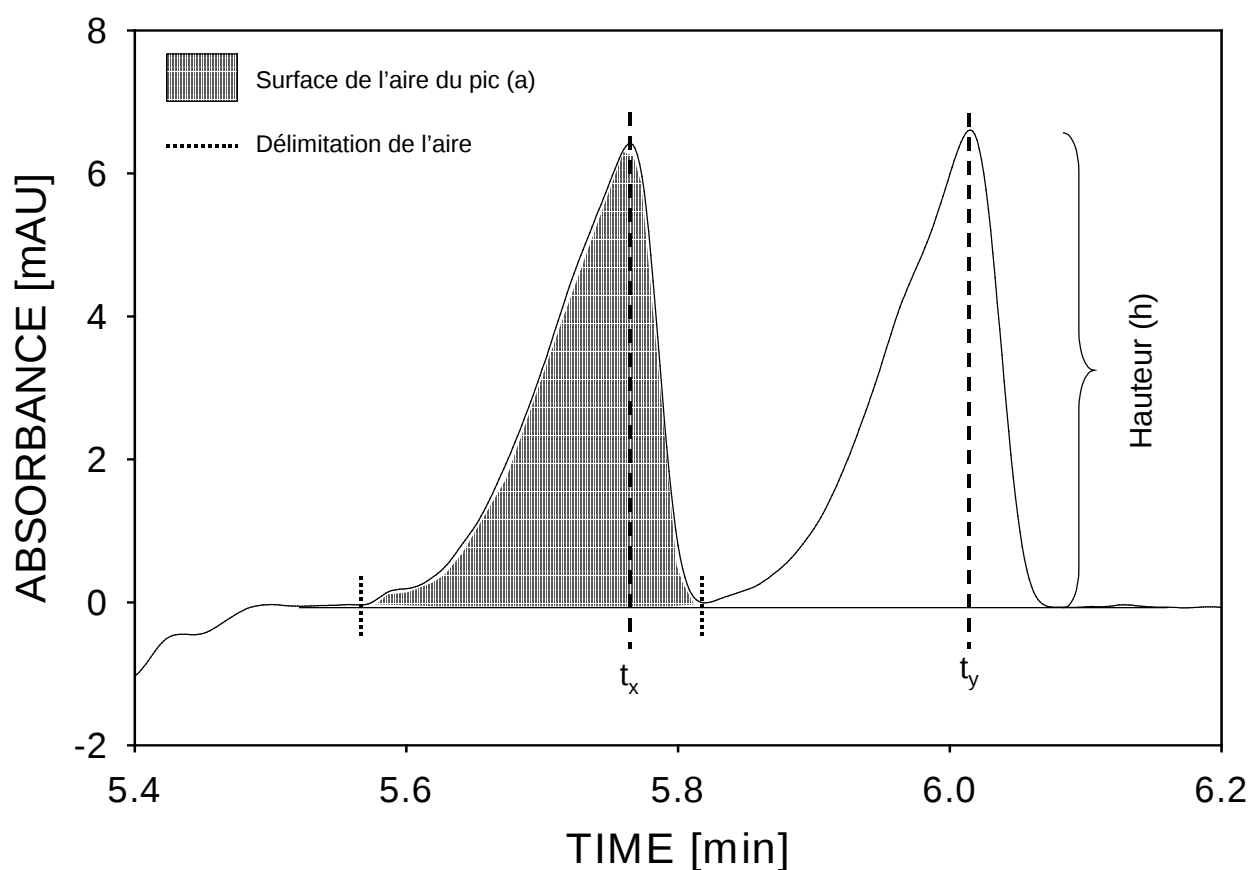


Fig. 12 : Représentation de l'aire et de la hauteur des pics qui permettent le calcul des rapports énantiomériques.

- Les aires et hauteurs relatives des pics sont déterminées par la division de l'aire ou de la hauteur par le temps de migration ; $a_r = a/t_i$ et $h_r = h/t_i$. Comme en CE les substances se déplacent dans un flux, une diffusion des composés se produit; elle doit être corrigée par rapport au temps de migration.
- Les rapports énantiomériques sont calculés à l'aide des aires ou des hauteurs relatives des pics ; rapport énantiomérique = $a_r(1)/a_r(2)$ ou $h_r(1)/h_r(2)$.

- La précision de divers paramètres, comme le temps de détection et les rapports énantiomériques, est évaluée à l'aide de la déviation standard relative (RSD).

Non seulement les paramètres électrophorétiques peuvent être évalués mais également les paramètres liés à la méthode.

- Linéarité de la méthode : la calibration est évaluée par une droite de régression linéaire contenant environ 5 échantillons standards.
- Précision et exactitude de la méthode : elles sont évaluées au travers d'échantillons de contrôle, trois au minimum (valeurs inférieures, moyennes et élevées). L'utilisation du standard interne pour l'étalonnage est un avantage lors des analyses après extraction. Le standard interne (IS) adéquat doit de préférence posséder une structure chimique proche afin d'avoir un comportement similaire lors de l'extraction et de l'analyse. La précision donne la variabilité, et l'exactitude fournit les éventuelles erreurs systématiques de la méthode.
- Limite de quantification et limite de détection : elles sont évaluées par le rapport signal : bruit d'un composé après extraction de sa matrice.

2. Buts de la thèse

Le but de ce travail de recherche a été d'analyser par électrophorèse capillaire (CE) le métabolisme stéréosélectif de substances médicamenteuses et/ou de leurs métabolites chiraux, principalement les rotamères et les sulfoxydes, dans divers fluides biologiques ainsi que par incubations *in vitro*. Pour permettre une vision d'ensemble de ces processus métaboliques, les méthodes utilisées doivent permettre l'extraction ainsi que la séparation de la substance mère et/ou de son/ses métabolites.

Dans le cadre d'incubations *in vitro* avec des microsomes de cellules d'insectes infectées par un baculovirus dont le gène exprime un CYP450 humain individuel (SUPERSOMES™) ou des microsomes hépatiques humains, le métabolisme stéréosélectif de diverses substances a été pris en considération. Ces incubations sont destinées à confirmer des métabolismes stéréosélectifs observés *in vivo*, à découvrir de nouvelles voies métaboliques mais également à déterminer l'intérêt de l'utilisation de la CE pour l'analyse de ces échantillons. L'impact des différents CYP450 dans la stéréosélectivité du métabolisme de la MET peut être déterminée par son incubation avec différents SUPERSOMES™, tels que le CYP3A4, le CYP2C9, le CYP2C19, le CYP2D6 et le CYP1A2, ainsi qu'avec un mélange de microsomes hépatiques humains. L'incubation de la MEPH avec le CYP2C19 peut quant à elle permettre de confirmer le métabolisme hautement stéréosélectif observé *in vivo*. Des incubations utilisant les SUPERSOMES™ pour le métabolisme *in vitro* et analysées par CE n'ont à ce jour pas encore été décrites dans la littérature.

Dans le cadre des métabolismes stéréosélectifs *in vivo*, divers fluides corporels sont utilisés ; il s'agit d'urine pour la MQ, ainsi que de plasma et de salive pour l'ABZSO. En ce qui concerne la recherche de la stéréosélectivité du métabolisme *in vivo*, le choix s'est orienté vers la MQ sur la base de la littérature décrivant l'excrétion des cinq métabolites hydroxylés principaux et la rotation bloquée des rotamères de la MQ [72] et du 2'OH-MQ [73]. Comme les énantiomères de la molécule mère et de l'un des métabolites hydroxylés ont pu être caractérisés, le but de ce travail a été l'observation de la chiralité des autres métabolites hydroxylés ainsi que la caractérisation de la stéréosélectivité éventuelle du métabolisme. A cet effet, il a fallu développer un système tampon permettant la résolution des énantiomères de la MQ et de ses métabolites. La procédure de préparation de ces échantillons comportait une hydrolyse. Celle-ci pouvant avoir une composante stéréosélective, la suite du projet s'est focalisée sur diverses méthodes permettant de confirmer l'origine métabolique et non pas hydrolytique de la stéréosélectivité. Les urines récoltées proviennent de deux volontaires EM

et d'un volontaire PM pour les CYP2D6 et CYP2C19. Les variations interindividuelles du métabolisme de la MQ sont des phénomènes décrits dans la littérature ; l'urine du volontaire PM a donc été récoltée dans le but d'observer si les polymorphismes ont une influence sur ces variations. Diverses incubations de la MQ avec différents CYP450 ont été faites afin d'essayer de découvrir les voies métaboliques et surtout d'observer leur stéréosélectivité.

L'intérêt de l'observation du métabolisme stéréosélectif de l'ABZ réside dans la possibilité de recevoir du laboratoire de routine de l'Institut de pharmacologie clinique des échantillons plasmatiques de patients traités contre l'échinococcose hépatique. Ce projet avait comme but de développer une méthode de CE chirale pour la quantification de l'ABZSO dans ces échantillons plasmatiques. Les bases de Pirkle ainsi que les cyclodextrines peuvent être prises en considération comme sélecteurs chiraux. Une séparation chirale donne la possibilité de déterminer les rapports énantiomériques et de quantifier les taux plasmatiques pour un lot de patients. Cette méthode chirale de CE peut ensuite être comparée à la méthode HPLC utilisée dans le laboratoire de routine de l'Institut de pharmacologie clinique. La détection de l'ABZSO par la fluorescence ainsi que l'analyse des extraits salivaires sont également prises en considération dans le cadre de cette étude. De plus, la biotransformation d'ABZ en ABZSO peut être observée par incubations in vitro d'ABZ avec des CYP450.

3. Partie expérimentale

3.1. Produits chimiques et systèmes tampons

Tous les produits chimiques utilisés sont de qualité analytique. La provenance des différents produits est mentionnée dans les articles en annexe. Différentes méthodes de CE ont été utilisées dans le cadre de ce travail. Les systèmes tampons utilisés, pour les analyses de la MEPH, de la MET et en partie pour l'ABZSO, ont été repris de la littérature. Tous les systèmes permettent la détection de la substance mère et/ou du ou des métabolites.

La méphénytoïne est analysée à l'aide d'un système tampon MECC chiral constitué de 5.6 mM de tétraborate disodique décahydraté, de 8.4 mM d'hydrogénophosphate disodique dihydraté et de 95 mM de sodium dodécyl sulfate (SDS). 40 mM de sélecteur chiral (β -cyclodextrine [β -CD]) et 8 % d'isopropanol sont ajoutés à cette solution [15]. La séparation énantiomérique de la MET et de son métabolite 2-ethylidène-1,5-diméthyl-3,3-diphénylpyrrolidine (EDDP) se fait par CZE chirale en milieu acide. Le système tampon se compose d'une solution de 100 mM de dihydrogénophosphate sodique hydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) à pH 2.3 auquel sont ajoutés 2 mM de sélecteur chiral (heptakis (2,6-di-O-méthyl)- β -cyclodextrine [DIMEB]) et 10 % de méthanol [6].

Pour certaines mesures chirales d'ABZSO, une solution de 30 mM de tétraborate de sodium décahydraté à pH 9.2 est utilisée ; le sélecteur chiral (la (R)-(-)-N-(3,5-dinitrobenzoyl)- α -phénylglycine [R-DNBPG]) est ajouté à la solution électrolytique. Le système tampon à base de cyclodextrine mis au point par Paias et al. [17] a été adopté lors de sa publication. Une quantité de 3 % (m/v) de sélecteur chiral (β -cyclodextrine sulfatée, 7-11 sulfates/mol de CD [sulfated- β -CD]) est ajoutée à une solution de 20 mM de tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris) dont le pH a été ajusté à 7.0 à l'aide d'acide phosphorique.

La MQ et ses métabolites sont séparés à l'aide d'un système tampon achiral constitué d'une solution de 75 mM d'hydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) à pH 2.5. Le pH a été ajusté par adjonction d'acide phosphorique. Pour les mesures chirales, on utilise un pH de 2.1 et 50 mM de sélecteur chiral (hydroxypropyl- β -cyclodextrine, degré de substitution ~ 0.6 [OHP- β -CD]) [23].

3.2. Instruments

Les analyses par CE ont été effectuées à l'aide de deux appareils différents. Le système d'électrophorèse capillaire BioFocus 3000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a été utilisé pour les détections UV de la MQ, de l'ABZSO et des principes actifs incubés in vitro. Un avantage de cet instrument est le détecteur de scanning rapide. Le miroir rotatif rapide permet l'acquisition d'un certain nombre de points par seconde, et permet ainsi de récolter des spectres UV. Le ventilateur des carrousels et le liquide régulant la température du capillaire ont permis de thermostatier l'instrument entre 15 et 40 °C, selon les mesures. Les échantillons sont injectés par application d'une pression positive de quelques psi $\times$ s. Des capillaires en silice fondue non traitée d'un I.D. de 50 μ m ont été utilisés. La longueur totale a varié entre 50 et 104.6 cm et la longueur jusqu'au détecteur entre 45.4 et 100 cm.

Le système d'électrophorèse SpectraPHORESIS 100 (Thermo Separation Products, Fremont, CA, USA) couplé à un détecteur Argos250B (Flux Instruments, Bâle, Suisse) a permis la détection par fluorescence de certains échantillons d'ABZSO. Le détecteur est composé d'une lampe Xe-Hg reliée par des fibres optiques venant de et allant à la cellule de détection, et d'une cellule de détection dans laquelle la lumière fluorescente est totalement réfléchi à l'intérieur du capillaire. La lumière fluorescente est collectée à l'aide d'un ellipsoïde en fin de cellule avant d'être guidée dans la fibre optique amenant au photomultiplicateur. La majeure partie des mesures ont été effectuées par excitation à 280 nm et émission à l'aide d'un filtre cut-off de 320 nm. L'injection des échantillons se fait par aspiration pendant 0.8 s. Des capillaires d'un I.D. de 50 μ m en silice fondue non traitée ont été utilisés. La longueur totale était de 71 cm et la longueur jusqu'au détecteur de 48 cm.

Les conditions particulières des mesures peuvent être trouvées dans les articles en annexe.

3.3. Provenance des fluides biologiques

Pour les investigations au sujet de la MQ, trois volontaires ont pris per os une dose unique de Toquilone compositum[®], contenant 250 mg de MQ et 25 mg de chlorhydrate de diphénhydramine (DH). Les urines ont été récoltées entre 0 et 42 h après la prise du comprimé par 4 intervalles : 0-9 h, 13-17 h, 24-32 h et 37-42 h. Un volontaire est PM et les deux autres sont EM pour les CYP2C19 et CYP2D6. Les phénotypes des volontaires ont été déterminés antérieurement pour les deux cytochromes. Les détails sont décrits dans les annexes 7.2 et 7.3.

Les plasmas de patients traités à l'ABZ ont été obtenus du laboratoire de routine de l'Institut de pharmacologie clinique, lequel a déterminé le taux plasmatique d'ABZSO des échantillons par HPLC [74]. Les échantillons de salive ont été collectés en même temps que les échantillons de plasma correspondants et proviennent de patients consentants. D'autres informations se trouvent dans les annexes 7.4 et 7.5.

Les urines utilisées pour les analyses du métabolisme de la MET in vivo proviennent de patients recevant de la MET racémique en Suisse ou de l'énantiomère actif R en Allemagne. Quant aux urines contenant de la méphénytoïne, elles proviennent de patients pour lesquels le phénotype hydroxylateur a été déterminé à l'Institut de pharmacologie clinique. De plus amples détails peuvent être trouvés dans l'annexe 7.1.

3.4. Incubations in vitro

Les enzymes et autres produits de Gentest utilisés pour les incubations in vitro, ainsi que les conditions expérimentales, sont décrits dans l'annexe 7.1. Les incubations in vitro ont été effectuées selon les recommandations du producteur. Une quantité appropriée de principe actif est ajoutée à un tampon phosphate à 100 mM de pH 7.4 contenant des solutions A (26.0 mM NADP^+ , 66 mM glucose-6-phosphate et 66 mM MgCl_2) et B (40 U/ml de glucose-6-phosphate déshydrogénase dans 5 mM de citrate de sodium) régénérant le NADPH. Ce mélange est thermostaté à 37 °C pendant 10 min dans un Eppendorf Thermomixer avant d'ajouter le CYP adéquat ou les microsomes hépatiques humains. Les solutions sont incubées entre 1 et 72 h, placées dans de la glace pour terminer la réaction, et finalement extraites. Des solutions mères aqueuses de MET (1 mg/ml) et de DH (2 et 10 mg/ml) ont été utilisées, et des solutions mères ont été préparées dans l'acétonitrile pour la MEPH (2 mg/ml) et dans le méthanol pour la MQ (2, 16 et 70 mg/ml) et l'ABZ (1 mg/ml).

3.5. Hydrolyses

Les urines collectées pour les analyses métaboliques de la MQ ont subi une hydrolyse enzymatique préalablement à leur extraction. Pour cette étape, 2.5 ml d'urine sont combinés avec 2.5 ml d'un tampon acétate à pH 5.4, puis 50 μl d'une solution de β -glucuronidase de *Escherichia Coli* (Type VII-A, 25'000 unités/ml) sont ajoutés. Les échantillons ont été incubés 4 h, puis extraits par LLE ou SPE, voir paragraphe 3.6 ou annexes 7.2 et 7. 3.

3.6. Méthodes d'extraction

Chaque substance étudiée dans le cadre de ce travail a besoin d'une méthode d'extraction spécifique. Ces méthodes sont décrites précisément dans les articles en annexe. Deux modes d'extraction principaux ont été utilisés : l'extraction liquide-liquide et l'extraction en phase solide. Dans toutes les extractions, la substance mère ainsi que le ou les métabolites sont extraits en une seule opération pour permettre leur analyse simultanée.

Le système d'extraction liquide-liquide (LLE) est basé sur la différence de polarité et de solubilité de la molécule entre la phase aqueuse et la phase organique. Pour l'extraction de la MQ, on a utilisé un système d'extraction préfabriqué, les Toxi-Tubes A (Analytical Systems, Laguna Hills, CA, USA). Cette LLE commerciale contient en tant que solvants organiques un mélange de dichlorométhane, de 1,2-dichloroéthane, d'heptane et d'isopropanol dont les proportions ne sont pas connues, ainsi qu'un sel basique permettant d'effectuer une extraction à pH 9. La MQ est une base faible dont le pKa est de 2.5, l'extraction liquide-liquide basique permet à la molécule non chargée de s'accumuler dans la phase organique. L'extraction ne se limite pas à la molécule mère, mais s'étend également aux métabolites principaux. L'extraction de l'ABZSO est similaire à l'extraction utilisée en analyse de routine [74]. Elle est basée sur une extraction liquide-liquide par du dichlorométhane à pH 10.3. L'ABZSO est une molécule lipophile, de ce fait la valeur du pH n'interfère que peu dans l'extraction et possède des pKa dont les valeurs sont 0.3 et 9.7, ce qui rend la molécule amphotère. Au pH de 10.3 la molécule est chargée négativement mais son accumulation en phase organique ne semble pas être influencée. Les mêmes conditions permettent également l'extraction de l'ABZ et de l'ABZSO₂. La LLE de la méphénytoïne a été effectuée à l'aide de dichloroéthane comme décrit dans la réf. [15].

Certaines extractions en phase solide (SPE) ont également été effectuées. La MQ et ses métabolites peuvent en plus de la méthode de l'extraction liquide-liquide être extraits à l'aide de cartouches d'extraction en phase solide [23]. Dans cette méthode, des cartouches de mode mixte sont utilisées ceci signifie la présence d'une phase hydrophobe et d'un échangeur d'ions ; la nature exacte des phases d'extraction utilisées n'est pas connue. Il s'agit plus précisément de cartouches Bond Elut Certify N° 1211-3050 (Analytichem International, Harbor City, CA, USA). Celles-ci permettent d'éluer dans une première fraction les substances plutôt acides et neutres, et dans une deuxième fraction les composés basiques.

En leur qualité de bases faibles, la MQ et certains de ses métabolites sont élués dans la première fraction, tandis que la diphényldramine et d'autres métabolites de la MQ se trouvent

dans la seconde fraction récoltée. Pour la SPE de la méthadone et de l'EDDP, les mêmes cartouches ont été utilisées, mais la procédure d'élution est différente. En leur qualité de molécules basiques, elles se trouvent dans la solution de la deuxième élution contenant 5 % d'ammoniac concentré [9].

3.7. Évaluation des résultats

Les résultats obtenus à l'aide d'un électrophérogramme peuvent être interprétés de manière qualitative ou quantitative selon le but de l'analyse. Dans le cadre de ce travail, la seule évaluation quantitative a été celle de l'ABZSO dans les plasmas de patients traités contre l'échinococcose hépatique. La stéréosélectivité des métabolismes et des incubations in vitro a quant à elle été évaluée de façon qualitative.

Plusieurs étapes sont nécessaires à l'évaluation d'une méthode. Pour commencer, des validations préliminaires sont nécessaires :

- L'analyse du fluide corporel (matrice vierge), appelé blanc, permet la détection d'éventuels composés endogènes extraits. La fig. 13A montre un blanc sans interférences.
- L'adjonction de solution standard dans le blanc (fig. 13B) révèle la possibilité, après extraction, d'analyse du composé et les éventuelles interférences avec les composés endogènes.
- L'analyse d'un extrait de fluide corporel (fig. 13C) provenant d'un patient permet de comparer les temps de migration ainsi que les spectres UV du composé extrait par rapport à ceux de la solution standard ajoutée à la matrice vierge. Les spectres UV des composés peuvent être consultés dans les articles en annexe. Les spectres UV permettent l'identification et l'estimation de la pureté du composé extrait : si les spectres UV du composé extrait et de la solution standard sont identiques, le pic contient en majeure partie le composé extrait ; dans le cas contraire, une substance endogène interfère avec le composé à analyser. Pour la confirmation et l'identification des composés extraits, il faut non seulement constater des spectres UV identiques et des temps de migration correspondants entre la substance extraite et la solution standard, mais également procéder à la réanalyse de l'extrait de fluide corporel après adjonction de solution standard du composé (fig. 13D). Cette étape qualitative est importante tant pour les analyses qualitatives que quantitatives ; elle détermine la sélectivité de la méthode.

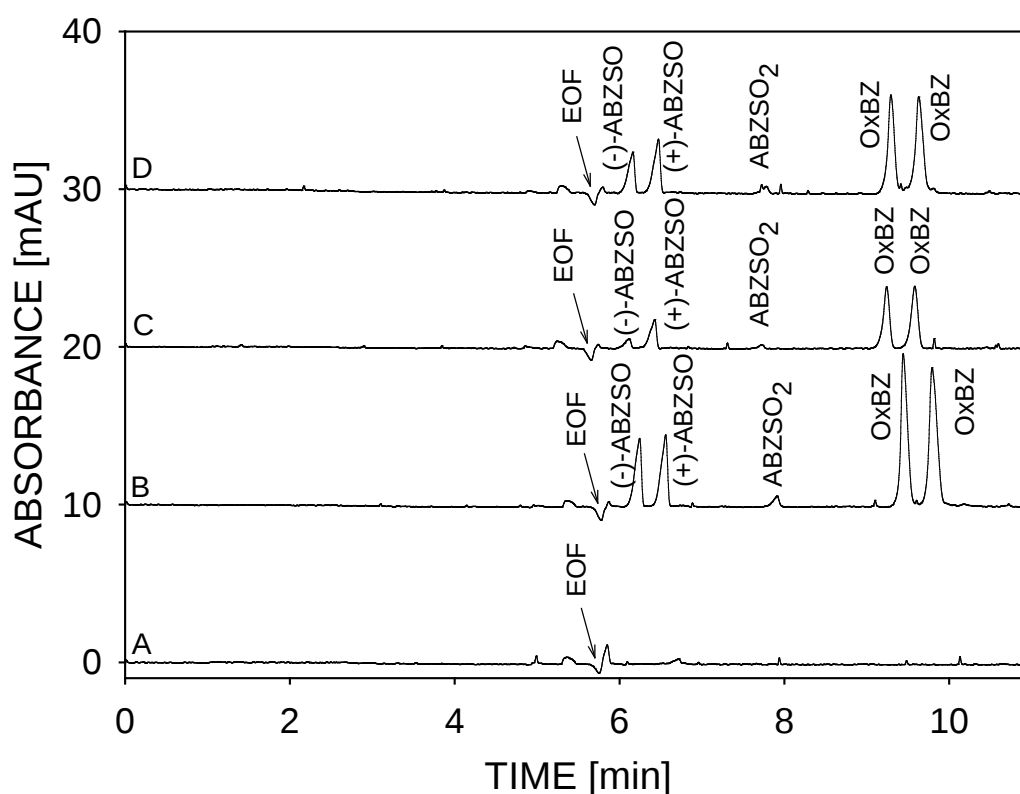


Fig. 13 : Electrophérogrammes obtenus après extraction LLE ; ils représentent (A) un plasma vierge, (B) un plasma vierge auquel des solutions standard racémiques d'ABZSO (2.5 µg/ml) et d'OxBZ (5 µg/ml) ont été ajoutées, (C) un plasma d'un patient contenant 1.77 µg/ml d'ABZSO (valeur déterminée par HPLC) auquel 3 µg/ml d'OxBZ (IS) ont été ajoutées et (D) le mélange 1 : 1 des échantillons (B) et (C). EOF représente le flux électro-osmotique. Système tampon : 20 mM Tris pH 7 contenant 3 % (m/v) de sulfated β -CD. Conditions électrophorétiques : 18 kV (courant env. 56 µA), thermorégulation du capillaire : 20 °C. Injection : 5 psi $\times$ s. Capillaire de 50µm de I.D., longueur totale (jusqu'au détecteur) du capillaire : L = 50 cm (l = 45.4 cm). Longueur d'onde de détection : 225 nm.

Si les résultats des validations préliminaires sont prometteurs, les paramètres suivants peuvent être évalués :

- La linéarité de la méthode est évaluée par une droite de régression linéaire composée de 6 échantillons provenant d'extraits plasmatiques auxquels une solution d'ABZSO et de IS a été ajoutée. Cette droite de régression linéaire permet ensuite l'évaluation quantitative de l'ABZSO au travers des aires relatives des pics. La concentration inconnue d'ABZSO dans le plasma a pu être calculée à l'aide de cette régression linéaire et de la concentration connue de IS ajouté à l'échantillon.

- La précision est évaluée à l'aide de la déviation standard relative (RSD). Les facteurs évalués sont la variabilité des rapports énantiomériques après extraction dans le cas de la MQ et la variabilité de la méthode de quantification dans le cas de l'ABZSO.
- La représentation des valeurs obtenues pour les rapports énantiomériques calculés par les hauteurs relatives des pics de (-)-ABZSO/(+)-ABZSO, a été effectuée sous la forme d'un diagramme de fréquence ; un test de Kolmogorov-Smirnov a été utilisé pour évaluer la distribution des rapports énantiomériques.
- La comparaison entre deux méthodes analytiques peut être faite à l'aide de différents tests statistiques ; dans le cas de la comparaison entre la CE chirale et l'HPLC pour la quantification du taux plasmatique des patients traités contre l'échinococcose hépatique, on a procédé à une corrélation linéaire, à un test de t et à l'analyse de l'exactitude par une représentation de la différence comparée à la moyenne des paires de résultats.
- Les spectres UV obtenus par le détecteur à scanning rapide sont consultés au maximum du pic. Dans le spectre UV de la substance, l'erreur systématique du détecteur est neutralisée par soustraction d'un spectre provenant d'un point sur la ligne de base. La superposition du spectre UV provenant du composé à analyser et de celui de la solution standard permet l'identification du composé, voir annexe 7.2 fig. 10.

4. Résultats et discussion

4.1. Aspects du métabolisme stéréosélectif de la méphénytoïne et de la méthadone par incubation in vitro

L'étude du métabolisme peut se faire par diverses méthodes, des études in vivo ou in vitro. Lors d'essais in vitro, des principes actifs sont incubés avec des microsomes de cellules d'insectes infectées par un baculovirus dont le gène exprime un CYP450 humain ou avec des microsomes hépatiques humains afin de produire enzymatiquement le ou les métabolites. Le métabolisme de deux substances chirales, la méphénytoïne et la méthadone, a été examiné dans le cadre de cette étude.

La méphénytoïne (MEPH), voir fig. 14, est une substance anti-épileptique rarement utilisée en clinique en raison de sa toxicité potentielle et des effets secondaires de l'un de ses métabolites, le nirvanol [75]. La S-MEPH est connue pour être métabolisée de manière hautement stéréosélective en S-4-hydroxy-méphénytoïne (S-4-OH-MEPH) par le CYP2C19, voir fig. 14 [16]. Le polymorphisme génétique dû à cette hydroxylation stéréosélective et les conséquences dans différentes populations sont décrits de façon plus détaillée dans l'annexe 7.1.

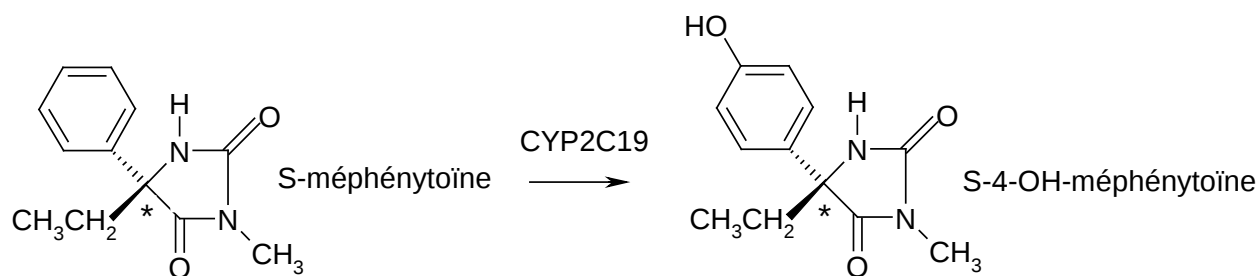


Fig. 14 : Structure chimique de la S-MEPH et de son métabolite hydroxylé le S-4-OH-MEPH formé par le CYP2C19. L'astérisque représente le centre chiral.

Les méthodes de MECC chirales ont déjà été utilisées antérieurement lors d'analyses du métabolisme stéréosélectif de la MEPH dans l'urine [15] et après incubation avec des microsomes hépatiques humains [70]. L'intérêt de l'incubation de la MEPH avec le CYP2C19 SUPERSOMES™ réside donc dans la détermination de sa capacité d'hydroxylation in vitro, en tant qu'enzyme isolée présente dans la solution d'incubation.

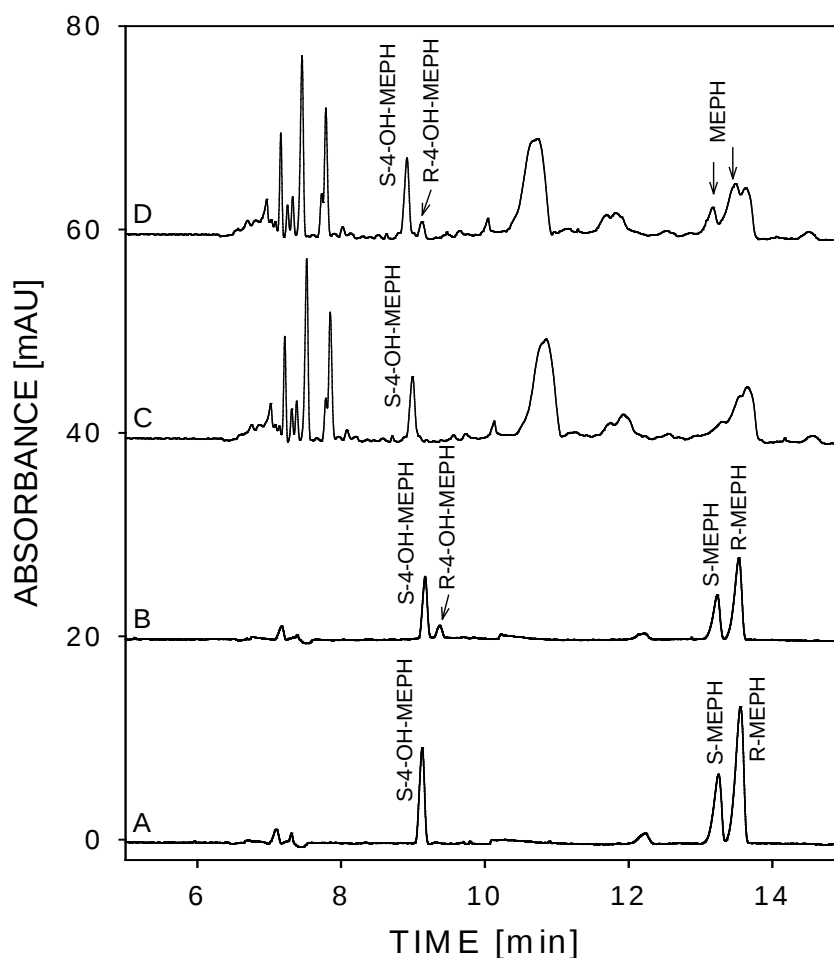


Fig. 15 : Électrophérogrammes de MECC chirale obtenus après extraction liquide-liquide (A) d'une incubation in vitro de 2 h de 100 μ M de solution racémique de MEPH avec le CYP2C19, (B) du même échantillon dilué 2 fois auquel ont été ajoutés 12.5 μ g/ml d'une solution de MEPH racémique et 12.5 μ g/ml d'une solution de 4-OH-MEPH racémique, (C) d'un échantillon dilué deux fois de 5 ml d'une urine de patient EM pour le CYP2C19 et (D) du même échantillon que (C) contenant les mêmes quantités de la solution de MEPH racémique et de la solution de 4-OH-MEPH racémique qu'en (B). Système tampon : tampon borate/phosphate contenant 95 mM de SDS, 40 mM de β -CD et 8 % d'isopropanol, pH de 9.1. Conditions électrophorétiques : 20 kV (courant env. 35 μ A), température du capillaire 20 °C. Capillaire de 50 μ m I.D., longueur totale (jusqu'au détecteur) L = 50 cm (l = 45.4 cm). Injection par pression positive de 5 psi $\times$ s. Longueur d'onde de détection : 195 nm.

Une concentration de 100 μM d'une solution racémique de MEPH a été incubée avec le CYP2C19 pendant 2 h à 37 °C, avant de faire l'objet d'une extraction liquide-liquide et d'une analyse par MECC chirale à 195 nm. La composition du système tampon est décrite dans la légende de la fig. 15 ou sous paragraphe 3.1. La comparaison des électrophérogrammes obtenus respectivement par cet échantillon (fig. 15A) et par le même échantillon dilué deux fois, auquel des solutions racémiques de MEPH et de 4-OH-MEPH ont été ajoutées (fig. 15B), montre la formation stéréosélective de S-4-OH-MEPH et parallèlement la disparition de S-MEPH. L'adjonction de solutions racémiques prouve non seulement la haute stéréosélectivité du métabolisme mais également la chiralité de l'essai. De plus, en combinaison avec les spectres UV récoltés (voir réf. [15]), cette adjonction de solutions standard permet l'identification des composés. Cet électrophérogramme obtenu par extraction de cette incubation in vitro de la MEPH avec le CYP2C19 a été comparé à celui de l'extrait urinaire d'un métaboliseur rapide qui, in vivo, possède la faculté d'hydroxyler la S-MEPH en S-4-OH-MEPH, voir fig. 15C. On peut voir que la S-4-OH-MEPH est présente dans les extraits urinaires de patients EM. Quant à la R-MEPH, elle reste intacte après incubation avec le CYP2C19, qui hydroxyle stéréosélectivement la S-MEPH, voir fig. 15A. Ceci est en accord avec la littérature qui décrit la déméthylation préférentielle de la R-MEPH en nirvanol [16] ; l'enzyme responsable de cette voie métabolique n'est à l'heure actuelle pas encore élucidée [76]. L'éventuelle présence de MEPH dans la fig. 15C est masquée par l'interférence avec des composés endogènes. Ces interférences n'empêchent pas de déterminer le polymorphisme génétique d'un individu [15]. L'incubation in vitro de la MEPH avec le CYP2C19 SUPERSOMES™ a permis de démontrer son activité enzymatique in vitro et les résultats obtenus reflètent les conditions in vivo.

La méthadone (MET) est le second principe actif à métabolisme stéréosélectif étudié dans le cadre de ce projet. La MET est la substance la plus répandue dans le traitement de maintenance des patients présentant une dépendance aux opiacés ; elle est également utilisée dans la thérapie de la douleur chronique. En Suisse, seul le mélange racémique est utilisé ; en Allemagne, en revanche, tant le mélange racémique que l'énantiomère R (actif) sont autorisés en thérapeutique [6]. La biotransformation de MET en EDDP (déméthylation puis cyclisation spontanée, voir fig. 16) est catalysée principalement par le CYP3A4 [77, 78]. La stéréosélectivité métabolique de la MET est observée à travers les rapports énantiomériques obtenus dans différents fluides corporels comme le plasma [37], l'urine [6, 9, 12] ou la salive

[13]. La MET est un agoniste des récepteurs μ avec des propriétés pharmacologiques qualitativement similaires à celles de la morphine. L'activité analgésique de la R(-)-MET est 8 à 50 fois importante que celle de l'énantiomère S(+) [78a]. De plus d'importantes variations interindividuelles sont observées dans les rapports énantiomériques ; elles sont dues à des influences métaboliques, pharmacocinétiques [37, 79].

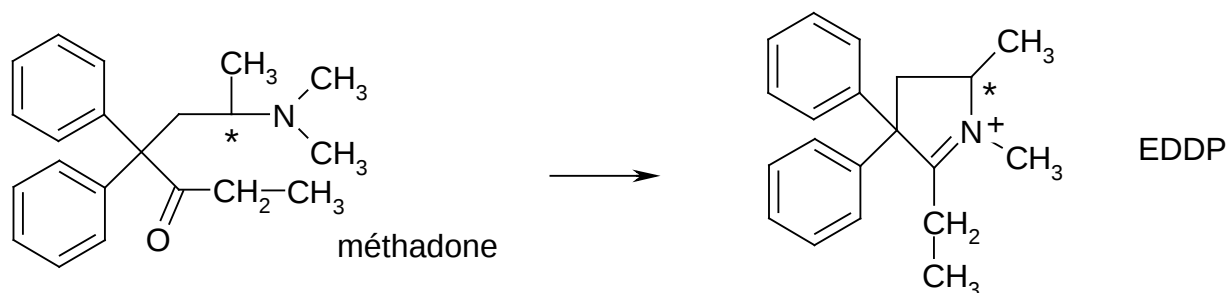


Fig. 16 : Bio-transformation de la méthadone en 2-éthylidène-1,5-diméthyl-3,3-diphénylpyrrolidine (EDDP). L'astérisque représente le centre chiral.

Ces considérations ont suscité l'intérêt pour l'observation de l'impact de l'incubation *in vitro* de la MET avec différents SUPERSOMES™, tels que le CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 et le CYP1A2. Les échantillons sont incubés 24 h, extraits à l'aide d'une méthode SPE optimisée par Lanz et Thormann [9], puis analysés par CZE-UV d'après une méthode de Frost et al. [6] dont le système tampon est composé d'une solution de 100 mM de phosphate contenant 2 mM de DIMEB comme sélecteur chiral ainsi que 10 % de méthanol.

La formation d'EDDP résultant d'incubations de solutions racémiques de MET avec les CYP2C9, CYP2C19 et CYP2D6, permet l'observation de la stéréosélectivité de la biotransformation de la MET, voir tableau 3. Les rapports énantiomériques d'EDDP (R/S) obtenus par le CYP2C9 et CYP2C19 sont de 2.78 et 3.03 respectivement, tandis que celui du CYP2D6 se monte à 0.39. Le CYP1A2, également mentionné dans la littérature comme étant un cytochrome actif dans le métabolisme de la MET, n'a pour sa part pas produit d'EDDP dans les conditions d'incubation utilisées. Le CYP3A4, dernière enzyme citée dans le tableau 3 et principale enzyme métabolisant la MET [77], a révélé un rapport énantiomérique (R/S) de 0.91, qui, par incubation d'une solution de MET dont le rapport énantiomérique (R/S) est de 1.06, dénote une formation d'EDDP non stéréosélective. L'incubation de solutions de MET non racémiques a permis de confirmer les résultats précédents. Les rapports énantiomériques obtenus par ces incubations peuvent être consultés dans le tableau 3. Ces

observations concernant l'absence de stéréosélectivité dans la formation d'EDDP lors du processus métabolique par le CYP3A4 sont en accord avec la littérature [77]. Deux électrophérogrammes de la fig. 17 montrent les résultats obtenus par les extraits des incubations d'une solution racémique (17A) et d'une solution non racémique (17B) de MET. D'autres considérations liées aux incubations des solutions non-racémiques de MET ainsi que les électrophérogrammes obtenus par incubation de la solution racémique avec les autres cytochromes individuels peuvent être consultés dans l'annexe 7.1.

Tableau 3 : Rapports énantiomériques de divers échantillons obtenus après incubation in vitro ou échantillons urinaires, contenant de la MET et/ou de l'EDDP.

Echantillon	Matrice de l'échantillon ou de l'incubation	Rapport énantiomérique: méthadone R/S ^{a)}	Rapport énantiomérique: EDDP R/S ^{a)}
MET rac.(200 µM) ^{c)}	CYP3A4	1.06	0.91
MET rac. (200 µM) ^{c)}	CYP2C9	1.08	2.78
MET rac. (200 µM) ^{c)}	CYP2C19	1.05	3.03
MET rac. (200 µM) ^{c)}	CYP2D6	1.08	0.39
MET rac. (200 µM) ^{c)}	CYP1A2	1.07	-
MET rac. (200 µM) ^{c)}	HLM	1.11	0.73
MET non rac. (R/S=0.56) ^{b) c)}	CYP3A4	0.55	0.39
MET non rac. (R/S=2.07) ^{b) c)}	CYP3A4	2.10	2.22
Urine de patient (fig. 17D)	Urine	1.52	0.59

a) Rapport des hauteurs relatives des pics.

b) Echantillons d'environ 200 µM.

c) Rapports énantiomériques d'EDDP et de MET obtenus après incubation in vitro.

Sachant que, in vivo, la stéréosélectivité du métabolisme de MET est observable dans divers fluides corporels, l'incubation de la solution racémique avec des microsomes hépatiques humains (HLM) présente un grand intérêt. On constate non sans étonnement une formation stéréosélective des énantiomères d'EDDP (rapport énantiomérique (R/S) de 0.73, voir tableau 3), tandis que la substance mère reste racémique, voir fig. 17C. Cette incubation est intéressante en comparaison avec l'extrait urinaire d'un patient traité avec le mélange racémique de MET, voir fig. 17D ; dans cet extrait urinaire, la substance mère et l'EDDP montrent une stéréosélectivité. Les phénomènes in vivo ne sont pas encore tous élucidés ; de plus, ils sont mieux connus pour la MET que pour l'EDDP.

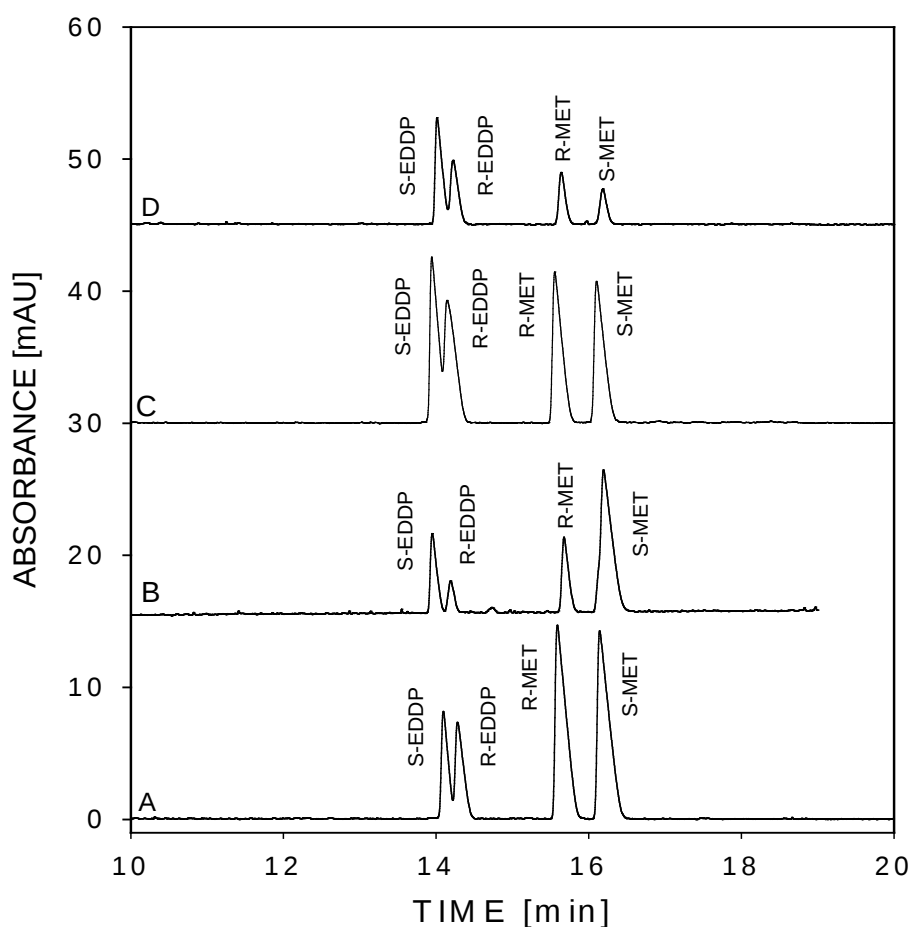


Fig. 17 : Electrophérogrammes représentant des incubations avec le CYP3A4 après extraction SPE (A) d'une solution racémique de 200 μ M de MET et (B) d'une solution d'environ 200 μ M de MET dont le rapport énantiomérique est de 0.56 (R/S). L'électrophérogramme en (C) représente une incubation d'une solution racémique de 200 μ M avec les HLM après extraction SPE et en (D) un extrait urinaire d'un patient traité avec une solution racémique de méthadone. L'électrophérogramme en B présente un offset de 1 min sur l'axe des x. Système tampon : tampon phosphate de 100 mM pH 2.3 contenant 2 mM de DIMEB comme sélecteur chiral et 10 % de méthanol. Conditions électrophorétiques : 20 kV (courant env. 46 μ A), injection par pression positive de 3 psi $\times$ s, capillaire thermostaté à 20 °C. Capillaire de 50 μ m I.D., longueur totale (jusqu'au détecteur) L = 50 cm (l = 45.4 cm). Longueur d'onde de détection : 200 nm.

4.2. Analyse par CE chirale du métabolisme stéréosélectif de la méthaqualone dans l'urine

La méthaqualone (MQ), voir fig. 18, est un principe actif hypnotique et anticonvulsivant. Les problèmes d'accoutumance et d'abus en font une substance strictement réglementée dans certains pays, tandis que dans d'autres la MQ est utilisée en thérapeutique. En Suisse, le principe actif se trouve sur le marché dans le médicament Toquilone Compositum® en combinaison avec la diphénhydramine (DH), un antihistaminique. La combinaison avec la DH permet un meilleur effet sédatif, sans influencer la toxicité du produit [80, 81].

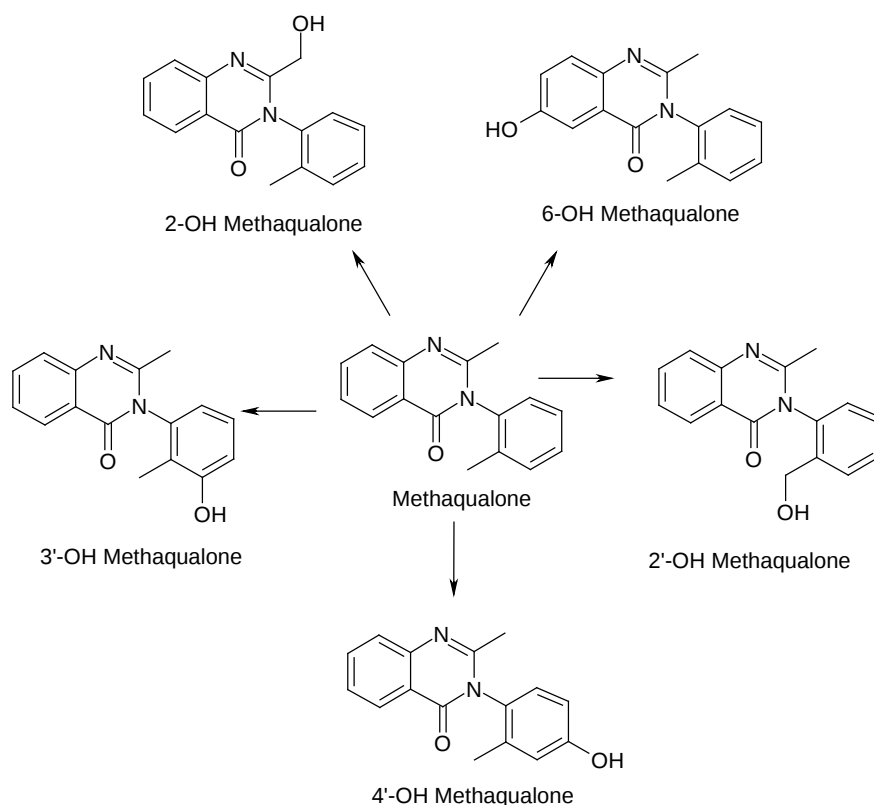


Fig. 18 : Structure moléculaire de la méthaqualone et de ses métabolites hydroxylés principaux.

Le métabolisme de la MQ se fait en majeure partie par hydroxylation de la molécule à divers endroits, ainsi que par formation de O-glucuronides, de O-méthyl éther et de N-oxyde [82, 83]. Aucune activité thérapeutique significative n'a pu être établie pour les métabolites [82]. La différence d'activité anticonvulsive des rotamères de la MQ a été évaluée par un test utilisant des électro-chocs chez les souris. Ce modèle a montré des activités biologiques semblables pour les énantiomères, tout en indiquant une activité anticonvulsive un peu plus puissante pour le rotamère M(-) [8]. De grandes variations interindividuelles ont été observées dans le métabolisme de la MQ. Cinq métabolites mono-hydroxylés principaux sont pris en

considération dans le cadre de ce travail: la 2'-hydroxy-méthqualone (2'OH-MQ), la 3'-hydroxy-méthqualone (3'OH-MQ), la 4'-hydroxy-méthqualone (4'OH-MQ), la 2-hydroxy-méthqualone (2OH-MQ) et la 6-hydroxy-méthqualone (6OH-MQ) [82]. Les structures de ces métabolites hydroxylés sont présentées dans la fig. 18.

Diverses recherches concernant le métabolisme de la MQ ont été effectuées de façon achirale par GC [84] et par GC-MS [85]. Le but de cette étude était le développement d'un système analytique sur la base de la CE afin de permettre la séparation des énantiomères des cinq métabolites hydroxylés de la MQ en une seule mesure.

En premier lieu, un tampon adéquat pour la séparation de la MQ et de ses cinq métabolites en une seule mesure est requis pour la vision d'ensemble du motif d'excrétion. La MQ, base faible, possède un pKa de 2.5 [83]. L'analyse achirale de la MQ et de ses cinq métabolites hydroxylés est possible à l'aide d'un système tampon phosphate de 75 mM à pH 2.5, voir fig. 19A. Au pH du système tampon, la molécule est chargée à 50 % ; comme l'EOF est presque nul, cette charge positive va permettre la migration de la molécule à travers le capillaire vers le détecteur. Pour permettre une séparation énantiomérique, l'adjonction d'un sélecteur chiral est nécessaire.

Le choix du sélecteur chiral adéquat est une étape essentielle pour les séparations énantiomériques. Une étude préliminaire avait décrit la séparation des énantiomères de la MQ par CZE, dont le système tampon est composé de 75 mM de phosphate à pH 2.5 contenant 8 mM d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (OHP- β -CD) [22]. Comme la cyclodextrine utilisée est neutre, la migration des énantiomères dépend de leur charge et de leur force de complexation avec le sélecteur chiral. Ce système tampon a été appliqué pour la séparation énantiomérique des métabolites de la MQ, mais ne permet pas de séparer tous les composés, voir fig. 19B. Toutefois, un début de séparation énantiomérique est détecté pour tous les métabolites. De ce fait, ce système tampon a été le point de départ pour le développement du système optimal, qui permet la séparation énantiomérique des cinq métabolites. On a joué sur différents paramètres, tels que le pH, la concentration de l'électrolyte du système tampon et celle du sélecteur chiral. La diminution du pH à 2.1 a amélioré la séparation des énantiomères, et à pH 3 aucun pic n'a été détecté après 70 min. De faibles variations de pH aux alentours du pKa des molécules changent leur charge et de ce fait leur migration. Les divers autres essais pour l'obtention du système tampon optimal sont décrits dans l'annexe 7.2. Finalement, une concentration de 50 mM d'OHP- β -CD dans un tampon phosphate de 75 mM à pH 2.1 permet la séparation des cinq métabolites, voir fig. 19C. Lors de l'analyse de solution standard des cinq métabolites et de la MQ avec ce système tampon, la MQ interfère avec les métabolites

4'OH-MQ et 6OH-MQ du fait de leur détection simultanée. Mais en raison du métabolisme rapide de la MQ et de ses faibles quantités dans l'urine, cette interférence n'a pas d'influence sur les résultats urinaires (voir ci-après).

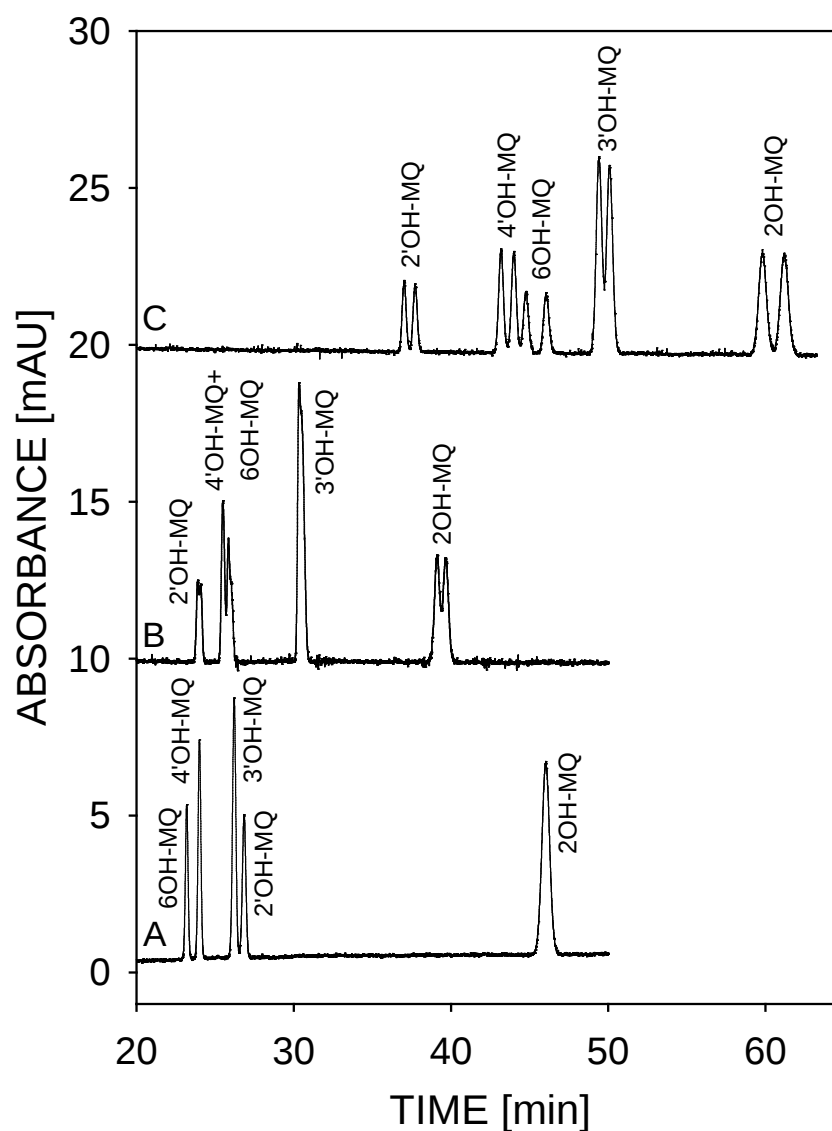


Fig. 19 : Electrophérogrammes représentant les solutions standard racémiques des cinq métabolites de la MQ analysés par (A) un tampon phosphate 75 mM à pH 2.5, (B) un tampon phosphate 75 mM à pH 2.5 contenant 8 mM d'OHP- β -CD, et (C) un tampon phosphate à pH 2.1 contenant 50 mM d'OHP- β -CD. Conditions électrophorétiques : pour (A) 14 kV (courant env. 47 μ A), pour (B) et (C) 18 kV (courant env. 60-65 μ A), injection par pression positive de 4 psi $\times$ s, capillaire thermostaté à 25 °C. Capillaire de 50 μ m I.D., longueur totale (jusqu'au détecteur) L = 50 cm (l = 45.4 cm). Longueur d'onde de détection : 200 nm.

Les longs temps de migration des analyses ont poussé à la recherche d'autres cyclodextrines neutres, dont l'avantage serait la diminution du temps de migration. La β -cyclodextrine (β -CD), la DIMEB, la (2,3,6-triméthyl)- β -cyclodextrine (TRIMEB) ou l'hydroxypropyl- γ -cyclodextrine (OHP- γ -CD), ainsi que leurs mélanges, ont été testés ; ils n'ont toutefois pas eu la faculté de fournir simultanément une séparation optimale de tous les énantiomères des cinq métabolites de la MQ et une amélioration du temps d'analyse. Le tableau 4 récapitule les résultats importants obtenus par l'utilisation de l'OHP- β -CD et l'OHP- γ -CD, tandis que les autres sélecteurs chiraux et certains électrophérogrammes sont décrits et représentés plus en détail dans l'annexe 7.2. Au terme de cette recherche du sélecteur chiral permettant la séparation des cinq métabolites hydroxylés, le système tampon composé de 75 mM de phosphate à pH 2.1 avec addition de 50 mM d'OHP- β -CD va être utilisé pour la suite des expériences, voir fig. 19C.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des concentrations d'OHP- β -CD et d'OHP- γ -CD utilisées pour la résolution des énantiomères des métabolites de la MQ.

CD utilisées [concentration]	PH du tampon phosphate ^{a)}	La résolution énantiomérique observée est partielle ou totale	Aucune résolution énantiomérique n'est observée
OHP- β -CD [8 mM]	2.5	2'OH-MQ, 6OH-MQ, 4'OH-MQ, 2OH-MQ	3'OH-MQ
OHP- β -CD [50 mM]	2.1	2'OH-MQ, 6OH-MQ, 4'OH-MQ, 3'OH-MQ, 2OH-MQ	-
OHP- γ -CD [16 mM]	2.1	2'OH-MQ, 6OH-MQ, 3'OH-MQ, 2OH-MQ	4'OH-MQ
OHP- γ -CD [50 mM]	2.1	2'OH-MQ, 6OH-MQ, 3'OH-MQ, 2OH-MQ	4'OH-MQ
OHP- γ -CD [16 mM] + OHP- β -CD [8 mM]	2.1	2'OH-MQ, 6OH-MQ, 3'OH-MQ, 2OH-MQ	4'OH-MQ
OHP- γ -CD [16 mM] + OHP- β -CD [50 mM]	2.1	2'OH-MQ, 4'OH-MQ, 6OH-MQ, 2OH-MQ	3'OH-MQ

a) La concentration du tampon phosphate utilisé est de 75 mM pour tous les essais. Conditions électrophorétiques : 18 kV (courant variable d'une mesure à l'autre entre 55 et 70 μ A).

La séparation achirale et chirale des solutions standard des métabolites permet de passer à l'étude des fluides corporels. Les urines récoltées par les trois volontaires sont hydrolysées puis extraites par LLE ou SPE, selon les méthodes brièvement expliquées dans le paragraphe 3.6 ou en détail dans l'annexe 7.2. L'hydrolyse des échantillons urinaires est nécessaire pour séparer l'acide glucuronique du métabolite afin de pouvoir extraire ce dernier par les

méthodes citées précédemment. L'hydrolyse des glucuronides se fait par incubation de l'urine à pH 5.4 en présence de β -glucuronidase pendant 4 h à une température de 37 °C.

L'extraction a été effectuée de deux façons différentes. La première méthode, l'utilisation de Toxi-Tubes A pour la LLE, a l'avantage d'être rapide. Ces tubes présentent toutefois l'inconvénient suivant : la saturation de leur phase organique ne permet d'extraire qu'une fraction des composés. Ceci est démontré par le fait que l'extraction avec 5 fois le volume de la phase organique a permis d'extraire une quantité semblable à la SPE. Ces considérations sont exposées en détail dans l'article de l'annexe 7.2. Pour sa part, la SPE a l'avantage de séparer la MQ des métabolites avec lesquels elle interfère lors de la séparation électrophorétique. Son inconvénient réside en l'obtention de deux fractions, ce qui peut rendre l'évaluation des résultats plus difficile. Les procédures d'extraction ne présentent pas de stéréosélectivité ; ce fait est développé dans l'annexe 7.2, de même que d'autres détails concernant les méthodes d'extraction.

L'évaluation qualitative des résultats obtenus par les deux méthodes s'est basée sur les rapports énantiomériques des métabolites de la MQ obtenus après hydrolyse, extraction et analyse CZE de l'urine WT8 à trois jours différents. Les rapports énantiomériques des métabolites (premier énantiomère détecté/deuxième énantiomère détecté) ont été calculés à partir des hauteurs relatives des pics. Les moyennes (n=3) et les déviations standard relatives (RSD) de ses rapports énantiomériques sont présentées dans le tableau 5. La détermination des composés a été réalisée par l'adjonction des solutions standard des métabolites dans l'échantillon extrait, suivie d'une réanalyse de l'échantillon, ainsi que par les spectres UV des composés présentés dans la figure 10 de l'article en annexe 7.2. Le tableau ci-dessous montre que les rapports énantiomériques entre les deux méthodes d'extraction ne présentent pas de fortes variations ; de ce fait, l'une ou l'autre des deux méthodes peut être utilisée pour l'évaluation de la stéréosélectivité du métabolisme de la MQ.

Tableau 5 : Rapports énantiomériques (premier pic détecté/deuxième pic détecté) des hauteurs relatives des pics obtenus pour l'urine WT8 (n=3). Extraction et analyse à trois jours différents.

Métabolite	Procédure d'extraction					
	LLE		SPE			
			1 ^{re} fraction		2 ^e fraction	
	Moyenne	RSD (%)	Moyenne	RSD (%)	Moyenne	RSD (%)
2'OH-MQ	2.62	10.87	2.73	5.42	2.60	4.46
4'OH-MQ	0.026	3.28	0.101	7.05	0.023	13.04
6OH-MQ	0.77	6.02	-	-	0.99	11.75
3'OH-MQ	5.77	1.25	5.78	0.79	5.67	3.12
2OH-MQ	0.21	2.79	0.22	2.66	-	-

Pour l'élucidation du métabolisme stéréosélectif, des extraits urinaires de trois volontaires (WT, SZ et UM) sont analysés. Les volontaires WT et SZ ont été déterminés être des EM, tandis que le volontaire UM est un PM pour les CYP2D6 et CYP2C19. Les urines des volontaires sont récoltées pendant des périodes de 2 à 9 h sur une durée d'environ 42 h à partir de l'ingestion d'une dose unique de Toquilone Comp. ; les détails de l'échantillonnage sont décrits dans l'article en annexe 7.3. Les urines sont hydrolysées, puis extraites par LLE et SPE avant d'être analysées par CZE chirale. Les rapports énantiomériques obtenus par les analyses des extraits urinaires (SPE) récoltés par les trois volontaires au cours des 8 h suivant l'ingestion du comprimé sont présentés dans le tableau 6. Les rapports énantiomériques obtenus dans les extraits des urines récoltées entre 12 et 42 h peuvent être consultés dans le tableau 2 de l'annexe 7.3. Les tableaux 5 et 6 montrent tous les deux par les rapports énantiomériques la stéréosélectivité du métabolisme de la MQ. De plus, le tableau 6 présente la similarité des motifs métaboliques des trois volontaires.

Tableau 6 : Rapports énantiomériques des métabolites urinaires de la MQ obtenus après hydrolyse et analyse SPE des urines collectées entre 0 et 8 h par les trois volontaires.

		Urines de volontaires récoltées entre t_0 et 8h (± 1 h)		
		WT	SZ	UM
Métabolite	Procédure d'extraction	Rapport énantiomérique ^{a)}	Rapport énantiomérique ^{a)}	Rapport énantiomérique ^{a)}
2'OH-MQ	SPE I	2.29	4.56	3.78
	SPE II	2.00	4.04	3.23
4'OH –MQ	SPE I	0.11	0.16	0.07
	SPE II	0.03	0.05	0.03
6OH-MQ	SPE I	-	-	-
	SPE II	1.04	1.14	0.64
3'OH-MQ	SPE I	5.57	13.67	12.58
	SPE II	5.49	10.69	10.44
2OH-MQ	SPE I	0.23	0.23	0.30
	SPE II	-	-	-

a) Rapport énantiomérique calculé à partir des hauteurs relatives des pics (premier énantiomère détecté/deuxième énantiomère détecté), $n=1$.

Une extraction LLE de l'échantillon urinaire provenant du volontaire SZ, collecté entre 0 et 9 h, est représentée en figure 20. Le motif métabolique permet d'observer un métabolite principal, la 4'OH-MQ, dont le deuxième énantiomère détecté est visible en quantité supérieure au premier métabolite. Cette observation indique une forte stéréosélectivité du métabolisme. La 2'OH-MQ, la 3'OH-MQ, la 2OH-MQ et la 6OH-MQ sont présentes en quantité plus faible ; leurs rapports énantiomériques, mentionnés dans le tableau 6, montrent

également la stéréosélectivité métabolique de la MQ. L'accomplissement de ce projet a permis de décrire pour la première fois la stéréosélectivité du métabolisme de la MQ. D'autres détails sont relevés dans l'annexe 7.2.

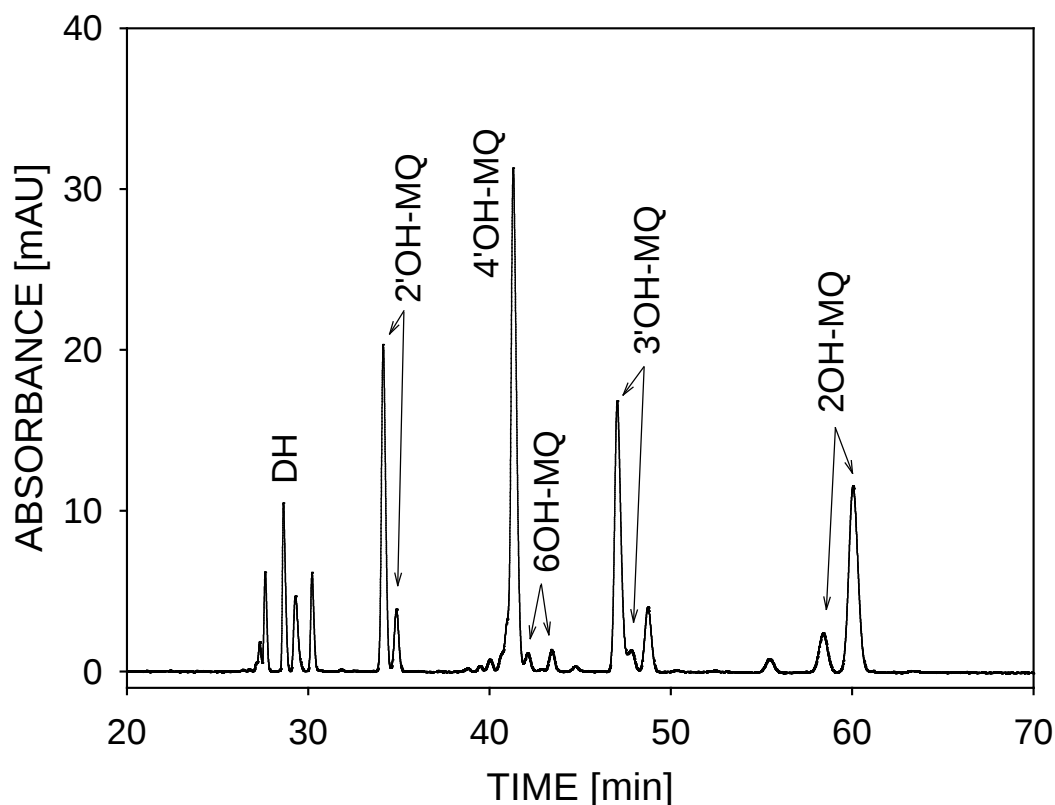


Fig. 20 : Electrophérogramme obtenu à partir d'un échantillon d'urine récolté par le volontaire SZ, au cours des 9 h suivant l'ingestion du Toquilone compositum®. L'échantillon d'urine a été hydrolysé, extrait par LLE et finalement analysé par CZE chirale. Les pics détectés juste après la diphenhydramine (DH) sont déterminés être deux de ses métabolites. Système tampon : 75 mM phosphate pH 2.1 contenant 50 mM OHP- β -CD. Conditions électrophorétiques : 18 kV (courant env. 60-70 μ A), injection 4 pis $\times$ s, température du capillaire : 25 °C. Capillaire de 50 μ m I.D., longueur totale (jusqu'au détecteur) L = 50 cm (l = 45.4 cm). Longueur d'onde de détection : 200 nm. DH : diphenhydramine.

L'influence des polymorphismes génétiques pour les CYP2C19 et CYP2D6 dans le cas du métabolisme stéréosélectif de la MQ pourrait être révélée par des différences dans les rapports énantiomériques des principaux métabolites obtenus pour le PM UM et les EM WT et SZ. La plupart des rapports énantiomériques des métabolites sont semblables pour les trois volontaires (voir tableau 6), sauf dans le cas du 6OH-MQ dont les rapports énantiomériques

sont de >1 pour les volontaires WT et SZ (EM) et de 0.64 pour le volontaire UM (PM) ; ces résultats devraient être confirmés par l'analyse d'autres échantillons car d'une part le métabolite concerné est présent en faible quantité et d'autre part le nombre de volontaires n'est pas suffisant. Les résultats obtenus ne semblent pas montrer l'influence des polymorphismes génétiques dans le métabolisme de la méthaqualone. De plus, la variation des rapports énantiomériques du 2'OH-MQ dans les échantillons d'urine récoltés par les volontaires WT et SZ sur une période prolongée révèle des différences métaboliques interindividuelles. Cette variation des rapports énantiomériques est exposée en détail dans l'annexe 7.3.

Pour les résultats présentés ci-dessus, toutes les interprétations ont été formulées en partant de l'idée que la stéréosélectivité ne pouvait venir que de la biotransformation de la MQ. Or, les échantillons urinaires analysés sont hydrolysés enzymatiquement ; du fait de l'utilisation d'enzymes, par définition chirales, cette forme d'hydrolyse présente donc un élément stéréosélectif. Dans l'annexe 7.3, différentes méthodes sont décrites par lesquelles il a été possible non pas d'exclure une stéréosélectivité enzymatique mais de donner des preuves quant à la stéréosélectivité métabolique.

Les métabolismes stéréosélectifs peuvent être élucidés *in vivo*, mais le métabolisme *in vitro* peut révéler des aspects supplémentaires. La méthaqualone a de ce fait été incubée avec différents enzymes hépatiques CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 et CYP2D6 SUPERSOMESTM et extra-hépatiques CYP1A1 ainsi qu'avec des HLM. Différentes concentrations et des temps d'incubation variables ont été pris en considération. Ces dernières ont été extraites par LLE avant d'être mesurées de manière achirale, puis chirale. Comme la MQ interfère avec deux métabolites dans les LLE, voir p. 54 et annexe 7.2, l'analyse achirale permet d'identifier les éventuels métabolites formés. Puis, suite à leur détection, l'analyse chirale permet d'observer la stéréosélectivité du métabolisme. Seules la 2'OH-MQ et la 2OH-MQ ont pu être formées en quantités importantes grâce au processus métabolique se produisant *in vitro* aux conditions utilisées. Leur formation a été possible par incubation avec le CYP3A4 et les microsomes hépatiques humains, en utilisant des concentrations de MQ entre 0.2 et 0.8 mM et des temps d'incubation de 24 à 72 h, voir tableau 7. Les rapports énantiomériques (premier métabolite détecté/second métabolite détecté) obtenus pour la 2'OH-MQ et la 2OH-MQ sont de 0.73 et 0.18, respectivement pour l'incubation de 0.2 mM de MQ avec le CYP3A4 (24 h), et de 0.86 et 0.23, respectivement pour l'incubation de 0.8 mM de MQ avec les microsomes hépatiques (24 h). Les rapports énantiomériques obtenus pour la MQ montrent des valeurs entre 1.28 et 1.46 ; ceux-ci révèlent une diminution de la

quantité du deuxième métabolite de la MQ dans les échantillons, ce qui signifie son utilisation durant les incubations in vitro. Les rapports énantiomériques obtenus pour la 2'OH-MQ, la 2OH-MQ et la MQ sont reportés dans le tableau 7, ci-après.

Tableau 7 : Conditions d'incubation in vitro de la MQ et rapports énantiomériques obtenus après extraction LLE (n=1).

Milieu d'incubation ou échantillon	Temps d'incubation (h)	Concentration de la MQ (mM)	Rapport énantiomérique 2'OH-MQ	Rapport énantiomérique 2OH-MQ	Rapport énantiomérique MQ
HLM	24	0.8	0.86	0.23	1.40
HLM	72	2	0.96	0.34	1.46
HLM	24	0.8	0.83	0.24	1.35
CYP3A4	24	0.2	0.73	0.18	1.31
CYP3A4	72	0.2	0.74	0.21	1.33
CYP2D6	72	2	0.20	-	1.28
urine WT8	-	-	2.62	0.21	-

Les deux métabolites formés par ces incubations in vitro démontrent la stéréosélectivité de ce métabolisme. De plus, les rapports énantiomériques obtenus avec les incubations in vitro pour le 2OH-MQ sont similaires à ceux observés in vivo. Les autres métabolites n'ont pu être formés qu'en quantités infimes. Cette formation stéréosélective des métabolites par le CYP3A4 et les microsomes hépatiques donne une confirmation supplémentaire du fait que la stéréosélectivité est due au métabolisme et non à l'hydrolyse enzymatique. D'autres considérations relatives au métabolisme in vitro figurent dans l'annexe 7.3. Ces considérations in vitro concernant la stéréosélectivité présentent un certains intérêt, mais les conditions et/ou les cytochromes utilisés non pas permis d'élucider la voie métabolique du métabolite principal, la 4'OH-MQ.

4.3. Analyse par CE chirale du métabolisme stéréosélectif de l'albendazole dans le plasma

Le but de cette étude était de trouver une méthode de séparation chirale utilisant l'électrophorèse capillaire afin de quantifier le taux d'ABZSO dans des échantillons de plasma de patients traités contre l'échinococcose hépatique. La recherche du sélecteur chirale adéquat, la détection par UV et fluorescence, la comparaison entre différents fluides corporels et la quantification du taux plasmatique d'ABZSO sont les points importants de ce sous-chapitre.

L'albendazole (ABZ) est une benzimidazole anti-helminthique à large spectre utilisée dans le traitement des parasites du tractus gastro-intestinal et des parasites tissulaires [33, p. 748]. L'ABZ est un composé prochiral dont l'oxydation par les CYP450 et les FMO forme comme premier métabolite l'ABZSO chiral ; la seconde oxydation par les CYP450 forme ensuite l'albendazole sulfone, composé achiral, voir fig. 21 [17, 86]. Le premier métabolite oxydé de l'ABZ, l'ABZSO, est une molécule amphotère dont les pKa sont de 0.3 et 9.7 ; il est par conséquent neutre entre pH 2 et 8 [87].

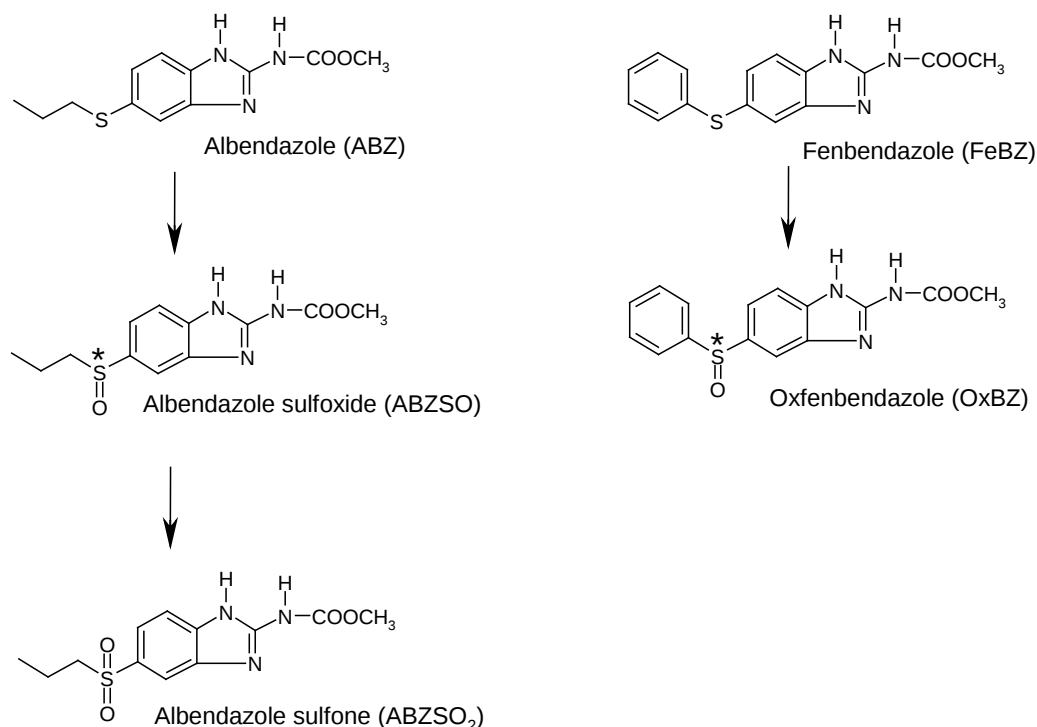


Fig. 21 : Structure chimique de l'albendazole, du fenbendazole et de leurs métabolites. L'astérisque montre le centre de chiralité des molécules.

Les premiers essais concernant la séparation des énantiomères d'ABZSO par CE chirale furent entrepris en utilisant différentes cyclodextrines (α -CD, β -CD, OHP- β -CD, OHP- γ -CD, DIMEB et TRIMEB) dans un tampon borate aqueux de pH 9.3. Aucun de ces sélecteurs chiraux n'a permis la résolution énantiomérique de l'ABZSO. Comme la littérature décrit l'utilisation de bases de Pirkle pour la séparation énantiomérique de sulfoxydes par HPLC [88], plusieurs bases de Pirkle ont été mises à contribution pour la résolution des énantiomères d'ABZSO en CE ; deux de ces bases sont citées dans le tableau 8. Une concentration de 50 mM de (R)-DNBPG (pour la structure chimique voir fig. 10) dans un tampon borate de 30 mM à pH 9 a finalement permis la séparation énantiomérique d'ABZSO partielle [89]. Différents phénomènes décrits dans l'annexe 7.4, comme l'influence de la température intracapillaire sur la séparation énantiomérique, ont pu être observés par les mesures effectuées avec ce système tampon [89]. La (R)-DNBPG présente un inconvénient majeur : il n'a pas été possible d'atteindre une limite de détection suffisamment basse pour rendre possible la quantification des échantillons plasmatiques ; de ce fait, l'utilisation de ce sélecteur chirale a dû être abandonnée. Les résolutions et autres observations obtenues par l'utilisation des autres bases de Pirkle sont décrites dans l'article de l'annexe 7.4.

Tableau 8 : Résolution de l'ABZSO avec différents sélecteurs chiraux dans un capillaire de 50 cm de longueur.

Sélecteur chirale	Concentration	Résolution ABZSO	Résolution OxBZ
(R)-DNBPG ^{a)}	50 mM	Complète ^{c)}	Partielle
N-(3,5-dinitrobenzoyl)-leucine ^{a)}	20-50 mM	Partielle	Partielle
Sulfated- β -CD ^{b)}	3% (m/v)	Complète	Complète
Heptakis(2,3-diméthyl-6-sulfato)- β -CD ^{b)}	3% (m/v)	Aucune	-
Heptakis(2,3-diacétyl-6-sulfato)- β -CD ^{b)}	3% (m/v)	Aucune	-

a) tampon borate 30 mM pH 9

b) tampon Tris 20 mM pH 7.

c) uniquement lors de l'utilisation d'un système tampon discontinu, voir ci-après.

Suite aux problèmes concernant les limites de détection, une autre approche a été adoptée : elle consiste à éviter la présence de sélecteur chirale lors de la détection de l'analyte. Deux méthodes utilisant des systèmes discontinus (capillaire rempli de background electrolyte, puis injection de l'échantillon suivi d'un plug de sélecteur chirale) ont été envisagées : d'une part le passage d'une zone de sélecteur chirale à travers l'analyte, voir fig. 22B, C et D, d'autre part l'utilisation d'une zone de sélecteur chirale ne présentant pas d'interruption, voir fig. 22A.

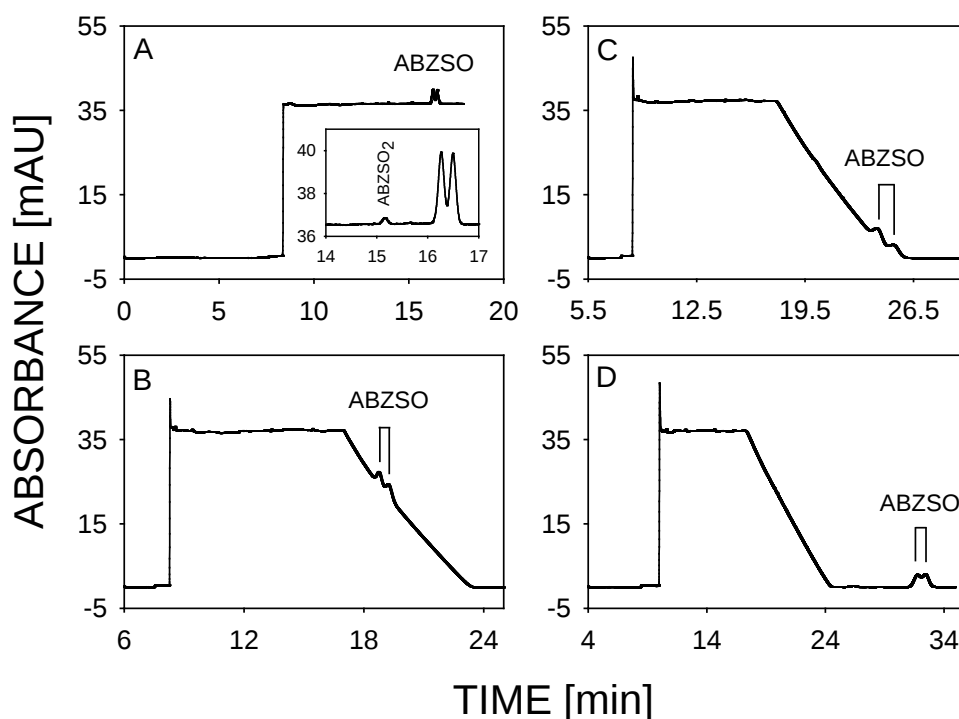


Fig. 22 : Electrophérogrammes obtenus à l'aide d'une zone de (R)-DNBPG traversant la zone contenant l'analyte en polarité inverse après élimination du EOF. La figure A représente la séparation obtenue par une zone continue tandis que (B) à (D) montrent des résultats obtenus par des systèmes discontinus dont l'apport de sélecteur chiral a été arrêté après (B) 6.0 min, (C) 5.5 min, (D) 4.0 min d'électrophorèse. Conditions électrophorétiques : -20 kV (courant env. (A) 30, (B) 16, (C) 15, (D) 15 μ A), capillaire thermostaté à 20 °C. Capillaire de 50 μ m I.D., longueur totale (jusqu'au détecteur) L = 50 cm (l = 45.4 cm). Injection d'un échantillon de 200 μ g/ml dissout dans de l'acétonitrile par application d'une pression positive de 5 psi $\times$ s. Longueur d'onde de détection : 280 nm. Le système tampon était composé de 30 mM Na₂B₄O₇ et 3 mM de spermine (pH 9.2), et la zone tampon contenant le sélecteur chiral de 30 mM Na₂B₄O₇, 50 mM (R)-DNBPG et 3 mM de spermine (pH 9.0). La figure insérée en (A) est une représentation de la même mesure avec les axes x et y élargis.

Comme à pH 9 l'ABZSO et le sélecteur chiral sont chargés négativement, les mesures ne sont pas possibles en mode normal. De ce fait, un additif, la spermine, qui sert de revêtement dynamique [90], est ajouté à la solution tampon à une concentration de 3 mM. Cette substance a permis de réduire suffisamment le EOF afin de permettre la détection d'ABZSO par polarisation inversée (cathode du côté de l'injecteur). En mode inverse, ainsi qu'avec la suppression du EOF, l'analyte et le sélecteur chiral migrent du côté du détecteur. La séparation énantiomérique est possible grâce à une mobilité effective de l'ABZSO plus petite

que celle de la (R)-DNBPG. Ainsi la zone de sélecteur chiral peut migrer à travers la zone de l'analyte et permettre une séparation énantiomérique de la substance. Malheureusement, la mobilité effective de la (R)-DNBPG est plus faible que celle du borate utilisé comme électrolyte ; de ce fait, la fin de la zone contenant le sélecteur chiral présente un tailing. Ceci signifie que la zone de sélecteur chiral ne finit pas abruptement mais qu'un certain temps est nécessaire afin de retrouver l'absorbance de la ligne de base. Cette limite de zone, dans laquelle la concentration de sélecteur chiral n'est pas constante, amène un élargissement des pics d'ABZSO. Le résultat obtenu par la zone de sélecteur chiral ne présentant pas d'interruption a permis d'obtenir une séparation complète des énantiomères d'ABZSO par le (R)-DNBPG. Cette approche de la détection consistant à éviter la présence du sélecteur chiral n'a par conséquent pas amélioré la limite de détection de notre composé pour rendre possible la quantification dans des échantillons plasmatiques.

L'utilisation d'un système tampon contenant 3 % (m/v) de sulfated β -CD dans un tampon Tris à pH 7 a permis de résoudre le problème de la limite de détection. En tant que dérivé du sucre, le sélecteur chiral n'influence pas la détection des molécules dans le domaine UV utilisé. La sulfated β -CD est une cyclodextrine chargée négativement ; les glucopyranoses sont substitués par 7 à 11 sulfates/mol de CD. Ce point est le seul inconvénient de ce sélecteur chiral. Sa substitution aléatoire ne permet pas une synthèse toujours identique. Certaines propriétés variables ont par conséquent pu être observées entre différents lots, heureusement pas dans le cadre de ce travail. Deux autres cyclodextrines chargées négativement, dont la structure est bien définie, ont été mises à contribution mais aucune d'elles n'a permis la résolution de l'ABZSO, voir tableau 8.

La séparation électrophorétique des énantiomères d'ABZSO avec la sulfated β -CD s'effectue en mode normal. A pH 7, l'albendazole sulfoxyde est neutre et par conséquent entraîné à travers le capillaire par l'EOF, tandis que la sulfated β -CD, en tant que molécule chargée négativement, va migrer du côté de l'injecteur. De ce fait, le complexe d'ABZSO-sulfated β -CD chargé négativement est détecté juste après l'EOF, voir fig. 22.

Pour une analyse quantitative, le choix d'un standard interne (IS) adéquat est important. Le choix s'est tourné vers l'oxfenbendazole (OxBZ), métabolite oxydé du fenbendazole utilisé comme anti-helminthique en médecine vétérinaire. L'OxBZ présente la même structure chirale que l'ABZSO, voir fig. 21, et sa résolution énantiomérique est possible par le système tampon cité ci-dessus. L'interaction de l'OxBZ avec le sélecteur chiral semble être plus importante que celle de l'ABZSO ; sa détection intervient par conséquent après celle de

l'ABZSO, voir fig. 22. Comme le choix du IS s'est fixé sur une molécule chirale, seul le premier énantiomère détecté a été considéré comme tel.

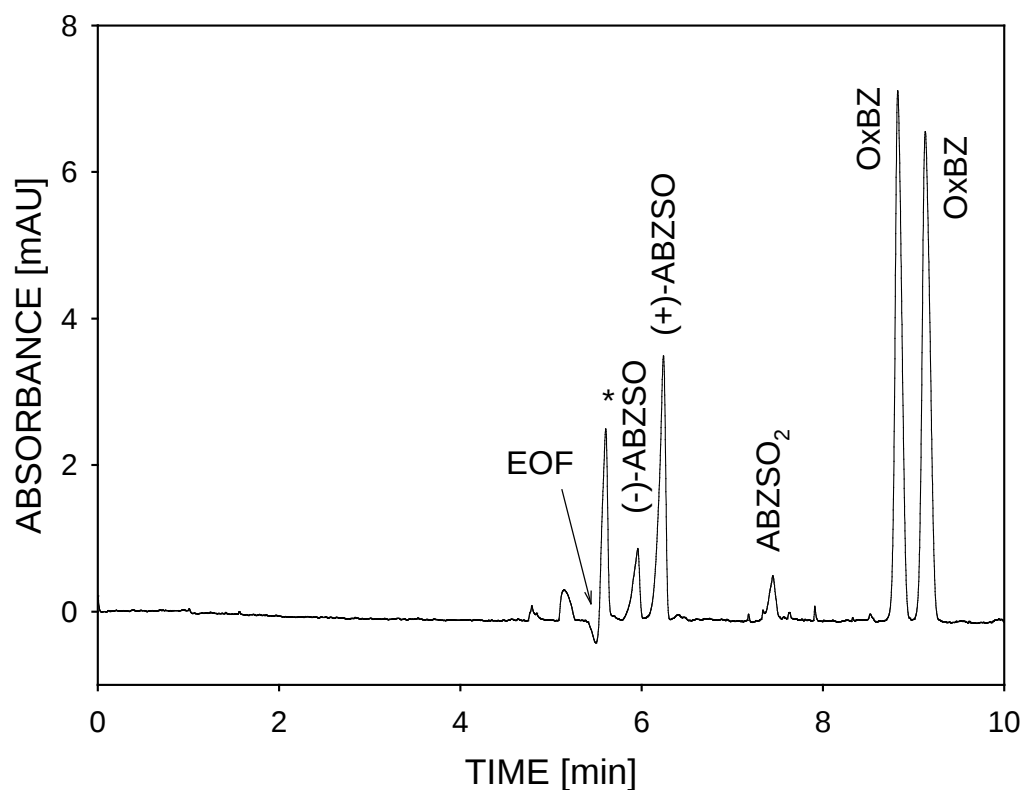


Fig. 23 : Electrophérogramme obtenu après extraction LLE d'un échantillon plasmatique d'un patient traité avec l'ABZ, contenant selon les résultats obtenus par HPLC 2.28 $\mu\text{g/ml}$ d'ABZSO. La quantité ajoutée d'OxBZ (IS) est de 5 $\mu\text{g/ml}$. L'astérisque marque la caféine et d'autres composés neutres. Système tampon : 20 mM Tris à pH 7 contenant 3 % (m/v) de sulfated β -CD. Conditions électrophorétiques : 18 kV (courant env. 56 μA), capillaire thermostatisé à 20 °C. Capillaire de 50 μm I.D., longueur totale (jusqu'au détecteur) $L = 50$ cm ($l = 45.4$ cm). Injection par application d'une pression positive de 5 psi $\times$ s. Longueur d'onde de détection : 225 nm. L'ABZSO₂ représente le deuxième métabolite de l'ABZ.

La validation de la méthode a été effectuée à l'aide de cinq extraits pour lesquels l'ABZSO et le IS ont été ajoutés dans du plasma vierge et de cinq extraits provenant d'un patient traité à l'ABZ, dans lesquels seul le IS a été ajouté ; un électrophérogramme type est montré dans la fig. 23. La méthode électrophorétique présente pour les deux types d'échantillons des RSD ≤ 3 % pour les temps de migration. Par la méthode d'extraction, les aires et les hauteurs des pics varient considérablement, mais les RSD des rapports énantiomériques ont des valeurs ≤ 7 %.

La limite de détection, évaluée par adjonction d'ABZSO dans un échantillon de plasma vierge avant extraction, a été déterminée à 0.10 µg/ml par énantiomère. Pour la quantification des échantillons plasmatiques, une droite de calibration a été utilisée pour chaque énantiomère d'ABZSO ; cette droite est constituée de 6 calibrateurs. Par l'utilisation de cette droite de régression linéaire, les valeurs d'ABZSO des deux sortes d'échantillons plasmatiques ont pu être déterminées ; les valeurs obtenues par cette quantification des énantiomères d'ABZSO donne des RSD ≤ 7 %. Les tableaux de résultats ainsi que les droites de régression linéaires obtenues ne sont pas mentionnées plus en détail ici mais se trouvent dans l'article de l'annexe 7.5.

Cette méthode permet d'évaluer les rapports énantiomériques et de quantifier l'ABZSO dans des échantillons plasmatiques d'un lot de 31 patients traités contre l'échinococcose hépatique. Les détails quant à la thérapie de l'ABZSO – dosage, amélioration de la résorption – sont décrits dans l'article de l'annexe 7.5. Les rapports énantiomériques de ce lot de patients ont été calculés à l'aide de la hauteur relative des pics de (-)-ABZSO/(+)-ABZSO. La moyenne et la médiane de ces rapports énantiomériques donnent des valeurs de 0.31 et 0.29, respectivement ; le RSD de la moyenne est de 50.56 % avec les valeurs des rapports énantiomériques le plus bas et le plus élevé à 0.07 et 0.62, respectivement. A l'aide d'une évaluation statistique utilisant le test de Kolomogorov-Smirnov, la distribution normale des rapports énantiomériques a pu être calculée. Un diagramme de fréquence, voir fig. 24, montre cette distribution des rapports énantiomériques. Ces résultats sont en accord avec la littérature [17] ; les rapports énantiomériques obtenus sont < 1 et probablement dus à l'influence de plusieurs CYP450 et de FMO dans le métabolisme de l'ABZSO. Ces rapports énantiomériques montrent la variation interindividuelle du métabolisme de ce lot de patients. En comparaison avec les patients traités contre la neurocystercose [17], la valeur moyenne des rapports énantiomériques pour le lot de patients traités contre l'échinococcose hépatique est plus élevée et la distribution plus large. D'autres considérations liées à l'influence de différents lots de patients ainsi que l'influence du moment de l'échantillonnage plasmatique sont exposées dans l'annexe 7.5.

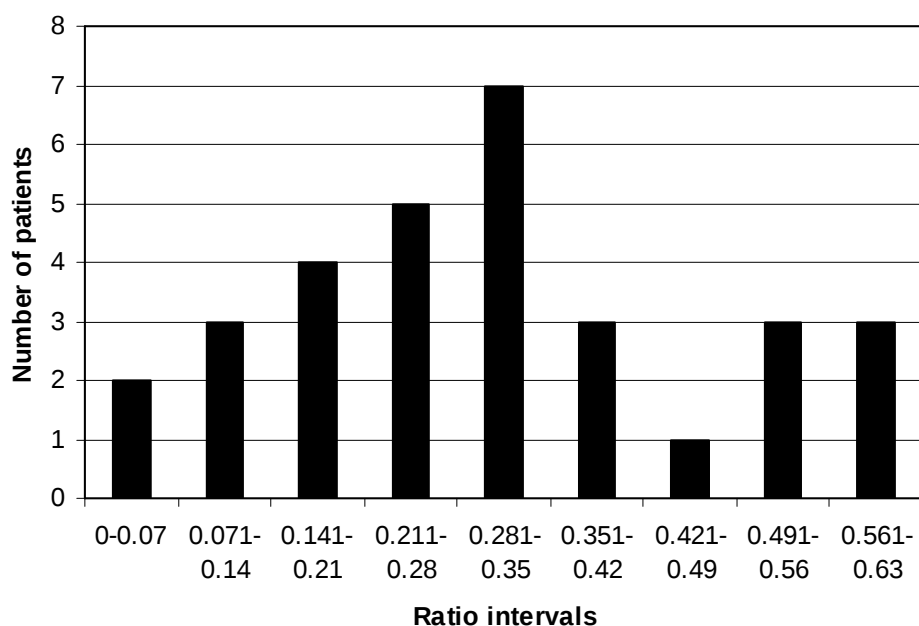


Fig. 24 : Diagramme de fréquence des rapports énantiomériques obtenus par la hauteur relative des pics (n=31). L'intervalle des rapports énantiomériques est défini à 0.07.

La concentration des deux énantiomères a été déterminée à l'aide de l'aire relative des pics. Les concentrations plasmatiques moyennes obtenues pour le lot de 31 patients par la méthode de CZE chirale pour le (-)-ABZSO et le (+)-ABZSO sont respectivement de 0.48 µg/ml et de 1.52 µg/ml. Les concentrations plasmatiques totales d'ABZSO obtenues sont très différentes d'un patient à l'autre. Par comparaison, les concentrations d'ABZSO obtenues dans le fluide cérébrospinal de patients traités contre les neurocystercoses [17] sont moins élevées que les concentrations plasmatiques de patients traités contre l'échinococcose hépatique. Les concentrations plasmatiques totales obtenues par CE ont été utilisées pour la comparaison avec la méthode HPLC achirale utilisée par le laboratoire d'analyse de routine de l'Institut de pharmacologie clinique. La régression linéaire obtenue à partir des valeurs d'HPLC (en y) et de CE (en x) présente une bonne corrélation des résultats. La droite de régression est linéaire ($r=0.956$) avec une pente de 0.909 et coupe l'axe des y à 0.40 µg/ml. Le test de t, avec un intervalle de confiance de 95 %, révèle que la différence statistique entre les deux méthodes n'est pas significative. L'analyse de l'erreur systématique entre la CE et l'HPLC montre des valeurs plus faibles pour l'HPLC. La droite de régression, la représentation de l'erreur

systématique ainsi que d'autres détails concernant la comparaison des deux méthodes sont décrits dans l'article en annexe 7.5.

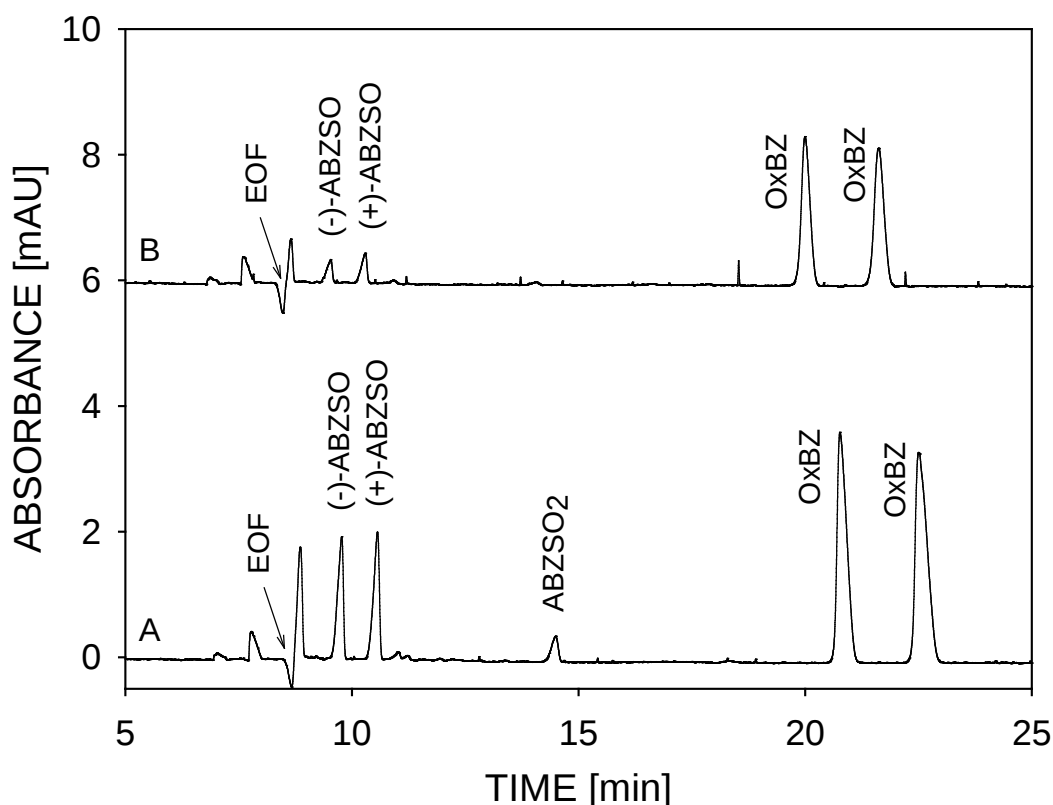


Fig. 25 : Electrophérogrammes obtenus après LLE d'échantillons (A) de plasma (rapport énantiomérique des hauteurs relatives de (-)-ABZSO/(+)-ABZSO = 1.01), et (B) de salive (rapport énantiomérique (-)-ABZSO/(+)-ABZSO = 0.81), prélevés d'un patient traité contre l'échinococcose hépatique, et auxquels une solution racémique d'OxBZ est ajoutée comme IS. Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un système tampon de Tris 20 mM pH 7 contenant 3 % (m/v) de sulfated β -CD. Conditions électrophorétiques : 18 kV (courant env. 56 μ A), capillaire thermostaté à 20 °C. Capillaire de 50 μ m I.D., longueur totale (jusqu'au détecteur) L = 50 cm (l = 45.4 cm). Injection par application d'une pression positive de 5 psi $\times$ s. Longueur d'onde de détection : 225 nm. Ces électrophérogrammes présentent une particularité pas observée dans le lot de patients traités contre l'échinococcose hépatique : le rapport énantiomérique est proche de 1 tout en montrant une quantité plus faible de (-)-ABZSO dans la salive. L'ABZSO₂ représente le deuxième métabolite de l'ABZ.

Les analyses ne se sont pas limitées à des échantillons plasmatiques ; elles ont également porté sur des échantillons salivaires. Certains patients consentants ont accepté le prélèvement non seulement de sang, mais également de salive. Les échantillons de salive n'ont pas donné lieu à une quantification mais uniquement à une comparaison qualitative des rapports

énantiomériques par rapport à ceux obtenus dans les échantillons plasmatiques. Les rapports énantiomériques de l'ABZSO dans la salive montrent en tendance une valeur inférieure de 20 % à ceux constatés dans le plasma. La fig. 25 présente les extraits plasmatique et salivaire de l'unique patient dont le rapport énantiomérique plasmatique présente une valeur de 1.01. Ce motif métabolique n'entre pas dans l'évaluation présentée ci-dessus. Il n'a cependant pas été possible d'élucider l'origine de ce rapport énantiomérique particulier avec les informations connues au sujet de cet échantillon. La valeur du rapport énantiomérique trouvée dans la salive est de 0.81, ceci montre comme dans les autres cas que la valeur du rapport énantiomérique salivaire est inférieure à la valeur plasmatique. Les composés détectés dans la salive proviennent de la fraction plasmatique libre et influencent en conséquence les rapports énantiomériques.

L'ABZSO, en plus de son absorbance UV, est une molécule fluorescente. La fluorescence est une méthode de détection sélective qui dans certains cas permet d'abaisser les limites de détection par rapport à l'UV. Les essais avec la fluorescence ont été faits dans l'idée d'arriver à des limites de détection aussi basses qu'avec l'HPLC. La comparaison des électrophérogrammes avec détection UV et fluorescence contenant l'ABZSO, l'ABZSO₂ et l'OxBZ montre une limite de détection similaire pour l'ABZSO, abaissée pour l'ABZSO₂ et augmentée pour l'OxBZ. De ce fait, l'OxBZ ne pourrait pas être utilisé comme IS aux conditions de fluorescence retenues dans cette application. Tandis que le système pourrait être utilisé pour la quantification de l'ABZSO₂. Aux conditions utilisées, la fluorescence n'améliore pas le système d'analyse ; on a donc renoncé à son utilisation. D'autres détails concernant ces essais se trouvent dans l'annexe 7.5.

Après l'observation du métabolisme stéréosélectif de l'ABZ in vivo dans le plasma et la salive, le but a été la formation des métabolites in vitro à l'aide de CYP450. Le métabolisme de l'ABZ n'a été élucidé que partiellement. La biotransformation d'ABZ en ABZSO est vraisemblablement due à deux ou plusieurs enzymes, tels qu'une FMO et un ou plusieurs CYP450, dont probablement le CYP3A4 [86] ; pour l'oxydation d'ABZSO en ABZSO₂, le CYP1A2 pourrait jouer un rôle [91]. Comme la formation stéréosélective d'ABZSO présente un grand intérêt dans le cadre de ce travail, des incubations préliminaires sont entreprises afin d'observer la formation d'ABZSO. Ces incubations préliminaires d'ABZ avec les CYP2D6, CYP2C19 et CYP3A4 ne montrent pas de formation d'ABZSO. Cet effet pourrait être dû à la quantité de solvant organique, qui se situe entre 2.5 et 5.5 % pour ces incubations. En 1999, Busby et al. décrivent l'influence de la quantité de solvant dans les incubations in vitro et mettent par conséquent en évidence les précautions nécessaires lors de leur utilisation [92].

Cet aspect revêt une importance particulière lors de l'incubation d'une substance aussi peu soluble que l'ABZ. La suite des investigations s'est limitée aux incubations de l'ABZ avec le CYP3A4 et les HLM, en prenant garde à la quantité de solvant organique utilisée ; les incubations sont répertoriées dans le tableau 9.

Tableau 9 : Rapports énantiomériques, calculés à l'aide des hauteurs relatives d'ABZSO, obtenus par les incubations in vitro d'ABZ avec le CYP3A4 (25 pmol) et les microsomes hépatiques humains (0.5 µg/ml).

Echantillon	Temps d'incubation [h]	Matrice de l'échantillon ou de l'incubation	Pourcentage de méthanol [%]	Rapport énantiomérique (-)-ABZSO/(+)-ABZSO
ABZ [100 µM]	24	CYP3A4	env. 2.5 %	-
ABZ [50 µM]	24	CYP3A4	env. 1.25 %	-
ABZ [100 µM]	24	HLM	env. 2.5 %	0.97
ABZ [50 µM]	24	HLM	env. 1.25 %	0.92
ABZ [25 µM]	24	HLM	env. 0.625 %	0.89
ABZ [50 µM]	72	HLM	env. 1.35 %	0.88
Plasma de patients (n=31)	-	Plasma	-	0.31

Les incubations avec le CYP3A4 ne montrent pas de formation d'ABZSO aux conditions d'incubation utilisées. Ce résultat ne peut donc pas confirmer l'activité du CYP3A4 telle qu'elle est mentionnée dans la littérature [86]. Les incubations d'ABZ avec les HLM montrent quant à elles un métabolisme quelque peu stéréosélectif. Les rapports énantiomériques obtenus donnent des valeurs entre 0.88 et 0.97 et ne présentent pas de différence significative après une incubation de 24 ou de 72 h. La stéréosélectivité observée après extraction de ces incubations est moins marquée que dans les extraits plasmatiques de patients, voir tableau 9 et fig. 23. Les quantités d'ABZSO formées par ces incubations n'ont pas été quantifiées, mais leur montant est minime. L'extrait de l'incubation qui montre la quantité d'ABZSO formée la plus importante est celui provenant de l'incubation de 50 µM d'ABZ pendant 24 h ; celui-ci est représenté dans la fig. 26.

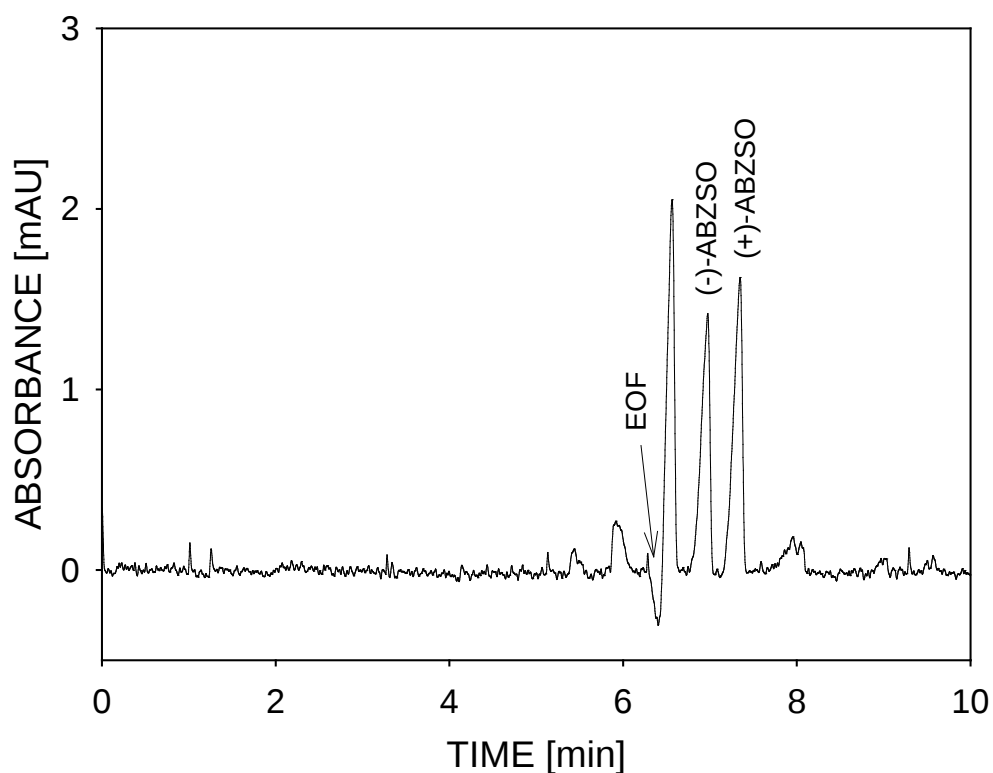


Fig. 26 : Electrophérogramme obtenus après LLE de l'incubation de 50 μM d'ABZ avec 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de HLM pendant 24 h. Le rapport énantiomérique d'ABZSO obtenu à l'aide des hauteurs relatives des pics est de 0.92. Système tampon : 20 mM Tris pH 7 contenant 3 % (m/v) sulfated β -CD. Conditions électrophorétiques : 18 kV (courant env. 56 μA), thermorégulation du capillaire : 20 $^{\circ}\text{C}$. Capillaire de 50 μm I.D., longueur totale (jusqu'au détecteur) $L = 50$ cm ($l = 45.4$ cm)., Injection par application de pression positive : 5 psi $\times$ s.

5. Conclusions

Diverses facettes du métabolisme de substances médicamenteuses chirales ont été traitées dans le cadre de ce travail ; l'électrophorèse capillaire s'est révélée une méthode polyvalente pour l'analyse de différents aspects tels que les incubations *in vitro* de composés chiraux avec des enzymes hépatiques, l'évaluation du métabolisme stéréosélectif de la MQ dans l'urine, et la quantification des énantiomères d'ABZSO dans le plasma.

Les incubations *in vitro* ont permis de montrer que la CE convient à l'analyse d'échantillons après incubation avec des CYP450 SUPERSOMES™ et les microsomes hépatiques humains. Il a été possible de confirmer le métabolisme hautement stéréosélectif de la MEPH et d'observer l'impact de CYP450 individuel sur la stéréosélectivité de métabolisme de la MET. Quant au métabolisme de la MQ, sa stéréosélectivité a pu être mise en évidence pour la première fois par l'analyse d'extraits urinaires ainsi qu'*in vitro*. La stéréosélectivité du métabolisme de la MQ a été évaluée à l'aide des rapports énantiomériques des hauteurs relatives des pics observés pour les 5 métabolites hydroxylés principaux, qui après LLE sont en moyenne de : 2.62 pour la 2'OH-MQ ; 0.026 pour la 4'OH-MQ ; 0.77 pour la 6OH-MQ ; 5.77 pour la 3'OH-MQ ; et 0.21 pour la 2OH-MQ. Les urines, récoltées par 3 volontaires dont deux sont EM et le troisième est PM pour les CYP2D6 et CYP2C19, montrent que le métabolisme ne semble pas être influencé par les polymorphismes génétiques de ces deux enzymes. Différentes incubations *in vitro* avaient pour but d'élucider la ou les voies métaboliques de la MQ. Les incubations par le CYP3A4 et les HLM permettent de former la 2'OH-MQ et la 2OH-MQ de façon stéréosélective. Les autres voies métaboliques n'ont pas pu être élucidées aux conditions utilisées. Pour l'ABZSO, le but était de trouver une méthode chirale qui permette de quantifier la substance dans des échantillons plasmatiques provenant de patients traités contre l'échinococcose hépatique. Après un essai effectué avec des bases de Pirkle, qui se sont révélées inadéquates en tant que sélecteurs chiraux pour la séparation des énantiomères d'ABZSO dans les conditions utilisées, la sulfated β -CD a finalement permis une meilleure résolution des énantiomères. L'utilisation de sulfated β -CD a permis l'analyse d'échantillons plasmatiques provenant d'un lot de 31 patients traités contre l'échinococcose hépatique. La moyenne des rapports énantiomériques de (-)-ABZSO/(+)-ABZSO obtenus pour ce lot de patients donne une valeur moyenne de 0.31 avec un RSD de 50.56 % ; les valeurs extrêmes s'établissent à 0.07 pour la plus basse et à 0.62 pour la plus élevée. La corrélation entre la méthode de CZE chirale et la méthode de HPLC achirale est linéaire et présente des concentrations d'ABZSO légèrement inférieures par la quantification par CE.

Aux conditions utilisées, l'utilisation de la fluorescence n'a pas montré d'avantages quant à la quantification de l'ABZSO, et les incubations *in vitro* de l'ABZ n'ont pas permis l'élucidation des voies métaboliques. Seules les incubations avec des HLM ont permis la formation d'ABZSO.

Par conséquent, la CE est une méthode particulièrement intéressante pour les séparations énantiomériques, cela non seulement pour des molécules comme la MET possédant un carbone asymétrique, mais également pour des molécules comme la MQ ou l'ABZSO, qui présentent une forme de chiralité différente. Un grand nombre de facteurs interviennent lors d'une séparation électrophorétique. Les éventuelles variations des conditions électrophorétiques permettent de faire des séparations énantiomériques selon différentes méthodes. Les effets les plus importants sont dus au choix du sélecteur chiral. La nature du sélecteur chiral a une influence particulière sur la séparation énantiomérique. L'utilisation d'une cyclodextrine neutre ou chargée, la nature de ses substituants, ou l'utilisation d'une autre molécule comme un éther de couronne ou une base de Pirkle entraînent des conditions de départ très différentes. Chaque sélecteur chiral possède une interaction chimique spécifique avec la molécule dont les énantiomères doivent être séparés par formation de liaisons hydrogènes ou de complexes d'inclusion avec les molécules. La concentration du sélecteur chiral est un autre facteur à considérer lors de la formation de complexes. Ces systèmes sont basés sur des équilibres et dépendent donc de la concentration d'une substance par rapport à l'autre. La possibilité de combinaison des sélecteurs chiraux ou leur addition dans divers systèmes comme la CZE ou la MECC rendent les possibilités de variation du système d'autant plus importantes. Par ailleurs, d'autres phénomènes chimiques, ainsi que des phénomènes physiques et d'autres facteurs doivent être pris en considération lors de la mise au point d'un système de séparation par électrophorèse capillaire. La tension, la température, la longueur et la nature du capillaire, le choix de l'électrolyte dans la solution tampon, sa concentration et son pH, sont différents facteurs dont les variations ont plus ou moins d'impact sur les séparations de composés de natures différentes ainsi que dans la résolution d'énantiomères. L'intérêt de la CE provient non seulement des possibles variations de ces divers paramètres, mais également des faibles quantités de matériel et de solvants organiques nécessaires aux analyses. De plus, par la solubilité du sélecteur chiral dans le système tampon, les coûts en CE chirale sont inférieurs à ceux de l'HPLC et de la GC, dont les colonnes chirales sont chères.

Dans le cadre de cette étude, les substances chirales analysées se trouvent dans des matrices biologiques. Ceci implique leur extraction afin de les séparer de leur matrice, qui dans

certain cas peut causer des interférences lors de la détection. Des méthodes comme la LLE ou la SPE peuvent être utilisées. Mais selon la nature de la substance à détecter et sa concentration dans le fluide corporel analysé, la préparation de l'échantillon peut se réduire à une centrifugation ou une précipitation des protéines. Dans certains cas, comme pour l'urine hydrolysée enzymatiquement, l'échantillon peut être injecté directement sans extraction préalable [15].

Ces analyses chirales, effectuées de surcroît dans les fluides corporels, amènent à des considérations pharmacologiques. Le métabolisme stéréosélectif de substances thérapeutiques a été pris en considération dans les différentes études décrites dans le cadre de cette thèse. Les métabolismes stéréosélectifs *in vivo* et *in vitro* ont été abordés. Ces deux approches métaboliques permettent par l'étude *in vivo* d'avoir le motif métabolique dans un fluide biologique donné à un moment précis et par les incubations *in vitro* de reproduire certains processus métaboliques hépatiques. Les aspects qualitatifs et quantitatifs permettent des évaluations métaboliques dont les approches sont très différentes. L'aspect qualitatif, comme dans le cas de la MQ, a permis par combinaison de différentes investigations l'évaluation du métabolisme stéréosélectif de ce principe actif. L'aspect quantitatif a été utilisé pour l'évaluation de la concentration plasmatique d'un lot de patients, comme dans le cas de l'ABZSO.

La CE est une méthode analytique variée, le métabolisme, un sujet vaste, et la chiralité des principes actifs, un phénomène répandu, de telle sorte que le sujet est intarissable. Les méthodes proposées et les aspects étudiés pourraient être améliorés ou transformés de diverses manières. La séparation dans un microchip permettrait par exemple de diminuer le temps d'analyse pour les énantiomères de la MQ. Une méthode de CEC pourrait être un moyen d'éviter l'interférence de la R-DNBPG avec le composé à analyser lors de son utilisation comme sélecteur chiral pour la séparation de l'ABZSO. Des études cliniques pourraient être entreprises pour mieux évaluer certains processus métaboliques *in vivo*. Grâce au développement du génie génétique, des incubations avec des enzymes P450 permettent d'élucider certaines réactions hépatiques. Ce développement doit continuer afin de permettre à la recherche de progresser et à l'industrie d'acquérir assez de connaissances pour la mise sur le marché des nouveaux produits thérapeutiques.

Un nombre considérable de méthodes CE peuvent être utilisées avec les techniques actuelles ; à cet égard, le développement est continu. Cela n'est pas seulement le cas pour la CE, mais également pour les autres techniques analytiques et la science en général. A l'avenir, de nouvelles méthodes analytiques permettront de faire certaines analyses de routine plus

efficacement, de faire des études cliniques avec plus de sûreté, et les personnes contribuant à l'évaluation mais surtout à l'utilisation quotidienne des méthodes analytiques disposeront d'une quantité toujours plus grande d'informations. Les questions de métabolisme sont donc des sujets actuels, et leur analyse est importante pour la compréhension des mécanismes d'action biologiques. L'analyse qualitative des substances chirales restera aussi toujours d'importance, comme par exemple pour le contrôle de la qualité de la cocaïne, qui en tant que substance naturelle ne contient que l'énantiomère (-), et en tant que produit synthétique présente l'énantiomère (+) ou le mélange des énantiomères (+/-) [93]. L'importance de l'analyse de la cocaïne réside dans le fait que l'énantiomère (+) est rapidement hydrolysé et n'a par conséquent qu'une faible activité pharmacologique [94]. Les futurs développements technologiques resteront d'un grand intérêt pour l'amélioration des diverses applications de séparations chirales liées ou non au métabolisme.

6. Bibliographie

- [1] Aboul-Enein, H.Y., Wainer, I.W. (Eds.), The Impact of Stereoselectivity on Drug Development and Use, Chemical Analysis Series vol. 142, John Wiley & Sons, New York, 1997.
- [2] Testa, B., Principles of Organic Stereochemistry, Gassman, P.G. (Ed.), volume 6, Marcel Dekker, New York, 1979.
- [3] Williams, M.L., Wainer, I.W., Ther. Drug Monit. 2002, 24, 290-296.
- [4] Vollhardt, K.P.C., Chimie Organique, De Boeck-Wesmael, Bruxelles, 1990, p. 146-187.
- [5] Wainer, I.W., in Handbook of Analytical Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology, Wong, S.H.Y. & Sunshine, I. (Eds), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 1-19 (1997).
- [5a] Tripathi, K.D., Indian J. Pharmacol. 1993, 25, 73-77.
- [6] Frost, M., Köhler, H., Blaschke, G., Electrophoresis 1997, 18, 1026-1034.
- [7] Foster, D.J.R., Somogyi, A.A., Bochner, F., J. Chromatogr. B 2000, 744, 165-176.
- [8] Mannschreck, A., Koller, H., Stühler, G., Davies, M.A., Traber, J., Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther. 1984, 19, 381-383.
- [9] Lanz, M., Thormann, W., Electrophoresis 1996, 17, 1945-1949.
- [10] Cherkaoui, S., Rudaz, S., Varesio, E., Veuthey, J.-L., Electrophoresis 2001, 22, 3308-3315.
- [11] Rudaz, S., Cherkaoui, S., Gauvrit, J.-Y., Lantéri, P., Veuthey, J.-L., Electrophoresis 2001, 22, 3316-3326.
- [12] Angelo, H.R., Beck, N., Kristensen, K., J. Chromatogr. B 1999, 724, 35-40.
- [13] Ortelli, D., Rudaz, S., Chevalley, A.-F., Mino, A., Déglon, J.-J., Balant, L., Veuthey, J.-L., J. Chromatogr. A 2000, 871, 163-172.
- [14] Rudaz, S., Ortelli, D., Gex-Fabry, M., Déglon, J.-J., Balant, L., Veuthey, J.-L., Chirality 1999, 11, 487-494.
- [15] Desiderio, C., Fanali, S., Küpfer, A., Thormann, W., Electrophoresis 1994, 15, 87-93.
- [16] Küpfer, A., Roberts, R.K., Schenker, S., Branch, R.A., J. Pharmacol. Exp. Ther. 1981, 218, 193-199.
- [17] Paias, F.O., Lanchote, V.L., Takayanagui, O.M., Bonato, P.S., Electrophoresis 2001, 22, 3263-3269.
- [18] Lienne, M., Caude, M., Rosset, R., Tambuté, A., Delatour, P., Chirality 1989, 1, 142-153.

- [19] Lanchote, V.L., Marques, M.P.C., Takayanagui, O.M., de Carvalho, R., Paias, F.O., Bonato, P.S., *J. Chromatogr. B* 1998, 709, 273-279.
- [20] Kaijser, G.P., Beijnen, J.H., Bult, A., Keizer, H.J., Underberg, W.J.M., *J. Chromatogr. B* 1997, 690, 131-138.
- [21] Granville, C.P., Gehrcke, B., König, W.A., Wainer, I.W., *J. Chromatogr.* 1993, 622, 21-31.
- [22] Zaugg, S., Thormann, W., *J. Microcol. Sep.* 2001, 13, 96-101.
- [23] Prost, F., Thormann, W., *Electrophoresis* 2001, 22, 3270-3280.
- [24] Koller, H., Rimböck, K.-H., Mannschreck, A., *J. Chromatogr.* 1983, 282, 89-94.
- [25] Rimböck, K.-H., Kastner, F., Mannschreck, A., *J. Chromatogr.* 1985, 329, 307-310.
- [26] Eveleigh, P., Hulme, E.C., Schudt, C., Birdsall, N.J.M., *Mol. Pharmacol.* 1989, 35, 477-483.
- [27] Junghänel, J., Buss, V., Beyrich, T., Jira, T., *Chirality* 1998, 10, 253-261.
- [28] *Handbook of Chemistry and Physics*, Weast, R.C., Astle, M.J., Beyer, W.H., 67th Edition, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1986, F-70.
- [29] Azanli, E., Rothchild R., Sapse, A.-M., *Spectrosc. Lett.* 2002, 35, 257-274.
- [30] Schoetz, G., Trapp, O., Schurig, V., *Electrophoresis* 2001, 22, 3185-3190.
- [31] Schoetz, G., Trapp, O., Schurig, V., *Anal. Chem.* 2000, 72, 2758-2764.
- [32] Montanari, C.A., Cass, Q.B., Tiritan, M.E., Soares de Souza, A.L., *Anal. Chim. Acta*, 2000, 419, 93-100.
- [33] Katzung B.G., *Basics and Clinical Pharmacology*, 5th edition, 1992, Appleton & Lange, Connecticut, USA.
- [34] Venkatakrishnan, K., von Moltke, L.L., Greenblatt, D.J., *J. Clin. Pharmacol.* 2001, 41, 1149-1179.
- [35] Schorderet et coll., *Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques*, 2^{ème} édition, 1992, Frison-Roche, Slatkine, Paris.
- [36] Caldwell, J., *J. Chromatogr. A* 1995, 694, 39-48.
- [37] Foster, D.J.R., Somogyi, A.A., Dyer, K.R., White, J.M., Bochner, F., *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2000, 50, 427-440.
- [37a] Reist, M., Carrupt, P.-A., Francotte, E., Testa, B., *Chem. Res. Toxicol.* 1998, 11, 1521-1528.
- [38] Bressolle, F., Audran, M., Pham, T.-N., Vallon, J.-J., *J. Chromatogr. B* 1996, 687, 303-336.
- [39] Chankvetadze, B., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A* 2001, 906, 309-363.

- [40] Fanali, S., Catarcini, P., Blaschke, G., Chankvetadze, B., *Electrophoresis* 2001, 22, 3131-3151.
- [41] Shihabi, Z.K., *J. Chromatogr. A* 1998, 807, 27-36.
- [42] Thormann, W., Wey, A.B., Lurie, I.S., Gerber, H., Byland, C., Malik, N., Hochmeister, M., Gehrig, C., *Electrophoresis* 1999, 20, 3203-3236.
- [43] Thormann, W., Lurie, I.S., McCord, B., Marti, U., Cenni, B., Malik, N., *Electrophoresis* 2001, 22, 4216-4243.
- [44] Amini, A., *Electrophoresis* 2001, 22, 3107-3130.
- [45] Zaugg, S., Thormann, W., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 27-41.
- [46] Scriba, G.K.E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 27, 373-399.
- [47] Chen, S.-H., Chen, Y.-H., *Electrophoresis* 1999, 20, 3259-3268.
- [48] Haldey, M.R., Camilleri, P., Hutt, A.J., *Electrophoresis* 2000, 21, 1953-1976.
- [49] Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T., *Capillary Electrophoresis*, Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft, Braunschweig, 1994.
- [50] *Capillary Electrophoresis Guidbook*, Altria, K.D. (Ed.), volume 52, Humana Press, Totowa, 1996.
- [51] Foret, F., Křivánková, L., Boček, P., in *Capillary Zone Electrophoresis*, Radola, B.J. (Ed.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1993.
- [52] Camilleri P. (Ed.), *Capillary Electrophoresis : Theory and Practice*, CRC Press, Boca Raton, 1993.
- [53] Neuhoff, V., *Electrophoresis* 2000, 21, 3-11.
- [54] Verpoorte, E., *Electrophoresis* 2002, 23, 677-712.
- [55] Dolník, V., Liu, S., Jovanovich, S., *Electrophoresis* 2000, 21, 41-54.
- [56] Vespalec, R., Boček, P., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 431-445.
- [57] Wren, S.A.C., Rowe, R.C., *J. Chromatogr.* 1992, 603, 235-241.
- [58] Armstrong, D.W., Nair, U.B., *Electrophoresis* 1997, 18, 2331-2342.
- [59] Kuhn, R., Erni, F., Bereuter, T., Häusler, J., *Anal. Chem.* 1992, 64, 2815-2820.
- [60] Lee, O.-S., Jang, Y.H., Cho, Y.G., Hyun, M.H., Kim, H.-J., Chung, D.S., *Chem. Lett.* 2001, 232-233.
- [61] Lurie, I.S., *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 297-307.
- [62] Schneiderman, E., Stalcup, A.M., *J. Chromatogr. B* 2000, 745, 83-102.
- [63] Rodríguez, I., Jin, L.J., Li, S.F.Y., *Electrophoresis* 2000, 21, 211-219.
- [64] Lanz, M., Caslavská, J., Thormann, W., *Electrophoresis* 1998, 19, 1081-1090.

- [65] Hoffmann, P., Wagner, H., Weber, G., Lanz, M., Caslavská, J., Thormann, W., *Anal. Chem.* 1999, 71, 1840-1850.
- [66] Fanali, S., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 89-122.
- [67] Chankvetadze, B., *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, John Wiley & Sons, Chichester, 1997.
- [68] Gareil, P., Gramond, J.P., Guyon, F., *J. Chromatogr.* 1993, 615, 317-325.
- [69] Pruñonosa, J., Obach, R., Diez-Cascón, A., Gouesclou, L., *J. Chromatogr.* 1992, 574, 127-133.
- [70] Okafo, G.N., Bintz, C., Clarke, S.E., Camilleri, P., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1992, 1189-1192.
- [71] Fanali, S., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., Desiderio, C., *J. Chromatogr. A* 2001, 919, 195-203.
- [72] Blumenstein, M., Ross, J., Rothchild, R. *Spectrosc. Lett.* 1990, 23, 189-221.
- [73] Poropatich, A., Rothchild, R., *Spectrosc. Lett.* 1990, 23, 29-43.
- [74] Procházková, A., Chouki, M., Theurillat, R., Thormann, W., *Electrophoresis* 2000, 21, 729-736.
- [75] Martindale, *The Extra Pharmacopoeia, Thirty-first Edition*, Reynolds, J.E.F. (Ed.), Royal Pharmaceutical Society, London, 1996, p. 376.
- [76] Jansson, B., Simonsson, U.S.H., Ashton, M., *J. Chromatogr. B* 2003, 791, 179-191.
- [77] Foster, D.J.R., Somogyi, A.A., Bochner, F., *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1999, 47, 403-412.
- [78] Iribarne, C., Dréano, Y., Bardou, L.G., Ménez, J.F., Berthou, F., *Toxicology* 1997, 117, 13-23.
- [78a] Goodman & Gilman's, Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., Goodman Gilman, A. (Eds.), 9th Edition, The McGraw-Hill Companies, 1996, p. 544.
- [79] Eap, C.B., Finkbeiner, T., Gastpar, M., Scherbaum, N., Powell, K., Baumann, P., *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1996, 50, 385-389.
- [80] Kurz, R.W., Hainz, R., Gremmel, F., Grisold, W., Hruby, K., Dellert, P., Vycudilik, W., *Anaesthesist* 1995, 44, 863-868.
- [81] Gupta, K.P., Bhargava, K.P., Basheer, A., *J. Pharm. Pharmacol.* 1982, 34, 744-746.
- [82] Baselt, R.C., Cravey, R.H., *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*, (Eds.), 4th Edition, Chemical Toxicology Institut, Foster City, CA, 1995, pp. 483-486.
- [83] Clarke's Isolation and Identification of Drugs, Moffat, A.C., Jackson, J.V., Moss, M.S., Widdop, B. (Eds.), 2nd Edition, The Pharmaceutical Press, 1986, pp. 746-747.
- [84] Wilson, K., Reynolds, C.N., Burnett, D., *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1978, 13, 291-297.

- [85] Ericsson, Ö., Danielsson, B., *Drug Metab. Dispos.* 1977, 5, 497-502.
- [86] Rawden, H.C., Kokwaro, G.O., Ward, S.A., Edwards, G., *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2000, 49, 313-322.
- [87] Jung, H., Medina, L., García, L., Fuentes, I., Moreno-Esparza, R., *J. Pharm. Pharmacol.* 1998, 50, 43-48.
- [88] Küsters, E., Gerber, G., *Chromatographia* 1997, 44, 91-96.
- [89] Thormann, W., Prost, F., Procházková, A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 27, 555-567.
- [90] Righetti, P.G., Gelfi, C., Verzola, B., Castelletti, L., *Electrophoresis* 2001, 22, 603-611.
- [91] Marques, M.P., Takayanagui, O.M., Lanchote, V.L., *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 2002, 35, 261-269.
- [92] Busby, W.F., Ackermann, J.M., Crespi, C.L., *Drug Metab. Dispos.* 1999, 27, 246-249.
- [93] Lurie, I.S., Klein, R.F.X., Dal Cason, T.A., LeBelle, M.J., Brenneisen, R., Weinberger, R.E., *Anal. Chem.* 1994, 66, 4019-4026.
- [94] Gatley, S.J., *Biochem. Pharmacol.* 1991, 41, 1249-1254.

7. ANNEXES

7.1 Capillary electrophoresis to assess drug metabolism induced in vitro using single CYP450 enzymes (SUPERSOMES™) : Application to the chiral metabolism of mephénytoin and methadone.

Electrophoresis 2003, 24, 2577-2587.

7.2 Enantiomeric analysis of the five major monohydroxylated metabolites of methaqualone in human urine by chiral capillary electrophoresis.

Electrophoresis 2001, 22, 3270-32-80.

7.3 Assessment of the stereoselective metabolism of methaqualone in man by capillary electrophoresis.

Electrophoresis 2003, 24, 2598-2607.

7.4 Capillary electrophoresis with (R)-(-)-N-(3,5-dinitrobenzoyl)- α -phenylglycine as chiral selector for separation of albendazole sulfoxide enantiomers and their analysis in human plasma.

J. Pharm. Biomed. Anal. 2002, 27, 555-567.

7.5 Chiral analysis of albendazole sulfoxide enantiomers in human plasma and saliva using capillary electrophoresis with on-column absorption and fluorescence detection.

J. Sep. Sci. 2002, 25, 1043-1054.