

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES FORMULES BRUTES

- 5-HT₃ : Sérotoninergique de type 3
- ACN : acétonitrile
- ALAT : Alanine Aminotransférase
- Ali: Alizapride
- BGE: Back Ground Electrolyte (Electrolyte de séparation)
- CB₁ : Cannabinoïde de type 1
- CB₂ : Cannabinoïde de type 2
- CEMC : Chromatographie Electrocinétique Micellaire Capillaire
- CH₃COOH : acide acétique
- CZE: Capillary Zone Electrophoresis (Electrophorèse capillaire de zone)
- D₂ : Dopaminergique de type 2
- Dim: Dimenhydrinate
- Dom: Dompéridone
- EC: Electrophorèse capillaire
- ECG : Electrophorèse Capillaire en Gel
- EI: Etalon Interne
- ETOH : éthanol
- FASI: Field Amplified Sample Injection (Préconcentration par amplification de champ électrique avec une injection électrocinétique)
- FASS: Field Amplified Sample Stacking (Préconcentration par amplification de champ électrique)
- FEO: Flux électroosmotique
- H₃PO₄: acide orthophosphorique
- Halo: Halopéridol
- HCOOH : acide formique

- LIF: Laser Induced Fluorescence (Fluorescence induite par laser)
- LOD: Limit Of Detection (Limite de détection)
- LOQ : Limite of quantification (limite de quantification)
- MeOH : méthanol
- Meto: Métoclopramide
- Métop: Métopimazine
- NaOH : hydroxyde de sodium
- NK-1 : Neurokinine 1
- Pro: Prométhazine
- S : Seconde
- SM: Spectrométrie de Masse
- TFA : acide trifluoroacétique
- THC : Δ -9-tetrahydrocannabinol
- UV : Ultra-violet

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : structure de la peau	10
<u>Figure 2</u> : Structures chimiques de la chlorpromazine (a), de la métopimazine (b) et de la prométhazine	22
<u>Figure 3</u> : Structures chimiques du métoclopramide(a), de l'alizapride (b) et de la dompéridone (c)	23
<u>Figure 4</u> : Structure chimique de l'halopéridol	23
<u>Figure 5</u> : Structures chimiques de la dexaméthasone (a) et de la méthylprednisolone (b) ...	25
<u>Figure 6</u> : Structure chimique du Δ-9-tétrahydrocannabinoïde.....	26
<u>Figure 7</u> : Structure chimique de la dimenhydrinate	26
<u>Figure 8</u> : Structures chimiques de l'ondansétron (a) et du granisétron (b)	28
<u>Figure 9</u> : Structures chimiques de l'aprépitant (a) et du fosaprépitant (b).....	29
<u>Figure 10</u> : Schéma d'un appareil d'électrophorèse capillaire	30
<u>Figure 11</u> : Ordre de migration des anions, cations et molécules neutres lors d'une analyse en électrophorèse capillaire.....	33
<u>Figure 12</u> : Principe de l'injection hydrodynamique.....	35
<u>Figure 13</u> : Principe de l'injection electrocinétique	36
<u>Figure 14</u> : schéma du principe préconcentration par amplification du champ électrique avec injection hydrodynamique (FASS).....	38
<u>Figure 15</u> : Schéma du principe de l'injection electrocinétique par amplification du champ électrique en tête de capillaire (FASI).....	40
<u>Figure 16</u> : Schéma de principe du FASI avec un plug d'eau	41
<u>Figure 17</u> : Influence de la force ionique sur la résolution des analytes	50
<u>Figure 18</u> : Séparation électrophorétique du mélange d'antiémétiques dans les conditions optimisées.....	52
<u>Figure 19</u> :Influence de la nature et de la concentrationen de l'agent de protonation sur le rapport signal-sur-bruit (S/N) (a) et sur l'aire corrigée (b) de la prométhazine	55

Figure 20 : Influence de la longueur du créneau d'eau sur l'aire corrigée (a) et sur le rapport signal-sur-bruit (b) de la prométhazine (1), le dimenhydrinate (2), l'étalon interne (3), le métoclopramide (4), l'halopéridol (5) et la dompéridone (6)	56
Figure 21 : Influence de la concentration de méthanol dans l'échantillon sur le rapport signal-sur-bruit (a) et sur l'aire des pics (b) pour les analytes : prométhazine (1), dimenhydrinate (2), l'étalon interne (3), métoclopramide (4), halopéridol (5) et dompéridone (6).....	58
Figure 22 : Influence du temps d'injection de l'analyte sur la hauteur(a), le rapport signal-sur-bruit (S/N)(b), la résolution (Rs)(c), et l'efficacité (N)(d) pour : prométhazine (1), dimenhydrinate (2), l'étalon interne (3), métoclopramide (4)alizapride (5), halopéridol (6) et dompéridone (7)	59
Figure 23 : Histogramme représentatif des critères de performance du modèle pour chaque réponse étudiée	65
Figure 24 : surfaces des réponses modélisant l'aire corrigée de la dompéridone en fonction de la tension et du temps d'injection (a) et en fonction de la $[CH_3COOH]$ et %MeOH de méthanol (c), le S/N de la dompéridone en fonction de la tension et du temps d'injection (b), et en fonction de la $[CH_3COOH]$ et %MeOH (d)	69
Figure 25 : Electrophorégramme des deux conditions optimales proposées par MODDE.....	71
Figure 26 : Comparaison des modes d'injection hydrodynamique (a) et FASI (b)	72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : liste des réactifs utilisés	47
Tableau II : liste des substances de référence et médicaments	48
Tableau III : Paramètres de performance (temps de migration : t_M , efficacité et la résolution de la méthode) de la méthode d'analyse	53
Tableau IV : Valeurs des facteurs aux points étoiles (- α ; + α), factoriels (-1 ; +1) et centré (0) du plan composite centré	61
Tableau V : Matrice des expériences modélisée par le logiciel MODDE	62
Tableau VI : Réponses mesurées pour chaque expérience	63
Tableau VII : Coefficients significatifs du polynôme du second degré modélisant l'équation des surfaces de réponses obtenues pour chaque facteur	67
Tableau VIII : Deux conditions optimales proposées par le logiciel MODDE	71
Tableau IX : Limites de quantification en mode hydrodynamique et FASI	72

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
I. Généralités sur les médicaments	4
I.1 Définition du médicament.....	4
I.2 Origine des médicaments.....	4
I.2.1 Origine naturelle [2]	4
I.2.2 Médicaments d'origine synthétique	5
I.2.3 Médicaments d'origine biogénétique	5
I.3 Différents types de médicaments	5
I.4 Utilisation des médicaments	6
I.5 Voies d'administration des médicaments	6
I.5.1 La voie orale ou buccale	7
I.5.2 Voie parentérale ou voie injectable	7
I.5.3 La voie transmuqueuse	8
I.5.4 La voie pulmonaire	9
I.5.5 La voie percutanée ou transdermique	9
II. Généralités sur les nausées et vomissements.....	14
II.1 Les nausées.....	14
II.2 Les vomissements.....	15
III. Les étiologies des nausées et vomissements	16
IV. Les nausées et vomissements chimio-induits (NVCI).....	18
IV.1 Les nausées et vomissements aigus.....	19
IV.2 Les nausées et vomissements anticipés.....	19
IV.3 Les nausées et vomissements retardés	20
V. Les agents antiémétiques.....	20
V.1 Les antagonistes des récepteurs à la dopamine de type 2	20
V.1.1 Les phénothiazines.....	21
V.1.2 Les benzamides	22
V.1.3 Les butyrophénones.....	23
V.2 Les corticostéroïdes	23

V.3 Les antagonistes des récepteurs aux Cannabinoïdes CB1	25
V.4 Les antihistaminiques.....	26
V.5 Les antagonistes sérotoninergiques.....	26
V.5.1 Les propriétés communes	27
V.5.2 Les particularités	28
V.6 Les antagonistes des récepteurs aux neurokinines de type 1	28
VI. Généralités sur l'électrophorèse capillaire	30
VI.1 Principe.....	30
VI.1.1 La migration électrophorétique	31
VI.1.2 L'écoulement électroosmotique	32
VI.1.3 La mobilité apparente	33
VI.2 Les différents modes d'analyse en électrophorèse capillaire et leurs applications	34
VI.3 Les avantages et inconvénients de l'électrophorèse capillaire	34
VI.4 Les techniques de concentration	35
VI.4.1 Rappel sur les différents modes d'injection.....	35
VI.4.2 Les méthodes de préconcentration appliquées aux molécules ionisables.....	37
VII. Les caractéristiques de validation d'une méthode analytiques [7].....	42
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL.....	45
I. Objectifs.....	45
I.1 objectifs de l'étude	45
I.1.1 objectif général de l'étude	45
I.2 Cadre de l'étude	45
II. Matériels, Réactifs et Substances de Références.....	45
II.1 Petit matériel et verrerie	46
II.2 REACTIFS ET SUBSTANCES DE REFERENCE	47
II.2.1 Réactifs	47
II.2.2 substances de référence	47
III. Mise au point de la séparation.....	48
III.1 Choix du pH de l'électrolyte	49
III.2 Influence de la force ionique de l'électrolyte.....	50
III.3 Ajout d'un modificateur organique dans le tampon	51
III.4 Performance de la méthode d'analyse	51
IV. Développement d'un protocole d'injection avec amplification de champ (FASI) à l'aide d'un plan d'expériences.	53

IV.1 Essais préliminaires	54
IV.1.1 Influence de la nature et de la concentration de l'agent de protonation et de sa concentration dans l'échantillon.....	54
IV.1.2 Influence de la longueur du créneau d'eau	56
IV.1.3 Influence du pourcentage de méthanol dans l'échantillon	57
IV.1.4 Influence du temps d'injection des analytes	58
IV.2 Construction du plan d'expériences	60
IV.2.1 Définition des niveaux de chaque facteur	60
IV.2.2 Définition des réponses étudiées.....	61
IV.3 Construction de la matrice des expériences	61
IV.4 Validité du modèle	64
IV.5 Interprétation des résultats du plan d'expériences.....	66
IV.5.1 Les effets de chaque facteur	68
IV.5.2 L'interaction entre les facteurs	68
IV.5.3 Etudes des surfaces de réponses	68
IV.6 Détermination de l'optimum	70
V. Comparaison des modes d'injection hydrodynamique et FASI.....	72
CONCLUSION.....	74
BIBLIOGRAPHIE	76

INTRODUCTION

La chimiothérapie consiste en l'administration de substances chimiques capables de limiter la multiplication anarchique des cellules. La plupart des principes actifs utilisés en chimiothérapie ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses et peuvent entraîner des dérèglements physiopathologiques et des effets secondaires tels que les nausées et les vomissements. De ce fait, un traitement antiémétisant est souvent administré conjointement à une chimiothérapie anticancéreuse afin d'améliorer la qualité de vie du patient [1].

Ces principes actifs sont administrés principalement sous contrôle hospitalier, soit par voie intraveineuse, soit par voie orale. Le mode d'administration par voie intraveineuse est très traumatisant et par voie orale comporte des inconvénients, notamment pour un patient souffrant de nausées, des vomissements survenant peu de temps après la prise de composés antiémétiques peuvent diminuer leur efficacité thérapeutique.

La prise en charge des patients peut, toutefois, être améliorée en administrant les principes actifs par voie transcutanée. De nouvelles formes galéniques sont ainsi développées et le passage transdermique des principes actifs peut être évalué au moyen d'une cellule de diffusion. Ce système est équipé d'un compartiment donneur et d'un compartiment accepteur, séparés par une membrane naturelle (peau humaine ou animale). L'efficacité de la libération est évaluée en déterminant la quantité de principe actif dans le compartiment accepteur. Toutefois, les faibles volumes d'échantillon prélevés associés aux petites quantités de principes actifs dans ce compartiment nécessitent l'utilisation d'une méthode de dosage suffisamment sensible.

L'électrophorèse capillaire est une technique unanimement reconnue pour ses performances analytiques puisqu'elle associe rapidité de séparation,

automatisation et faible consommation d'échantillon. Néanmoins, elle souffre, parfois, d'un manque de sensibilité en raison du faible trajet optique lié à la détection UV.

Des techniques de pré-concentration en ligne peuvent être développées pour améliorer les seuils de quantification. Parmi celles couramment utilisées, l'amplification de champ avec injection électrocinétique (FASI) est particulièrement bien adaptée pour améliorer les seuils de quantification de molécules ionisables. Toutefois, sa mise en œuvre peut être longue et fastidieuse en raison des nombreux paramètres (nature du tampon de séparation, milieu de solubilisation de l'échantillon, durée et tension d'injection) qui influent sur le facteur de pré-concentration.

L'optimisation de méthode avec une approche monovariée est souvent privilégiée car elle est plus simple à mettre en œuvre. Toutefois, elle ne permet pas de prendre en compte les interactions entre les variables étudiées ni la pertinence de chacune, contrairement à l'approche multivariée. L'optimisation de méthode à l'aide d'un plan d'expériences constitue une alternative intéressante. Par ailleurs, l'approche multivariée permet de déterminer les conditions optimales en réduisant le nombre d'essais.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes fixés comme objectifs d'une part de mettre au point une méthode électrophorétique générique pour l'analyse de sept antiémétiques, potentiellement ionisables, entrant dans la composition de nouvelles formes galéniques et d'autre part, d'optimiser les paramètres conditionnant les performances du FASI à l'aide d'un plan d'expériences.

Ce travail est présenté en deux parties :

- une première partie consacrée à un rappel bibliographique sur les médicaments, les nausées et vomissements et leur traitement et le principe de l'électrophorèse capillaire
- une seconde partie expérimentale réservée à notre travail de laboratoire et à la présentation de nos résultats.

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les médicaments

I.1 Définition du médicament

La définition du médicament est donnée dans l'article L. 511 du Code de la Santé Publique (C.S.P.) : On entend par médicament, toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques.

I.2 Origine des médicaments

Les médicaments peuvent être d'origine très diverses :

I.2.1 Origine naturelle [2]

➤ *Médicaments d'origine végétale*

Les médicaments d'origine végétale comprennent les plantes entières ou certaines de leurs parties ainsi que les principes extraits des plantes comme les essences, les résines, etc. La thérapeutique par les plantes ou phytothérapie est à l'heure actuelle appréciée par de nombreuses populations qui y voient une manière naturelle et écologique de se traiter.

➤ *Médicaments d'origine animale*

Le règne animal aussi fournit de nombreux médicaments dont :

- Des organes d'animaux : la thérapeutique par les organes d'animaux s'appelle opothérapie. Mais les médicaments à base de produits d'origine bovine sont interdits afin d'éviter le risque de transmission de « la maladie e la vache folle ».

-
- Des produits obtenus par expression de certains tissus animaux (huile de foie de morue).
 - Des préparations dérivées du sang d'animaux immunisés contre certaines maladies infectieuses. Il s'agit des sérum thérapeutiques.

I.2.2 Médicaments d'origine synthétique

La plupart des médicaments actuellement commercialisés sont obtenus par synthèse organique.

I.2.3 Médicaments d'origine biogénétique

Par génie génétique, on fait fabriquer par des cellules vivantes des molécules qui ont toutes les caractéristiques de leur modèle humain (insuline, hormone de croissance...).

I.3 Différents types de médicaments

L'étude de la préparation des médicaments est une discipline qui s'appelle pharmacie galénique. Elle concerne :

- Les spécialités pharmaceutiques : ce sont des médicaments préparés par l'industrie pharmaceutique et protégés par un brevet. Ils sont présentés sous un conditionnement particulier, caractérisés par une dénomination spéciale et vendus en officine
- Les médicaments magistraux : ce sont des médicaments préparés par le pharmacien à partir d'une formule rédigée par un médecin pour un seul malade
- Les médicaments officinaux : ce sont des médicaments préparés par le pharmacien à partir d'une formule inscrite à la pharmacopée. Le médicament officinal peut être préparé à l'officine mais on peut l'obtenir en vrac dans l'industrie, la division et le conditionnement se faisant à l'officine

-
- Les médicaments essentiels : l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a défini une liste de médicaments, révisée régulièrement, indispensables au traitement des maladies les plus répandues
 - Le gène médicament : la thérapie génique ou transfert de gène est le traitement d'une maladie génétique par l'introduction dans l'organisme de la version normale du gène défectueux responsable de la maladie.

I.4 Utilisation des médicaments

Selon leurs effets, les médicaments peuvent être classés en quatre grands groupes qui sont:

- Les médicaments symptomatiques : ce sont les plus nombreux. Ils guérissent les symptômes et non la maladie,
- Les médicaments curatifs : ils guérissent le malade en s'attaquant à la cause de la maladie,
- Les médicaments substitutifs : ils remplacent un constituant de l'organisme qui fait défaut (vitamines, insulines, œstrogènes ...),
- Les médicaments préventifs : ils protègent le sujet sain d'une maladie (vaccins) ou modifient temporairement un processus physiologique (contraceptifs).

I.5 Voies d'administration des médicaments

Le choix de la voie d'administration dépend du type d'action souhaité (action locale ou générale) et des circonstances d'administration (situation d'urgence, volume important à administrer, particularité du point d'administration, nature ou composition particulière du médicament et le risque de dégradation dans le tube digestif ou par effet du premier passage hépatique) [3].

I.5.1 La voie orale ou buccale

Le tube digestif va de la bouche au rectum. Après administration orale, le médicament traverse la barrière intestinale puis le foie avant d'atteindre la circulation générale et ensuite les organes pour son action thérapeutique.

L'administration des médicaments par voie orale est aisée et des doses élevées peuvent être prises une seule fois.

Toutefois, ce mode d'administration présente des inconvénients:

- ❖ Ils peuvent être dégradés par diverses enzymes ou être excrétés par la voie biliaire. Si le passage par le foie est important, l'activité du médicament peut être considérablement diminuée,
- ❖ L'action n'apparaît qu'après un temps de latence correspondant au temps d'absorption,
- ❖ L'absorption peut être incomplète, voire même nulle,
- ❖ Il existe des risques de destruction par les sucs digestifs,
- ❖ Certains médicaments (anti-inflammatoires, corticostéroïdes) peuvent occasionner une irritation du tube digestif,
- ❖ L'odeur et le goût des médicaments sont parfois désagréables.

I.5.2 Voie parentérale ou voie injectable

C'est la voie la plus directe d'administration qui consiste à injecter directement le principe actif dans la circulation sanguine ou dans les liquides interstitiels évitant le tractus digestif. Les médicaments administrés par voie parentérale sont les préparations injectables liquides (solutions, émulsions, suspensions) ou solides (implants). On distingue : la voie intraveineuse, la voie intramusculaire, la voie sous cutanée, les voies intra-rachidienne et épидurale.

Les avantages de cette voie sont :

- L'effet rapide, surtout après administration intraveineuse,

-
- Le passage immédiat dans l'organisme,
 - L'absence de destruction par les enzymes du tube digestif,
 - L'injection au lieu désiré.

Les inconvénients de cette voie sont :

- L'injection est parfois douloureuse et peut entraîner un risque d'infection,
- Les difficultés en cas d'injection répétée, car le nombre de points d'injection est limité,
- Seuls les médicaments liquides peuvent être injectés,
- La durée d'action médicamenteuse est généralement courte, surtout après administration intraveineuse.

I.5.3 La voie transmuqueuse

On distingue deux modes d'administration :

- La voie perlinguale : c'est une voie d'administration très rapide où les médicaments (petits comprimés, solutions aqueuses ou alcooliques, granulés) sont placés sous la langue. Elle permet une pénétration rapide du médicament dans la circulation générale sans passer par le foie
- *La voie rectale* : par cette voie les médicaments ne subissent pas l'action des enzymes digestives et de l'acidité gastrique. Elle est couramment utilisée chez l'enfant. Toutefois, elle ne permet pas l'administration de produits irritants pouvant ulcérer les muqueuses rectales. Elle ne permet pas également d'éviter la barrière hépatique
- La voie vaginale : elle permet une action locale des médicaments. Les formes utilisées sont les ovules, les comprimés vaginaux (ovules secs) et les mousses gynécologiques.
- La voie nasale : on l'utilise pour traiter localement les affections de la sphère nasale. Les formes pharmaceutiques utilisées sont les poudres, les pommades, les solutions.

-
- La voie oculaire : la fragilité et la sensibilité de la muqueuse oculaire exigent l'utilisation de médicaments parfaitement contrôlés et stériles (collyres, pommades ophtalmiques, inserts ophtalmiques).

I.5.4 La voie pulmonaire

Avec une surface de 100 m^2 chez l'homme adulte et grâce à sa vascularisation importante, l'arbre pulmonaire permet une absorption rapide du médicament. Cette voie est utilisée pour administrer les médicaments sous forme d'aérosols.

I.5.5 La voie percutanée ou transdermique

La pénétration percutanée d'un médicament se fait au niveau de l'appareil pilo-sébacé et dépend de plusieurs facteurs. Elle est favorisée par les massages et les frictions. Ce mode d'administration présente l'avantage d'avoir une absence du premier passage hépatique, une libération lente et contrôlée du médicament. Une limite à ce traitement est liée à la nature physico-chimique de la peau qui constitue une barrière très efficace. Pour comprendre le principe d'administration des médicaments par voie transdermique, quelques rappels de physiologie sont nécessaires :

➤ *Structure de la peau [4]*

La peau est une barrière de protection mécanique, physique et biologique vis-à-vis des agressions extérieures. Toutefois, elle peut être considérée comme un organe récepteur, source de diverses réactions de métabolisation. D'une superficie totale d'environ 2 m^2 chez l'adulte, elle est composée de trois compartiments principaux du plus superficiel au plus profond : l'épiderme, le derme, l'hypoderme (figure 1).

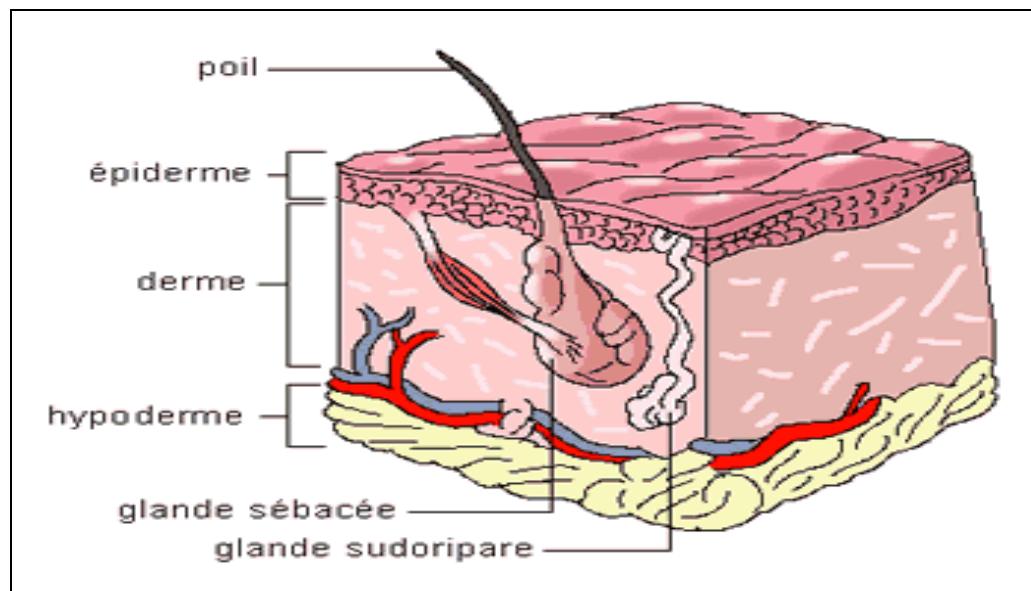


Figure 1 : structure de la peau

- **L'épiderme :** Il est constitué de la couche cornée ou stratum corneum qui se compose principalement de kératinocytes en renouvellement constant. Sa composition lipidique et son organisation cellulaire lui permet de jouer un rôle majeur dans la fonction barrière de la peau. Les cellules de langerans sont responsables de son immunité cellulaire, les mélanocytes, de sa pigmentation et de sa protection contre les rayons ultraviolets du soleil [5].
- **Le derme :** Ce tissu conjonctif constitue l'élément de soutien et de nutrition de l'épiderme. Il est surtout composé de collagène, de glycosaminoglycans et de différentes glycoprotéines. Il renferme les glandes sudoripares et les follicules pileux. Le derme est particulièrement innervé et vascularisé. Il contient de 20 à 40% de l'eau totale du corps, grâce aux propriétés hydrophiles des protéoglycans. Son épaisseur augmente jusqu'à l'âge adulte et diminue après 50 ans.
- **L'hypoderme :** Cette couche, la plus profonde de la peau, est constituée d'adipocytes et est reliée au derme par des fibres de collagène et d'élastine, formant un tissu conjonctif sous-cutané. L'hypoderme a un

rôle de réservoir énergétique, de protection mécanique et de régulation thermique.

La peau évite la perte d'eau, d'électrolytes et d'autres constituants du corps humain et empêche, autant qu'il peut la pénétration de molécules de l'environnement. Cette fonction barrière n'est cependant pas infaillible et c'est cette perméabilité relative qui est mise à profit pour le passage des médicaments à travers la peau. L'absorption percutanée correspond à un transfert d'une substance xénobiotique à travers la peau du milieu extérieur jusqu'au sang. Elle se fait en trois étapes successives :

- Pénétration de la substance dans les différentes couches de la peau :

L'étape de pénétration est une diffusion passive de la substance qui peut emprunter deux voies. La première est dite voie transdermique, dans ce cas, les molécules appliquées passent à travers les espaces intercellulaires ou à travers les cellules du stratum corneum. En dehors de cette voie préférentielle, une certaine quantité de substance peut pénétrer par les orifices sudoripares et par la voie pilo-sébacée. Après la phase de contact entre la molécule et la surface de la peau, la substance active quitte son véhicule pour pénétrer au sein de la couche cornée, avec plus ou moins de facilité, ce qui est caractérisé par le coefficient de partage (K_m) [6]. La phase qui suit consiste en une diffusion à travers le stratum corneum, selon un gradient de concentration, les quantités au sein du stratum corneum dépendent de l'affinité de la molécule pour cette structure.

- Perméation :

Après cette étape de diffusion suit la phase de perméation, lors de laquelle le principe actif migre d'une couche à l'autre de la peau pour gagner le derme superficiel.

- Résorption par la circulation sanguine ou lymphatique.

Enfin, le principe actif atteint le réseau vasculaire avant de subir un métabolisme local ou de diffuser plus largement.

➤ *Les préparations pour application transdermique*

On distingue deux types de préparations galéniques permettant une administration des principes actifs par voie transdermique :

- *Les Patches* :

Ce sont des systèmes transdermiques qui vont régulièrement libérer un principe actif destiné à la voie systémique dans le domaine du médicament. Le mode d'administration du principe actif peut être de nature passive ou active.

- Dispositifs passifs : la mise en contact du patch contenant le principe actif sur la peau conduit à sa résorption sanguine pour une action systémique
- Dispositifs actifs : permettent le passage forcé des principes actifs à travers la peau.

- *Les gels* : [7]

Un gel est un système colloïdal semi-solide, non cristallin et non vitreux dans lequel une phase liquide est immobilisée dans un réseau tridimensionnel composé de fibres gélifiantes entrelacées [8]. La construction de cet ensemble est fondée sur l'auto assemblage supramoléculaire des gélateurs en des structures généralement fibrillaires. En fonction de la nature liquide qui les constitue, les gels peuvent être classés en deux familles : les organogels et les hydrogels.

➤ *Les hydrogels*

Les hydrogels sont constitués de polymères hydrophiles capables de constituer un gel avec un pouvoir élevé. En effet, ils peuvent contenir jusqu'à 99% d'eau dans leur forme finale.

Les hydrogels se forment *in situ* dans des conditions bien particulières : sous radiation lumineuse, par chauffage, par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique ou en présence de sels covalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}).

Ils sont principalement utilisés pour des applications oculaires et peuvent ainsi permettre une libération prolongée du principe actif. Il y'a de nombreux autres application sur le marché particulièrement pour des brûlures et des plaies légères. La grande capacité de rétention en eau des hydrogels permet alors une hydratation permanente, facilitant la cicatrisation [7].

➤ *Les organogels*

Les organogels sont composés d'un agent tensio-actif, d'un solvant organique non polaire et d'un agent polaire présent à faible teneur. Les organogels possèdent des propriétés physiques bien particulières : ils sont thermoréversibles et leur viscosité est supérieure à celle du solvant seul [9]. Les organogels à base de tension actifs naturels : sont à bases de lécithine d'origine naturelle, d'isopropyl palmitate et d'eau possèdent des propriétés intéressantes pour des applications médicinales. Le caractère amphiphile permet au gel d'interagir avec les lipides de la peau favorisant ainsi le passage transcutané de nombreux principes actifs. De plus, la lécithine est un tensio-actif biocompatible puisqu'elle est naturellement présente dans l'organisme au niveau des membranes cellulaires. L'isopropyl palmitate, utilisé comme solvant organique, possède des bonnes caractéristiques de pénétration à travers la peau. Enfin, l'eau est utilisée comme agent structurant et stabilisant du gel formé. Ces gels, un peu sensibles à l'humidité et aux risques de contamination microbienne, constituent une forme galénique alternative aux patchs [7].

- Organogel à bases de tensio-actifs synthétique : l'adjonction d'un tensio-actif synthétique (pluronic F127 : copolymère d'éthylène oxyde et de propylène oxyde) qui agit comme co-surfactant et stabilisant permet de

réaliser des organogels avec de la lécithine synthétique. Ces gels, communément appelés pluronic lecithin organogel (PLO) sont constitués d'une phase huileuse lipophile (lécithine dissoute ou non dans l'isopropyl palmitate) et d'une phase aqueuse hydrophile (pluronic F127 et de l'eau). Ainsi quelle que soit la polarité du principe actif, ils sont susceptibles d'être solubiliser dans ce gel [7].

II. Généralités sur les nausées et vomissements

II.1 Les nausées

La nausée peut être considérée comme une sensation subjective, désagréable et non douloureuse provenant de la partie haute du tractus digestif, associée au besoin de vomir ou la sensation que les vomissements sont imminents.

Cet état de malaise est l'expression d'une stimulation du système nerveux autonome. Les nausées sont considérées comme sévères si elles s'accompagnent de signes d'activation du système nerveux sympathique : tachycardie, sueurs froides, vasoconstrictions cutanées (pâleur), mydriase. On observe également, lors des nausées, une modification de l'activité du système parasympathique : sialorrhée, diminution du tonus gastrique et augmentation du tonus duodénal avec péristaltisme rétrograde.

Au niveau physiologique, il existe une corrélation entre les nausées induites par la chimiothérapie anticancéreuse et les perturbations hormonales observées chez les patients. On note, par exemple, une modification des taux de vasopressine, de cortisol, d'adrénaline, d'hormone de croissance, de prolactine. On observe également une fréquence anormale de l'activité myéloélectrique de l'estomac lors de nausées liées à la chimiothérapie ou à la grossesse.

La nausée est une expérience psychique, donc difficile à définir et à quantifier en raison du seuil variable de perception selon les patients. Elle n'est pas toujours suivie de vomissement; cependant si celui-ci a lieu, il peut procurer un soulagement et une disparition des nausées.

Les nausées et vomissements sont souvent associés, mais il n'est pas démontré que la physiopathologie de ces deux phénomènes soit semblable. Les fibres afférentes de la partie haute du tractus gastro-intestinal semblent jouer un rôle dans ces deux signes cliniques. On considère que les nausées sont dues à un stimulus de plus faible intensité par rapport à celui des vomissements. Le mécanisme nerveux des nausées est peu connu. De plus, il est difficile de trouver un modèle animal, en raison de la nature subjective du phénomène [10].

II.2 Les vomissements

Le caractère involontaire et brutal de l'expulsion du contenu gastro-intestinal par la bouche permet de définir le vomissement comme un réflexe de défense de l'organisme. Il se retrouve chez l'homme comme chez les animaux.

Le vomissement débute par un péristaltisme rétrograde vers l'anse gastrique. Puis, l'ouverture des deux sphincters (cardia et pylore) concomitante aux violentes contractions rythmiques de la musculature abdominale, du diaphragme et des muscles respiratoires, aboutit à une importante force d'éjection. Il en résulte l'expulsion du contenu gastro-intestinal. L'estomac joue un rôle passif dans le vomissement. L'augmentation de la pression dans le thorax et l'abdomen aboutit à une compression de celui-ci. Le réflexe émétique est accompagnée de symptômes spécifiques : sueurs, bradycardie, sialorrhée et plus rarement, de défécation ou de troubles du rythme cardiaque. Les vomissements résultent d'une stimulation suffisante des centres du vomissement pour que le processus soit enclenché [11].

III. Les étiologies des nausées et vomissements

Le vomissement, grâce aux vomitifs, a été utilisé comme outil thérapeutique dans le cadre de nombreuses civilisations anciennes. Actuellement, la finalité physiologique du vomissement est d'être un réflexe de défense vis-à-vis d'éventuels toxiques ingérés. Il peut être activé lors de dysfonctionnements organiques ou des troubles métaboliques : le vomissement est alors un symptôme pathologique. La prise en charge thérapeutique se base sur le diagnostic étiologique. On distingue les causes des nausées et vomissements aigus, des nausées et vomissements chroniques.

Différentes causes provoquent des vomissements aigus :

- Les causes digestives : gastroentérite aigue et intoxication alimentaire, hépatite virale aigue, zona infection à cytomégavirus, occlusion sténose pylorique et intestinale, péritonite, douleur biliaire, pancréatique aigue
- Les causes iatrogènes et toxiques : antibiotiques, anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), antimitotique, intoxication alcoolique
- Les causes neurologiques : maladie vestibulaire, migraine, syndrome vestibulaire-labyrinthique, méningite, hypertension intracrânienne, hémorragie méningée, traumatisme cérébral
- Les causes métaboliques et endocrinianes : grossesse, acidocétose diabétique, insuffisance rénale aigue, hyperkaliémie, insuffisance surrénale aigue, hyperthyroïdie, syndrome de Reye
- Les autres causes : post-opératoire, mal de transport, glaucome aigu, infarctus du myocarde, colique néphrétique, radiothérapie, vomissement psychogène.

Les nausées et vomissements chroniques sont évoqués lorsque la symptomatologie persiste. Ces derniers sont définis arbitrairement par une durée d'évolution supérieure à 7 jours. Il peut s'agir de vomissements

quotidiens et persistants ou de vomissements récidivants après une période asymptomatique.

Les étiologies évoquées sont les suivantes :

- Les troubles au niveau du tractus digestif supérieur :
 - Obstruction mécanique à l'évacuation gastrique : ulcère gastrique, pylorique ou duodénal, cancer ou lymphome gastrique, cancer duodénal, maladie pancréatique, maladie de Cohn
 - Obstruction fonctionnelle : gastroparesie, médicament, virus
- Les troubles au niveau de l'intestin et du colon :
 - Obstruction mécanique tumorale : adénocarcinome, carcinoïde, tumeur péritonéale
 - Obstruction mécanique non tumorale : maladie de crohn, post-radiothérapie, AINS, ischémie, parasitose
 - Obstruction fonctionnelle : pseudo-obstruction intestinale chronique, sclérodermie diabète
- Les causes psychiatriques et psychogènes : boulimie, anorexie mentale
- Les causes neurologiques : hypertension intracrânienne tumorale ou non épilepsie
- Les causes iatrogènes et toxiques : antibiotique, anti-inflammatoire non stéroïdien, antimitotiques, intoxication alcoolique
- La grossesse : premier trimestre de grossesse
- Les causes métaboliques et endocrinianes : hyperthyroïdie, maladie d'Addison, hyperparathyroïdie, syndrome de Zollinger-Ellison
- Les autres causes : vomissement cyclique idiopathique

En raison des nombreuses causes de vomissement, le diagnostic étiologique peut être complexe. Il nécessite toujours un examen clinique complet accompagné d'un interrogatoire précis. Les vomissements aigus et les

vomissements chroniques peuvent avoir des étiologies communes. La chimiothérapie anticancéreuse, par exemple, selon son potentiel émétisant, provoque différents types de vomissements [11].

IV. Les nausées et vomissements chimio-induits (NVCI)

Les nausées et vomissements chimio-induits demeurent des effets indésirables parmi les plus redoutés des patients.

Le risque émétique dépend de plusieurs facteurs [11, 12]:

- Les facteurs de risques liés aux drogues administrées :
 - ❖ Potentiel émétisant propre à chaque molécule,
 - ❖ Mono ou poly-chimiothérapie,
 - ❖ Posologie et modalités d'administration.
- Les facteurs de risques liés au patient :
 - ❖ Mauvaise tolérance de précédentes chimiothérapies,
 - ❖ Sexe : les femmes sont plus touchées que les hommes,
 - ❖ Age : les jeunes sujets sont plus touchés par rapport à leurs ainés,
 - ❖ Nausées préexistantes,
 - ❖ Mauvais état général,
 - ❖ Consommation d'alcool (l'éthylose chronique diminue le risque d'apparition des nausées et vomissements),
 - ❖ Anxiété (responsable de l'apparition de vomissements anticipés), les antécédents de vomissements : les personnes ayant eu des vomissements pendant la grossesse ou en postopératoire, des vomissements liés au mal des transports, ou lors de chimiothérapie anticancéreuse antérieure, sont davantage prédisposées aux vomissements chimio-induits,
 - ❖ Co morbidités associées : hépatite, métastases cérébrales, pancréatite....

Les NVCI sont de trois types : aigus, anticipés et retardés.

IV.1 Les nausées et vomissements aigus

Les nausées et vomissements aigus surviennent durant les 24 heures suivant le début du traitement anticancéreux. Ils sont importants de la 2^{ème} à la 12^{ème} heure après l'administration du cisplatine et s'atténuent ensuite [13]. Un second pic peut être observé 18 heures après la cure de chimiothérapie. L'effet émétisant de la chimiothérapie passe en majorité par un mécanisme périphérique, dont la transmission se fait par voie nerveuse.

IV.2 Les nausées et vomissements anticipés

L'incidence des nausées et vomissements anticipés varie entre 20 et 60 %. Ils surviennent suite à l'évocation du traitement cytotoxique, avant l'administration des produits. Ce type d'emesis obéit au réflexe de Pavlov. Il résulte de l'activation du système supérieur cortico-limbique, chargé de la mémoire. Ce réflexe conditionné de type Pavlovien se met en place si le patient a connu, précédemment, un épisode émétique suite à une cure de chimiothérapie. Le patient associe alors, inconsciemment, aux nausées et vomissements (réponse inconditionnée) liés à la chimiothérapie (stimulus inconditionné), un environnement visuel, sonore, olfactif et/ou gustatif. Ces informations mémorisées sur l'environnement clinique deviennent le stimulus conditionné du réflexe. Ce stimulus conditionné, sans la chimiothérapie, suffit pour déclencher les nausées et vomissements anticipés (réponse conditionnée) [13].

Les vomissements répétés peuvent induire des effets indésirables sévères et interférer avec le bon déroulement du traitement : ulcération et ou hémorragie digestive, troubles métaboliques avec déshydratation, dénutrition.

Il est donc essentiel de prévenir et de traiter le plus efficacement et le plus rapidement possibles ces troubles.

IV.3 Les nausées et vomissements retardés

L'incidence et la cinétique d'apparition des vomissements retardés varient en fonction du type de chimiothérapie anticancéreuse. Les vomissements retardés surviennent à partir de la 24ème heure et jusqu'à 5 jours après le début de la chimiothérapie. La démarcation « à partir de 24 heures » est arbitraire, mais reflète bien les deux phases de vomissements observées après l'injection du cisplatine. Les nausées et vomissements reprennent, le plus souvent, de la 48ème à la 72ème heure après la chimiothérapie, pour ensuite diminuer continuellement pendant les deux jours suivants [13].

V. Les agents antiémétiques

V.1 Les antagonistes des récepteurs à la dopamine de type 2

Les antagonistes des récepteurs D₂ (benzamides, phénothiazines et butyrophénones) ont été les premiers antiémétiques utilisés pour traiter les NVCI. Les effets thérapeutiques recherchés découlent principalement de l'action centrale de ces composés. Ils franchissent tous la barrière hémato-encéphalique, à l'exception de la dompéridone.

Les récepteurs D₂ centraux sont localisés au niveau de différentes voies cérébrales : nigro-strié, mésolimbique, mésocorticale, tubéro-infundibulaire, periventriculaire-thalamique et zone chémoréceptrice. L'action antiémétique est liée majoritairement aux récepteurs présents dans cette dernière zone. Les antagonistes D₂ peuvent agir sur d'autres récepteurs. A fortes concentrations, ils inhibent les récepteurs muscariniques, α-adrénergiques (antagoniste des récepteurs α1), histaminergiques (antagonistes des récepteurs H1) et surtout sérotoninergiques (antagonistes des récepteurs 5-HT3) [14,15].

Toutefois, ces agents présentent de nombreux effets indésirables. Leur action α-adrénergique provoque une somnolence diurne, des vertiges et de l'asthénie. Les

effets indésirables de ces médicaments sont aussi liés à leur activité sur les récepteurs muscariniques ou anticholinergiques: sécheresse buccale, constipation, rétention urinaire et trouble de l'accommodation. Les prises, à doses élevées, de certains de ces agents engendrent des effets extrapyramidaux. Ces symptômes se répartissent en quatre groupes : dyskinésie précoce, akathisie, syndrome extrapyramidal ou (pseudo) parkinsonien et dyskinésie tardive [16].

En raison des nombreux effets secondaires associés aux antagonistes des récepteurs D₂, leur usage est donc restreint à la prophylaxie antiémétique, pour les chimiothérapies faiblement émétisantes ou lors de contre-indication aux corticoïdes. Ils peuvent être utilisés, en traitement de secours, si des nausées et des vomissements surviennent, malgré une thérapie optimale.

En cas d'apparition de ces symptômes extrapyramidaux, il convient d'arrêter le neuroleptique antiémétique. Le syndrome extrapyramidal précoce est, en général, réversible après l'arrêt du traitement. Dans certains cas, un traitement symptomatique est nécessaire, tel que des benzodiazépines ou des antiparkinsoniens anticholinergiques. Exceptionnellement, un syndrome malin des neuroleptiques peut survenir [16].

V.1.1 Les phénothiazines

La chlorpromazine, la prométhazine et la métopimazine (Figure 2) sont les trois structures chimiques les plus caractéristiques de la famille des phénothiazines.

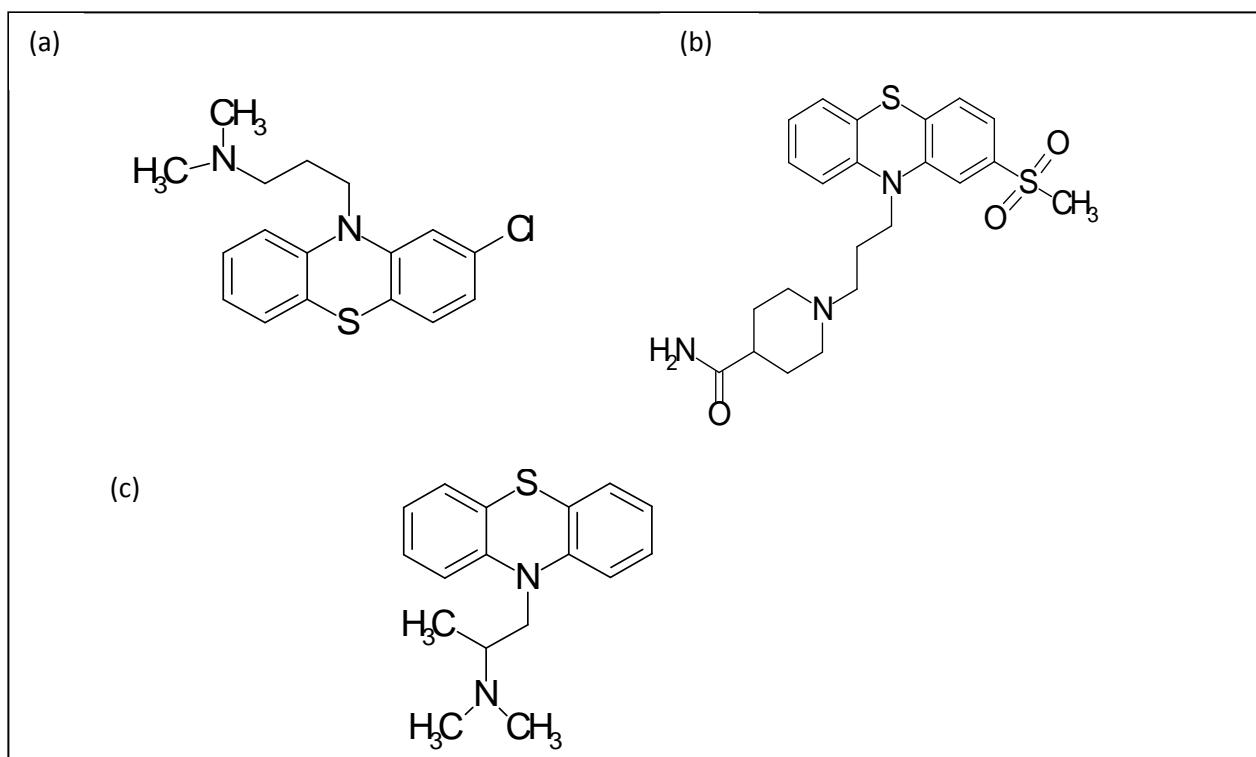


Figure 2 : Structures chimiques de la chlorpromazine (a), de la métopimazine (b) et de la prométhazine.

V.1.2 Les benzamides

Les benzamides sont représentés par la domperidone, le métoclopramide et l'alizapride (Figure 3)

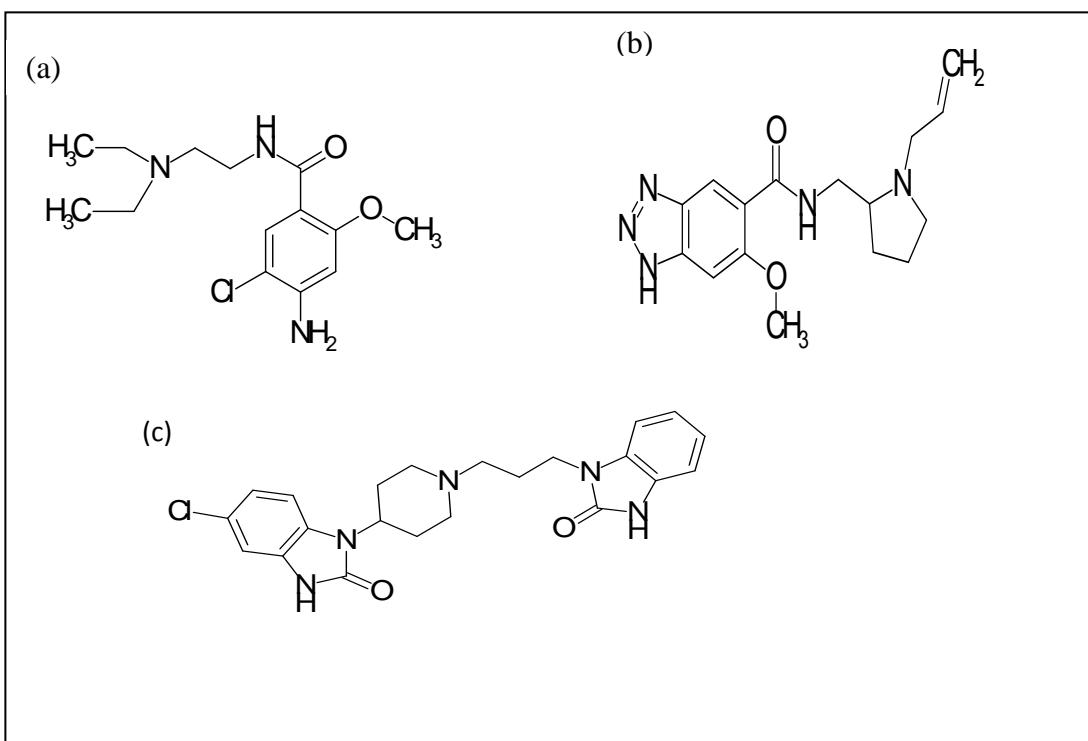


Figure 3 : Structures chimiques du métoclopramide(a), de l'alizapride (b) et de la dompéridone (c).

V.1.3 Les butyrophénones

La famille des butyrophénones est principalement représentée par l'halopéridol dont la structure chimique est présentée sur la Figure 4.

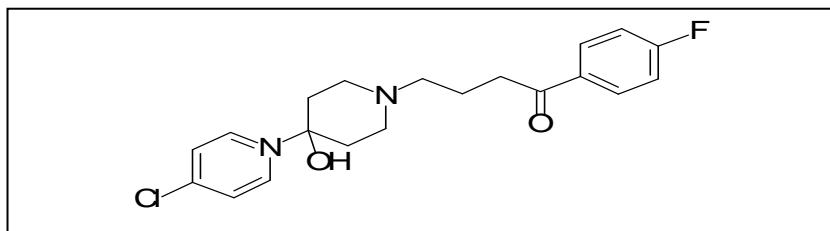


Figure 4 : Structure chimique de l'halopéridol

V.2 Les corticostéroïdes

Non reconnu comme une classe d'antiémétiques, certains corticoïdes comme la dexaméthasone et la méthylprednisolone (Figure 5) ont pourtant un index thérapeutique élevé.

Ainsi, la dexaméthasone est le corticoïde le plus prescrit dans le cadre des NVCI, bien que son mécanisme d'action ne soit pas clairement élucidé. Toutefois, certaines hypothèses suggèrent que la diminution des nausées et vomissements serait due aux interférences avec la synthèse des prostaglandines liées à l'administration de la dexaméthasone. Une autre action possible des corticoïdes serait d'activer le tryptophane pyrrolase hépatique, détournant le tryptophane de la voie de synthèse de la sérotonine. Le stock de sérotonine nécessaire pour la neurotransmission du stimulus émétisant serait alors diminué [16]. Enfin, il est possible que la dexaméthasone réduise la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, diminuant ainsi la pénétration des agents émétisants tels que les anticancéreux.

Les corticoïdes sont efficaces en monothérapie antiémétique, chez des patients recevant une chimiothérapie à faible pouvoir émétisant. Associés à d'autres agents antiémétiques reconnus, ils potentialisent leur effet antiémétique en élevant le seuil émétogène. La dexaméthasone augmente ainsi l'effet antiémétique des antagonistes des récepteurs 5-HT3, chez des patients traités par une chimiothérapie modérément émétisante. L'association sétron/corticoïde assure un contrôle des nausées chez des patients recevant des chimiothérapies hautement émétisantes [15].

Cette classe thérapeutique est reconnue pour son efficacité et sa bonne tolérance en tant qu'antiémétique. Toutefois, certains effets indésirables (hyperglycémie, rétention urinaire, insomnie, effet immunosuppresseur) peuvent survenir dans le cas de traitement de longue durée [16].

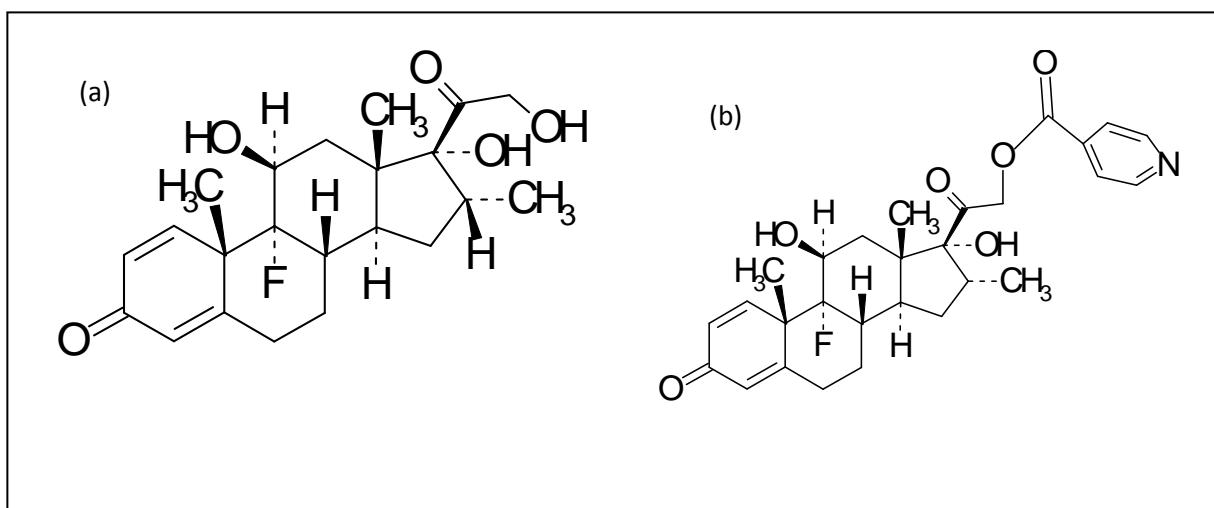


Figure 5 : Structures chimiques de la dexaméthasone (a) et de la méthylprednisolone (b).

V.3 Les antagonistes des récepteurs aux Cannabinoïdes CB1

Cannabis sativa et *Cannabis indica*, les deux variétés de chanvre, comportent le Δ-9-tetrahydrocannabinol (Figure 6). Celui-ci mime l'action des endocannabinoïdes en se liant sur les récepteurs aux Cannabinoïdes CB1 et CB2. Les récepteurs CB1, les plus répandus au niveau cérébral semblent être localisés dans le complexe vagal dorsal du tronc cérébral.

L'effet antiémétique a été démontré dans les chimiothérapies faiblement à modérément émétisantes. Ce sont des médicaments à index thérapeutique faible. L'utilisation des Cannabinoïdes de synthèse est très restreinte en raison du faible nombre d'essais cliniques les comparant aux protocoles antiémétiques standard actuels [17]. De plus, ils induisent de nombreux effets indésirables délétères : hypotension orthostatique, dysphorie ; vertiges, hallucinations, dépression [16]. Toutefois, certains effets indésirables peuvent être bénéfiques comme l'euphorie, la sédation qui inhibent de manière subjective les NVCI.

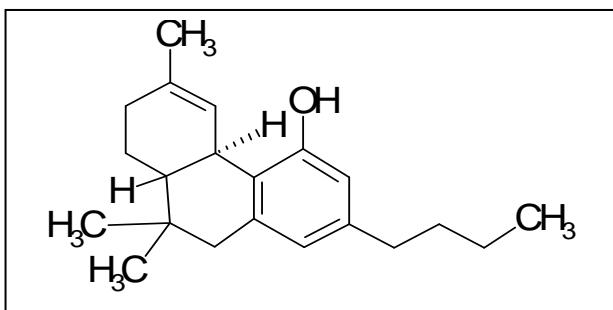


Figure 6 : Structure chimique du Δ-9-tétrahydrocannabinoïde.

V.4 Les antihistaminiques

Les études réalisées avec la dimenhydrinate (Figure 7) n'ont montré aucune efficacité dans la prévention des NVCI. Les antihistaminiques sont toutefois administrés lors des chimiothérapies pour prévenir des réactions extrapyramidales (dystonies aigues et tardives) induites par les antagonistes dopaminergiques. Leur action est reconnue dans le cadre du traitement du mal des transports.

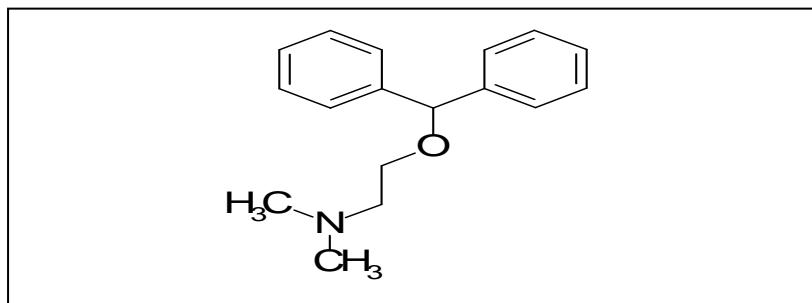


Figure 7 : Structure chimique de la dimenhydrinate.

V.5 Les antagonistes sérotoninergiques

Dans les années 1990, l'introduction des antagonistes des récepteurs 5-HT₃ a révolutionné la prise en charge des NVCI. Quatre antagonistes sérotoninergiques sont actuellement disponibles : l'ondansétron, le granisétron, le tropisétron et le

palonosétron. Les sétrons sont la pierre d'angle pour les chimiothérapies modérément et hautement émétisantes. En raison de leurs structures très proches, ils possèdent des index thérapeutiques élevés, une efficacité similaire et des effets indésirables comparables [17]. Cependant, chaque molécule se distingue dans leurs indications. On constate que l'activité des sétrons par voie orale est équivalente, à dose adaptée, à leur activité par voie intraveineuse. Ils agissent principalement par antagoniste des récepteurs 5HT3. L'administration d'une dose quotidienne est équivalente, au niveau de l'efficacité, à l'administration de doses multiples. Cette prise unique est partiellement liée à la saturation des récepteurs sérotoninergiques au-dessus d'un certain seuil [11].

V.5.1 Les propriétés communes

Les sétrons agissent au niveau périphérique, plus particulièrement au niveau des terminaisons vagales afférentes de la muqueuse gastrique. Ils bloquent les récepteurs 5-HT3, par liaison compétitive avec la sérotonine. La genèse et la transmission de l'influx nerveux, responsables du réflexe émétique, sont ainsi inhibées. Seuls certains antagonistes sérotoninergiques, comme le granisétron et le tropisétron, se fixeraient sur les autorécepteurs des cellules antérochromaffines. Ces autorécepteurs induisent respectivement une augmentation puis une diminution de la libération de sérotonine par les cellules [11]. Les antagonistes des récepteurs 5-HT3 s'opposent donc aux vomissements provoqués par les chimiothérapies anticancéreuses.

Néanmoins, cette classe thérapeutique est responsable de la survenue d'effets indésirables aux doses usuelles. Les plus courants sont des céphalées légères, de la constipation, une élévation transitoire des taux d'alino-transférases hépatiques. Des cas de réactions allergiques immédiates, quelquefois sévères, ont été signalés, mais restent peu fréquents.

Les sétrons semblent être plus efficaces sur les vomissements que sur les nausées et inactifs sur les vomissements anticipés. Leur efficacité est importante dans les 12 premières heures suivant l'administration du cisplatine ; elle chute dans les heures qui suivent [11]. Les structures chimiques de l'ondansétron et granisétron sont présentées sur la Figure 8.

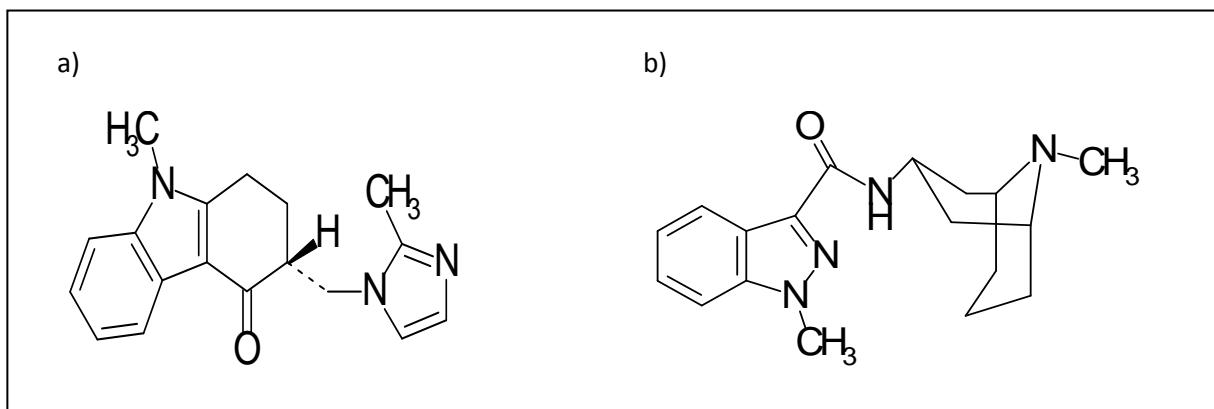


Figure 8 : Structures chimiques de l'ondansétron (a) et du granisétron (b).

V.5.2 Les particularités

Les propriétés pharmacocinétiques chaque sétron sont toutefois bien particulières. Le palonosétron se différencie par une demi-vie prolongée (environ 40 heures) et une affinité supérieure pour les récepteurs 5-HT₃ que l'ondansétron. La palonosétron donne des meilleurs résultats antiémétiques que l'ondansétron avec une demi-vie de 4 à 6 heures tandis que le dolasétron et le tropisétron ont une demi-vie de 7 heures environ [11].

V.6 Les antagonistes des récepteurs aux neurokinines de type 1

Ils constituent la dernière classe d'antiémétiques la plus récemment commercialisée pour le traitement des NVCI. L'aprépitant (Figure 9) est le premier médicament de cette classe d'antiémétiques. A la différence des antagonistes sérotoninergiques, l'aprépitant doit passer la barrière hémato-

encéphalique pour cibler les récepteurs centraux aux neurokinines de type 1 et exercer son action centrale antiémétique [11, 18].

L’aprépitant est administré dans le cadre d’un schéma thérapeutique comportant un corticostéroïde et un antagoniste 5-HT3. Il améliore le contrôle global des NVCI. Il est également utilisé dans la prévention des nausées et vomissements aigus et retardés associés à une chimiothérapie anticancéreuse moyennement et hautement émétisante chez l’adulte.

Son action bénéfique se maintient pendant plusieurs cycles de traitement, dans les chimiothérapies moyennement et hautement émétisantes et pour les deux phases de vomissements. Ils ne sont pas recommandés chez les enfants de moins de 18 ans car les données concernant leur sécurité d’emploi et leur efficacité sont insuffisantes.

Il est, en général, bien toléré mais induit quelques effets secondaires tels que l’asthénie, le hoquet, l’élévation des ALAT, la constipation, les céphalées et l’anorexie [16]. Désormais, une forme injectable contenant sa prodrogue (fosaprépitant) est disponible (Figure 9).

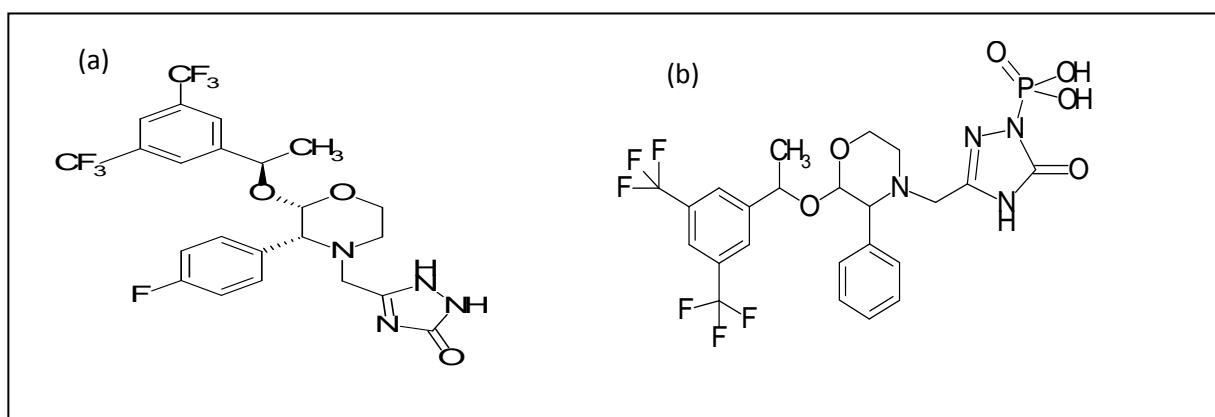


Figure 9 : Structures chimiques de l’aprépitant (a) et du fosaprépitant (b).

VI. Généralités sur l'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique d'analyse qui s'est développée grâce aux acquis de la chromatographie liquide haute performance et de l'électrophorèse sur gel [19]. Elle est couramment utilisée pour séparer des molécules aux structures chimiques très variables : anions et cations inorganiques, acides aminés, catécholamines, principes actifs pharmaceutiques, vitamines, sucres, peptides, protéines, acides nucléiques, nucléotides, polynucléotides et de nombreuses autres espèces [20].

VI.1 Principe

Cette technique de séparation est basée sur la migration des espèces de l'échantillon en solution, porteuses ou non d'une charge électrique globale, sous l'effet d'un champ électrique intense et dans un capillaire de faible diamètre (Figure 10).

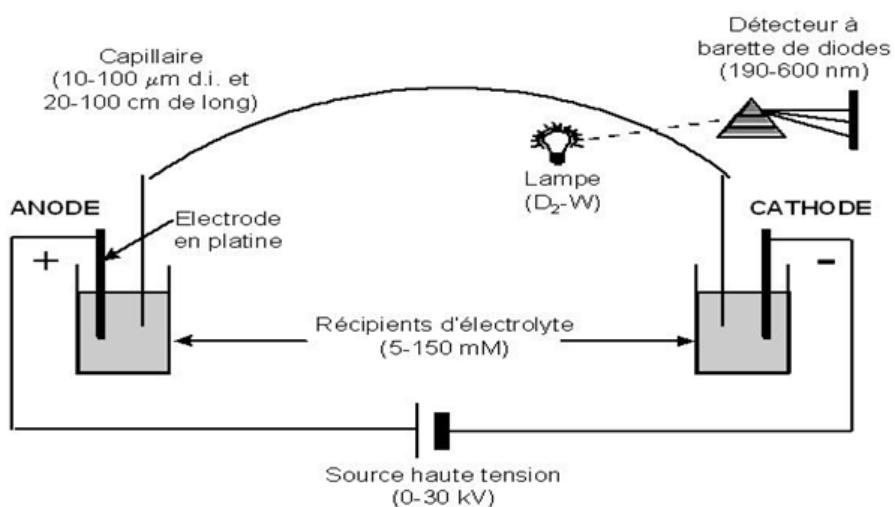


Figure 10 : Schéma d'un appareil d'électrophorèse capillaire.

L'appareillage, nécessaire pour réaliser des analyses électrophorétiques, est relativement simple. Les principaux composants du système sont un générateur

de tension capable de délivrer une différence de potentiel comprise en 10 et 30 kV, un capillaire (50 ou 75 µm de diamètre interne) dans lequel aura lieu la séparation, un détecteur (généralement UV).

La procédure générale d'une analyse se décompose de la manière suivante :

- Le capillaire est conditionné par de la soude 0,1 M, de l'eau et enfin la solution électrolytique,
- L'échantillon est injecté : dans le cas d'une détection à la cathode (pôle négatif), l'échantillon est injecté à l'anode soit en mode hydrodynamique (application d'une surpression à la surface de l'échantillon) soit en mode electrocinétique (application d'une différence de potentiel),
- La séparation des analytes a lieu dans le capillaire lors de l'application d'une différence de potentiel ; les deux extrémités du capillaire ainsi que les électrodes plongent dans la solution électrolytique.

VI.1.1 La migration électrophorétique

La migration électrophorétique correspond au déplacement d'un analyte porteur d'une charge sous l'influence d'un champ électrique. La vitesse de migration électrophorétique V_{ep} ($m.s^{-1}$) s'exprime en fonction de la charge de l'ion q (C), de son rayon hydrodynamique R_h (m), du champ électrique appliqué E ($V.m^{-1}$) et de la viscosité du milieu η ($Pa.s^{-1}$).

$$V_{ep} = qE / 6\pi\eta R_h = \mu_{ep}E \quad (\mu_{ep} : \text{mobilité électrophorétique en } m^2.s^{-1}.V^{-1})$$

Ainsi, la vitesse de migration électrophorétique est directement proportionnelle au rapport charge/rayon hydrodynamique de l'ion. Les ions chargés positivement sont attirés vers la cathode et les ions chargés négativement sont attirés vers l'anode.

La mobilité électrophorétique d'un composé dépend de plusieurs paramètres : le pH, la force ionique de l'électrolyte et des interactions éventuelles de l'analyte avec les espèces présentes dans l'électrolyte (tension actif) [21].

VI.1.2 L'écoulement electroosmotique

Le second facteur qui contrôle la migration des solutés est l'écoulement de l'électrolyte. La vitesse de l'écoulement electroosmotique V_{feo} (m.s^{-1}) est reliée à la densité de charge portée par le capillaire ξ ($\text{m}^3 \cdot \text{Kg}^2 \cdot \text{C}^{-3} \cdot \text{s}^{-4}$), au champ électrique appliqué E (V.m^{-1}), à la viscosité de la solution η (Pa.s^{-1}) et à la constante diélectrique du tampon ϵ ($\text{C}^2 \cdot \text{N}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) [22, 23].

$$V_{feo} = \epsilon \xi E / 4 \pi \quad \eta = \mu_{feo} E \quad (\mu_{feo} : \text{mobilité electroosmotique en } \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-1})$$

L'application d'une tension à travers un capillaire rempli d'électrolyte cause un flux de solution s'écoulant dans le capillaire de l'anode vers la cathode. Il est dû à l'ionisation des groupements silanols à caractère acide de la paroi interne du capillaire en contact avec la solution. A pH supérieur à 3, les groupements silanols (Si-OH) du capillaire sont ionisés en silanoates (Si-O⁻). Pour maintenir l'électroneutralité, ces sites anioniques attirent les cations présents dans la solution afin de former une couche cationique mobile. Entre ces deux couches naît une différence de potentiel (le potentiel zéta), dont la valeur dépend de la concentration de l'électrolyte et du pH. Lorsque la tension est appliquée, les cations migrent vers la cathode. Les molécules d'eau solvatant les cations se déplacent aussi, provoquant un écoulement global de la solution. Au cœur de la solution, le champ électrique entraîne la migration des cations vers la cathode. Les anions sont également entraînés et progressent de façon contre-electroosmotique [19].

L'écoulement electroosmotique dépend fortement de la force ionique et du pH de l'électrolyte; ce dernier conditionne le degré d'ionisation des groupements silanols et la densité de la double couche. L'ajout de certains surfactants dans

l'électrolyte peut inverser la polarité de la paroi interne du capillaire de silice vierge provoquant l'inversion du flux électroosmotique.

VI.1.3 La mobilité apparente

Chaque ion a une mobilité apparente (μ_{app}) qui est la somme algébrique de la mobilité électrophorétique et de la mobilité électroosmotique :

$$\mu_{app} = \mu_{ep} + \mu_{feo} = L l / t V$$

L : longueur totale du capillaire (cm)

l : longueur du capillaire jusqu'au détecteur (cm)

t : temps de migration (min)

V : tension appliquée (V)

Ainsi, l'injection anodique d'un mélange constitué d'éléments cationiques, anioniques et neutres, conduit à la migration successive des composés chargés positivement, des éléments neutres et enfin des anions (Figure 11).

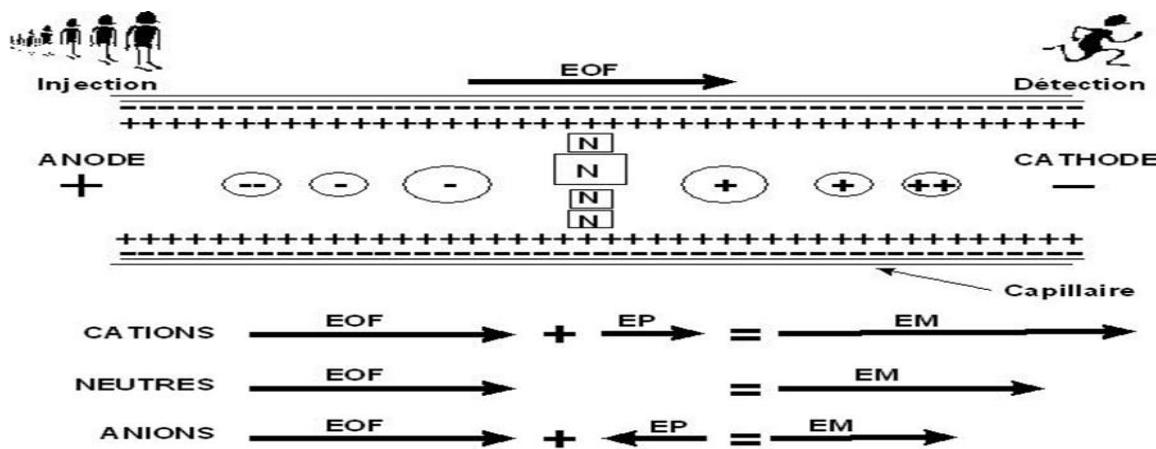


Figure 11 : Ordre de migration des anions, cations et molécules neutres lors d'une analyse en électrophorèse capillaire.

EOF : flux électroosmotique ; EP : migration électrophorétique ; N : composé neutre ; EM : mobilité apparente

VI.2 Les différents modes d'analyse en électrophorèse capillaire et leurs applications

L'électrophorèse capillaire s'est développée depuis une trentaine d'années et a connu de nombreuses évolutions concernant les modes de séparation. L'électrophorèse capillaire de zone (ECZ) est la méthode la plus simple et couramment utilisée pour séparer des molécules chargées. L'électrophorèse capillaire en gel (ECG) permet la séparation de macromolécules selon leur masse moléculaire. La chromatographie électrocinétique micellaire capillaire (CEMC) permet la séparation de molécules neutres par interaction avec des tensioactifs qui, sous forme de micelles, permettent le déplacement de l'analyte vers le système de détection. Avec la multitude des modes d'analyse, les applications en électrophorèse capillaire sont nombreuses : polluants, produits pharmaceutiques, métaux, composés biologiques (peptides, protéines, ADN...) [24].

VI.3 Les avantages et inconvénients de l'électrophorèse capillaire

Les principaux avantages de l'EC sont une grande efficacité des pics, un développement de méthode rapide, un coût d'analyse raisonnable et une grande versatilité de séparation, permettant d'analyser une grande variété de composés (allant des petits ions inorganiques aux protéines). De plus, les faibles volumes d'échantillon injectés rendent cette technique compatible à l'analyse de fluides biologiques. Par ailleurs, l'EC est attractive pour des raisons écologiques puisque la plupart des séparations ont lieu en milieu aqueux. En outre, en raison d'un principe de séparation qui lui est propre, l'EC est une technique de séparation orthogonale et complémentaire aux techniques chromatographiques.

Toutefois, les faibles volumes d'échantillon injectés associés à un faible trajet optique, dans le cas de la détection UV, engendrent des problèmes de sensibilité,

constituant un frein pour l'analyse d'éléments présents à l'état de traces dans des fluides biologiques, par exemple.

VI.4 Les techniques de concentration

Pour palier aux problèmes de sensibilité associés à l'EC, plusieurs stratégies sont envisageables. Des détecteurs plus sensibles tels que la spectrométrie de masse (SM) ou la fluorescence induite par laser (LIF) peuvent être utilisées accédant à des seuils de détection très faibles. Toutefois, l'utilisation de tels détecteurs s'avère plus onéreuse et plus fastidieuse de mise en œuvre. Ainsi, des stratégies de pré-concentration de l'échantillon en ligne peuvent être envisagées.

VI.4.1 Rappel sur les différents modes d'injection

➤ *Injection hydrodynamique*

C'est l'injection la plus classique utilisée en électrophorèse capillaire. Elle consiste à injecter l'échantillon en appliquant une pression (Figure 12) à sa surface ou de créer une surpression à la surface de l'échantillon.



Figure 12 : Principe de l'injection hydrodynamique

Lors d'une injection hydrodynamique, un vial contenant l'échantillon est positionné à l'entrée du capillaire et un autre en sortie.

➤ *Injection electrocinétique*

L'injection électrocinétique consiste à injecter l'échantillon en appliquant une tension (Figure 13). Pour ce faire, un vial contenant l'électrolyte (BGE) est positionné à la sortie du capillaire. La quantité d'analyte injectée est proportionnelle à la section du capillaire, à la durée d'injection et à la tension appliquée. Elle dépend également de la vitesse du flux électroosmotique (FEO) : ainsi des composés neutres qui ne possèdent pas de mobilité électrophorétique peuvent être injectés en choisissant judicieusement le pH du solvant de solubilisation de l'échantillon et celui de l'électrolyte.



Figure 13 : Principe de l'injection électrocinétique

Toutefois, ce mode d'injection est discriminant notamment lors de l'injection d'un mélange constitué de composés anioniques, cationiques et neutres [25]. A temps d'injection identique, l'injection électrocinétique permet d'obtenir un gain en sensibilité d'un facteur de 2 à 10 par rapport à l'injection hydrodynamique qui restent insuffisant pour l'analyse d'éléments présents à l'état de traces.

VI.4.2 Les méthodes de préconcentration appliquées aux molécules ionisables

➤ ***Préconcentration par amplification du champ électrique avec injection hydrodynamique (FASS)***

Le principe de la méthode FASS (« *Field Amplified Sample Stacking*»), qui ne s’applique qu’aux composés chargés, a été décrit pour la première fois par Mikkers [26]. Le capillaire est tout d’abord conditionné par l’électrolyte de séparation (a), puis un grand volume d’échantillon (10 à 20% du volume du capillaire) (b), de conductivité plus faible que l’électrolyte, est injecté de manière hydrodynamique. Lors de l’application de la tension d’analyse, les analytes migrent vers la cathode puis leur vitesse chute brutalement quand ils entrent dans l’électrolyte où règne un champ électrique plus faible (c). Les cations sont ainsi accumulés à la frontière des zones échantillon/électrolyte (d) (Figure 14).

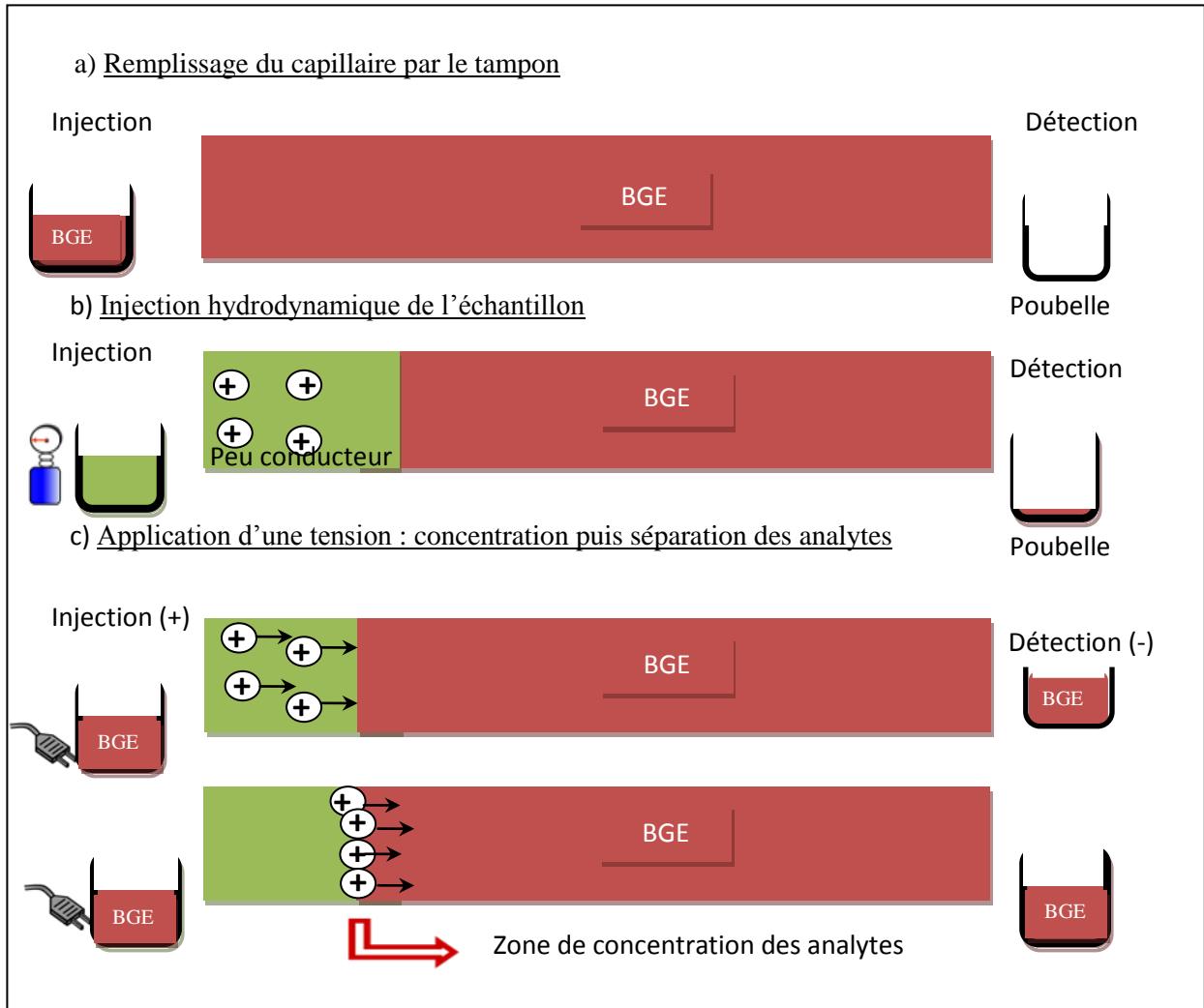


Figure 14 : schéma du principe préconcentration par amplification du champ électrique avec injection hydrodynamique (FASS).

Ensuite, la séparation se poursuit de manière classique c'est-à-dire en électrophorèse de zone.

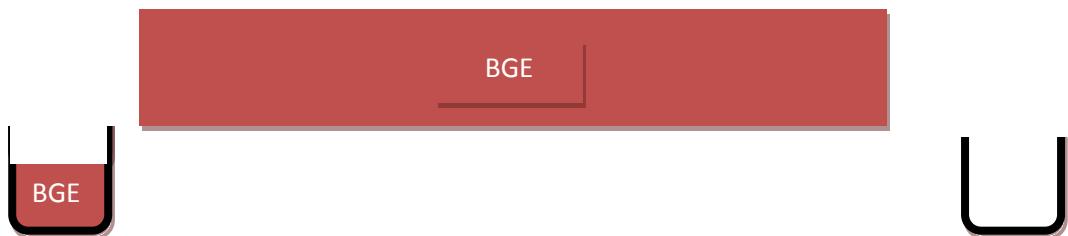
L'utilisation de ce principe de préconcentration avant la séparation permet d'injecter des volumes d'échantillon plus élevés que lors d'une injection classique, du fait de la concentration des analytes dans une bande plus fine. Toutefois, en présence d'un FEO, il a été montré que les différences entre les mobilités électroosmotiques locales, régnant dans la zone échantillon et dans l'électrolyte, entraîne des volumes maximaux d'échantillon compris 5 et 10 % (cela dépend des mobilités électrophorétiques des analytes). Ceci est lié à la

différence du champ électrique entre les deux zones et donc à la différence de conductivité, mais aussi à l'ampleur de l'FEO dans le capillaire (pH, viscosité, force ionique) [25, 26].

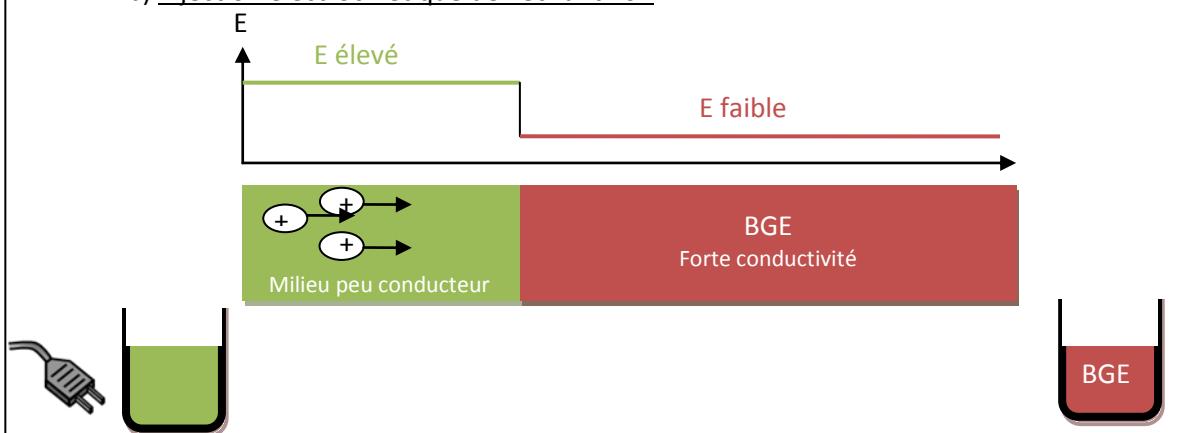
➤ ***Préconcentration par amplification du champ électrique et injection électrocinétique(FASI)***

Cette méthode est communément nommée « *Field Enhanced Sample Injection* » (FESI), ou « *Field Amplified Sample Injection* » (FASI), a été décrit pour la première fois par Chien et Burgi. Son principe est présenté sur la Figure 15. Le capillaire est tout d'abord conditionné par l'électrolyte de séparation (a), puis les analytes solubilisés dans un milieu peu conducteur sont injectés en appliquant une tension (b). En raison de la différence de conductivité entre l'électrolyte de séparation (BGE) et le milieu d'injection, un champ électrique (E) élevé règne dans le réservoir échantillon, en tête de capillaire, tandis qu'il existe un champ électrique faible dans l'électrolyte. Les analytes sont donc ralentis à leur entrée dans l'électrolyte et s'accumulent en tête de capillaire (c). Comme le phénomène de concentration s'effectue en tête de capillaire, le rapport des conductivités entre l'électrolyte et l'échantillon n'est plus limité à 10. Toutefois, il a été montré qu'avec de trop grandes différences de conductivité, des élévations de température jusqu'à 100 °C peuvent être atteintes [26, 27].

a) Remplissage du capillaire par le tampon (BGE)



b) injection électrocinétique de l'échantillon



c) concentration des analytes

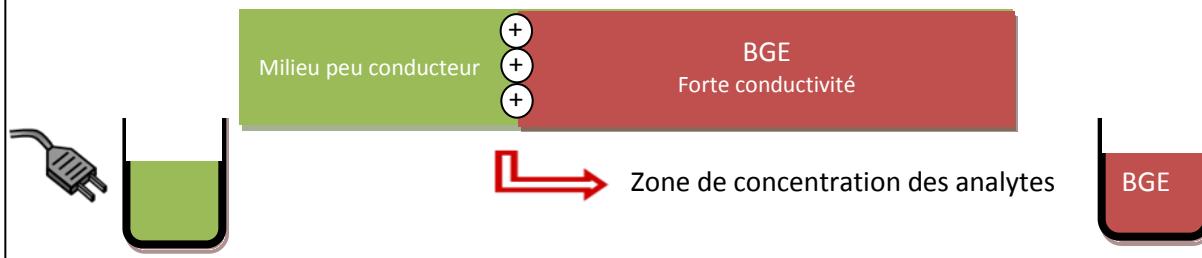


Figure 15 : Schéma du principe de l'injection électrocinétique par amplification du champ électrique en tête de capillaire (FASI).

La répétabilité des surfaces des pics peut être améliorée en injectant un crâneau d'eau avant l'injection électrocinétique des analytes (Figure 16). A ce jour, il y'a toujours controversé quant à l'amélioration de la sensibilité apportée par cette procédure.

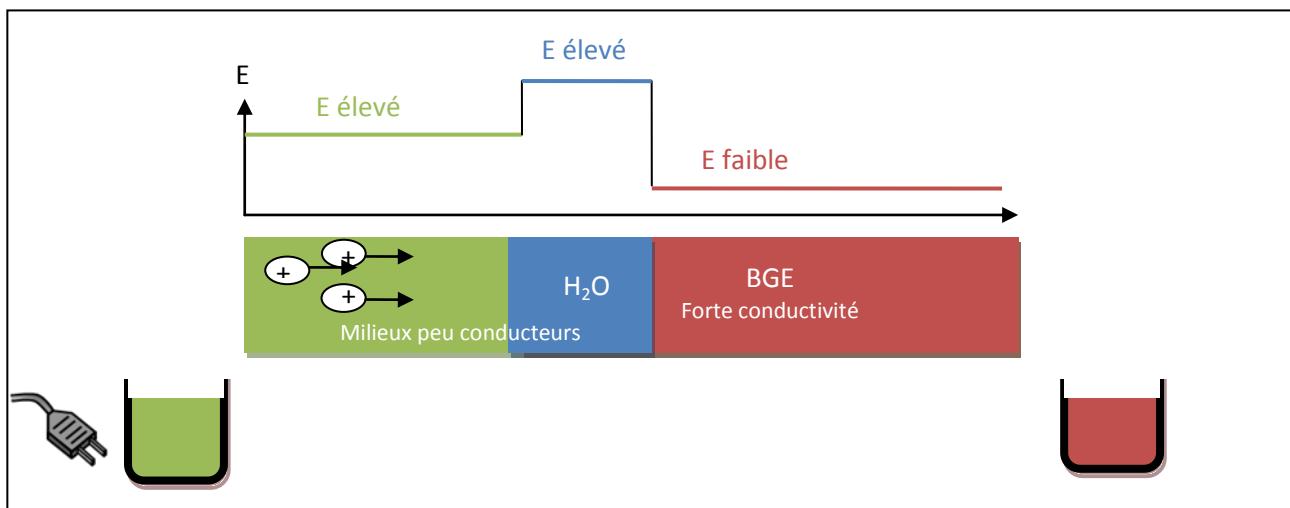


Figure 16 : Schéma de principe du FASI avec un plug d'eau

Comme la méthode FASI repose sur l'amplification du champ électrique, la maîtrise de la conductivité de l'échantillon est très importante pour que les résultats soient répétables. De plus, pour exploiter au mieux le pouvoir du FASI, il est nécessaire que les échantillons soient de faible conductivité ; en effet, du fait du mode d'injection, lorsque des espèces mobiles comme les ions sodium, potassium ou chlorure sont présents, ceux-ci sont injectés en plus grande proportion par rapport aux analytes d'intérêt. Dès lors, pour les échantillons de conductivité élevée un dessalement est nécessaire [28].

L'amplification du champ électrique peut être améliorée en ajoutant des solvants organiques dans la zone échantillon tel que du méthanol, de l'acétone ou de l'acétonitrile [29]. En effet, l'ajout de tels solvants dans l'échantillon y abaisse la conductivité de manière drastique, ce qui a pour conséquence d'y augmenter fortement le champ électrique.

Toutefois, lorsque de trop grands pourcentages de solvant sont utilisés, des ruptures de courant résultant de la création de micro-bulles apparaissent très souvent [30]. Les gains en sensibilité dépendent de l'amplification du champ, mais aussi de la durée de l'injection. Tout comme pour la FASS, les durées d'injection sont limitées en FASI, car le volume final que peuvent occuper les

analytes injectés est limité par les performances de séparation (sélectivité et résolution) [31].

Quand de longues injections électrocinétiques sont utilisées, les gains en sensibilité ne sont plus proportionnels aux durées d'injection. Ce comportement peut-être dû, entre autres, à la déplétion. En effet, au fur et à mesure de l'injection, il y a un appauvrissement des analytes autour de l'électrode ce qui entraîne une plus faible quantité d'analyte injectée par unité de temps [32].

VII. Les caractéristiques de validation d'une méthode analytiques [7]

La validation d'une méthode est la procédure par laquelle on démontre que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. Elle est fondée sur l'analyse statistique d'un certain nombre de critères permettant de conclure quant à l'exactitude des résultats fournis.

La liste et définition des caractéristiques qui peuvent être spécifiées pour une méthode analytique et données par ICH (International Conference on Harmonisation), sont :

- **L'exactitude** : l'exactitude exprime l'etroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence
- **La spécificité** : la spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à établir l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants. Une procédure d'analyse est spécifique lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser ou qu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physicochimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substances dans l'échantillon

-
- **La fonction de réponse** : la fonction de réponse correspond à la courbe d'étalonnage, cela traduit la relation entre la réponse correspondant au signal et la concentration en substance
 - **La sensibilité** : la sensibilité d'une procédure d'analyse peut être définie comme étant le rapport de la variation de la réponse mesurée à la variation de concentration d'analyte. Une procédure est dite sensible si une faible variation de la concentration ou de la quantité d'analyte entraîne une variation significative de la réponse
 - **La linéarité** : la linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à obtenir des résultats proportionnels à la quantité en analyse dans l'échantillon
 - **La justesse** : la justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats et une valeur qui est acceptée comme « référence ». La justesse permet d'évaluer l'erreur systématique associée à la méthode
 - **La fidélité** : la fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de plusieurs prises d'un même échantillon homogène dans des conditions définies. Elle est évaluée à trois niveaux :
 - **Répétabilité** : conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des échantillons identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps (essais réalisés la même journée).
 - **Fidélité intermédiaire** : conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné (plusieurs jours)

- **Reproductibilité :** conditions ou les résultats sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents
- **Limite de détection (LOD) :** c'est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales de la procédure
- **Limite de quantification(LOQ) :** c'est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée, dans les conditions expérimentales de la procédure

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL

I. Rappel des Objectifs de l'étude

I.1 objectif général de l'étude

L'objectif de cette étude est de développer une méthode d'analyse par électrophorèse suffisamment sensible pour évaluer le passage transdermique de nouvelles formes galéniques contenant des antiémétiques.

I.2 l'objectif spécifiques

Notre travail consistera d'une part à la mise au point d'une méthode électrophorétique générique pour l'analyse de sept antiémétiques, potentiellement ionisables, entrant dans la composition de nouvelles formes galéniques d'antiémétiques et d'autre part d'optimiser les paramètres conditionnant les performances du FASI à l'aide d'un plan d'expériences.

I.2 Cadre de l'étude

Ce travail a été effectué au laboratoire de Chimie Analytique de l'Université de Lille 2 dans le cadre de développement d'une méthode d'analyse par électrophorèse capillaire pour l'analyse de nouvelles formes galéniques d'antiémétiques.

II. Matériels, Réactifs et Substances de Références

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un appareil d'électrophorèse capillaire P/ACE MDQ (Beckman Coulter, Villepinte, France), équipé d'un détecteur à barrette de diodes. La détection a été réalisée à la longueur d'onde de 214nm. Le choix de cette longueur d'onde de mesure a été faite à partir de l'enregistrement des spectres UV de chacune des molécules. Ces résultats sont présentés en

Annexe 1. Les données sont collectées et analysées par le logiciel 32 karat (version 8.0).

II.1 Petit matériel et verrerie

- ✓ Crayon
- ✓ Règle
- ✓ Stylos feutre
- ✓ Lampe UV
- ✓ filtre
- ✓ Bain ultrason
- ✓ Agitateur
- ✓ pH mètre
- ✓ réfrigérateur
- ✓ papier film
- ✓ balance
- ✓ bandes adhésives
- ✓ Fioles de 10, 20, 25, 50, 100 et 200 ml
- ✓ Eprouvette graduée
- ✓ Seringue
- ✓ Micropipette
- ✓ Entonnoir

II.2 REACTIFS ET SUBSTANCES DE REFERENCE

II.2.1 Réactifs

Tous les réactifs utilisés sont de qualité pour analyse et sont regroupés dans le Tableau I suivant avec leur laboratoire d'origine et leur numéro de lot :

Tableau I: liste des réactifs utilisés

Réactifs	Fournisseurs	Numéro de lot
Acétonitrile	Merck	I606429140
Acide acétique	J.T Baker	0908204020
Acide formique	Prolabo	212GC
Acide ortho phosphorique	Merck	K27477273006
Acide trifluoro acétique	J.T Baker	9304
Ethanol	Merck	K41593527 043
Hydroxyde de sodium	VWR Prolabo BDH	11F280517
Méthanol	J.T Baker	0434240002

II.2.2 substances de référence

Les antiémétiques de référence utilisés pour la préparation des solutions standards de travail sont présentés dans le Tableau II ci-après:

Tableau II : liste des substances de référence et médicaments

Produit	Laboratoire	Numéro de lot
Alizapride (plitican®)	Sanofis Aventis France	1y013
Dimenhydrinate	chencruz	G0912
Dompéridone	Santa Cruz biotechnology	#H0211
Halopéridol	sigma	120M1333V
Metoclopramide hydrochloride	Santa Cruz biotechnology	#L0911
Métopimazine (vogaléne®)	Cephalon France	H0010
Prométhazine	sigma	#G0912
Ticlopidine (EI)	Sigma Abrich	#BCBC8918V

III. Mise au point de la séparation

L'échantillon est constitué de sept antiémétiques la dompéridone (Dom), l'halopéridol (Hal), le métoclopramide (Meto), l'alizapride (Ali), le diménhydrinate (Dim), la métopimazine (Metop), et la prométhazine (Pro), chacun à la concentration de 50 ppm. Un étalon interne (EI), la ticlopidine (50 ppm) a été ajouté aux analytes d'intérêt. Les structures et les valeurs de pKa des analytes sont répertoriées en Annexe 2.

Les composés ont été séparés dans un capillaire de silice vierge (longueur totale (L) : 50 cm ; longueur effective (l) : 40 cm ; diamètre intérieur (d.i) : 50µm). La tension (U) appliquée a été fixée à 30 kV et la température (T) a été

maintenue à 25°C. Lors de l'optimisation de la séparation, les injections ont été effectuées à l'anode en utilisant le mode hydrodynamique (0,5 psi, 7 sec).

Tout capillaire neuf est conditionné successivement par de la soude 1M (25psi, 10 min), de la soude 0,1M (25psi, 10 min) et de l'eau (25psi, 10 min). Entre chaque analyse, le capillaire est rincé par de la soude 0,1M (20psi, 2 min), de l'eau (20 psi, 2 min) et le tampon d'analyse (20 psi, 5 min).

Dans les conditions optimisées, l'électrolyte de séparation est constitué d'acide phosphorique et de la soude (force ionique (FI) = 60 mM, pH 2,5) auquel est ajouté 5% d'EtOH. Différents paramètres électrophorétiques tels que l'efficacité des pics (N), la résolution (Rs) et le rapport signal-sur-bruit (S/N) ont été calculés afin d'évaluer la performance de la méthode développée. Les formules de calcul sont présentées en Annexe 3.

III.1 Choix du pH de l'électrolyte

Le choix du pH de l'électrolyte est essentiel lors du développement d'une méthode en EC puisqu'il conditionne, d'une part, le taux d'ionisation des analytes, et d'autre part, l'ionisation des groupements silanols de la paroi interne du capillaire. Les antiémétiques choisis pour cette étude possèdent des amines primaires, secondaires ou tertiaires, de pKa compris entre 7,4 et 16,4 (Annexe 1). Ainsi, un tampon H₃PO₄ / NaOH (FI = 50 mM, pH 2,5) a été choisi. Dans ces conditions, les analytes sont chargés positivement et l'écoulement électroosmotique est nul.

III.2 Influence de la force ionique de l'électrolyte

L'influence de la force ionique sur la résolution des analytes a été évaluée. Différents tampons de force ionique comprise entre 40 et 80 mM ont été préparés. Les résultats sont représentés sur la Figure 17.

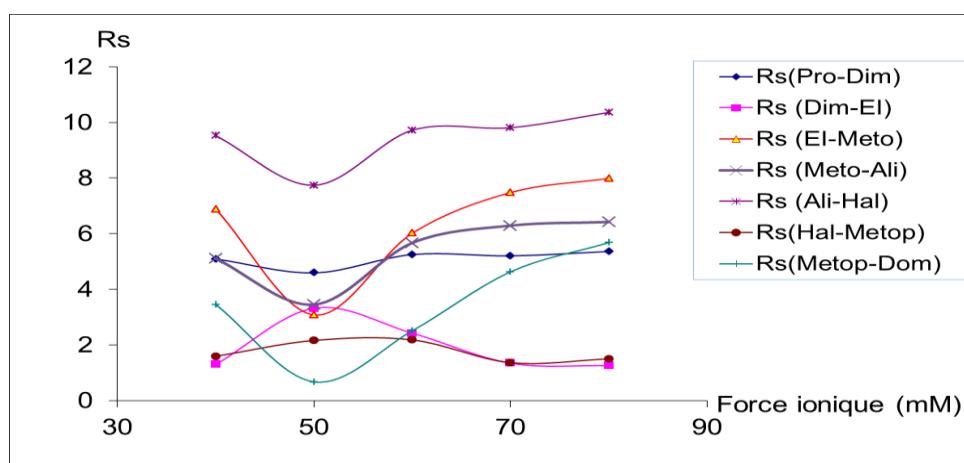


Figure 17 : Influence de la force ionique sur la résolution des analytes.

De façon générale, la résolution augmente avec la force ionique du tampon. Toutefois, elle décroît à partir de 60 mM pour les couples Dim-EI et Hal-Metop et atteint des valeurs inférieures au seuil critique de 1,5 lorsque la force ionique est fixée à 70 mM ($Rs_{Dim-EI} = 1,30$ et $Rs_{Hal-Metop} = 1,36$). Ainsi, une force ionique moyenne de 60 mM a été sélectionnée pour poursuivre cette étude puisque l'ensemble des analytes sont résolus.

Par ailleurs, des études [33] ont montré que le facteur de concentration obtenu après une injection FASI est d'autant plus élevé que la différence de conductivité entre l'échantillon et la solution électrolytique est grande.

Un tampon de force ionique égale à 60 mM semble donc favorable pour obtenir des facteurs de concentration élevés suite à une injection en mode FASI.

III.3 Ajout d'un modificateur organique dans le tampon

Dans les conditions sélectionnées précédemment (tampon H_3PO_4 / NaOH , $\text{FI} = 60 \text{ mM}$, $\text{pH } 2,5$), le couple Hal-Metop est séparé avec une faible réserve en résolution ($\text{Rs} = 1,8$ par rapport au seuil de 1,5) qui peut constituer un frein lors de l'analyse d'échantillons plus concentrés. Afin d'améliorer la qualité de la séparation, l'ajout d'un modificateur organique dans le tampon est possible. En modifiant la viscosité et de la conductivité du tampon, l'ajout d'une faible teneur en modificateur organique permet d'obtenir des gains en résolution [34]. Différents modificateurs organiques (acétonitrile, méthanol et éthanol) ont été ajoutés à une teneur de 5% dans le tampon de force ionique 60 mM. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'acétonitrile. Toutefois après une dizaine d'injections successive dans les mêmes conditions, l'acétonitrile dissout le polyimide du capillaire, rendant son utilisation impossible en routine. L'éthanol offre une bonne résolution et sa toxicité est moindre par rapport au méthanol. Ainsi 5% d'éthanol ont été ajoutés dans le tampon.

III.4 Performance de la méthode d'analyse

Après optimisation, les analytes sont totalement résolus en moins de 10 min (Figure 18) avec des efficacités de pics supérieurs à 150 000 pour la plupart des analytes. L'ensemble des paramètres de séparation sont résumés dans le Tableau III.

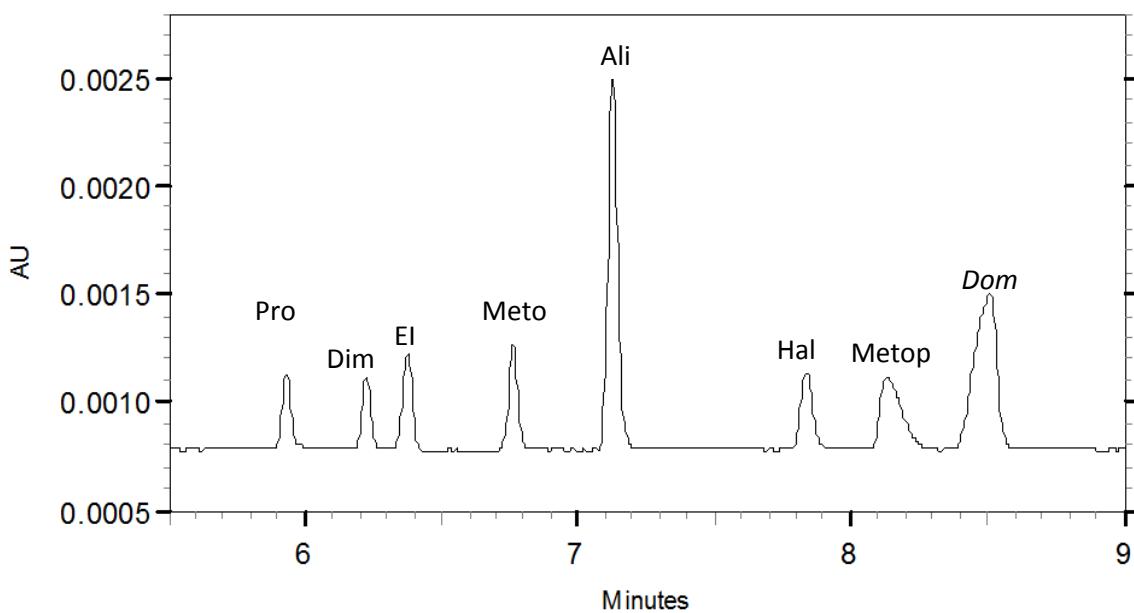


Figure 18 : Séparation électrophorétique du mélange d'antiémétiques dans les conditions optimisées

Capillaire de silice vierge, L=50 cm, l= 40 cm, diamètre intérieur = 50 μm ; électrolyte de séparation : tampon phosphate (pH= 2,5, FI= 60 Mm) + 5% EtOH ; T= 30 kV ; injection anodique hydrodynamique (0, 5 psi, 7s), température de la cassette 25°C.

Tableau III : Paramètres de performance (temps de migration : t_M , efficacité et la résolution de la méthode) de la méthode d’analyse.

Produit	t_M (min)	Efficacité	Résolution
Pro	5,93	180 500	-
Dim	6,22	187 700	5,22
EI	6,38	152 000	2,44
Meto	6,76	189 600	6,08
Ali	7,13	182 100	5,82
Hal	7,84	154 400	9,77
Metop	8,13	50 600	2,65
Dom	8,51	48 700	2,51

IV. Développement d'un protocole d'injection avec amplification de champ (FASI) à l'aide d'un plan d'expériences.

En électrophorèse capillaire, la détection UV des analytes s'effectue directement sur le capillaire après avoir brûlé une faible portion de polyimide le recouvrant. Le faible diamètre des capillaires (50 µm) engendre des problèmes de sensibilité car la réponse est directement proportionnelle au trajet optique. Par ailleurs, les faibles volumes injectés constituent un handicap supplémentaire. Pour la quantification d'analytes présents à faible concentration dans l'échantillon, des techniques de préconcentration de l'échantillon peuvent alors être envisagées. Parmi les techniques de préconcentration couramment utilisées, l'amplification de champ avec injection électrocinétique (FASI) est particulièrement bien adaptée pour améliorer les seuils de quantification de molécules ionisables. Toutefois, sa mise en œuvre peut être longue et fastidieuse en raison des

nombreux paramètres (nature du tampon de séparation, milieu de solubilisation de l'échantillon, durée et tension d'injection) qui influent sur le facteur de préconcentration. La première partie de cette étude va donc consister à identifier les paramètres impactant le plus le facteur de concentration. Ensuite, une optimisation de méthode multivariée a été utilisée afin de quantifier l'influence de chaque paramètre, sélectionné précédemment, d'identifier leurs interactions éventuelles puis de déterminer les conditions optimales.

IV.1 Essais préliminaires

IV.1.1 Influence de la nature et de la concentration de l'agent de protonation dans l'échantillon

En mode FASI, un large volume d'échantillon est injecté en mode électrocinétique. L'ajout d'un agent de protonation dans l'échantillon est nécessaire [33]. Quatre agents de protonation tels que l'acide trifluoroacétique (TFA), l'acide formique (HCOOH), l'acide acétique (CH_3COOH) et l'acide phosphorique (H_3PO_4) ont été ajoutés dans l'échantillon à différentes concentrations ($500\mu\text{M}$, $2000\mu\text{M}$). A titre d'exemple, la Figure 19 présente l'influence de la nature et de la concentration en agent de protonation sur le rapport signal-sur-bruit (a) et sur l'aire corrigée du pic (b) de la prométhazine en mode d'injection FASI.

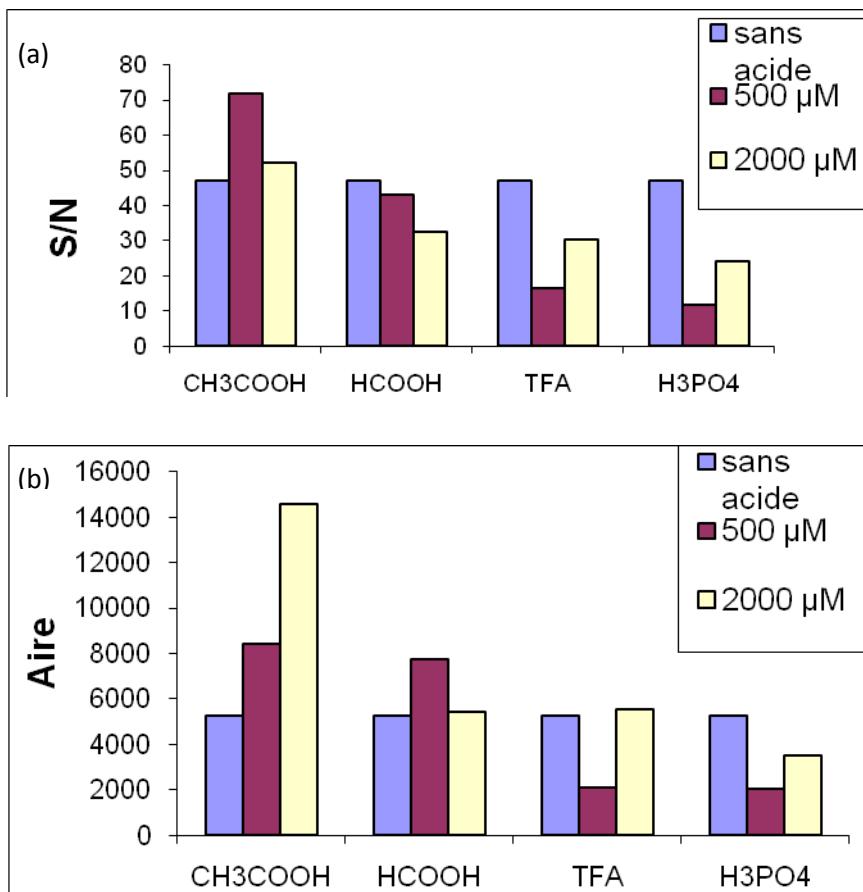


Figure 19 : Influence de la nature et de la concentrationen de l'agent de protonation sur le rapport signal-sur-bruit (S/N) (a) et sur l'aire corrigée (b) de la prométhazine.

L'ajout de acide trifluoroacétique (TFA) ou de l'acide orthophosphorique (H_3PO_4) dans l'échantillon diminuent simultanément l'aire et rapport S/N de la prométhazine tandis que l'acide acétique (CH_3COOH) ou l'acide formique (HCOOH) permet d'augmenter l'aire du pic. Il semblerait donc que les acides de force plus élevée ($\text{pK}_a = 2,13$ pour les couple $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ et $\text{pK}_a = 0,53$ pour $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CF}_3\text{COO}^-$) soient défavorables pour amplifier le signal en mode FASI. Ce resultat a été déjà observé par He [35] lors de l'analyse d'antibiotiques. La difference de comportement entre HCOOH et CH_3COOH s'explique par la différence de conductivité ionique des especes ionisées molaire ($4,09 \text{ mS.cm}^{-1}$ pour CH_3COO^- ; $5,46 \text{ mS.cm}^{-1}$ pour HCOO^-). En effet, le gain en sensibilité de l'injection FASI est d'autant plus important que la difference de conductivié entre la solution électrolytique et l'échantillon est grande. Ainsi,

l'acide acétique donne les meilleurs résultats et a été sélectionné comme agent de protonation dans la suite de notre étude.

IV.1.2 Influence de la longueur du créneau d'eau

Dans l'objectif d'améliorer les performances du FASI, un créneau d'eau est injecté précédemment à l'échantillon, de façon hydrodynamique (0,5 psi, 5 s). Après leur injection, les analytes vont venir se concentrer dans cette zone peu conductrice se situant à l'interface entre la solution électrolytique et l'échantillon. Par ailleurs, l'injection de ce créneau d'eau permet d'améliorer la répétabilité de la surface des pics [25]. Différents volumes de créneau d'eau (7,04 ; 28,18 et 56,36 nL) correspondant à des temps d'injection, respectifs, de 0 ; 5 ; 20 et 40 s à 0,5 psi ont été testés et leur influence sur l'aire corrigée et le rapport S/N des analytes est reportée sur la Figure 20.

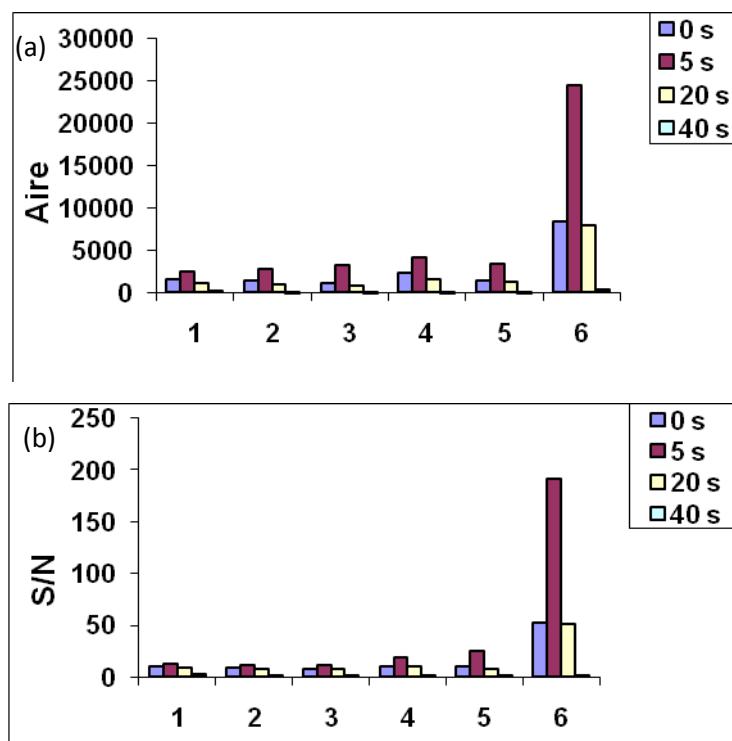


Figure 20 : Influence de la longueur du créneau d'eau sur l'aire corrigée (a) et sur le rapport signal-sur-bruit (b) de la prométhazine (1), le dimenhydrinate (2), l'étalon interne (3), le métoclopramide (4), l'halopéridol (5) et la dompéridone (6).

La longueur du créneau d'eau influence fortement les valeurs des aires corrigées et des rapports S/N des analytes. L'aire corrigée est doublée lorsqu'un créneau d'eau de 5 s est ajouté dans la procédure FASI par rapport à une procédure sans créneau d'eau. Cet effet est accentué pour la dompéridone avec un gain d'un facteur 4, tant sur l'aire corrigée que sur le rapport S/N. A partir de 20 s d'injection, l'intensité des signaux diminue probablement due à un effet de dilution des analytes dans l'eau. Ainsi, l'injection d'un créneau d'eau (5 s, 0,5 psi) est favorable pour concentrer les analytes et sera retenu dans la suite de l'optimisation de la méthode.

IV.1.3 Influence du pourcentage de méthanol dans l'échantillon

Pour exploiter au mieux le pouvoir du FASI, il est nécessaire que les analytes soient solubilisés dans un milieu de faible conductivité. L'ajout d'un solvant organique dans l'échantillon est souvent préconisé [29, 31] afin d'une part de diminuer la conductivité du milieu, ce qui a pour conséquence d'y augmenter fortement le champ électrique et, d'autre part de favoriser la solubilité des analytes. Des quantités croissantes en méthanol ont été ajoutées dans l'échantillon (10 ; 50 et 90%). Les résultats sont présentés sur la Figure 21.

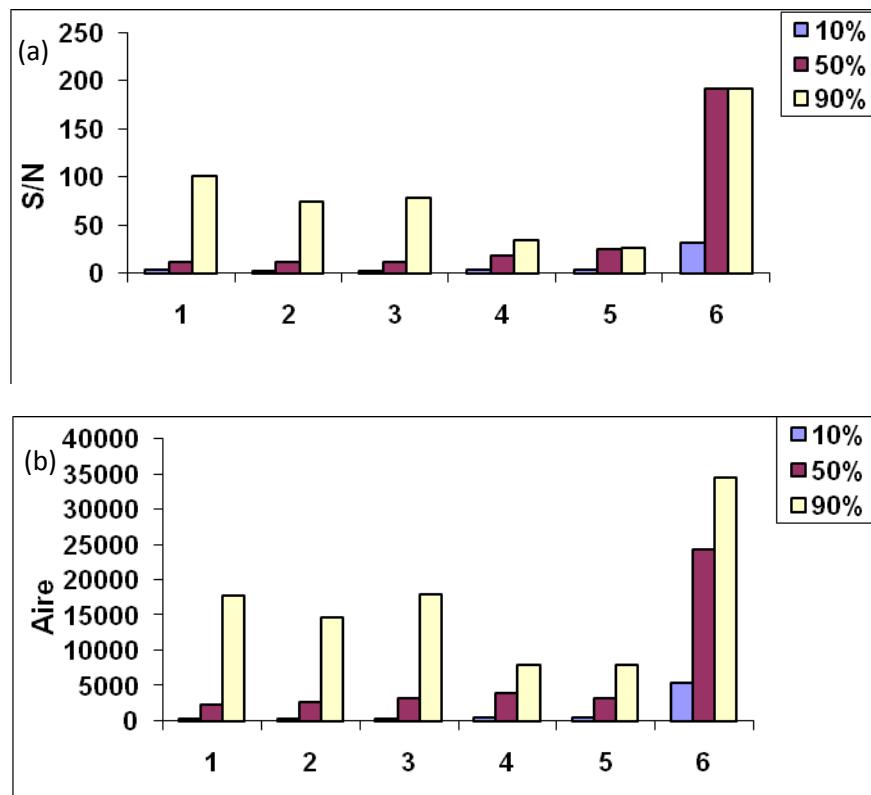


Figure 21 : Influence de la concentration de méthanol dans l'échantillon sur le rapport signal-sur-bruit (a) et sur l'aire des pics (b) pour les analytes : prométhazine (1), dimenhydrinate (2), l'étalon interne (3), métoclopramide (4), halopéridol (5) et dompéridone (6)

Quel que soit l'analyte, les rapports S/N et les aires corrigées des pics augmentent avec la quantité de méthanol ajoutée dans l'échantillon. De ce fait, le pourcentage de méthanol a été retenu comme facteur dans la mise en place du plan d'expériences pour optimiser le FASI.

IV.1.4 Influence du temps d'injection des analytes

Les gains en sensibilité dépendent de l'amplification du champ, mais aussi de la durée de l'injection [27, 28]. Les durées d'injection restent toutefois limitées en FASI, car le volume final que peuvent occuper les analytes injectés est limité par les performances de séparation (résolution, et efficacité de pic). Différents temps d'injection de l'échantillon (7 ; 15 ; 30 et 60 s) ont été testés. Les résultats sont présentés sur la Figure 22.

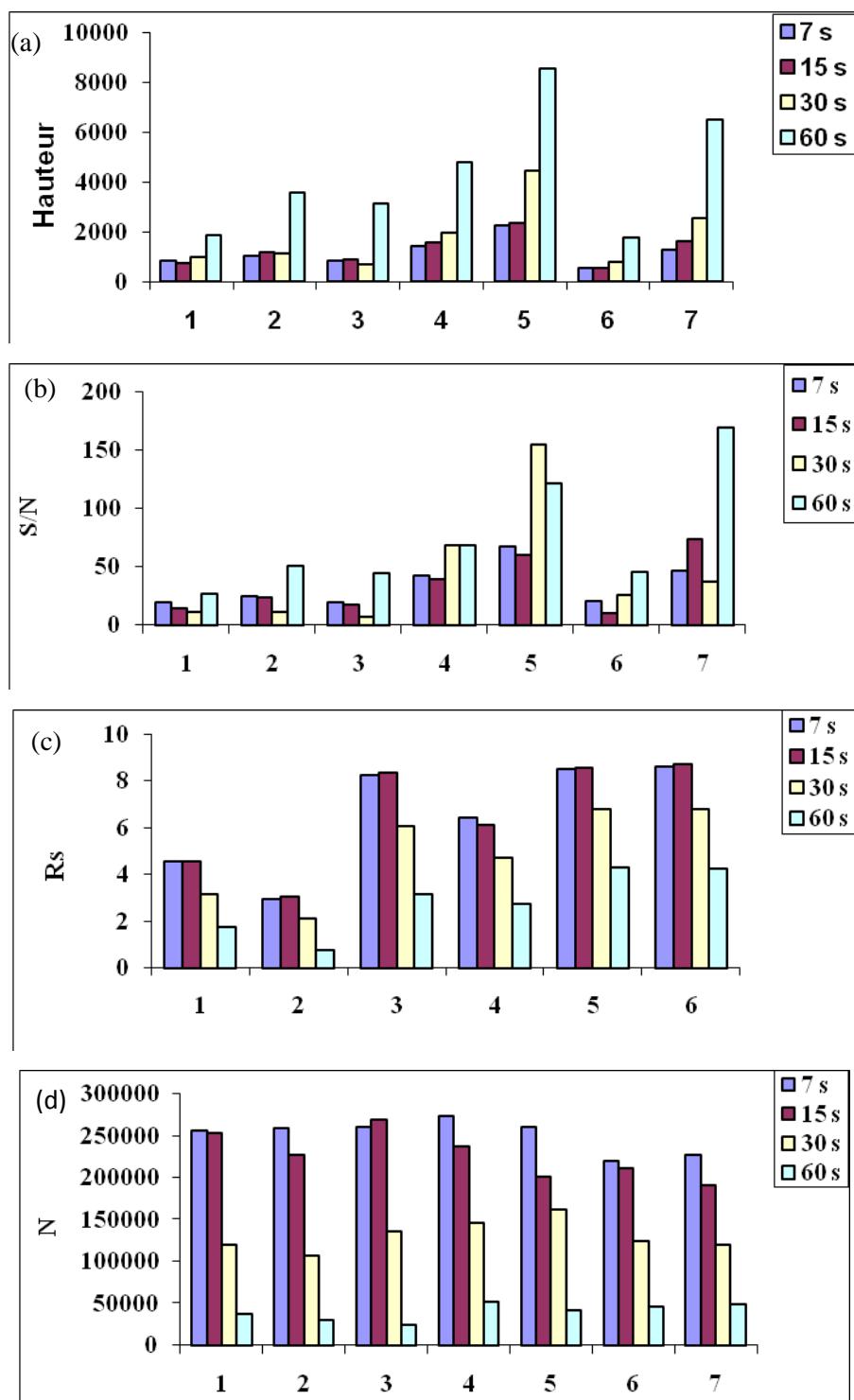


Figure 22 : Influence du temps d'injection de l'analyte sur la hauteur(a), le rapport signal-sur-bruit (S/N)(b), la résolution (Rs)(c), et l'efficacité (N)(d) pour : prométhazine (1), dimenhydrinate (2), l'étalon interne (3), métoclopramide (4)alizapride (5), halopéridol (6) et dompéridone (7).

Une augmentation du temps d'injection de 7 à 60 s conduit à une multiplication par deux de la hauteur des pics de la prométhazine et de l'halopéridol. Un gain d'un facteur 4 a pu être observé pour le dimenhydrinate, le métoclopramide, l'alizapride et la dompéridone.

Pour la plupart des analytes, le rapport signal-sur-bruit augmente avec le temps d'injection. On constate, toutefois, pour le métoclopramide, un phénomène de saturation du rapport S/N. Ce rapport diminue pour l'alizapride pour un temps d'injection de 60 s. En effet, l'injection en mode FASI provoque d'une part un élargissement significatif des pics (se traduisant par une baisse d'efficacité et de résolution figure 21 (c, d)) et simultanément une augmentation de l'amplitude du bruit de fond. Ceci a pour conséquence une baisse du rapport S/N pour des temps d'injection élevés.

Ainsi, il semblerait que le temps d'injection soit un facteur essentiel à prendre en considération lors de la construction du plan d'expériences afin d'allier une augmentation significative du signal tout en conservant une qualité de séparation suffisante.

IV.2 Construction du plan d'expériences

Un plan composite centré (5 niveaux par facteur) a été mis en place pour optimiser les paramètres du FASI.

L'échantillon est constitué de la prométhazine, du dimenhydrinate, du métoclopramide, de l'étalon interne, et de l'halopéridol à 100 ppb et de la dompéridone à 30 ppb.

IV.2.1 Définition des niveaux de chaque facteur

Suite aux essais préliminaires, la teneur en méthanol et la concentration en acide acétique dans l'échantillon, la durée et la tension d'injection de l'analyte ont été

retenues comme les principaux facteurs influençant les performances de l'injection FASI en électrophorèse capillaire. Pour mettre en place le plan d'expériences, il est nécessaire de définir un domaine d'étude pour chaque facteur ainsi que les valeurs associées à chaque niveau ($-\alpha$; -1 ; 0 ; $+1$; $+\alpha$). Les niveaux des différents facteurs sont résumés dans le Tableau IV.

Tableau IV : Valeurs des facteurs aux points étoiles ($-\alpha$; $+\alpha$), factoriels (-1 ; $+1$) et centré (0) du plan composite centré.

Niveau	MeOH (%)	[CH ₃ COOH] (mM)	t injection(s)	Tension d'injection (kV)
$-\alpha$	0,5	0	4,5	2
-1	23,0	1,25	16	4
0	45,0	2,5	27,5	6
$+1$	68,0	3,75	39	8
$+\alpha$	90,5	5	50,5	10

IV.2.2 Définition des réponses étudiées

Les réponses ont été choisies de manière à être les plus caractéristiques possibles pour évaluer les performances de l'injection FASI. Ainsi l'aire corrigée (Ac) et le rapport signal-sur-bruit (S/N) des pics pour chaque molécule d'intérêt constituent les réponses étudiées.

IV.3 Construction de la matrice des expériences

Lors de la construction d'un plan composite centré, le nombre d'expériences est choisi selon la formule suivante : $2^x + 2x + 3No$; où x représente le nombre de facteurs, 2^x : le nombre de points du plan factoriel, $2x$: le nombre de points étoilés, No : le point central.

Le plan d'expériences comportent quatre facteurs à optimiser ; il est donc composé de 16 expériences pour le plan factoriel, 8 pour les points étoilés et 3

points centraux soit 27 essais. Puisque toutes les expériences ont été répétées deux fois, 54 expériences ont été réalisées au total. La matrice des expériences proposée par le logiciel MODDE (logiciel qui permet de dresser un plan d'expériences) est représentée dans le Tableau V.

Tableau V : Matrice des expériences modélisée par le logiciel MODDE.

Exp Name	Run Order	MeOH	CH3COOH	tension	t inj
N1	1	23	1,25	4	16
N2	17	68	1,25	4	16
N3	25	23	3,75	4	16
N4	28	68	3,75	4	16
N5	45	23	1,25	8	16
N6	10	68	1,25	8	16
N7	49	23	3,75	8	16
N8	38	68	3,75	8	16
N9	19	23	1,25	4	39
N10	41	68	1,25	4	39
N11	47	23	3,75	4	39
N12	9	68	3,75	4	39
N13	39	23	1,25	8	39
N14	35	68	1,25	8	39
N15	5	23	3,75	8	39
N16	3	68	3,75	8	39
N17	13	0,5	2,5	6	27,5
N18	34	90,5	2,5	6	27,5
N19	43	45,5	0	6	27,5
N20	21	45,5	5	6	27,5
N21	18	45,5	2,5	2	27,5
N22	50	45,5	2,5	10	27,5
N23	51	45,5	2,5	6	4,5
N24	44	45,5	2,5	6	50,5
N25	12	45,5	2,5	6	27,5
N26	24	45,5	2,5	6	27,5
N27	53	45,5	2,5	6	27,5
N28	48	23	1,25	4	16
N29	27	68	1,25	4	16
N30	32	23	3,75	4	16
N31	16	68	3,75	4	16
N32	36	23	1,25	8	16
N33	26	68	1,25	8	16
N34	33	23	3,75	8	16
N35	30	68	3,75	8	16
N36	22	23	1,25	4	39
N37	8	68	1,25	4	39
N38	7	23	3,75	4	39
N39	15	68	3,75	4	39
N40	23	23	1,25	8	39
N41	37	68	1,25	8	39
N42	4	23	3,75	8	39
N43	2	68	3,75	8	39
N44	14	0,5	2,5	6	27,5
N45	11	90,5	2,5	6	27,5
N46	29	45,5	0	6	27,5
N47	20	45,5	5	6	27,5
N48	6	45,5	2,5	2	27,5
N49	52	45,5	2,5	10	27,5
N50	54	45,5	2,5	6	4,5
N51	46	45,5	2,5	6	50,5
N52	40	45,5	2,5	6	27,5
N53	31	45,5	2,5	6	27,5
N54	42	45,5	2,5	6	27,5

Afin d'éviter tout biais expérimental, les essais du plan ont été randomisés et les résultats de chaque expérience sont présentés dans le Tableau VI.

Tableau VI: Réponses mesurées pour chaque expérience

Exp Name	Run Order	Incl/Excl	AcPro	S/NPro	AcDim	S/NDim	AcEl	S/NEI	AcMET	S/NMet	AcHalo	S/NHalo	AcDom	S/NDom
N1	1	Incl	125	9	117	8	89	6	157	11	101	14	256	23
N2	17	Incl	705	47	751	46	475	33	781	63	458	29	1003	130
N3	25	Incl	41	3	26	2	51	3	36	2	24	1	68	5
N4	28	Incl	140	7	135	7	145	8	152	9	90	7	250	21
N5	45	Incl	218	14	208	13	143	9	303	20	189	20	253	26
N6	10	Incl	347	33	493	40	275	25	579	12	228	16	667	64
N7	49	Incl	202	14	66	5	70	6	87	9	52	5	199	15
N8	38	Incl	318	21	282	18	201	14	344	25	233	22	577	63
N9	19	Incl	169	8	153	8	83	5	189	10	94	11	200	22
N10	41	Incl	372	9	338	8	310	8	497	13	309	19	672	48
N11	47	Incl	99	3	86	2	79	2	127	3	64	8	101	12
N12	9	Incl	620	33	695	31	668	26	709	41	498	32	670	122
N13	39	Incl	126	6	147	8	187	8	187	10	101	6	249	16
N14	35	Incl	1356	29	1216	26	818	16	2198	46	1374	72	1674	74
N15	5	Incl	135	4	115	3	124	4	172	5	101	7	264	19
N16	3	Incl	1200	31	1102	27	1166	23	1067	33	862	52	1051	73
N17	13	Incl	29	1	38	1	27	1	70	2	34	3	17	2
N18	34	Incl	925	22	980	21	778	16	1038	27	678	61	2116	196
N19	43	Incl	235	12	362	20	333	18	495	30	275	12	785	46
N20	21	Incl	299	19	264	18	186	12	397	26	241	21	320	18
N21	18	Incl	116	9	110	8	82	6	136	12	77	10	71	11
N22	50	Incl	241	11	256	11	198	8	264	14	197	15	200	16
N23	51	Incl	55	4	51	3	45	3	64	5	40	3	84	5
N24	44	Incl	407	12	470	13	657	14	545	64	358	13	827	64
N25	12	Incl	293	15	352	17	175	9	447	24	232	16	661	76
N26	24	Incl	296	14	280	13	294	14	419	20	282	17	774	52
N27	53	Incl	232	10	200	9	254	11	271	13	166	15	398	37
N28	48	Incl	67	7	63	7	37	4	79	10	60	5	135	14
N29	27	Incl	644	53	693	58	484	43	790	78	453	36	916	85
N30	32	Incl	61	4	39	3	38	2	61	9	43	5	44	5
N31	16	Incl	235	16	210	15	138	11	264	21	158	21	350	44
N32	36	Incl	153	11	150	10	92	7	175	14	100	12	183	14
N33	26	Incl	434	28	474	30	319	30	597	40	349	34	419	50
N34	33	Incl	181	15	186	14	141	11	231	19	150	16	147	19
N35	30	Incl	375	18	337	16	234	11	519	25	317	23	390	24
N36	22	Incl	167	10	155	10	91	6	178	12	110	11	230	22
N37	8	Incl	341	23	350	22	261	15	380	29	256	25	540	81
N38	7	Incl	191	8	200	8	127	5	250	11	168	17	208	29
N39	15	Incl	782	54	687	48	581	37	814	66	527	41	788	66
N40	23	Incl	211	5	168	5	184	5	230	7	133	9	293	19
N41	37	Incl	1091	62	856	46	635	35	891	57	642	44	589	29
N42	4	Incl	197	7	226	7	329	10	217	9	152	9	313	22
N43	2	Incl	1552	27	1402	23	978	15	2332	39	1630	74	2302	127
N44	14	Incl	14	1	23	2	16	1	60	4	31	2	20	2
N45	11	Incl	1180	45	1080	41	640	25	1486	61	1055	49	2171	78
N46	29	Incl	232	17	353	24	266	17	380	30	190	24	421	73
N47	20	Incl	357	28	350	26	905	21	403	36	246	26	664	53
N48	6	Incl	77	7	87	7	53	5	109	9	55	6	118	12
N49	52	Incl	561	15	413	12	400	10	567	17	323	22	828	59
N50	54	Incl	75	3	64	2	46	2	85	3	58	6	67	3
N51	46	Incl	495	13	386	11	441	12	654	18	405	32	1104	73
N52	40 Excl													
N53	31	Incl	304	17	311	16	250	12	339	21	203	23	566	86
N54	42	Incl	371	21	401	20	342	15	520	29	348	25	391	31

IV.4 Validité du modèle

La validité globale du modèle a été estimée par le biais de quatre paramètres évalués par le logiciel MODDE : la qualité d'ajustement du modèle (R^2), la qualité de prédiction (Q^2), la validité et la répétabilité du modèle. L'ajustement du modèle sera considéré comme bon, si la valeur du R^2 est supérieure à 0,50. Néanmoins, ce paramètre n'est pas suffisant pour affirmer ou infirmer la validité du modèle. En effet, la qualité de prédiction Q^2 doit être supérieure à 0,50 et la différence entre R^2 et Q^2 ne doit pas excéder une valeur de 0,2-0,3.

Le critère de validité du modèle permet de vérifier que le modèle de régression choisi (quadratique dans notre cas) est adéquat. Sa valeur doit être supérieure à 0,25. La répétabilité est un critère qui permet d'évaluer la variabilité du modèle. Plus sa valeur numérique est élevée, plus l'erreur de répétition est faible. Elle doit être supérieure à 0,50.

En résumé, un modèle sera validé s'il remplit les critères suivants :

$R^2 > 0,50$
$Q^2 > 0,50$
$0,2 < R^2 - Q^2 < 0,3$
Critère de validité $> 0,25$
Répétabilité $> 0,50$

L'histogramme représentatif des critères de performance du modèle pour chaque réponse étudiée est présenté sur la Figure 23.

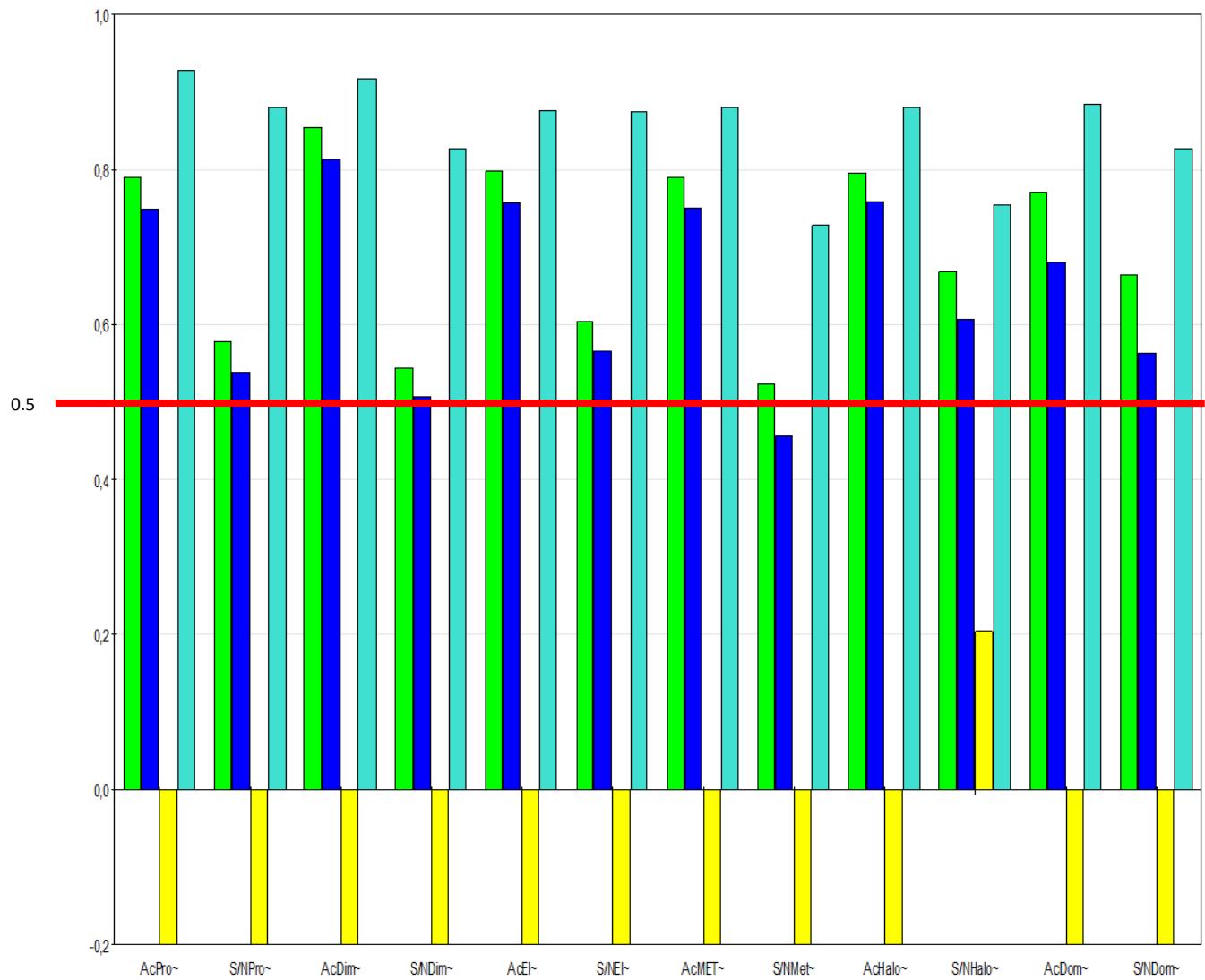


Figure 23: Histogramme représentatif des critères de performance du modèle pour chaque réponse étudiée.

- [Green Box] R^2
- [Blue Box] Q^2
- [Yellow Box] Validité du modèle
- [Cyan Box] Reproductibilité

A l'exception de la réponse S/N du métoclopramide, la fonction mathématique quadratique est suffisamment ajustée pour prédire les réponses étudiées puisque l'ensemble des valeurs de R^2 et Q^2 remplissent les critères mentionnés précédemment.

Puisque les valeurs de répétabilité sont comprises entre 0,73 et 0,95, l'erreur de répétition associée à chaque réponse est négligeable.

Enfin, l'adéquation du modèle mathématique choisi pour l'étude de notre système a été vérifiée. Le modèle est considéré comme valide si la valeur du critère permettant d'évaluer sa validité est supérieure à 0,25. Or, les valeurs de validité obtenues sont toutes négatives (-0,2) excepté le rapport S/N de Hal qui est égale à 0,2. Il est possible dans certains cas que le critère de validité du modèle soit négatif. Ceci correspond à un artefact du fait d'une très faible erreur de répétition comparée à celle du modèle mathématique.

Les valeurs des critères de validité du modèle étant incluse dans le domaine d'acceptabilité, le modèle peut être utilisé pour optimiser l'injection des antiémétiques en mode FASI.

IV.5 Interprétation des résultats du plan d'expériences

Les surfaces de réponses obtenues par le biais du plan composite centré ont pour équation un polynôme du second degré :

$$Y = a_1x_1 + a_{11}x_1^2 + a_2x_2 + a_{22}x_2^2 + a_3x_3 + a_{33}x_3^2 + a_4x_4 + a_{44}x_4^2 + a_1a_2x_1x_2 + a_1a_3x_1x_3 + a_1a_4x_1x_4 + a_2a_3x_2x_3 + a_2a_4x_2x_4 + a_3a_4x_3x_4 + b$$

D'où a_i correspond aux coefficients du 1^{er} ordre, a_{ii} à ceux du 2^{ème} ordre et $a_{i1}a_{i2}$ aux termes croisés. Afin de déterminer la significativité des coefficients de la régression ($p\text{-value} < 0,05$, les valeurs qui sont entre parenthèses dans le Tableau VII), une analyse statistique a été réalisée. Les coefficients significatifs sont répertoriés dans le tableau ci-après.

Tableau VII : Coefficients significatifs du polynôme du second degré modélisant l'équation des surfaces de réponses obtenues pour chaque facteur.

	Pro		Dim		EI		Met		Hal		Dom	
	Ac	S/N	Ac	S/N	Ac	S/N	Ac	S/N	Ac	S/N	Ac	S/N
Interception	2,385	1,085	2,369	1,056	2,343	1,036	2,481	1,214	2,267	1,171	2,669	1,606
MeOH	0,344(0)	0,315(0)	0,359(0)	0,313(0)	0,327(0)	0,297(0)	0,319(0)	0,282(0)	0,33(0)	0,298(0)	0,369(0)	0,341(0)
Acide	-	-	-0,053(0,04)	-	-	-0,077(0,03)	-	-	-	-	-	-
U	0,124(0)	-	0,117(0)	-	0,132(0)	-	0,121(0)	-	0,126(0)	0,085(0,01)	0,114(0)	-
MeOH*MeOH	-	-	-	-	-0,059(0,04)	-	-	-	-	-	-0,078(0,03)	-0,081(0,04)
Tinj	0,153(0)	-	0,164(0)	-	0,195(0)	-	0,165(0)	0,083(0,04)	0,169(0)	0,123(0)	0,166(0)	0,156(0)
Acide*Tinj	-	-	0,112(0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U*U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,081(0,02)	-
Tinj*Tinj	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,077(0,05)

IV.5.1 effets de chaque facteur

Le méthanol a un effet positif (0,33) sur l'aire corrigée et sur le S/N de chaque produit. Son effet est plus de trois fois supérieure à celui de la tension (environ 0,12) ou le temps d'injection (environ 0,16).

L'ajout de l'acide a un effet négatif sur l'aire corrigée de la prométhazine, sur le rapport signal-sur-bruit de l'étalon interne et n'est pas significatif pour les autres analytes.

IV.5.2 interaction entre les facteurs

On parle d'interaction entre deux facteurs lorsque le niveau de l'un influe sur la réponse du second. Il y aura interaction entre deux facteurs si le terme croisé correspondant de la régression quadratique est significatif. Les quatre facteurs étudiés n'interagissent pas, à l'exception de la teneur en acide avec le temps d'injection pour la réponse Ac_{Dom} (coefficient = 0,112 ; p-value = 0). On peut ainsi supposer que d'augmenter le temps d'injection n'aura pas le même effet en fonction de la concentration en acide dans l'échantillon. En effet, en absence d'acide dans l'échantillon, l'analyte n'est pas ionisé et son injection électrocinétique n'est pas envisageable. A contrario, une forte teneur en acide dans l'échantillon permet d'ioniser l'analyte et le signal sera d'autant plus amplifié que le temps d'injection sera long.

IV.5.3 Etudes des surfaces de réponses

Il est possible de modéliser les réponses étudiées en fonction des niveaux de chaque facteur au moyen des surfaces de réponses.

Les surfaces des réponses de la dompéridone dans le plan sont représentées sur la Figure 24.

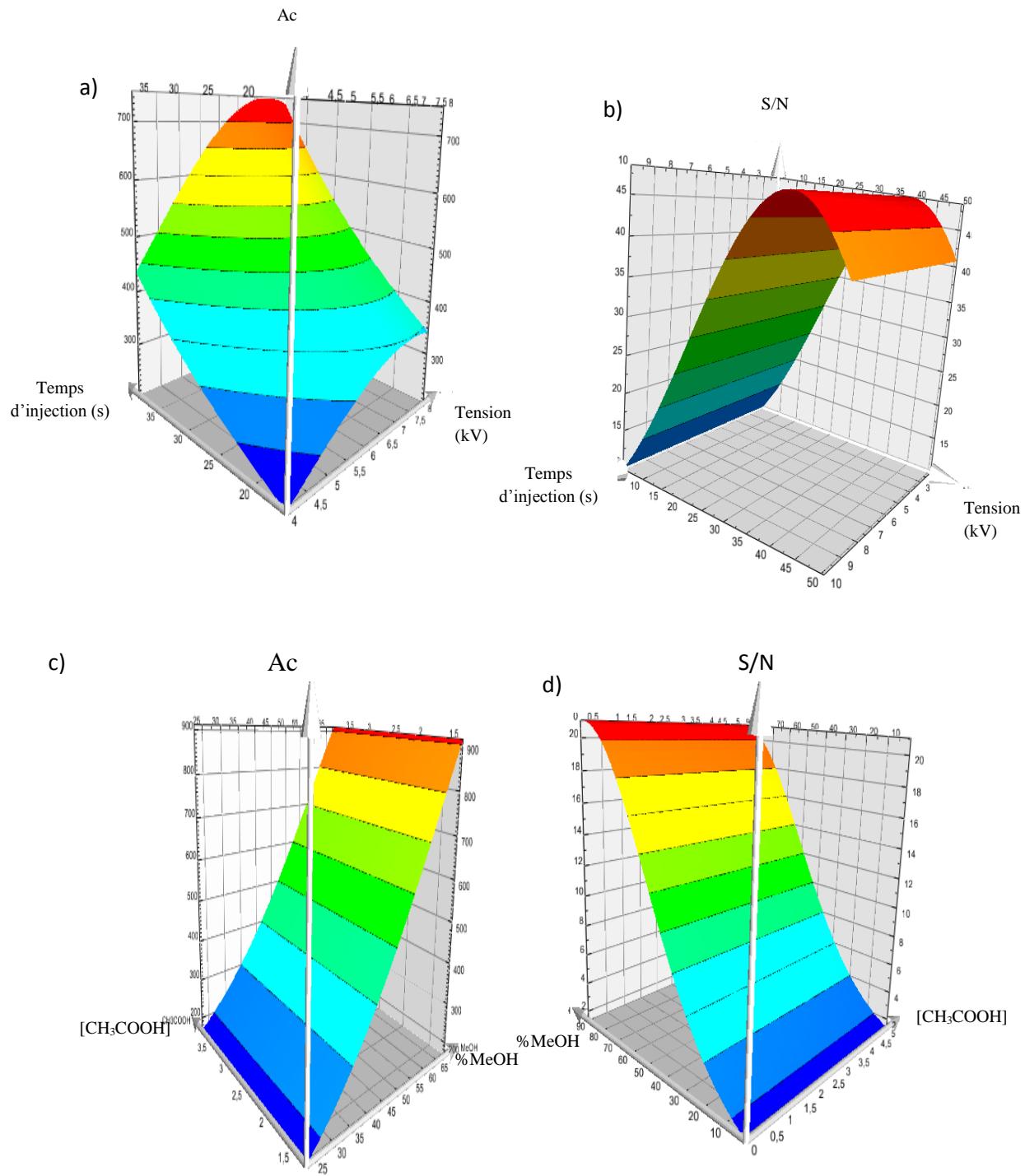


Figure 24 : surfaces des réponses modélisant l'aire corrigée de la dompéridone en fonction de la tension et du temps d'injection (a) et en fonction de la [CH₃COOH] et %MeOH de méthanol (c), le S/N de la dompéridone en fonction de la tension et du temps d'injection (b), et en fonction de la [CH₃COOH] et %MeOH (d).

Les surfaces de réponses de la dompéridone montrent qu'une forte teneur en méthanol entraîne une augmentation de l'aire corrigée et le rapport signal-sur-bruit.

La concentration d'acide acétique n'a pas une influence sur l'aire corrigée ainsi que le rapport signal-sur-bruit mais son ajout est indispensable pour la protonation des molécules.

Une augmentation de la tension entraîne une augmentation de l'aire corrigée des pics et du rapport signal-sur-bruit

Une augmentation du temps d'injection entraîne une augmentation de l'aire corrigée mais n'a pas d'influence sur le rapport signal-sur-bruit.

IV.6 Détermination des conditions optimales de la séparation en mode FASI

Après modélisation mathématique des aires corrigées et des S/N, il est possible de déterminer les conditions expérimentales permettant d'obtenir un gain en sensibilité maximal lors d'une injection FASI. Parmi les sept conditions expérimentales proposées par le logiciel MODDE, deux conditions nous ont semblé intéressantes à tester (Tableau VIII). La quantité de méthanol, la tension et temps d'injection prennent des valeurs maximales dans les deux cas tandis que les concentrations en acide acétique sont très différentes (2,5 ou 5 mM).

Tableau VIII : Deux conditions optimales proposées par le logiciel MODDE

Essai	% MeOH	[CH ₃ COOH] (mM)	Tension (kV)	Temps d'injection (s)
1	90,5	5	9,8	46
2	90,5	2,5	10	48

Les électrophorégrammes correspondant à ces deux conditions sont représentés sur la Figure 25.

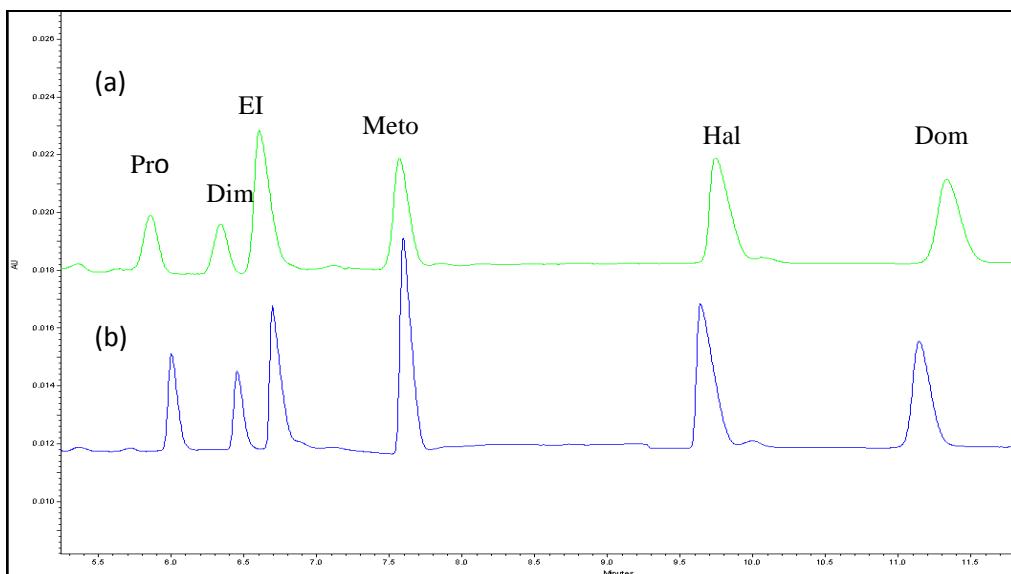


Figure 25 : Electrophorégramme des deux conditions optimales proposées par MODDE

- (a)%MeOH= 90 ; %Acide = 5 ; Tension=9,8 kV ; Temps d'injection= 46 s)
- (b): (%MeOH= 90 ; %Acide = 2,5 ; Tension=10 kV ; Temps d'injection= 48 s)

Les résultats obtenus sont relativement proches. Toutefois le gain en sensibilité est optimal lorsqu'une concentration minimale d'acide 2,5 mM est ajoutée dans l'échantillon.

V. Comparaison des modes d'injection hydrodynamique et FASI

Les électrophorégrammes de la Figure 26 montrent l'injection hydrodynamique et electrocinétique à la même concentration d'analyte (50 ppm pour chaque analyte).

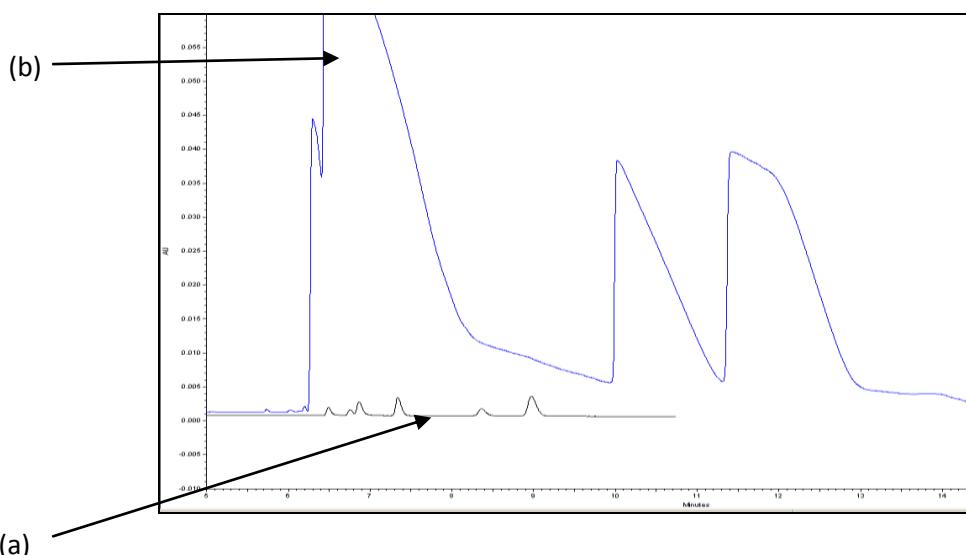


Figure 26 : Comparaison des modes d'injection hydrodynamique (a) et FASI (b).

Les limites de quantifications obtenues en mode FASI ont été comparées à celles calculées avec une injection hydrodynamique (7 s, 0,5 psi). Les résultats sont présentés dans le Tableau IX.

Tableau IX : Limites de quantification en mode hydrodynamique et FASI

Analyte	LOQ (ng.mL ⁻¹) Hydrodynamique	LOQ (ng.mL ⁻¹) FASI	Gain en concentration
Prométhazine	30000	16	1800
Dimenhydrinate	25000	11	2200
Métoclopramide	12000	4	3000
Halopéridol	25000	8	3125
Dompéridone	3000	4	750

Les limites de quantification obtenues en FASI sont de l'ordre du ng.mL^{-1} comparées aux dizaines de $\mu\text{g.mL}^{-1}$ obtenues avec l'injection hydrodynamique.

L'injection FASI permet ainsi un gain en sensibilité d'un facteur moyen de 2200 par rapport à l'injection hydrodynamique.

CONCLUSION

Le but de cette étude était de développer une méthode d'analyse par électrophorèse suffisamment sensible pour évaluer le passage transdermique de nouvelles formes galéniques contenant des antiémétiques.

Tout d'abord, la séparation électrophorétique a été développée facilement. Un électrolyte constitué d'acide phosphorique et de soude (force ionique = 60mM, pH 2,5) auquel est ajouté 5% d'éthanol, a permis de résoudre les sept antiémétiques et l'étalon interne en moins de 10 mn. Les seuils de quantification associés à une injection hydrodynamique (0,5 psi, 7 sec) sont de l'ordre de 25000 ng.mL⁻¹ pour la plupart des analytes.

Afin d'améliorer les seuils de quantification, une technique de concentration par amplification du champ électrique avec injection electrocinétique (FASI) a été mise au point. Les essais préliminaires ont permis de déterminer les facteurs favorables à la concentration des analytes.

Ainsi, la composition du solvant d'injection (teneur en MeOH et la concentration d'acide acétique), ainsi que le temps et la tension d'injection conditionnant le facteur d'amplification. Un plan d'expériences composite centré a été construit permettant de déterminer les conditions optimales du FASI. Un gain en sensibilité d'un facteur moyen de 2200 est obtenu grâce à l'injection FASI par rapport à l'injection hydrodynamique.

Ce travail a fait l'objet de deux communications par affiche aux congrès annuel du PRIM (Pôle de Recherche Interdisciplinaire sur le Médicament) à Lille et biannuel de l'AFSEP (Association Francophone des sciences séparatives) à Paris.

Cette étude sera poursuivie en vue de sa validation, pour le dosage de nouvelles formes transdermiques d'antiémétiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **MOULEC, S ; VERDRINE, L.** « Prise en charge des nausées et vomissements en oncologie thoracique ». Revue de pneumologie clinique 64 (2008) 76-80.
2. **TOUITOU, Y.** *Pharmacologie : diplôme d'état d'infirmières et professionnels*. 9^{ème} édition, Paris : Masson, 2000. 400.
3. **MOULIN, M ; COQUEREL, A.** *Pharmacologie*. 2^{ème} édition, Paris : Masson, 2002. 845.
4. **WEHRLE, P.** Formulation et technologie pharmaceutique. Pharmacie galénique 2^{ème} édition Maloine 191-211.
5. **LEDRENEY-GROSJEAN, L.** ABC du conseil dermocosmétologie en pharmacie. le moniteur du pharmacien 1-42.
6. **HUMBERT, Ph ; MARTIMESTRES, G.** Septembre 2008
<http://www.therapeutique-dermatologique.org> consulté en ligne le 23 mai 2013.
7. **BRIDOUX A.** Développement de nouvelles formes Pharmaceutiques à base d'organogels : application pour l'administration d'antiémétiques par voie transdermique, Mémoire de stage de première année M1 du master « conception du médicament », université de Lille 2 (13-15) 2012.
8. **VINTILOIU, A; LEROUX, JC.** Organogels and their use in drug delivery, journal of controlled release 125 (2008) 179-192.
9. **DOWLING, TC et al.** Relative bioavailability of ketoprofen 20% in a poloxamer-lecithin organogel, american society of health-system pharmacists 61 (2004) 2541

-
10. **FAURE, S.** Les traitements adjutants à la chimiothérapie anticancéreuse. Actualités pharmaceutiques. 470 (2008) 10-20.
 11. **TILMANT A-S.** Nausées et vomissement chimio-induits : Prévention et traitement. Thèse de doctorat d'état en Pharmacie, Université de Lille 2(2007).
 12. **DURAND, J; et al.** Recommandations pour la prévention et le traitement des nausées et vomissements induits par la chimiothérapie. Bulletin du cancer 96 (2009) 951-960.
 13. **MANTEL, E ; COANON, R.** Implication du pharmacien d'officine dans la prise en charge du patient bénéficiant d'une chimiothérapie anticancéreuse orale. Thèse pour le Diplôme D'Etat de Docteur en Pharmacie, Université de Lille 2,(2011) 125-128.
 14. **LEVY, E ; et al.** Nausées et vomissement chez les patients atteints de cancer. Revue du praticien, 56 (2006) 2015-2019.

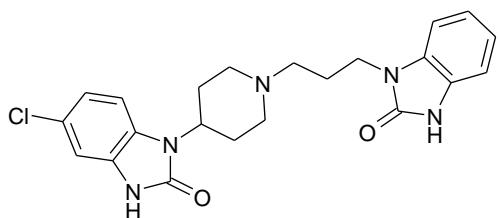
 15. **PAUL J; HESTKETH, M.D.** Chemotherapy Induced Nausea and Vomiting. The New England Journal of Medicine, 358 (2008) 2482-2494.
 16. **Vidal 2013.** Version : 2.1.0.0, consulté en ligne, Service de documentation commune Lille 2.
 17. **NANDEESH, R; REDDY, T.** Chemotherapy Inducted Nausea and Vomiting. Journal of Basic and Clinical Pharmacology, 1(2012) 125-31.
 18. **AAPRO, M.S ; et al.** Anticipatory nausea and vomiting. Supp Care Cancer 13 (2005)117-121.
 19. **ROUESSAC, F ; et al.** Analyse Chimique, Méthodes et Techniques Instrumentales Dunod 7^{ème} édition, 139-154.
 20. **SKOOG ; et al.** Chimie Analytique. De Boeck. 8^{ème} édition, 1003-1007.
 21. **MAHUZIER ; G. et al.** Chimie Analytique : Méthode de Séparation 3^{ème} édition tome 2, 298-305.

-
22. **TAVERNA, M ; et al.** Principe de l'électrophorèse. Techniques de l'ingénieur, (2013) 3-365.
23. **GAREIL, P; PELTRE, G.** Electrophorèse. Technique de l'Ingénieur, (1995) 1 815-1818.
24. **BOUCHARA, S.** « Couplage en ligne de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse : Application à l'analyse de protéines du lait ». Année spéciale de Diplôme Universitaire de technologie, spécialité Chimie. Ecole Nationale de Chimie Supérieure Paris. _2009) 8.
25. **LARA, F; et al.** «Development and validation of a capillary electrophoresis method for the determination of phenothiazines in human urine in the low nanogram *per milliliter* concentration range using field amplified». *Electrophoresis*, 26 (2005) 2418–2429.
26. **ANRES, P.** Développement de nouvelles méthodes concentration électrocinétique in-situ en électrophorèse capillaire pour l'analyse de trace. Thèse de Doctorat de l'université Pierre et Marie Curie. Septembre 2012, 23-31.
27. **KAEWCHUAY, N; et al.** Simultaneous determination of pyridine-triphenyl borane anti-fouling agent and its degradation products in paint-waste sample using capillary zone electrophoresis with field-amplified sample injection. *Analytical sciences*, 28 (2012) 1991-1996.
28. **WU, Y.** Field-amplified sample injection for the determination of albumin and transferring in human urines by MEKC. *Electrophoresis* 30(2009) 668-673.
29. **DAWOD, M; et al.** Electrokinetic supercharging for on-line preconcentration of seven non-steroidal anti-inflammatory drugs in water samples. *Journal of chromatography A*, 1189 (2008) 278-284.

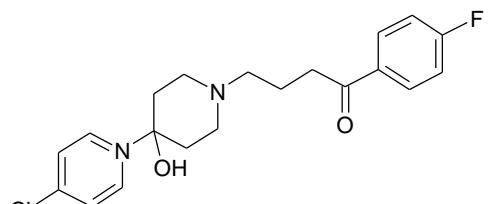
-
30. **GRARD, S; et al.** Application of capillary electrophoresis with field-amplified sample injection for the detection of new adrenoreceptor antagonist enantiomers in plasma in the low ng/mL concentration range. *Electrophoresis* 23 (2002) 2399-2407.
 31. **WEI, S; et al.** Sample stacking by field-amplified sample injection and sweeping for simultaneous analysis of acidic and basic components in clinic application. *Electrophoresis* 33 (2012) 1571-1581.
 32. **ZINELLU, A. et al.** Measurement of carnosine, homocarnosine and anserine by FASI capillary electrophoresis UV detection: Applications on biological samples. *Talanta* 84 (2011) 931-935.
 33. **CLAUDE, B; et al.** Analysis of urinary neurotransmitters by capillary electrophoresis: Sensivity enhancement using Field-amplified sample injection and molecular imprinted polymer solid phase extraction, *Analytica chimica acta* 699 (2011) 242-248.
 34. **ABDELAL, A.** Method development and validation for the simultaneous determination of cinnarizine and co-formulated drugs in pharmaceutical preparations by capillary electrophoresis, *Journal Of Biomedical Analysis* 46 (2008) 491-497.
 35. **HE, H; et al.** Multiresidue determination of (fluoro) quinoleine antibiotics in chicken by polymer monolith microextraction and field-amplified sample stacking procedures coupled to CE-UC, *Talanta* 82 (2010) 1562-1570.

ANNEXES

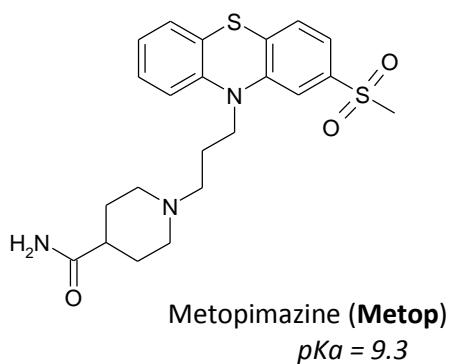
Annexe 1



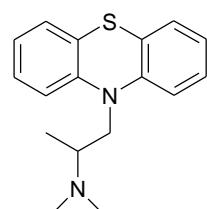
Domperidone (Dom)
 $pK_a = 7.9$



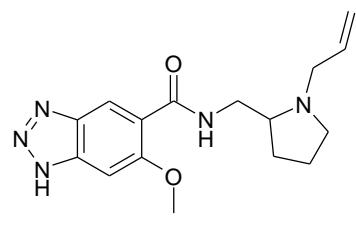
Haloperidol (Hal)
 $pK_a = 8.3$



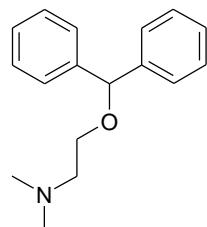
Metopimazine (Metop)
 $pK_a = 9.3$



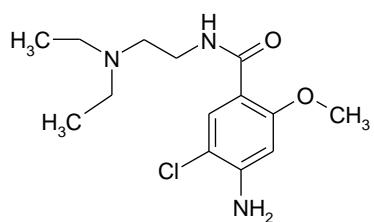
Promethazine (Pro)
 $pK_a = 9.1$



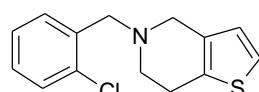
Alizapride(Ali)
 $pK_a = 13.6$



Dimenhydrinate(Dim)
 $pK_a = 10.7$



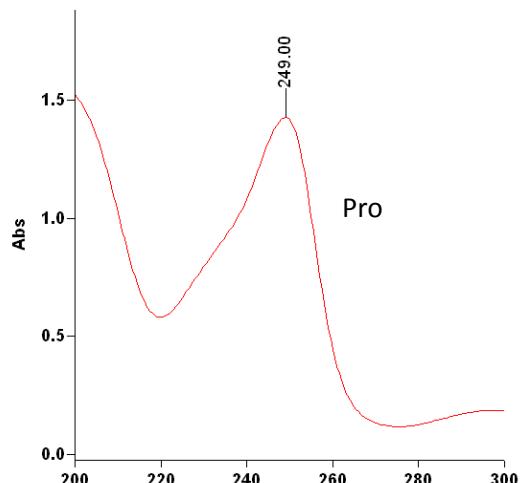
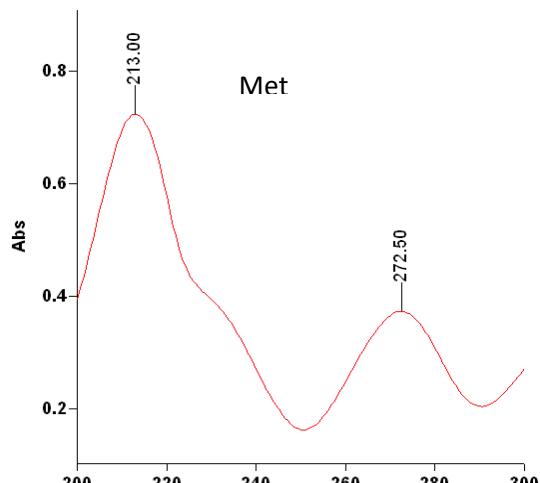
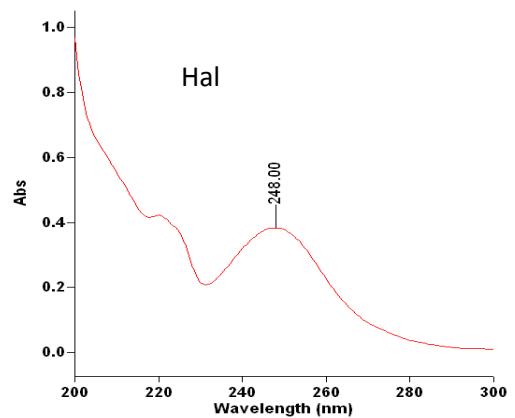
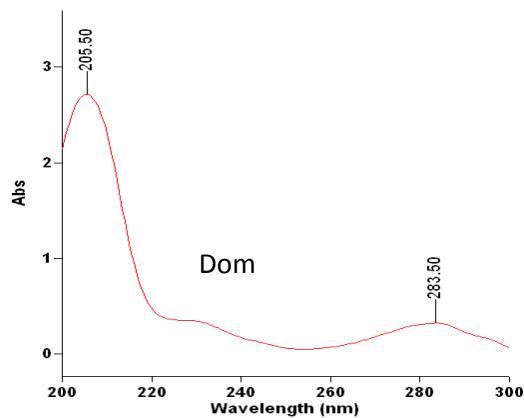
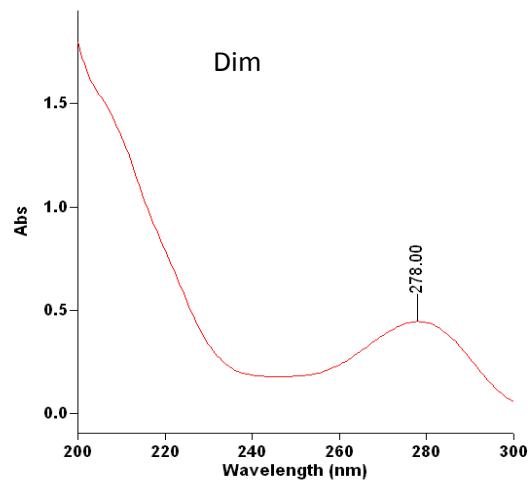
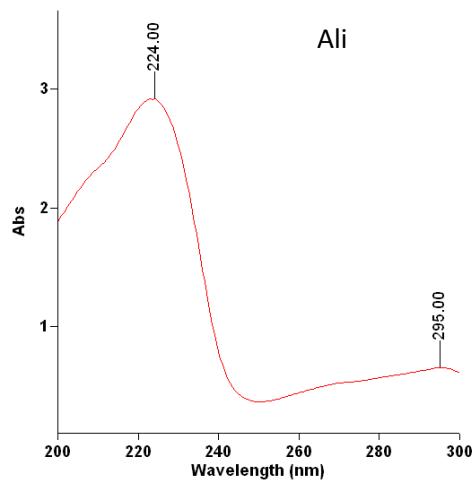
Metoclopramide (Meto)
 $pK_a = 9.3$

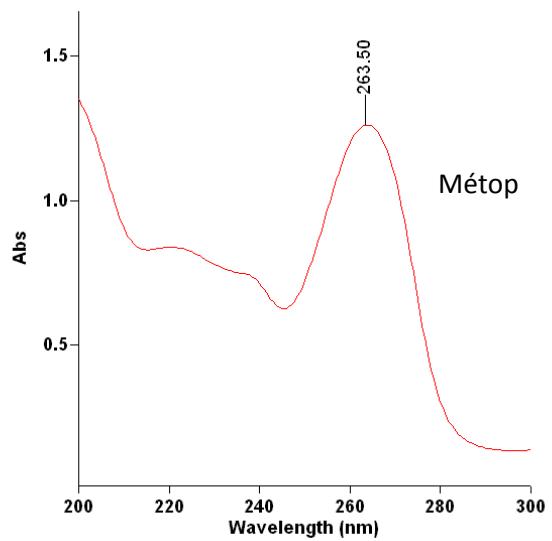
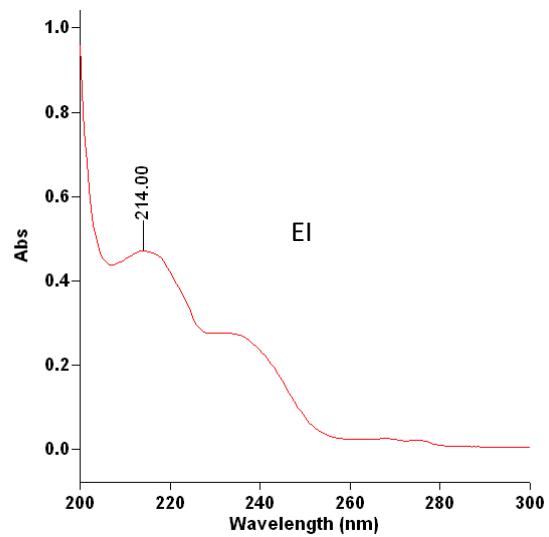


Ticlopidine (El)
 $pK_a = 7.6$

Annexe 2

Les spectres d'absorption des antiémétiques ont été enregistrés avec un spectromètre UV double faisceau Cary 100, sur la gamme spectrale 200-300 nm. La vitesse d'acquisition est de 600 nm/min. Les antiémétiques ont été solubilisés dans l'eau à une concentration de 10 ppm.





Annexe 3

Paramètres de performances électrophorétiques

- ❖ Résolution (R_s) : aptitude d'un système à séparer les constituants d'un mélange.

$$R_s = 2 \frac{t_{m2} - t_{m1}}{w_1 + w_2}$$

t_m : temps de migration

w : Largueur du pic à la base

La résolution doit être supérieure à 1,5 pour avoir une bonne séparation.

- ❖ **L'efficacité** (N) ou nombre de plateaux théoriques : elle rend compte de la finesse des pics
$$N = 16 t_m^2 / w^2$$
- ❖ **Le rapport signal-sur-bruit** (S/N) : c'est le rapport entre la hauteur du pic (S) et l'amplitude du bruit de fond (N).
- ❖ **La limite de quantification** : c'est la plus petite quantité qu'on peut quantifier et qui correspond au rapport signal-sur-bruit égale à 10.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes Condisciples.

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la Santé Publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

PERMIS D'IMPRIMER

Vu :

Le président du jury

Vu :

Le Doyen.....

Vu et Permis d'imprimer

Pour le recteur, le Président de l'assemblée d'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et par
délégation

Le Doyen

RESUME

L'électrophorèse capillaire est technique unanimement reconnue pour ses performances analytiques puisqu'elle associe rapidité de séparation, automatisation et faible consommation d'échantillon. Néanmoins, elle souffre, parfois, d'un manque de sensibilité en raison du faible trajet optique lié à la détection UV.

Le but de cette étude était de développer une méthode d'analyse par électrophorèse suffisamment sensible pour évaluer le passage transdermique de nouvelles formes galéniques contenant des antiémétiques.

Tout d'abord, la séparation électrophorétique a été développée facilement (moins de 10 mn). Les seuils de quantification associés à une injection hydrodynamique (0,5 psi, 7 sec) sont de l'ordre de 25000 ng.mL^{-1} pour la plupart des analytes.

Afin d'améliorer les seuils de quantification, une technique de concentration par amplification du champ électrique avec injection electrocinétique (FASI) a été mise au point. Les essais préliminaires ont permis de déterminer les facteurs favorables à la concentration des analytes. Un plan d'expériences composite centré a été construit permettant de déterminer les conditions optimales du FASI. Un gain en sensibilité d'un facteur moyen de 2200 est obtenu grâce à l'injection FASI par rapport à l'injection hydrodynamique, permettant l'étude de passage transdermique des antiémétiques associés à de nouvelles formes galéniques au moyen d'une cellule de diffusion.

Mots clés : électrophorèse capillaire, préconcentration par amplification de champ électrique avec une injection electrocinétique (FASI), antiémétiques, plan d'expériences composite centré.