UNIVERSITE MONTPELLIER 1 - U.F.R. DE MEDECINE

THESE

pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER 1

SECTION DU CONSEIL NATIONALE DES UNIVERSITES : 48.03

SPECIALITE : Pharmacologie clinique

ECOLE DOCTORALE : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS^2)

Présentée et soutenue publiquement

par

Olivier MATHIEU

le 19 novembre 2010

METABOLISME OXYDATIF DE LA CARBAMAZEPINE ET EFFETS INDESIRABLES DE TYPE HYPERSENSIBILITE : CONTRIBUTION DU METABOLISME SANGUIN DES DERIVES ACRIDINIQUES, MODIFICATIONS DES PROFILS METABOLIQUES AU COURS DU DRESS SYNDROME ET PAR LES COMEDICATIONS ANTIEPILEPTIQUES, ET ASPECTS OXYDATIFS ENVIRONNEMENTAUX.

JURY :

M. le Professeur Michel ANDREJAK	**Université d'Amiens, rapporteur**
M. le Professeur Jean-Pierre BLAYAC	**Université de Montpellier 1, président**
M. le Professeur Philippe BOUDEVILLE	**Université de Montpellier 1, co-directeur**
M. le Professeur Jacques CARON	**Université de Lille 2, rapporteur**
M. le Docteur Laurent CAVALIE	**CHRU de Toulouse, examinateur**
Mme. le Docteur Dominique HILLAIRE-BUYS	**Université de Montpellier 1, directeur**

Il m'a fallu un peu plus de 17 ans pour obtenir le baccalauréat,
et 18 ans supplémentaires pour soutenir cette thèse.

Je ne suis pas une espèce rare mais plutôt en voie de multiplication dans notre niche professionnelle. C'est de la Très Grande Randonnée humaine, avec pics et vallées vertigineux, qui ne peut être menée à bien qu'avec le concours de bons guides dès la naissance.

Je dédie cette thèse d'université à ceux-ci :

A mon père et mon grand-père qui sont arrivés au terme de leur randonnée,

A ma mère et à ma famille du ban, de l'arrière ban et par alliance qui me supportent (double sens),

A ma femme, à Philippe, à Paul et à …… qui assurent l'intendance affective et matérielle, les bêtises, et l'oxygène de la pluralité de la dimension humaine !

REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu Monsieur le Professeur Blayac, coordonnateur du département hospitalo-universitaire de pharmacologie médicale et toxicologie et praticien responsable du pôle de biologie pathologie du CHRU de Montpellier, pour m'avoir intégré à son équipe et favorisé la préparation de cette thèse dans le cadre plus large de la préparation de ma candidature hospitalo-universitaire. Merci pour votre disponibilité toujours baignée d'humour malgré vos multiples casquettes.

Toute ma reconnaissance va à Madame le Docteur Dominique Hillaire-Buys pour la formation à la recherche qu'elle m'a dispensée depuis le début de mon assistanat hospitalo-universitaire, et tout particulièrement à l'occasion de la direction de ces travaux de thèse. Dominique, un merci particulier pour ton accompagnement et tes conseils pour aborder les moments très particuliers que constitue la préparation d'une publication avec ses échecs et ses succès.

La préparation de cette thèse a été l'occasion pour moi de retrouver et travailler sous la co-direction de mon ancien maître de chimie minérale, Monsieur le Professeur Philippe Boudeville. J'ai fait partie de votre première promotion d'étudiants montpelliérains qui ont exploré avec vous les cases du tableau de Mendeleïev. Je ne savais alors pas que je devrai m'arrêter plus tard longuement sur la case de l'oxygène. Merci de votre concours à des instants critiques dans la préparation de cette thèse.

Je remercie les rapporteurs, Messieurs les Professeurs Michel Andréjak, Jacques Caron et Pierre Marquet, éminents pharmacologues hospitalo-universitaires français, qui m'ont fait le grand honneur d'avoir accepté de juger mon travail. C'est aussi l'occasion pour moi de créer des liens privilégiés avec les autres centres de pharmacologie hospitalo-universitaires français, ils ne sont pas si nombreux !

Je remercie Monsieur le Docteur Laurent Cavalié de m'avoir fait l'amitié de juger mon travail. L'étude de la rencontre des thématiques du médicament et de l'environnement est une vocation ancienne qu'il peut promouvoir activement au CHRU de Toulouse, et que nous discutons longuement au cours de trop rares conversations téléphoniques, parmi d'autres intérêts communs.

Je remercie les membres de mon comité de thèse, Madame le Professeur Claude Casellas, Monsieur Serge Chiron, Madame Hélène Fenet, Maîtres de conférences à l'Université de Marseille et de Montpellier pour leur aide, notamment lors de la demande de dérogation pour l'inscription en 4° année de thèse.

Je remercie également Madame Elena Gomez pour son accueil dans les projets AFSSET et ANR auxquels j'ai participé et qu'elle coordonne.

Je remercie pour leur aide scientifique les co-auteurs des publications liées à cette thèse, Messieurs les Professeurs Pascal Démoly, pneumologue-allergologue, et Olivier Dereure, dermatologue, Madame le Docteur Marie-Christine Picot, méthodologiste, Monsieur le Docteur Philippe Gélisse, neurologue. Merci également à ma tante, Madame Marie-Christine Coste-Rixte, professeur d'anglais, pour sa révision pédagogique des manuscrits des publications.

Je voudrais aussi exprimer ma grande sympathie pour l'équipe du laboratoire de pharmacologie médicale et toxicologie qui m'a accueilli tout jeune. Nous avons vécu les moments heureux et difficiles de toute équipe depuis 12 ans. Pendant plusieurs mois, mon activité de recherche et de préparation m'a éloigné du cœur de la ruche hospitalière, je n'avais clairement pas le choix. Merci au Docteur Jean-Claude Mathieu-Daudé, responsable du laboratoire, de m'avoir laissé de la liberté autant que faire se pouvait pour les étapes de rédactions des différents manuscrits. Merci à Martine, Marylène et Pierre, praticiens attachés, et aux divers internes pour avoir expédié les affaires courantes trop chronophages pendant le même temps. Merci à Monsieur Christophe Masmejean, notre cadre de santé à présent positionné sur d'autres secteurs d'activité, pour sa grande réactivité et son suivi dans la commande de réactifs. Et bien sûr, merci à Brigitte, Céline, Françoise, Josette, Martine, Myriam, Mathieu, Serge techniciennes et techniciens de laboratoire, et Christophe, aide de laboratoire, de m'avoir épargné au maximum lorsque vous rencontriez des difficultés analytiques ou techniques.

A tous un très sincère merci.

TABLES

Table des matières……...…….6

Table des figures…… 14

Table des tableaux……..17

Table des équations…….……..…20

Table des annexes…….. 22

Table des abréviations……23

TABLE DES MATIERES

Métabolisme oxydatif de la carbamazépine et effets indésirables de type hypersensibilité: contribution du métabolisme sanguin des dérivés acridiniques, modifications des profils métaboliques au cours du DRESS syndrome et par les co-médications antiépileptiques, et aspects oxydatifs environnementaux.

INTRODUCTION 26

Première partie : Synthèse bibliographique : les effets indésirables de type hypersensibilité des médicaments, les propriétés pharmaco-toxicologiques de la carbamazépine, les métabolites réactifs et cytotoxiques candidats.

1. Effets indésirables de type hypersensibilité liés aux médicaments 28

1.1. Essai de définition 28

1.2. Epidémiologie 33

1.3. Classification nosologique 34

1.3.1. Approche des "*mergers*", les syndromes des métabolites réactifs 34

1.3.1.1. Le syndrome d'hypersensibilité 35

1.3.1.2. Les réactions mimant une maladie sérique 36

1.3.1.3. Les lupus induits par les médicaments 36

1.3.1.4. Les pseudo-lymphomes 36

1.3.2. Approche des "*splitters*", le découpage des formes cliniques cutanées 37

1.3.2.1. Le rash commun 37

1.3.2.2. Urticaire, angioedème et anaphylaxie 38

1.3.2.3. La pustulose exanthématique aiguë généralisée (PEAG) 39

1.3.2.4. L'hypersensibilité de type DRESS 40

1.3.2.5. Les éruptions fixes 41

1.3.2.6. Syndrome de Stevens-Johnson et nécrolyse épidermique toxique 42

1.3.3. L'approche japonaise 43

1.4. Médicaments responsables et tableaux cliniques associés 44
1.4.1. Molécules antiépileptiques 45
1.4.1.1. Carbamazépine 45
1.4.1.2. Phénobarbital et phénytoïne 48
1.4.1.3. Lamotrigine 48
1.4.1.4. Acide valproïque 49
1.4.2. Molécules anti-infectieuses 50
1.4.3. Allopurinol 51
1.4.4. Autres molécules 53
1.5. Facteurs associés 53
1.5.1. Facteurs génétiques 53
1.5.1.1. Molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I 53
1.5.1.2. Molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II 56
1.5.1.3. Correspondance possible entre polymorphisme touchant le CMH et mécanismes immunologiques effecteurs 56
1.5.1.4. Molécules impliquées dans des voies de détoxifications potentielles 57
1.5.1.5. Autres polymorphismes génétiques identifiés 57
1.5.2. Facteurs infectieux 58
1.5.3. Pathologies chroniques actives associées 60
1.5.4. Facteurs médicamenteux 60
1.5.4.1. Réactivité croisée 60
1.5.4.2. Médicaments et immunosuppression 63
1.5.4.3. Acide valproïque 63
1.5.4.4. Diurétiques 64
1.6. Hypothèses physiopathologiques 64
1.6.1. Les différents types d'hypersensibilité 64
1.6.1.1. Hypersensibilité de type 1 dite "immédiate" 64
1.6.1.2. Hypersensibilité de type 2 : type de l'anémie hémolytique 65
1.6.1.3. Hypersensibilité de type 3 : maladie sérique 65
1.6.1.4. Hypersensibilité de type 4 : hypersensibilité retardée 66
1.6.1.5. L'exploration diagnostique dans les réactions d'hypersensibilité 68
1.6.1.5.1. Tests diagnostiques réalisés in vivo 68
1.6.1.5.2. Tests diagnostiques réalisés in vitro 69
1.6.1.5.2.1. Principes, marqueurs, limites théoriques 69
1.6.1.5.2.2. Le test de transformation lymphocytaire (TTL) 71
1.6.1.5.2.3. Test d'up-regulation du CD69 72
1.6.1.5.2.4. Mesure "*ex vivo*" de la sécrétion des cytokines 72
1.6.1.5.2.5. Mise en évidence du granzyme B et du CD107a 73
1.6.1.5.2.6. Test de toxicité lymphocytaire 75
1.6.1.5.2.7. Mise en œuvre des tests *in vitro* 75

1.6.2. Les hypothèses de l'activation immunologique 76
1.6.2.1. L'hypothèse de l'haptène : la piste des métabolites réactifs 76
1.6.2.1.1. La notion d'haptène 76
1.6.2.1.2. Voie métabolique des cytochromes P450 et surtoxification 77
1.6.2.1.3. Adducts et CYP 79
1.6.2.1.4. Voie métabolique des espèces réactives de l'oxygène et surtoxification 81
1.6.2.1.4.1. Généralités sur les espèces réactives de l'oxygène 81
1.6.2.1.4.2. Anion superoxyde $O_2^{-\cdot}$ 82
1.6.2.1.4.3. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 83
1.6.2.1.4.4. Le radical hydroxyle $OH^{\cdot}$ 85
1.6.2.1.4.5. L'oxygène singulet $^1O_2$ 86
1.6.2.1.5. Implication de la myéloperoxydase (MPO) 88
1.6.2.1.6. Autres enzymes potentielles d'activation 93
1.6.2.1.6.1. La NADPH oxydase 94
1.6.2.1.6.2. L'aldéhyde oxydase 94
1.6.2.1.6.3. La xanthine oxydoréductase 96
1.6.2.1.6.4. Rôle de la NAD(P)H oxydoréductase 98
1.6.2.1.7. Principe du concept de formation de métabolites "in situ" 99
1.6.2.1.8. Rôle de la peau 100
1.6.2.2. Le "p-i" concept : l'activation spontanée 102
1.6.2.3. L'hypothèse du (signal) danger 104
1.6.3. La piste de l'immunodépression 105
1.6.4. Orientation de la réponse immunologique 106
1.7. Prise en charge et traitements 109
1.8. Evolution 110

2. Propriétés pharmaco-toxicologiques de la carbamazépine 112
2.1. Propriétés physico-chimiques 112
2.2. Utilisation thérapeutique 113
2.3. Pharmacodynamie 114
2.4. Effets indésirables 115
2.5. Toxicologie clinique 120
2.6. Pharmacocinétique et métabolisme 121
2.6.1. Métabolites de la carbamazépine 123
2.6.1.1. Métabolites présents au niveau sanguin 123
2.6.1.2. Métabolites urinaires 123
2.6.1.2.1. Carbamazépine 123
2.6.1.2.2. Dérivés époxydes et dihydro-dihydroxylés 124

2.6.1.2.3. Dérivés hydroxy-trans-dihydro-dihydroxylés..... 125
2.6.1.2.4. Dérivés hydroxylés (phénols ou catéchols) 125
2.6.1.2.5. Dérivés décarbamoylés ou iminostilbènes..... 127
2.6.1.2.6. Dérivés acridiniques 129
2.6.2. Principales voies métaboliques..... 129
2.6.2.1. Voie métabolique des composés hydroxylés de la carbamazépine (phénols): 129
2.6.2.1.1. Données humaines in vitro 129
2.6.2.1.1.1. Voie dépendante des cytochromes P450 129
2.6.2.1.1.2. Voie dépendante de la myéloperoxidase..... 132
2.6.2.1.2. Données humaines in vivo..... 132
2.6.2.1.3. Rapprochement des données in vitro et in vivo..... 133
2.6.2.2. Voie métabolique des dérivés acridiniques 134
2.6.2.2.1. Données humaines in vitro 134
2.6.2.2.1.1. Voie dépendante des cytochromes P450 134
2.6.2.2.1.2. Voie dépendante de la myéloperoxidase..... 134
2.6.2.2.2. Données humaines in vivo..... 136
2.6.2.3. Réactions de conjugaison..... 137
2.6.2.3.1. N-glucuroconjugaison..... 137
2.6.2.3.2. O- glucuroconjugaison..... 139
2.6.2.3.3. Sulfoconjugaison 139
2.7. Suivi pharmacologique thérapeutique 141
3. Réactivité de la carbamazépine et de ses métabolites..... 143
3.1. Réactivité de la carbamazépine.....143
3.2. Réactivité des carbamazépine-époxydes 146
3.3. Réactivité des dihydro-dihydroxy-carbamazépines.....150
3.4. Réactivité des 2- et 3-hydroxy-carbamazépines et de leur catéchol 2,3-dihydroxy-carbamazépine.....150
3.5. Réactivité de l'iminostilbène.....155
3.6. Réactivité des dérivés acridiniques.....155
3.6.1. Réactivité du 9-hydroxy-méthyl-10-acridan..... 155
3.6.2. Réactivité du 9-acridinecarboxaldéhyde..... 155
3.6.3. Réactivité de l'acridine..... 157
3.6.4. Réactivité de l'acridone..... 158
3.6.5. Réactivité des dérivés chlorés de l'acridone 158
4. Discussion..... 160

Deuxième partie : Exploration de l'effet de la carbamazépine et de ses métabolites sur la sécrétion des cytokines : étude *ex vivo*, sur le sang de patients épileptiques traités, de la stimulation de la production d'IL-2, IL-5, IL-6, IL-10 et IFN-γ par la carbamazépine, le carbamazépine-10,11-époxyde, l'acridine et l'iminostilbène. Influence de la co-médication par l'acide valproïque et la lamotrigine.

1. Justification scientifique des expérimentations 165

2. Méthodologie 167

2.1. Patients sources 167

2.2. Prélèvements sanguins 168

2.3. Réactifs 168

2.4. Expérimentation ex vivo 168

2.5. Méthodes analytiques 169

2.6. Analyse statistique 169

3. Résultats 170

3.1. Description des patients sources 170

3.2. Profil basal des taux de cytokines 170

3.3. Production des cytokines après stimulation ex vivo 173

4. Discussion 177

4.1. Absence de groupe contrôle 177

4.2. Augmentation de la production d'IL-2 177

4.3. Modulation de la production d'IL-6 178

4.4. Modulation de la production d'IL-10 et d'IFN-γ 179

4.5. Modulation de la production d'IL-5 et influence de l'acide valproïque 181

5. Conclusion 183

Troisième partie : Présence et formation *ex vivo* d'acridone dans le sang de patients chroniquement traités par carbamazépine : exploration de la voie métabolique du 9-acridinecarboxaldéhyde.

1. Justification scientifique des expérimentations 185

2. Méthodologie 186

2.1. Patients sources 186

2.2. Prélèvements sanguins 187

2.3. Réactifs 187

2.4. Expérimentation ex vivo 188

2.5. Méthodes analytiques 188

2.6. Analyse statistique 189

3. Résultats 190

3.1. Description des patients 190

3.2. Exploration des taux circulant de CBZ et de se métabolites chez les patients traités de façon chronique 191

3.3. Expérimentations ex vivo 192

4. Discussion 200

4.1. Exploration des taux circulants des métabolites de la carbamazépine chez les patients traités chroniquement 200

4.2. Expérimentations ex vivo 201

5. Conclusion 204

Quatrième partie : Comparaison des concentrations plasmatiques de carbamazépine et de ses métabolites chez des patients hypersensibles à la carbamazépine, chez des patients traités sans effet indésirable avec la carbamazépine seule ou co-traités avec de l'acide valproïque.

1. Justification scientifique des expérimentations 208

2. Méthodologie 209

2.1. Patients et profil de l'étude 209

2.2. Echantillons sanguins 211

2.3. Réactifs 212

2.4. Méthode analytique 212

2.5. Analyse statistique 212

3. Résultats 212

3.1. Description des patients 212

3.2. Résultats analytiques 214

4. Discussion 222

5. Conclusion 225

Cinquième partie : Données relatives à la présence des métabolites de la carbamazépine chez les patients traités par oxcarbazépine.

1. Justification scientifique 227

2. Méthodologie 227

3. Résultats et discussion 228

4. Conclusion 229

Sixième partie : Aperçu du devenir post-excrétionnel de la carbamazépine et de ses métabolites : effet des procédés de traitement des eaux usées et exposition environnementale.

1. Justification scientifique des expérimentations 231

2. Résumé des résultats expérimentaux 242

Septième partie : Discussion générale

1. Contribution à la connaissance des propriétés pharmaco-toxicologiques des métabolites sanguins acridiniques 244

2. Autres molécules médicamenteuses pouvant générer des dérivés acridiniques……249

2.1. Dérivés directs de la carbamazépine et de l'oxcarbazépine 249

2.2. Molécules possédant un squelette chimique proche de celui de la carbamazépine 250

2.3. Molécules possédant déjà le noyau acridine.....253

3. Métabolisme oxydatif de la carbamazépine et effets indésirables de type hypersensibilité 255

CONCLUSION..... 261

Références Bibliographiques 263

ANNEXES……297

TABLE DES FIGURES

Figure 1 - Activation des dérivés oxygénés du benzène par le système $MPO/H_2O_2/Cl^-$. 91

Figure 2 - Formule développée de la carbamazépine et sa numérotation chimique 112

Figure 3 - Principaux squelettes chimiques des métabolites de la carbamazépine. 122

Figure 4 - Origine métabolique probable des diastéréoisomères de la 10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepine 124

Figure 5 - Origines métaboliques potentielles des 2- et 3-hydroxy-*trans*-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepine 126

Figure 6 - Origines métaboliques probables des principaux dérivés hydroxylés (phénols et catéchols) 127

Figure 7 - Origines métaboliques probables des dérivés iminostilbènes de la carbamazépine 128

Figure 8 - Formule développée de l'iminoquinone (IQ). 130

Figure 9 - Isoformes des cytochromes P450 identifiés *in vitro* dans le métabolisme de phase I des dérivés hydroxylés de la carbamazépine chez l'homme (enzymes microsomaux hépatiques). 131

Figure 10 - Origines proposées des métabolites acridiniques de la carbamazépine chez l'homme. 137

Figure 11 - Voies préférentielles de conjugaison des métabolites de la carbamazépine chez l'homme 140

Figure 12 - Formule développée de la carbamazépine-*o*-quinone (CBZ-o-Q) 152

Figure 13 - Formule développée de l'amsacrine, agent intercalant dérivé de l'acridine 158

Figure 14 - Voie métabolique des principaux métabolites réactifs déterminés *in vitro* à partir d'études de liaisons irréversibles de radio-marqueurs 159

Figure 15 - Taux basaux d'IL-2, d'IL-5, d'IL-6, d'IL-10 et d'IFN-γ chez des patients épileptiques traités de façon chronique par carbamazépine seule (CBZ) ou en association avec l'acide valproïque (CBZ + AV) ou avec la lamotrigine (CBZ + LAMO). 172

Figure 16 - Effet solvant sur la production de cytokines. 174

Figure 17 - Production nette (déduite du taux basal) d'IL-5 et d'IL-10 à la fin de l'incubation de 3h en conditions *ex vivo* de sang de patients épileptiques stimulés avec de l'acridine. 176

Figure 18 – Occurrences de la formation d'IM, d'AI et d'AO dans le sang de patients traités par carbamazépine incubés *ex* vivo avec différents précurseurs métaboliques potentiels. 194

Figure 19 - Formation d'AO après incubation *ex* vivo dans le sang de patients traités par CBZ après différents temps d'incubation. 195

Figure 20 – Corrélation positive significative observée entre la production d'AO dans le sang de patients traits par CBZ et le niveau du précurseur métabolique testé...... 197

Figure 21 - Variation des concentrations de CBZ, CBZ-EP, IM et AI pour 3 temps d'incubation testés. 199

Figure 22 - Métabolisme de la CBZ proposé dans le sang périphérique de patients traits de façon chronique par la carbamazépine...... 206

Figure 23 - Régressions linéaires entre le ratio (CBZ-EP/CBZ) et la concentration plasmatique de CBZ, le ratio (CBZ-EP/DiOH-CBZ) et la concentration plasmatique de CBZ-EP, le ratio (9ac/DiOH-CBZ) et la concentration plasmatique de DiOHCBZ, et le ratio (9ac/CBZ) et la concentration plasmatique de CBZ pour 2 groupes de patients sans effets indésirables. 219

Figure 24 - Origines métaboliques des dérivés acridiniques tenant compte de nos conclusions...... 248

Figure 25 - Représentation schématique de la contribution cumulative des différents acteurs impliqués dans l'élévation du potentiel immunologique...... 260

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Données démographiques et fréquences des signes cliniques et biologiques retrouvés dans les DRESS..... 31

Tableau 2 - Critères diagnostiques du DRESS et du DIHS selon les auteurs 32

Tableau 3 - Données démographiques et fréquences des signes cliniques et biologiques retrouvés dans les DRESS à la carbamazépine d'après différentes sources...... 47

Tableau 4 - Réactivité croisée évaluée sur l'apparition d'un rash cutané entre molécules antiépileptiques...... 62

Tableau 5 - Association entre les molécules thérapeutiques mises en cause dans des réactions d'hypersensibilité, les enzymes impliqués dans le métabolisme, les organes atteints, et les épitopes reconnus par les anticorps présents dans le sérum des patients. 80

Tableau 6 - Nature des métabolites réactifs produits par le système MPO/H_2O_2/Cl^- et par les neutrophiles activés identifiés chez des médicaments associés à des agranulocytoses. 92

Tableau 7- Effets indésirables de la carbamazépine classés par systèmes et organes et par fréquences..... 117

Tableau 8 - Excrétion urinaire de la carbamazépine et de ses métabolites chez l'homme...... 138

Tableau 9 - Contribution relative des différents isoformes des CYP450 à la formation d'adduct à partir de la carbamazépine et de la 3-hydroxy-carbamazépine. 153

Tableau 10 - Résultats de l'analyse statistique des expérimentations *ex vivo*. 175

Tableau 11 - Limites de détection et de quantification de la méthode de chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse pour le dosage de la CBZ et de l'OxCz et de leurs métabolites 189

Tableau 12 - Concentrations de la CBZ et de ses métabolites dans le plasma de patients traités par CBZ. 191

Tableau 13 - Formation d'AO après incubation avec différentes concentrations de précurseurs métaboliques testées. 196

Tableau 14 - Description et comparaison des caractéristiques des groupe CBZ et CBZ-AV de référence. 213

Tableau 15 - Concentrations de CBZ, CBZ-EP, DiOHCBZ dans les groupes de référence 215

Tableau 16 - Régressions (y= a + bx) entre les concentations plasmatiques ou les ratios de concentations plasmatiques, et la dose de CBZ ou les concentrations du précurseur métabolique dans le groupe CBZ. 215

Tableau 17 - Equations des régressions linéaires (y = a + bx) entre les concentrations plasmatiques et le ratio dose/poids (x) pour le groupe CBZ et le groupe CBZ-AV. 217

Tableau 18 - Equations des régressions linéaires (y = a + bx) entre les concentrations de 9ac et de CBZ, CBZ-EP et DiOH-CBZ pour le groupe CBZ et le groupe CBZ-AV. 218

Tableau 19 - Comparaison entre le ratio (concentration intra-érythrocytaire / concentration plasmatique) des patients traités par CBZ sans hypersensibilité (contrôle), un patient atteint de DRESS, et un patient atteint d'urticaire simple. 221

Tableau 20 - Pourcentage de présence des métabolites mineurs de la CBZ dans différents groupes cliniques. 222

Tableau 21 - Caractéristiques des patients traités par OxCz pour lesquels la recherche des métabolites a été réalisée. 228

Tableau 22 - Concentrations de l'OxCz et des métabolites potentiels dans le plasma de patients traités par OxCz. 230

TABLE DES EQUATIONS

Équation 1..... **81**

Équation 2..... **81**

Équation 3..... **81**

Équation 4..... **81**

Équation 5..... **82**

Équation 6..... **82**

Équation 7..... **82**

Équation 8..... **83**

Équation 9..... **83**

Équation 10..... **83**

Équation 11..... **84**

Équation 12..... **84**

Équation 13..... **84**

Équation 14..... **84**

Équation 15..... **84**

Équation 16..... **84**

Équation 17..... **84**

Équation 18..... **85**

Équation 19..... **85**

Équation 20..... **85**

Équation 21..... **85**

Équation 22..... **85**

Équation 23..... **85**

Équation 24..... **85**

Équation 25..... **86**

Équation 26..... **87**

Équation 27..... **87**

Équation 28..... **87**

Équation 29..... **87**

Équation 30..... **87**

Équation 31..... **87**

Équation 32..... **87**

Équation 33..... **87**

Équation 34..... **87**

Équation 35..... **88**

Équation 36..... **88**

Équation 37..... **93**

Équation 38..... **94**

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Mécanisme du réarrangement pinacolique à partir de la DiOH-CBZ……297

Annexe 2 : Mail d'acceptation de la publication dans Pharmacological reports……...298

Annexe 3 : Méthode de dosage de la CBZ et de ses dérivés par LC/MS publiée par notre équipe en 2005……..299

Annexe 4 : Mail d'acceptation de la publication dans Xenobiotica……. 310

Annexe 5 : Premières pages de l'accord de consortium pour le projet ANR……311

TABLE DES ABREVIATIONS

10-OH-CBZ : 10-hydroxy-carbamazépine

2,3-diOH-CBZ : 2,3-dihydroxy-carbamazépine

2-OH-CBZ : 2-hydroxy-carbamazépine

3-OH-CBZ : 3-hydroxy-carbamazépine

9ac : 9-hydroxyméthyl-10-carbamoylacridan

AI : acridine

AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdien

AO : acridone

ARE : Antioxydants Response Element

CBZ : carbamazépine

CBZ-EP : Carbamazépine-10,11-époxyde

CBZ-o-Q : Carbamazépine-o-Quinone

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : cytomégalovirus

Coll. : collaborateurs

CYP450 : cytochrome P450

DBA^{2+} : Diméthylbisacridinium

DIHS : *Drug Induced Hypersensitivity Syndrome*

DiOH-CBZ : *trans*-10,11,dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazépine

DRESS : *Drug Rash (*ou *Reaction) with Eosinophilia and Systemic Symptoms*

EBV : virus d'Epstein-Barr

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ELISPOT : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay SPOT

EPOx : Peroxydase des polynucléaires éosinophiles

$GS^{\cdot}$: Radical thiyle du glutathion

GSH/GS : Glutathion réduit/oxydé

H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)

HHV : Human Herpes Virus

HLA : Human Leucocyte Antigen

$HO^{\cdot}$: Radical hydroxyle

$HO_2^{\cdot}$: Radical perhydroxyle

HSP : Heat Shock Protein

IFN : Interferon

IgE, IgG, IgM : Immunoglobuline de type E, G, M

IL : Interleukine

IM : iminostilbène

IQ : Iminoquinone

LLOD : *Lowest Limit of Detection*, limite de détection

LLOQ : *Lowest Limit of Quantitation*, limite de quantification

LOECs : Lowest Observed Effect Concentrations

LPS : LipoPolySaccharide

MPO : Myéloperoxydase

NAD(P)H : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate) réduit

NK : Natural Killer

$NO^{\cdot}$: Monoxyde d'azote

NOELs : No Observed Effect Levels

$^1O_2$ / $^3O_2$: Oxygène singulet / triplet

$O_2^{-\cdot}$: Anion superoxyde

$ONOO^-$: Anion peroxynitrite

OxCz : Oxcarbazépine

PBMC : Peripheral blood mononuclear cell

PEAG : Pustulose Exanthématique Aiguë Généralisée

PHA : Phytohémagglutinine

p-i concept : *pharmacological interactions of drugs with immune receptors*

PMA : PhorbolMyristateAcétate

RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit

SJS : *Syndrome de Stevens-Johnson*

SNPs : Single Nucleotide Polymorphism

T-reg : Lymphocyte T à fonction régulatrice de la réponse immunitaire

TCD4, TCD8 : Lymphocytes T présentant les marqueurs de différentiation CD4, CD8

TCR : T-Cell Receptor, récepteur des lymphocytes T

TEN : *Toxic Epidermal Necrolysis*, nouvelle désignation du syndrome de Lyell

TGF : Tumor Growth Factor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TTL : Test de Transformation Lymphocytaire

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

INTRODUCTION

La carbamazépine est une molécule thérapeutique largement utilisée avec des indications en épileptologie, psychiatrie et algologie. Comme d'autres médicaments, son utilisation peut conduire à des réactions d'hypersensibilité particulières, d'incidence faible mais potentiellement létales. Ces réactions se manifestent cliniquement par des atteintes cutanées de divers grades et formes, associées ou non à des atteintes systémiques pouvant concerner les lignées sanguines ainsi que divers organes profonds au cours de syndromes plus ou moins identifiés nosologiquement, comme par exemple le DRESS (*Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms*) syndrome qui associe typiquement une hyperéosinophilie, un rash cutané et des atteintes multi-viscérales. Les bases immunologiques qui sous-tendent ces réactions d'hypersensibilité aux médicaments ne sont pas tranchées et plusieurs hypothèses physiopathologiques impliquant les voies immunologiques cytotoxiques (activation directe du récepteur des lymphocytes T [TCR] ou p-i concept) et/ou humorales (formation de néoantigènes pouvant induire la formation d'auto-anticorps) coexistent. Ces hypothèses physiopathologiques font davantage, mais de façon non exclusive, appel aux métabolites générés plutôt qu'à la carbamazépine elle-même. Plusieurs voies métaboliques semblent pouvoir générer des métabolites, consensuellement dénommés "métabolites réactifs", capables d'établir des liaisons covalentes avec les protéines ou les acides nucléiques endogènes et pouvant ainsi générer des néoantigènes. La "réactivité" de ces métabolites est supposée si intense que la formation d'adducts avec les molécules endogènes doit avoir lieu dans l'environnement immédiat du site de formation, ce raisonnement est à la base du principe dit de "formation *in situ*". Le sang est un lieu

métabolique d'intérêt particulier pour justifier des atteintes multiviscérales dans le contexte du principe de formation *in situ*, puisqu'en irriguant les organes avec ses nutriments et son équipement métabolique il permet de rendre compte du paradoxe apparent associant dissémination et confinement spatial de la réaction. De nombreux travaux scientifiques ont exploré la voie métabolique des dérivés hydroxylés de la carbamazépine (phénols et catéchols) mais peu d'équipes scientifiques se sont intéressées à la voie métabolique minoritaire des dérivés acridiniques, c'est à dire des dérivés du noyau acridine. Par ailleurs les mécanismes sous-tendant l'hyperéosinophilie, signe biologique discriminant et quasi pathognomonique des syndromes d'hypersensibilité de type DRESS, restent inexpliqués. Enfin, la carbamazépine est à présent utilisée comme marqueur anthropique par les sciences de l'environnement au même titre que les œstrogènes tant l'exposition environnementale est conséquente. Métabolisme humain et processus oxydatifs environnementaux partageant des voies chimiques communes, et les produits d'aval du premier étant les réactifs d'amont des seconds, un regard pharmacologique éclairé sur les données expérimentales environnementales peut être contributif. La question du degré de dégradation des produits rejetés après traitement des eaux usées est encore peu explorée mais est un pré-requis avant toute tentative dévaluation des risques pour l'homme, c'est-à-dire lorsque les produits des processus de traitement environnementaux doivent être considérés comme les composés d'amont du métabolisme humain.

Première partie : Synthèse bibliographique : les effets indésirables de type hypersensibilité des médicaments, les propriétés pharmaco-toxicologiques de la carbamazépine, les métabolites réactifs et cytotoxiques candidats.

1. Effets indésirables de type hypersensibilité liés aux médicaments

1.1. Essai de définition

Le titre de ce premier chapitre destiné à donner un aperçu de l'état des connaissances sur les réactions idiosyncrasiques imputées aux médicaments aurait pu s'appeler plus simplement réactions d'hypersensibilité aux médicaments mais, nous allons essayer de l'illustrer, le terme d'hypersensibilité est fortement associé à des théories voire des écoles nosologiques, physiopathologiques et mécanistiques. En effet, plusieurs appellations ont été données à une réponse inattendue et délétère de l'organisme à un médicament administré à dose thérapeutique, avec un rapport bénéfice/risque pourtant favorable pour la grande majorité des patients. Ce sont les réactions que la pharmacologie range dans la catégorie des effets indésirables de type B ou idiosyncrasiques. Certaines réactions sont immédiates, franches et massives, dès la première prise d'un médicament, c'est le type même de l'hypersensibilité immédiate, d'autres sont différées avec des tableaux cliniques très variables qu'il est très difficile d'individualiser. Actuellement, les recherches portant sur les réactions d'hypersensibilité sont polarisées vers les réactions sévères autres que de type immédiat, incluant les manifestations cutanées et englobant ou non, selon les hypothèses sous-jacentes, les réactions modérées. Les premiers effets indésirables sévères combinant manifestations

cutanées et atteintes organiques étant apparus avec les antiépileptiques (phénytoïne d'abord [Chaiken et coll., 1950], puis phénobarbital et carbamazépine), la première désignation de ces réactions a été "syndrome d'hypersensibilité aux anticonvulsivants" (A*nticonvulsant Hypersensitivity Syndrome*) (Shear et Spielberg, 1988 ; Knowles et coll., 1999). Puis ce syndrome étant apparu avec d'autres molécules et étant fréquemment associé à une hyperéosinophilie, la restriction aux médicaments anticonvulsivants a disparu et le terme de syndrome d'hypersensibilité de type DRESS (*Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms*) a été proposé (Bocquet et coll., 1996) puis l'acronyme a été un peu modifié par Begon et coll. (2004) (*Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms*) pour tenir compte des cas où les manifestations cutanées sont faibles ou absentes. Mais l'hyperéosinophilie n'étant pas constante, un autre terme a aussi été utilisé, le syndrome multiorganique d'hypersensibilité retardée induit par les médicaments (*Drug-Induced Delayed MultiOrgan Hypersensitivity Syndrome*, DIDMOHS), mettant l'accent sur le délai significatif d'apparition entre la première exposition et le début des signes cliniques et donc élargissant encore le champ d'étude (Sontheimer et Houpt, 1998). Enfin, une nouvelle appellation venue du Japon, syndrome d'hypersensibilité induite par les médicaments (*Drug-Induced Hypersensitivity Syndrome*, DIHS), propose l'introduction d'un critère de réactivation virale et impose par la même une hypothèse physiopathologique (Hashimoto et coll., 2003 ; Shiohara et coll., 2007).

La diversité des appellations reflète la diversité des tableaux cliniques observés. Une étude rétrospective de notre équipe a analysé les cas de réactions cutanées avec symptômes systémiques enregistrés entre 1985 et 2000 dans la banque de données de la pharmacovigilance française (Peyrière et coll., 2006). Les critères d'inclusion étaient ceux du DRESS de l'époque : éruption cutanée fébrile avec hyperéosinophilie et/ou

symptômes systémiques avec fièvre et anomalies hépatiques, rénales, cardiaques ou respiratoires au cours d'un traitement par antiépileptiques, minocycline, allopurinol, abacavir ou névirapine. Les sulfamides étaient exclus. Dans les résultats, aucun symptôme n'est identifié comme constant, y compris la fièvre et l'hyperéosinophilie (**Tableau 1**). Les atteintes cutanées sont les signes les plus rapportés et l'hyperéosinophilie est plus fréquemment associée aux atteintes systémiques. Aucune association franche entre un syndrome et un médicament n'apparaît. Toutefois la lamotrigine est plus souvent associée à la fièvre et la nécrolyse épidermique chronique (syndrome de Lyell), l'allopurinol à une atteinte rénale avec hyperéosinophilie sans fièvre et d'apparition tardive (7 mois après le début du traitement), la minocycline à des adénopathies périphériques, une hyperéosinophilie, des anomalies cardiaques et une pneumopathie à éosinophiles, l'abacavir à des symptômes gastro-intestinaux et une pseudo pneumonie virale aiguë. Le délai de latence entre le début de l'exposition et l'apparition des signes apparaît relativement plus élevé pour la carbamazépine (différence également retrouvée dans une étude turque [Mansur et coll., 2005]).

Les données de cette étude rapprochées à l'analyse des données d'une revue basée sur les critères du DRESS japonais donnent de nombreuses discordances probablement à mettre sur le compte d'un biais important de recrutement et donc sur des différences de fond dans la définition du DRESS (**Tableau 1**). Il faut ajouter que les différents critères ne sont pas contemporains les uns des autres mais suivent une cinétique d'apparition et de disparition décalée au cours des syndromes compliquant leur recueil exhaustif. La définition d'un syndrome bien isolé d'hypersensibilité applicable à tout médicament semble donc illusoire si elle veut s'appuyer sur des critères aussi bien chronologiques que cliniques ou biologiques, ou encore pharmaco-chimiques trop définis.

Tableau 1 - Données démographiques et fréquences des signes cliniques et biologiques retrouvés dans les DRESS à différents médicaments d'après différentes sources

	Carbamazépine		**Phénytoïne**		**Phénobarbital**		**Lamotrigine**		**Allopurinol**		**Minocycline**	
	Enquête (France)[a] n=63, 29%[c]	Revue (Japon)[b] n=8	Enquête (France) n=7, 3%	Revue (Japon) n=2	Enquête (France) n=10, 5%	Revue (Japon) n=4	Enquête (France) n=7, 3%	Revue (Japon) n.r.	Enquête (France) n=21, 10%	Revue (Japon) n=4	Enquête (France) n=18, 8%	Revue (Japon) n.r.
Age médian, intervalle	52 [15-78]	n.r.	52 [17-77]	n.r.	48 [22-85]	n.r.	26 [7-79]	n.r.	67 [38-94]	n.r.	20 [14-48]	n.r.
Sexe (M/F)	33/30	n.r.	3/4	n.r.	9/1	n.r.	1/6	n.r.	7/14	n.r.	11/7	n.r.
Délai d'apparition (j)[1]	30 [3-690]	36.8	11 [2-35]	40.5	21 [4-43]	31.7	15 [1-35]	n.r.	28 [8-480]	32.2	21 [6-30]	n.r.
Fièvre (%)	65%	C. I.	**43%**	C. I.	80%	C. I.	100%	n.r.	**23%**	C. I.	94%	C. I.
Eruption cutanée	100%	++	100%	++	80%	++	100%	n.r.	95%	++	94%	++
SJS	0 cas	n.r.	1 cas	n.r.	0 cas	n.r.	2 cas	n.r.	0 cas	n.r.	1 cas	n.r.
TEN	2 cas	n.r.	0 cas	n.r.	1 cas	n.r.	3 cas	n.r.	0 cas	n.r.	1 cas	n.r.
Hyperéosinophilie	92%	++	100%	++	100%	++	**0%**	n.r.	62%	++	72%	+++
Adénopathie(s)	22%	++	14%	++	20%	+++	28%	n.r.	10%	+	**78%**	+++
Atteinte hépatique[2]	73%	++	57%	+++	80%	++	**28%**	n.r.	62%	+	72%	+++
Atteinte pulmonaire[3]	11%	+	0%	+	0%	+	14%	n.r.	0%	+	11%	+++
Atteinte rénale[4]	8%	+	0%	+	0%	+	14%	n.r.	**43%**	+++	17%	+
Atteinte cardiaque[5]	2%	n.r.	0%	n.r.	0%	n.r.	0%	n.r.	0%	n.r.	5%	n.r.
Atteinte gastro-intestinale[6]	3%	n.r.	0%	n.r.	**50%**	n.r.	0%	n.r.	0%	n.r.	0%	n.r.
Lymphocytes atypiques	10%	++	14%	++	10%	+++	0%	n.r.	0%	++	**33%**	++
Leucocytose	n.r.	++	n.r.	++	n.r.	++	n.r.	n.r.	n.r.	++	n.r.	++
Anémie	0%	n.r.	14%	n.r.	10%	n.r.	14%	n.r.	5%	n.r.	11%	n.r.
Thrombocytose	0%	n.r.	0%	n.r.	0%	n.r.	0%	n.r.	0%	n.r.	5%	n.r.
Thrombocytopénie	3%	n.r.	0%	n.r.	0%	n.r.	**28%**	n.r.	0%	n.r.	5%	n.r.
Neutropénie	2%	n.r.	14%	n.r.	0%	n.r.	14%	n.r.	5%	n.r.	5%	n.r.

[a] : Analyse des données de la banque française de pharmacovigilance, critères d'inclusion : éruption cutanée fébrile avec hyperéosinophilie et/ou symptômes systémiques avec fièvre et anomalies hépatiques, rénales, cardiaques ou respiratoires au cours d'un traitement par antiépileptiques, minocycline, allopurinol, abacavir ou névirapine (Peyrière et coll., 2006); [b] : Revue de la littérature, DRESS défini par les critères japonais (Kano et Shiohara, 2009). *Il est noter que les critères de caractérisation de DRESS ne sont pas exactement superposables dans les enquêtes (Drug Reaction / DRESS indéterminé / DRESS comme DIHS typique ou atypique).* [c] : pourcentage de cas liés au médicament par rapport au total de cas de DRESS inclus; **C.I.** : Critère d'inclusion; **n.r.** : non renseigné; **+, ++, +++** : fréquence (ordre de grandeur en pourcentages non précisé); [1] : délai entre la première prise du médicament et le premier signe observé; [2] : élévation des enzymes hépatiques (particulièrement ASAT et ALAT); [3] : pneumopathie éosinophile, toux, dyspnée; [4] : insuffisance rénale aiguë, protéinurie, néphrite interstitielle; [5] : péricardite, atteinte myocardique; [6] : diarrhée, douleurs abdominales.
Les données en **gras** indiquent les différences entre les médicaments, les données grisées indiquent les discordances entre les fréquences rapportées par les auteurs.

C'est ainsi que les contours des syndromes d'hypersensibilité définis par des consensus japonais (DIHS) ou européens (tel que défini dans le registre des réactions cutanées sévères aux médicaments, RegiSCAR) font appel à des critères combinatoires peu restrictifs (**Tableau 2**).

Tableau 2 - Critères diagnostiques du DRESS et du DIHS selon les auteurs

Critères initiaux du DRESS (Bocquet et coll., 1996)	**Critères du DIHS (Shioara et coll., 2006)**	**Critères d'inclusion dans le RegiSCAR (Kardaun et coll., 2007)**
		Hospitalisation suite à une réaction suspectée d'être liée à un médicament
	Fièvre > 38°C*	Fièvre > 38°C*
Eruption cutanée	Eruption maculo-papuleuse se développant 3 semaines au moins après l'exposition à certains médicaments*	Rash cutané aigu*
Anomalies hématologiques dont hyperéosinophilie > 1.5 G/l ou lymphocytes atypiques	Anomalies hématologiques*: Leucocytose > 11 G/l Lymphocytose atypique > 5% Hyperéosinophilie > 1.5 G/l	Anomalies hématologiques : Lymphocytose ou lymphopénie* Hyperéosinophilie relative ou absolue* Thrombocytopénie*
Atteintes systémiques incluant adénopathies de diamètre > 2 cm, hépatites, néphrite interstitielle, pneumonie interstitielle ou cardite	ALAT > 100 U/l ou atteinte organique autre qu'hépatique* Adénopathie(s)	Atteinte d'au moins un organe interne* Apparition de ganglions sur au moins deux sites différents*
	Prolongement des signes cliniques 2 semaines après l'arrêt du médicament impliqué*	
	Réactivation de l'HHV6	
Critères majeurs : Atteintes organiques Hyperéosinophilie (Roujeau, 2005)	**Critère cumulatif :** DIHS typique si tous les critères DIHS atypique si 5 critères suivis de *	**Critère cumulatif :** Au moins 3 des critères suivis de *

1.2. Epidémiologie

La part des réactions idiosyncrasiques a été estimée comme pouvant atteindre 25 % de la totalité des effets indésirables (Pohl et coll., 1988), à côté des effets idiopathiques banals et des réactions dose-dépendantes. Une étude new-yorkaise rapporte que 14.3 % des patients traités par des antiépileptiques présentaient un rash à une molécule et 2.8 % à 2 molécules ou plus (Hirsch et coll., 2008). Il est toutefois hasardeux d'aller plus avant dans des données chiffrées de portée générale tant le recueil et l'imputation des effets indésirables est une activité soumise à de nombreux biais (Demoly et Hillaire-Buys, 2004). L'analyse descriptive de données recueillies est plus facile, devoir ensuite est d'interpréter ces données au regard des biais d'inclusion supposés. Il ne semble pas qu'il y ait un effet sexe ou ethnie si on considère les réactions sous l'angle de la définition la plus large (Knowles et coll., 1999). En revanche un effet ethnie (Roujeau en 2005 ; Hung et coll. en 2006) ou sexe (Peyrière et coll. [2006] en faveur d'un effet sexe ou Shioara et coll. [2006] en faveur de l'absence d'un effet sexe) peut apparaître selon la définition des sous-groupes. La définition du DRESS étant floue, une hétérogénéité dans le recensement des cas rend difficile toute enquête épidémiologique rétrospective valable, de plus les données que peut collecter de façon plus homogène une seule équipe sont rares (Eshki et coll. [2009] ont recruté 15 patients en 12 ans). Sur une étude rétrospective israélienne portant sur une période de 7 ans, incluant seulement 8 patients atteints de DRESS au sens de "*Drug Rash*", les auteurs identifieraient un effet sexe : les femmes seraient atteintes plus jeunes et plus précocement après la prise des médicaments, et un effet molécule, la carbamazépine serait plus impliquée (Maoz et Brenner, 2007). Une autre étude rétrospective turque portant sur la période 1995-2007 incluant 31 patients sur la base de 3 des 5 critères du DRESS limitée aux anticonvulsivants indique que la carbamazépine est la première molécule impliquée

suivie de la phénytoïne et de la lamotrigine (Mansur et coll., 2008). Les données françaises plus riches mais incluant des patients atteints de DRESS au sens de "*Drug Reaction*", semblent indiquer un sex-ratio de même tendance (1/45) correspondant assez bien aux données recueillies dans la littérature (1/34) (Peyrière et coll., 2006). La carbamazépine est ici encore la première molécule impliquée.

1.3. Classification nosologique

Les réactions d'hypersensibilité aux médicaments présentent donc une grande variabilité clinique qui rend difficile l'exploration physiopathologique et mécanistique. Deux stratégies scientifiques sont possibles : opérer une distinction entre les formes cliniques des syndromes avec l'hypothèse qu'aux variations d'expression est associé un mécanisme effecteur distinct, c'est l'approche analytique des "splitters" (Roujeau et Stern, 1994), ou rassembler toutes les formes cliniques avec l'hypothèse que l'effecteur commun est un métabolite réactif, c'est l'approche synthétique des "mergers" (Knowles et coll., 2000).

1.3.1. Approche des "mergers", les syndromes des métabolites réactifs

Selon les "mergers", les réactions idiosyncrasiques peuvent toucher divers organes et systèmes soit sous forme isolée (par exemple hépatite), soit sous forme d'un syndrome. Un certain nombre de manifestations semble avoir pour origine la réactivité des métabolites de l'agent thérapeutique avec les constituants de l'organisme traité. Trois grands types d'effets indésirables liés aux médicaments sont ainsi réunis et regroupés

sous le nom de syndromes des métabolites réactifs (*Reactive Metabolite Syndromes*) : le syndrome d'hypersensibilité, les réactions aux médicaments mimant une maladie sérique et les lupus induits par les médicaments.

1.3.1.1. Le syndrome d'hypersensibilité

Le syndrome d'hypersensibilité aux médicaments est défini d'un point de vue clinique par la présence de fièvre, d'un rash et d'une défaillance d'organe interne qui surviennent entre 2 et 8 semaines après la première prise d'un médicament (l'intervalle moyen pour la phénytoïne est de 17-21 jours et de 21-28 jours pour la carbamazépine). L'apparition des signes peut survenir en 1 jour chez des sujets déjà sensibilisés. La fièvre s'accompagne de malaise souvent associé à une pharyngite et à une adénopathie cervicale. Les manifestations cutanées vont de la simple rougeur symétrique à des manifestations bulleuses type syndrome de Stevens-Johnson ou nécrolyse épidermique toxique qui apparaissent peu de temps après la fièvre. L'atteinte organique touche très fréquemment le foie mais aussi la moelle osseuse (thrombocytopénie, agranulocytose, anémie aplasique), le rein (néphrite interstitielle, insuffisance rénale aiguë), le système nerveux central (encéphalites, méningite aseptique), l'intestin (colite) et le poumon (pneumonie interstitielle). Certains patients présentent des hypothyroïdies auto-immunes à distance de l'épisode aigu, classiquement après 2 mois. Les anomalies biologiques retrouvées à côté des modifications liées à l'atteinte organique sont des lymphocytes atypiques (première semaine) et une forte hyperéosinophilie (deuxième semaine). Son incidence est estimée à 1/1 000 à 1/10 000 expositions aux antiépileptiques et aux sulfamides antibactériens (Knowles et coll., 2003).

1.3.1.2. Les réactions mimant une maladie sérique

Les réactions de type maladie sérique apparaissent 1 à 3 semaines après l'exposition au médicament avec une atteinte cutanée de type urticaire ou érythémateuse multiforme et une arthralgie. A la différence de la vraie maladie sérique, il n'y a pas d'atteinte rénale ni d'immuns complexes. Les céphalosporines sont plus particulièrement impliquées (incidence de 2/1 000 à 2/10 000), mais aussi la minocycline et les sulfamides (Knowles et coll., 2000). Les arthralgies peuvent être traitées par de anti-inflammatoires non stéroïdiens.

1.3.1.3. Les lupus induits par les médicaments

Les lupus induits sont caractérisés par des douleurs des muscles squelettiques, de la fièvre, une perte de poids, une pleuro-pneumopathie et rarement des atteintes neurologiques, vasculaires ou rénales. Les atteintes cutanées sont rares. La symptomatologie apparaît tardivement (plus d'un an après le début du traitement). Des anticorps anti-nucléaires (anti-histones mais pas anti-ADN), parfois anti-myéloperoxydase (minocycline) peuvent être mis en évidence (Knowles et coll., 2000).

1.3.1.4. Les pseudo-lymphomes

Les pseudo-lymphomes constituent une entité particulière qui associe une éruption subaiguë avec quelques nodules ou des lésions semblables au *mycosis fungoides*, sans signes généraux 1 semaine à 2 ans après le début de l'exposition au médicament. La résolution est en revanche rapide (1 à 2 semaines) à l'arrêt du traitement en cause. L'histopathologie distingue le pseudo-lymphome à lymphocytes T et le pseudo-

lymphome à lymphocytes B. Des lymphocytes T CD30+ ont été mis en évidence chez un patient atteint de pseudo-lymphome ayant comme antécédent un rash à la phénytoïne (Nathan et Belsito, 1998). Cette observation n'a toutefois pas été rapportée par ailleurs dans la littérature. Le CD30 est le récepteur au TNF-α, responsable de l'activation de la voie NF-κB, présent à la surface des lymphocytes T et B activés. C'est un marqueur des lymphomes et des leucémies mais il est retrouvé dans d'autres pathologies, dont les infections virales (Su et Duncan, 2000). Le diagnostic différentiel avec un pseudo-pseudo-lymphome doit attendre la non-expression d'un lymphome véritable (Knowles et coll., 1999). L'arrêt du traitement suffit habituellement à la résolution d'un pseudo-lymphome.

1.3.2. Approche des "splitters", le découpage des formes cliniques cutanées

Il est possible de distinguer selon Roujeau (2005) :

1.3.2.1. Le rash commun

Exanthème ou éruption maculo-papuleuses bénignes, survenant dans 90 % des effets indésirables médicamenteux cutanés 4 à 14 jours après l'exposition à un nouveau médicament et même 1 à 2 jours après son arrêt. En cas de réintroduction, le délai d'apparition est réduit. L'éruption est souvent symétrique, commençant sur le tronc, les membres supérieurs et devenant confluant. L'éruption est typiquement polymorphe : morbilliforme ou urticarienne sur les membres, confluente sur le thorax et purpurique sur les pieds. Les membranes muqueuses sont généralement épargnées. Un prurit est souvent présent ainsi qu'une fièvre modérée. L'éruption disparaît en quelques jours. Le

diagnostic différentiel doit être fait avec les éruptions virales (CMV, EBV, HHV6, Parvovirus B19), toxiques, réaction aiguë du greffon contre l'hôte, syndrome de Kawasaki, maladie de Still...

L'exploration biologique n'indique qu'une élévation des éosinophiles dans 20-40 % des cas. L'histopathologie n'est pas spécifique de l'éruption d'origine médicamenteuse : infiltrat lymphocytaire autour des vaisseaux du derme, quelques kératinocytes nécrotiques dans l'épiderme.

Les infections virales sont les causes les plus fréquentes d'éruptions associées aux médicaments chez l'enfant. Si la plupart des médicaments peuvent provoquer des éruptions chez 1 % des patients, l'allopurinol, les aminopénicillines, les céphalosporines, les antiépileptiques et les sulfamides antibactériens sont chacun responsables d'une incidence supérieure à 3 %.

1.3.2.2. Urticaire, angiœdème et anaphylaxie

Les signes surviennent quelques minutes à quelques heures après l'administration d'un médicament. L'urticaire est une éruption commune transitoire de type papules et plaques érythémateuses et œdémateuses, le plus souvent prurigineuses. On parle d'angiœdème lorsque le derme et les tissus sous-cutanés sont atteints, la face et les muqueuses oro-pharyngées présentent des gonflements roses ou pâles. La complication mettant en jeu le pronostic vital est l'anaphylaxie qui peut entraîner une dépression respiratoire, un état de choc et le décès. Ces tableaux cliniques font partie de l'hypersensibilité de type 1 médiée par les IgE même si d'autres mécanismes histamino-libérateurs sont également impliqués. Les formes mineures jusqu'aux plaques durent quelques heures et

disparaissent en 24h sans séquelle. La mortalité à la suite d'anaphylaxie induite par les médicaments est de 2 %.

Les médicaments les plus impliqués dans les réactions médiées par les IgE sont les antibiotiques (dont les pénicillines, 1 cas /10 000) et les anesthésiques généraux. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (2 à 10 cas /10 000) sont associés à des urticaires et angiœdème non médiés par les IgE.

1.3.2.3. La pustulose exanthématique aiguë généralisée (PEAG)

Le délai d'apparition après l'exposition au médicament est de 1 à 3 jours. La PEAG est caractérisée par de la fièvre et un rash pustuleux constitué de nombreuses petites pustules apparaissant sur un érythème œdémateux. D'autres signes sont associés : œdème de la face et des mains, purpura, vésicules, lésions de type érythème multiforme, atteintes des muqueuses. Les pustules sont localisées préférentiellement au niveau des plis (cou, aisselles, aines, …), du tronc et des extrémités supérieures. L'éruption dure quelques jours puis est suivie d'une desquamation superficielle. Le taux de mortalité est de l'ordre de 5 %.

Une hyperleucocytose en particulier neutrophile, une insuffisance rénale transitoire et une hypocalcémie sont fréquemment retrouvées.

L'histopathologie permet de distinguer la PEAG d'un psoriasis pustuleux aigu, mettant en évidence des pustules spongiformes caractéristiques sous la couche cornée, ainsi que la résolution spontanée en moins de 15 jours. Un œdème des papilles dermiques ainsi qu'un infiltrat polymorphe périvasculaire sont fréquemment présents.

Les médicaments les plus associés à la PEAG sont les antibiotiques (aminopénicillines et pristinamycine notamment) et le diltiazem.

1.3.2.4. L'hypersensibilité de type DRESS

Une entité nosologique bien particulière au sein des réactions d'hypersensibilité est le DRESS syndrome, acronyme pour *Drug Rash with Eosinophilia ans Systemic Symptoms*, initialement décrit par l'équipe française de Jean-Claude Roujeau (Bocquet et coll., 1996) (**Tableau 2**), et principalement caractérisée par une hyperéosinophilie et une atteinte multiviscérale. Les signes apparaissent en général 2 à 6 semaines après la première prise de médicament. L'éruption est sévère de type érythrodermie évoluant vers une dermatite exfoliative accompagnée d'un œdème facial, d'adénopathies plus ou moins profondes, de fièvre et d'anomalies hématologiques. Les atteintes viscérales sont des hépatites (50 % des cas), des arthralgies, des infiltrations pulmonaires (lymphocytes et éosinophiles), des néphrites interstitielles, des myocardites, mais pas restrictivement ; ainsi des diabètes insulinodépendants et des encéphalites ont été décrits, de même que des uvéites et des thyroïdites. La signature biologique est constituée par l'hyperéosinophilie (> 1.5 G/l dans 60-70 % des cas) et la présence de lymphocytes basophiles atypiques périphériques. D'autres perturbations biologiques sont rattachées aux atteintes viscérales. Les signes persistent plusieurs semaines après l'arrêt du médicament initiateur avec un engagement du pronostic vital. Le taux de mortalité est d'environ 10 %, l'éruption peut se pérenniser sous forme de dermatite exfoliative chronique. Le diagnostic différentiel doit écarter une infection virale aiguë, un syndrome hyperéosinophilique idiopathique et un lymphome. La recherche d'HHV6 est

conseillée et il est probablement légitime de l'étendre aux autres virus du groupe herpès (Seishima et coll., 2006).

L'histopathologie des lésions cutanées montre un infiltrat lymphocytaire assez dense dans le derme superficiel et/ou au niveau périvasculaire, la présence d'éosinophiles et un œdème du derme. Dans certains cas, la présence d'un infiltrat dense et de lymphocytes atypiques peut orienter vers un lymphome cutané. En cas d'atteinte rénale, outre une protéinurie et des sédiments urinaires (éventuellement contenant des éosinophiles), on observe une infiltration interstitielle de lymphocytes, d'histiocytes et d'éosinophiles sur les biopsies rénales.

Les médicaments les plus couramment impliqués sont les antiépileptiques aromatiques (dont la carbamazépine, le phénobarbital et la phénytoïne), la minocycline, l'allopurinol, les sulfamides, les sels d'or et la dapsone. L'incidence est estimée à un patient sur 10 000 pour les antiépileptiques et les sulfamides. Une hérédité africaine semble associée à une plus grande susceptibilité (Roujeau, 2005).

1.3.2.5. Les éruptions fixes

Les lésions se développent en moins de 3 jours après la prise médicamenteuse. Il s'agit de plaques érythémateuses et œdémateuses rondes, nettement délimitées, parfois avec une bulle centrale. Il n'y a pas de localisations préférentielles au niveau cutané, en revanche les atteintes muqueuses sont principalement labiales et génitales. L'éruption disparaît progressivement en quelques jours en laissant une pigmentation brune post-inflammatoire. En cas de réintroduction du médicament, l'éruption réapparaît au même

endroit. Après plusieurs rechutes, l'éruption peut s'étendre sur de plus grandes surfaces. Il n'y a pas d'érosion des muqueuses et l'atteinte systémique est faible, sans mortalité.

L'histopathologie montre un léger infiltrat mixte (lymphocytes, éosinophiles et parfois neutrophiles) périvasculaire et du derme superficiel et profond, associé avec des kératinocytes nécrotiques. La présence de mélanophages (macrophages pigmentés par la mélanine) est un élément diagnostique déterminant.

1.3.2.6. Syndrome de Stevens-Johnson et nécrolyse épidermique toxique

Avec d'autres, Roujeau considère que les deux entités sont des variants d'une même maladie induite par les médicaments (écartant l'érythème polymorphe majeur associé essentiellement aux infections, notamment herpétiques). L'apparition des signes survient entre 7 et 21 jours après l'exposition au médicament. Le tableau clinique est caractérisé par des petites bulles sur des macules pourpres, disséminées et prédominants au niveau du tronc. La confluence des bulles aboutit à un décollement n'excédant pas 10 % de la surface corporelle. La nécrolyse épidermique toxique concerne les décollements supérieurs à 30 % de la surface corporelle. La fièvre est élevée dans les deux tableaux, l'érosion des muqueuses est quasi-constante. Les atteintes systémiques se traduisent par une élévation modérée des transaminases hépatiques (seulement 10 % d'hépatite), des manifestations intestinales et pulmonaires également dues à une desquamation épithéliale. L'atteinte rénale est possible, d'aspect plutôt tubulaire sans altération de la fonction rénale. La mortalité est de 10 % au cours du syndrome de Stevens-Johnson et de 40 % au cours de la nécrolyse épidermique toxique. Les séquelles sont nombreuses : décolorations cutanées, synéchies génitales, lésions sévères oculaires.

D'un point de vue biologique il n'y a pas d'éosinophilie ni de lymphocytes atypiques, au contraire une lymphopénie est quasi-constante associée fréquemment à une neutropénie et une hyperglycémie, 3 critères de gravité. D'un point de vue histopathologique, c'est la nécrose de toute l'épaisseur de l'épiderme qui domine, il y a un très léger infiltrat lymphocytaire sur le derme superficiel. La négativité des tests d'immunofluorescence permet d'écarter une cause auto-immune. La présence du Fas-ligand semble assez spécifique de ces manifestations cutanées (Posadas et coll., 2002).

Les médicaments (impliqués dans 70 % des cas) les plus associés sont les sulfamides antibactériens, les antiépileptiques, les AINS, l'allopurinol et la névirapine.

Nous utiliserons dans la suite les acronymes anglo-saxons SJS et TEN pour désigner respectivement le syndrome de Stevens-Johnson et la nécrolyse épidermique toxique.

1.3.3. L'approche japonaise

L'équipe japonaise de Kano propose de positionner les hypersensibilités de type DRESS au sein d'un groupe rassemblant des syndromes moins homogènes appelé syndrome d'hypersensibilité induit par les médicaments (D*rug-Induced Hypersensitivity Syndrome*, DIHS) dont le critère majeur est la présence d'une réactivation virale. Toutefois, il n'y a pas consensus sur cette réorientation sémiologique japonaise. Le pseudo-lymphome, la pseudo-maladie sérique comme le lupus induit ont initialement été exclus du champ nosologique (Kano et Shiohara, 2009). Mais la position du groupe japonais semble évoluer sur ce point tout en conservant la notion de contribution virale comme agent physiopathologique du DIHS. En effet, les auteurs ont publié le cas d'un patient ayant présenté un DIHS à l'HHV6 et à l'EBV, et qui a développé 4 ans plus tard

un lupus érythémateux systémique associé à une maladie de Kikuchi-Fujimoto. La mise en évidence de l'ARN de l'EBV dans les ganglions lymphatiques de ce patient a amené les auteurs à considérer le lupus comme une séquelle du DIHS, avec un rôle contributif de l'EBV (Aota et coll., 2009).

1.4. Médicaments responsables et tableaux cliniques associés

D'une façon générale, les sulfamides et les antiépileptiques sont associés à toutes les formes cutanées d'hypersensibilité. Alors que la minocycline semble plus associée au DRESS qu'à la PEAG, au SJS ou à la TEN, les autres cyclines sont peu associées au DRESS mais retrouvées fréquemment dans les éruptions fixes. Les oxicams (AINS) sont des causes majeures de SJS/TEN, fréquentes de DRESS mais ne sont pas associés à la PEAG. Le diltiazem et la pristinamycine sont associés essentiellement à la PEAG (Roujeau, 2005).

Les molécules à plus haut risque de SJS/TEN en Europe sur une exposition thérapeutique inférieure à 8 semaines sont : l'allopurinol (peut-être à risque le plus important selon Halevy et coll. [2008]), la carbamazépine, la lamotrigine, la névirapine, les oxicams, le pantoprazole, le phénobarbital, la phénytoïne, la sertraline, les sulfamides et le tramadol (Mockenhaupt et coll., 2007).

L'équipe japonaise a défini une liste positive des médicaments impliqués dans les DIHS/DRESS, un certain nombre ayant été associés à la réactivation d'HHV6, HHV7 et du CMV. Il s'agit : des anticonvulsivants mentionnés au titre de la classe pharmaco-thérapeutique, de la carbamazépine, de la phénytoïne, du phénobarbital, du zonisamide,

de la lamotrigine, l'allopurinol, de la minocycline, de la dapsone, de la sulfasalazine et de la méxilétine (Kano et Shiohara, 2009). La méxilétine, un antiarythmique, a donné des réactions de type diabète fulminant de type 1 (Seino et coll., 2004) et des pneumonies à éosinophiles (Lee et coll., 2010). En raison de leur importance clinique et de leur ancienneté, certaines molécules ont davantage été étudiées donnant lieu à des pistes pathogéniques d'intérêt.

1.4.1. Molécules antiépileptiques

Parmi les antiépileptiques, les molécules les plus impliquées sont la carbamazépine, la phénytoïne, le phénobarbital et la lamotrigine. Il est difficile d'estimer le facteur de risque attribuable à chacun dans la mesure où si la carbamazépine est largement utilisée dans de nombreuses indications, les autres molécules ont des indications limitées et plus restrictives associées à des pathologies pouvant affecter le processus physiopathologique des réactions indésirables. La réaction croisée entre les molécules est supérieure à 70 % et l'incidence est de 1/1 000 à 1/10 000.

1.4.1.1. Carbamazépine

D'après les données de l'enquête rétrospective française, la carbamazépine serait la première cause de DRESS (au sens de réaction aux médicaments avec éosinophilie et atteintes viscérales mais sans rash obligatoire) avec une incidence de 29 % (Peyrière et coll., 2006). Il n'y aurait pas d'effet sexe dans le risque d'être atteint d'un DRESS à la carbamazépine. L'hyperéosinophilie est quasi-constante, l'atteinte hépatique est présente dans près de ¾ des cas, la fièvre est présente chez 2 patients sur 3 et les adénopathies

chez 1 patient sur 5. Une lymphocytose atypique est retrouvée dans 1 cas sur 10. L'atteinte multiviscérale touche tous les organes mais avec une incidence faible. Des séquelles cutanées de type desquamation chronique sont retrouvées (incidence d'environ 3% ramené aux DRESS à la carbamazépine et d'environ 1% sur tous les cas de DRESS inclus). Si l'analyse des données de la littérature s'accordent sur la fréquence de l'atteinte hépatique avec le résultat de l'analyse de la banque de donnée française, il y a discordance sur l'hyperéosinophilie beaucoup moins décrite dans la littérature et l'adénopathie qui est en revanche plus décrite (**Tableau 3**). Un biais dans le recrutement est sans doute en cause puisque la requête pour l'exploitation des données de la banque de pharmacovigilance visait le DRESS au sens de "*Drug Reaction*", les mots clés d'interrogation du moteur de recherche Medline incluaient DRESS sans spécification de la signification du "R" et les données sommairement rapportées de la revue japonaise était polarisées sur le critère des DIHS. Il y a aussi nécessairement un effet pays dans l'utilisation des médicaments. Les données françaises sont sans doute à favoriser puisqu'elles sont plus homogènes (même pays, méthode standardisée d'imputabilité).

Tableau 3 - Données démographiques et fréquences des signes cliniques et biologiques retrouvés dans les DRESS à la carbamazépine d'après différentes sources.

	Données issues de l'analyse de la banque de données de la pharmacovigilance française **Période 1985-2000** **n=216**[a] (Peyrière et coll., 2006)	Analyse des données issues de la littérature **Période → 2001** **n=230**[b] (Peyrière et coll., 2006)	Revue de la littérature Période non précisée n=? (Kano et Shiohara, 2009)
Nombre de cas	63	32	8 [c]
Age médian (ans)	52	44	n.r.
Intervalle des âges (ans)	[15-78]	[4-76]	n.r.
Sexe (M/F)	33/30	14/18	n.r.
Délai d'apparition (j) [1]	30 (médiane)	24 (médiane)	36.8 (moyenne)
Valeurs extrêmes du délai d'apparition (j)	[3-690]	[2-90]	n.r.
Fièvre (%)	**65 %**	**84 %**	Critère d'inclusion
Eruption cutanée	**100 %**	**84 %**	++
Type d'éruption	Erythème non précisé Type érythème multiforme Purpurique	n.r.	Maculo-papulaire Type érythème multiforme Purpurique Exfoliative
Syndrome de Stevens-Johnson	0 cas	n.r.	n.r.
Nécrolyse épidermique toxique	2 cas	n.r.	n.r.
Hyperéosinophilie	**92 %**	**53 %**	++
Adénopathie	22 %	**53 %**	++
Atteinte hépatique [2]	**73 %**	**66 %**	++
Atteinte pulmonaire [3]	11 %	19 %	+
Atteinte rénale [4]	8 %	9 %	+
Atteinte cardiaque [5]	2 %	6 %	n.r.
Atteinte gastro-intestinale [6]	3 %	9 %	n.r.
Lymphocytes atypiques	10 %	28 %	++
Leucocytose	n.r.	n.r.	++
Anémie	0 %	16 %	n.r.
Thrombocytose	0 %	3 %	n.r.
Thrombocytopénie	3 %	6 %	n.r.
Neutropénie	2 %	3 %	n.r.

[a] : Critères d'inclusion : éruption cutanée fébrile avec hyperéosinophilie et/ou symptômes systémiques avec fièvre et anomalies hépatiques, rénales, cardiaques ou respiratoires au cours d'un traitement par antiépileptiques, minocycline, allopurinol, abacavir ou névirapine

[b] : Mots clés utilisés pour la requête sur Medline : DRESS, hypersensitivity reaction, eosinophilia, skin eruption, side-effect of drugs pour les mêmes médicaments

[c] : DRESS défini par les critères japonais

Il est noter que les critères de caractérisation de DRESS ne sont pas exactement superposables dans les enquêtes (Drug Reaction / DRESS indéterminé / DRESS comme DIHS typique ou atypique).

n.r. : non renseigné; +, ++, +++ : fréquence (ordre de grandeur en pourcentages non précisé)

Les données en **gras** indiquent les fréquences > 50 %, les données grisées indiquent les discordances entre les fréquences rapportées par les auteurs.

[1] : délai entre la première prise du médicament et le premier signe observé

[2] : élévation des enzymes hépatiques (particulièrement ASAT et ALAT)

[3] : pneumopathie éosinophile, toux, dyspnée

[4] : insuffisance rénale aiguë, protéinurie, néphrite interstitielle

[5] : péricardite, atteinte myocardique

[6] : diarrhée, douleurs abdominales

1.4.1.2. Phénobarbital et phénytoïne

D'après la même étude française (**Tableau 1**) (Peyrière et coll., 2006), les deux molécules sont à l'origine d'une incidence bien moindre de DRESS que la carbamazépine, les hommes semblent plus atteints de DRESS au phénobarbital. Le phénobarbital semble associé aux mêmes effets que la carbamazépine à l'exception d'une atteinte plus ciblée sur le tractus digestif et une anémie. La phénytoïne est moins associée à la fièvre que la carbamazépine et le phénobarbital, l'adénopathie est plus discrète et l'atteinte organique est moins fréquente et cible le foie. L'atteinte hématologique retrouve toujours une hyperéosinophilie, une lymphocytose atypique comme la carbamazépine (10 %), la phénytoïne se démarque par une association à l'anémie et à la neutropénie non négligeable.

1.4.1.3. Lamotrigine

La lamotrigine semble présenter un type particulier d'abord parce que sa structure chimique n'est pas aromatique à la différence des anciens antiépileptiques impliqués dans les réactions d'hypersensibilité aux anticonvulsivants. Certains auteurs ont introduit une entité nosologique particulière, le syndrome d'hypersensibilité à la lamotrigine, mais cette notion est discutée (Taillia et coll., 2009). L'incidence globale semble plus importante que pour les autres antiépileptiques (1/1 000 adultes, 1-2/100 enfants). D'après l'enquête de Peyrière et coll. (2006) (**Tableau 1**), la lamotrigine serait la cause de 10 % des DRESS, à égalité avec le phénobarbital (sans ajustement au nombre de prescriptions), les femmes semblent plus atteintes, et l'âge médian des réactions est de moitié celui de la carbamazépine, sans doute en relation avec l'utilisation pédiatrique. Autres particularités, l'hyperéosinophilie est absente, au

contraire, il semblerait que la lamotrigine ait un léger effet aplasiant (anémie [14 %], neutropénie [14%] et thrombocytopénie dans plus d'un cas sur 4). L'atteinte viscérale concerne majoritairement le foie mais touche aussi le poumon et le rein. Avec 2 cas de SJS et 3 cas de TEN, les deux syndromes contribuent à plus de 70% des cas de DRESS déclarés pour la lamotrigine. L'absence d'éosinophilie retrouvée et la prépondérance des syndromes de décollement cutané serait en faveur d'un positionnement particulier de la lamotrigine parmi les molécules à l'origine de réactions d'hypersensibilité.

Le métabolisme de la lamotrigine donne lieu à de nombreux composés mais la voie majoritaire est simple et conduit à une N-glucuroconjugaison. Il a été constaté que les réactions pourraient être dose-dépendantes : des doses de départ élevées et/ou une augmentation rapide des doses augmentent le risque d'apparition de réactions sévères d'hypersensibilité. La co-médication avec l'acide valproïque, inhibiteur enzymatique, est associée avec une augmentation du risque de manifestations cutanées. Ces éléments pourraient plaider en faveur de la responsabilité de la molécule lamotrigine elle-même. Toutefois, une étude très récente a montré que la lamotrigine pouvait être activée en un aryl-époxyde au niveau des microsomes hépatiques et des hépatocytes impliquant le CYP2A6 chez l'homme et le CYP2C11 chez le rat, mais aussi au niveau des kératinocytes épidermiques humains (Chen et coll., 2010).

1.4.1.4. Acide valproïque

L'acide valproïque a donné lieu à quelques cas de DRESS (Conilleau et coll., 1999 ; Arévalo-Lorido et coll., 2003 ; Yun et coll., 2006). Un cas de pseudo-lymphome a été rapporté (Cogrel et coll., 2001).

1.4.2. Molécules anti-infectieuses

La toxicité des sulfamides, par exemple le sulfaméthoxazole, semble liée à un déséquilibre entre une voie métabolique sûre passant par une N-acétylation et une voie métabolique à risque générant des hydroxylamines puis des dérivés nitroso, ces deux derniers groupes de métabolites étant capables de réagir avec le glutathion pour former des adducts. Une diminution de la voie de la N-acétylation (métaboliseurs lents) augmenterait la proportion de sulfaméthoxazole entrant dans la voie métabolique délétère, générant plus de composés réactifs, dépassant les capacités de détoxification dépendantes du glutathion (Shear et coll., 1986). Cette hypothèse expliquerait bien la corrélation entre syndrome de Stevens-Johnson ou toxidermie et phénotype acétylateur lent (Shapiro et Shear, 1996). Néanmoins une étude portant sur deux cohortes importantes de patients VIH positifs n'a pas permis d'isoler un impact significatif du génotype ni du phénotype acétylateur lent sur le risque d'effet indésirable cutané (Pirmohamed et coll., 2000 ; Wolkenstein et coll., 2000).

De façon plus consensuelle entre les études (**Tableau 1**), les DRESS à la minocycline sont fortement associés à une hyperéosinophilie, des adénopathies et une atteinte hépatique, l'atteinte viscérale touche tous les organes. De plus on retrouve une lymphocytose atypique ainsi qu'une atteinte de toutes les lignées sanguines.

De façon homogène entre les données françaises de pharmacovigilance et les données de la littérature, les antiviraux abacavir et névirapine donnent très peu d'adénopathies (0 à 16 %) par rapport à la carbamazépine et aux autres molécules, et sont associés à des atteintes digestives (la névirapine qu'en France). En revanche, si la fréquence d'hyperéosinophilie est similaire à celle de la carbamazépine pour la névirapine, elle est inférieure à 10 % pour l'abacavir (Peyrière et coll., 2006).

1.4.3. Allopurinol

La revue de la littérature de Markel (2005) donne une bonne idée de l'état des connaissances sur cette molécule que nous résumons dans ce paragraphe, les données françaises assez concordantes sont rapportées dans le **Tableau 1**. L'allopurinol est un vieux médicament antigoutteux développé à la fin des années 50. Son mode d'action est l'inhibition de la xanthine oxydase, l'enzyme responsable de la production de l'acide urique à partir de l'hypo xanthine. Un excès de production d'acide urique peu soluble dans le sang provoque sa précipitation et la formation des cristaux d'urate à l'origine de la crise de goutte. L'allopurinol est un analogue de l'hypoxanthine, qui est lui-même métabolisé par la xanthine oxydase en oxypurinol. L'allopurinol est un inhibiteur compétitif à faible dose puis non compétitif à forte dose, mais l'essentiel de l'activité repose sur l'oxypurinol qui est un inhibiteur non-compétitif persistant dans l'organisme. Des réactions cutanées banales sont observées chez 2 % des patients traités, mais une atteinte plus sévère potentiellement létale décrite comme le syndrome d'hypersensibilité à l'allopurinol apparaît plus rarement et est caractérisée par une vascularite, un rash, une hyperéosinophilie, une hépatite et une atteinte rénale progressive. Ce syndrome a donc été logiquement rattaché au DRESS, son incidence est alors estimée à 0.4 % patients traités, la mortalité (25 %) est plus élevée que celle observée dans les autres DRESS (10 %). Une étude de 30 cas de DRESS à Taïwan placerait l'allopurinol comme le premier agent causal devant la carbamazépine (Chiou et coll., 2008). Des arguments histopathologiques et biologiques pourraient cautionner un mécanisme pathogénique de type hypersensibilité de type 2 (anticorps anti-tubules ou anti-membrane basale glomérulaire) et 3 (dépôts de complexes immuns). Cependant davantage d'arguments (chronologie, immunité dirigée contre l'allopurinol et de façon plus importante contre l'oxypurinol, infiltration lymphocytaire et polynucléaire) plaident en faveur d'un

mécanisme d'hypersensibilité de type 4 (retardée). L'allopurinol pourrait diminuer l'immunité cellulaire T par inhibition de la purine nucléoside phosphorylase. Alors que les règles de prévention du risque préconisent une adaptation de la posologie d'allopurinol, il ne semble pas exister une dose dépendance du risque de DRESS à l'allopurinol résultant en particulier de l'accumulation de l'oxypurinol (pas de prévalence supérieure chez les patients sans adaptation posologique). Une étude plus récente montre une association entre la dose reçue et le risque de SJS et de TEN, ce risque n'est néanmoins présent que sur le court terme (moins de 8 semaines de traitement) (Halevy et coll., 2008). Les formes cliniques sont dominées par la fièvre et le rash (la fièvre est moins souvent rapportée dans les données françaises [**Tableau 1**]) ainsi que l'élévation des ASAT, l'hyperéosinophilie est moins fréquente que pour la carbamazépine. L'altération de la fonction rénale semble caractériser le DRESS à l'allopurinol avec une fréquence toutefois inférieure aux signes précédents (43 % en France) (Peyrière et coll., 2006). L'étude de Lee et coll. (2008) rapporte une fréquence de l'altération de la fonction rénale de 57 % dans la population asiatique et la série taïwanaise fait état d'une fréquence de 91 % (Chiou et coll., 2008). Les cas de décès sont plutôt associés à une nécrolyse épidermique toxique et des ASAT > 500 U/l. De façon très intéressante, contrairement aux antiépileptiques, les patch-tests semblent rester négatifs (allopurinol et oxypurinol) dans le cas de DRESS à l'allopurinol (Santiago et coll., 2010) traduisant sans doute un mécanisme immunologique spécifique et donc laissant à penser qu'il faudrait individualiser le DRESS à l'allopurinol.

L'efficacité de la corticothérapie qui est habituellement efficace dans les DRESS est incertaine, un risque de mortalité supplémentaire n'est pas à exclure. En cas de succès thérapeutique, les réponses cliniques et biologiques à la corticothérapie présentent les

mêmes effets de rebond observés dans les DRESS aux autres molécules lorsque la corticothérapie est arrêtée trop rapidement (Pluim et coll., 1998).

1.4.4. Autres molécules

L'azathioprine, la terbinafine (Schlienger et Shear, 1998), l'ibuprofène, la sulfasalazine (Descamps et coll., 2001), l'oxcarbazépine (Bosdure et coll., 2004), le zonisamide (Majeres et coll., 2004), la salazopirine (Maoz et Brenner, 2007), le celecoxib et l'éthambutol (Lee et coll., 2008), l'indométacine et le lévamisole (Chiou et coll., 2008), la vancomycine (Chiou et coll., 2008 et Mennicke et coll., 2009), le ranélate de strontium (Jonville-Béra et coll., 2009) ont été associés sporadiquement à des réactions d'hypersensibilité. Des cas de DRESS ont été rapportés en France avec la tazocilline, l'ibuprofène, le celecoxib, la vancomycine, la télithromycine et la méticilline (Boccara et coll., 2006 ; Eshki et coll., 2009).

1.5. Facteurs associés

1.5.1. Facteurs génétiques

1.5.1.1. Molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

Le croisement de données *in vitro* et *in vivo* sur la viabilité de lymphocytes exposés au métabolisme hépatique de la phénytoïne a indiqué que les lymphocytes de la parenté des patients atteints d'hypersensibilité à la phénytoïne présentaient une réactivité intermédiaire entre les contrôles et les patients réactifs, suggérant une anomalie

héréditaire dans le patrimoine lymphocytaire dans les capacités de détoxification (Shear et Spielberg, 1988).

Plusieurs associations entre gènes du CMH et réactions cutanées sévères ont été identifiées et semblent très spécifiques de l'entité nosologique diagnostiquée, de l'ethnie considérée et de la molécule impliquée (Chung et coll., 2007). Cette spécificité peut être liée à la participation des allèles aux mécanismes physiopathologiques mais aussi à des différences d'expression des facteurs de variabilité. L'hypersensibilité à l'abacavir est associée au HLA-B*5701 (et la recherche de cet allèle a permis de réduire les accidents thérapeutiques et d'apporter un succès thérapeutique à la pharmacogénétique [Phillips et Mallal, 2009], les SJS, TEN et DRESS à l'allopurinol sont associés au HLA-B*5801 chez les Japonais, les Thaïlandais et les Européens, une prédisposition d'hypersensibilité à la névirapine a été observée chez les Australiens caucasiens porteur de HLA-DRB*0101 à taux élevé de CD4 et chez les Sardes et les Japonais porteurs de HLA-Cw8 (Gatanaga et coll., 2008 ; Tassaneeyakul et coll., 2009). Une avancée majeure dans l'élucidation de cette association génétique tient dans les travaux de Chessman et coll. (2008) qui démontrent que seul l'allèle HLA-B*5701 constitue un ligand pour l'abacavir dans le contexte de présentation de l'antigène au TCD8 au sein de molécules du CMH de classe I. Cependant la présence de l'allèle, même si elle augmente le risque, n'est pas toujours ni nécessaire ni suffisante pour expliquer la maladie (Lonjou et coll., 2008).

Les travaux les plus nombreux concernent l'allèle HLA-B*1502 qui semble fortement associé à la survenue de syndrome de Stevens-Johnson dus à la carbamazépine chez les populations chinoises Han ainsi que dans la population thaïlandaise. L'association concerne également les nécroses épidermiques toxiques (Hung et coll., 2006). Compte tenu de la prévalence de ces effets indésirables et de la forte corrélation de cette association, un test pharmacogénétique de dépistage des patients à risque basé sur la

recherche de l'allèle a été proposé (et breveté par les auteurs) (Chung et coll., 2007). Le test présente de très bonnes valeurs prédictives pour la population thaïlandaise (Tassaneeyakul et coll., 2010). L'association avec l'allèle HLA-B*1502 est également observée lorsque la phénytoïne est l'agent causal sans qu'une réaction croisée soit systématique (Locharernkul et coll., 2008), avec l'oxcarbazépine et de façon moins significative avec la lamotrigine (Hung et coll., 2010). En revanche, aucune association de cette allèle n'a été observée avec les autres réactions d'hypersensibilité dans la population Han (les éruptions maculo-papuleuses semblent en revanche associées à un polymorphisme touchant le HLA-E et le HLA-A*3101) (Hung et coll., 2006). L'association HLA-B*1502 et SJS/TEN n'a pas été retrouvée dans la population caucasienne ni dans la population japonaise (Alfirevic et coll., 2006a ; Kaniwa et coll., 2008). Les travaux de Yang et coll. (2007) ont montré que certains acides aminés à des positions d'ancrage particulières semblent préférentiels pour qu'un peptide constitue un épitope reconnu par les molécules de l'allèle. Les auteurs ont également recherché un effet de la présence de la carbamazépine dans le milieu d'incubation sur les peptides reconnus par l'allèle (intégration en amont du Golgi), les peptides étaient les mêmes en présence ou en absence de carbamazépine. Il est à noter que l'effet des métabolites n'a pas été exploré.

Les données actuelles sur les facteurs de risque génétiques ont abouti à la généralisation et à l'officialisation par les autorités de santé des mesures de précautions concernant les patients porteurs de l'allèle HLA-B*1502 : information sur les notices, recherche de l'allèle chez les populations à risque, extension des recommandations à tout patient porteur de HLA-B*1502 (Chung et coll., 2010). Ces données ont été reprises dans le Résumé des Caractéristiques du Produit français de la carbamazépine.

1.5.1.2. Molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

Dans la population Han, les réactions d'hypersensibilité à la carbamazépine hors SJS/TEN semblent associées à un polymorphisme identifié par des SNPs dont la localisation géographique touche le gène de la motiline à l'extrémité des gènes du CMH de classe II (Hung et coll., 2006).

1.5.1.3. Correspondance possible entre polymorphisme touchant le CMH et mécanismes immunologiques effecteurs

Une certaine cohérence entre polymorphisme touchant le CMH et mécanismes immunologiques effecteurs semble se dégager des données de la littérature :

- le syndrome de Stevens-Johnson et de nécrolyse épidermique toxique partagent une association génétique avec l'allèle HLA-B*1502, si participation physiopathologique de l'allèle il y a, elle doit passer par les lymphocytes cytotoxiques puisque l'allèle concerne une molécule du CMH de classe I, ce qui est effectivement le cas. Cette remarque peut être appliquée à l'abacavir et à l'allopurinol (Chessman et coll., 2008),

- les autres réactions d'hypersensibilité ne sont pas particulièrement associées à l'allèle HLA-B*1502, mais peut-être davantage aux molécules de CMH classe II. Par ailleurs, des auto-anticorps ont été mis en évidence dans le plasma de patients traités avec réactions d'hypersensibilité en accord avec une réaction plutôt médiée par l'immunité humorale effectivement initiée par les TCD4.

1.5.1.4. Molécules impliquées dans des voies de détoxifications potentielles

Bien que des susceptibilités familiales semblent exister (Wolkenstein et coll., 1995), peu d'associations ont été identifiées entre une défaillance d'origine génétique des enzymes de détoxification et un l'apparition d'une réaction d'hypersensibilité (Löscher et coll., 2008). La découverte d'une anomalie familiale des voies de détoxification de la carbamazépine et de la phénytoïne (mais pas du phénobarbital) (Gennis et coll., 1991) d'abord attribuée à une activité de l'époxyde-hydrolase microsomale n'a pas été confirmée d'un point de vue génétique (Gaedigk et coll., 1994 ; Green et coll., 1995). Une association entre un variant allélique du CYP2C9 (CYP2C9*3) de faible activité et des réactions cutanées à la phénytoïne a été signalée sans interprétation précises sur les conséquences (Lee et coll., 2004). L'étude du polymorphisme génétique associé aux gènes impliqués dans le métabolisme de la carbamazépine n'a pas permis d'identifier de SNPs associés aux effets indésirables cutanés (étude portant sur les CYP3A4, 2B6, 2C8, 2C9, 1A2 et l'époxyde hydrolase 1) (Hung et coll., 2006).

1.5.1.5. Autres polymorphismes génétiques identifiés

La gravité des réactions d'hypersensibilité semble être corrélée à un polymorphisme touchant la région promotrice du gène du TNF-α mais de façon non indépendante des allèles HLA-DQ2 et au HLA-DR3 (Pirmohamed et coll., 2001). Les réactions d'hypersensibilité sévères à la carbamazépine semblent associées à un polymorphisme touchant un cluster du gène de la HSP70, protéine up-régulée lors du stress oxydatif (Alfirevic et coll., 2006b).

1.5.2. Facteurs infectieux

Certaines réactions d'hypersensibilité sont associées à des réactivations de virus du groupe Herpès, notamment l'HHV6 mais aussi le CMV, l'EBV et l'HHV7. La première implication de l'HHV6 dans une réaction d'hypersensibilité aux anticonvulsivants induite par le phénobarbital a été décrite par Descamps et coll. en 1997. Depuis, l'HHV6 a été retrouvé dans d'autres réactions d'hypersensibilité impliquant la sulfasalazine (Tohyama et coll., 1998), la carbamazépine (Zeller et coll., 2003), l'allopurinol (Masaki et coll., 2003). Il peut s'agir soit d'une primo-infection (Descamps et coll., 2001), soit d'une réactivation (Tohyama et coll., 1998). L'association HHV6-HHV7 a également été retrouvée (Suzuki et coll., 1998). Initialement les critères diagnostiques du DRESS syndrome n'ont pas inclus l'activation virale comme un item à évaluer (Descamps et coll., 2003). Comme indiqué plus haut, le terme de syndrome d'hypersensibilité induit par les médicaments (DIHS) a été proposé par deux équipes japonaises pour regrouper les manifestations d'hypersensibilité associées à une réactivation virale, créant clairement une entité nosologique indépendante (Hashimoto et coll., 2003 ; Shiohara et coll., 2007). Ainsi le DIHS est dit typique si la réactivation virale est objectivée et atypique dans le cas contraire (**Tableau 2)**. Mais les auteurs vont plus loin associant la réactivation virale au processus physiopathologique. Ainsi, Shiohara et coll. (2006) s'appuient sur la chronologie des signes biologiques et cliniques observés au cours de réactions au cours desquelles l'activité du HHV6 a été explorée. Ils établissent la chronologie suivante : plus de 3 semaines après le début d'un traitement médicamenteux, une réactivité clinique est observée contemporainement avec une diminution de l'immunité (hypogammaglobulinémie, diminution des taux d'anticorps, des lymphocytes B et des cellules NK) puis à l'arrêt du traitement d'autres signes apparaissent progressivement au moment même où des copies du virus HHV6

apparaissent dans le sang. La charge virale diminue ensuite avec la restauration de l'immunité. Le médicament serait responsable de l'immunodépression observée au début du syndrome et donc de la réactivation des herpes virus. Les premières manifestations cliniques seraient dues au virus (ou éventuellement à plusieurs autres virus réactivés de façon séquentielle) puis la réponse immunitaire stimulée par l'apparition des virus surviendrait de façon massive et serait également dirigée par réaction croisée contre le médicament générant les atteintes tissulaires observées à la manière des syndromes de réaction du greffon contre l'hôte (réaction croisée virus / alloantigènes) ou du syndrome de reconstitution de la réponse immune chez les patients atteints par le VIH, au cours d'une infection virale. De façon étrange, l'ordre de réactivation des virus observé dans les DIHS suit celui observé au cours des réactions du greffon contre l'hôte (HHV6 puis/ou EBV puis CMV) (Kano et coll., 2006). Gentile et coll. (2010) s'interrogent à propos d'un cas impliquant la lamotrigine sur la responsabilité première du médicament ou du HHV6 dans l'initiation du DIHS et concluent, également sur des critères chronologiques, en faveur d'une réactivation du virus quiescent au sein des lymphocytes T suite à l'activation de ces derniers par le médicament. Ce schéma rend particulièrement bien compte de l'aggravation des signes cliniques après le retrait de l'agent thérapeutique déclenchant expliqué par la persistance des antigènes viraux. On peut supposer que l'intensité immunitaire serait plus forte au niveau du site de distribution du médicament, donnant ainsi une explication possible de la toxicité rénale plus marquée de l'allopurinol. Ainsi les tenants du DIHS excluent du champ nosologique les manifestations d'hypersensibilité autres que le DRESS, dont les SJS/TEN, le DRESS étant une forme clinico-biologique incluse dans le DIHS (typique ou atypique en l'absence de réactivation virale objectivée, **Tableau 2**) (Kano et Shiohara, 2009).

La question d'une superposition sémiologique de la réponse immunitaire entre atteinte virale primitive et atteinte virale secondaire à la prise de médicament a été peu étudiée. L'étude de Torres et coll. (2003) a comparé deux groupes d'enfants présentant des atteintes cutanées attribuées soit à la prise de médicament dans le premier groupe, soit à une atteinte virale pure dans le second groupe. La production de cytokines semblerait de type Th1 pour le groupe médicament, Th0 pour le groupe virus. Toutefois, la portée de cette étude antérieure aux avancées sur l'HHV6 est limitée puisque la sérologie des patients du groupe médicament n'a pas été explorée pour ce virus. De plus, l'hyperéosinophilie n'était présente que chez 10 % des patients et l'ARNm de l'IL-5 était négatif dans tous les groupes.

1.5.3. Pathologies chroniques actives associées

Les seules associations décrites entre maladie préexistante et réactions d'hypersensibilité aux médicaments concernent le lupus érythémateux disséminé et les maladies inflammatoires systémiques (Roujeau et coll., 1995).

1.5.4. Facteurs médicamenteux

1.5.4.1. Réactivité croisée

Un certain nombre de cas cliniques font mention de réactivité croisée entre divers antiépileptiques, la prise antérieure d'un médicament pouvant alors être considérée comme un facteur favorisant, sans toutefois que la réactivité croisée soit systématique. A l'issue des travaux de Shear et coll. (1988), la réactivité croisée entre phénobarbital, phénytoïne, carbamazépine pourrait atteindre 75 % des patients. Une réaction croisée

entre phénytoïne, carbamazépine et oxcarbazépine a été décrite (Misra et coll., 2003). L'enquête de Hirsch et coll. (2008) portant sur 1 875 patients traités par antiépileptiques fait état d'une réactivité croisée importante entre carbamazépine, phénytoïne, phénobarbital, oxcarbazépine et lamotrigine ; la réactivité croisée est plus forte lorsque la carbamazépine ou la phénytoïne sont impliquées (**Tableau 4**). La carbamazépine possède une structure très voisine de celle de l'oxcarbazépine, ce qui explique sans doute le taux maximal de réactivité croisée rapporté (71.4 %), mais de façon intéressante l'oxcarbazépine semble donner lieu à moins de rash après sensibilisation avec la carbamazépine (33.0 %). La réactivité croisée entre carbamazépine et lamotrigine, carbamazépine et amoxicilline, et allopurinol et amoxicilline a été rapportée par ailleurs (Aouam et coll., 2009 ; Fredj et coll., 2010). En raison de leur parenté structurale, une réactivité croisée entre carbamazépine et antidépresseurs tricycliques est envisageable mais peu documentée (Seitz et coll., 2006).

Il ne semble pas qu'il y ait une réactivité croisée entre antiépileptiques et sulfamides pour lesquels la voie de détoxification est assez bien définie et non superposable à celle des anticonvulsivants. La réactivité croisée entre sulfamides appartenant à des groupes pharmaco-thérapeutiques différents a été démontrée *in vitro* : la sulfasalazine anti-inflammatoire et le sulfaméthoxazole antibactérien stimulent de la même façon les lymphocytes de patients ayant présenté une réaction d'hypersensibilité à une des deux molécules (le test employé était le test de transformation lymphocytaire) (Zawodniak et coll., 2010a).

Tableau 4 - Réactivité croisée évaluée sur l'apparition d'un rash cutané entre molécules antiépileptiques (n=1 875) (Hirsch et coll., 2008). Les taux supérieurs à 50 % apparaissent en gras.

Molécule à l'origine d'un rash cutané initial	**Molécule donnant une réaction croisée et taux déterminé**
Carbamazépine	Lamotrigine (20.0 %)
Carbamazépine	Oxcarbazépine (33.0 %)
Carbamazépine	Phénobarbital (26.7 %)
Carbamazépine	Phénytoïne (**57.6 %**)
Lamotrigine	Carbamazépine (26.3 %)
Lamotrigine	Oxcarbazépine (20.0 %)
Lamotrigine	Phénytoïne (38.9 %)
Oxcarbazépine	Carbamazépine (**71.4 %**)
Oxcarbazépine	Lamotrigine (37.5 %)
Phénobarbital	Carbamazépine (**66.7 %**)
Phénobarbital	Phénytoïne (**53.3 %**)
Phénytoïne	Carbamazépine (42.0 %)
Phénytoïne	Lamotrigine (18.9 %)
Phénytoïne	Phénobarbital (19.5 %)

1.5.4.2. Médicaments et immunosuppression

La notion de réactivité croisée dans un contexte d'immunodépression a été décrite à propos du cas d'un patient traité par cladribine pour une leucémie à tricholeucocytes. Une réactivité du patient a été mise en évidence par des tests de provocation à la clindamycine, au sulfaméthoxazole-triméthoprime, à l'allopurinol et au fluconazole. L'article en japonais ne permet pas l'étude détaillée du cas mais les conclusions des auteurs est que l'effondrement des cellules TCD4 est associé à la réactivité croisée à tous ces médicaments (Kokunai et coll., 2005).

1.5.4.3. Acide valproïque

Une relation singulière entre l'acide valproïque et les DRESS syndromes à d'autres molécules semble exister sans qu'il ne s'agisse d'une réaction croisée à proprement parler (Conilleau et coll., 1999 ; Cogrel et coll., 2001 ; Arévalo-Lorido et coll., 2003 ; Yun et coll., 2006 ; Aouam et coll., 2008). De plus, les données de la pharmacovigilance française indiquent que l'acide valproïque est fortement associé aux réactions d'hypersensibilité cutanées à la lamotrigine et ont été à l'origine d'un rappel aux prescripteurs en 2010. La littérature fait écho aux données françaises (Li et coll., 1996 ; Kocak et coll., 2007 ; Mansur et coll., 2008).

Par ailleurs, l'acide valproïque semble favoriser la réplication de l'HHV6 (Mardivirin et coll., 2009), de l'HHV8 (Shaw et coll., 2000) et du CMV (Kuntz-Simon et Obert, 1995). Le mécanisme probable reposerait sur l'activité inhibitrice sur l'histone-déacétylase de l'acide valproïque ou sur la stimulation de la région promotrice de transcription, ce dernier mécanisme serait partagé avec la carbamazépine (Mardivirin et coll., 2009).

1.5.4.4. Diurétiques

L'association de diurétiques et particulièrement de thiazidiques au traitement par allopurinol semble majorer le risque d'apparition d'un DRESS chez les patients insuffisants rénaux (Arellano et Sacristan, 1993).

1.6. Hypothèses physiopathologiques

1.6.1. Les différents types d'hypersensibilité

La classification de Gell et Coombs fait état de 4 types d'hypersensibilité :

1.6.1.1. Hypersensibilité de type 1 dite "immédiate"

Les signes apparaissent quelques secondes à quelques minutes après le contact avec l'allergène. Elle est associée, mais pas exclusivement, à la production d'anticorps de type IgE qui se lient aux mastocytes (cross-linking d'au moins 2 molécules d'IgE), provoquent leur dégranulation et la libération de médiateurs (histamine, leucotriènes, prostaglandines, cytokines) actifs sur les vaisseaux et les bronches et doués de propriétés chimiotactiques générant une hypotension, une bronchoconstriction, une urticaire, un angiœdème aboutissant à un état de choc potentiellement létal. Les cytokines les plus impliquées sont l'IL-4 et l'IL-13. Les molécules médicamenteuses les plus impliquées sont les pénicillines, les céphalosporines et les bloqueurs neuromusculaires.

1.6.1.2. Hypersensibilité de type 2 : type de l'anémie hémolytique

La modification structurale d'une protéine autologue par un médicament la rend reconnaissable par les cellules immunocompétentes comme n'appartenant plus à l'organisme (néoantigène), lesquelles développent des anticorps (IgM puis IgG) contre ce néoantigène. La fixation des anticorps sur la cellule (érythrocyte, leucocyte, plaquette) ou au niveau du tissu porteurs du néoantigène dirige l'immunité non spécifique contre eux et provoque leur lyse. Les signes apparaissent en quelques minutes à quelques heures après l'administration du médicament. Les molécules médicamenteuses les plus impliquées sont la méthyldopa (anémie hémolytique), l'aminopyrine (leucopénie) et l'héparine (thrombocytopénie).

1.6.1.3. Hypersensibilité de type 3 : maladie sérique

Le complexe immun (anticorps lié à l'antigène) soluble se dépose dans les tissus et provoque l'activation du complément entraînant un chimiotactisme et une réponse inflammatoire mettant en jeu les espèces oxydatives de l'oxygène contre le site où s'est déposé le complexe immun (membrane basale du glomérule rénal, petits vaisseaux). Les molécules médicamenteuses les plus impliquées sont les β-lactames (maladie sérique), la quinidine (lupus érythémateux médicamenteux), la minocycline (vascularite).

1.6.1.4. Hypersensibilité de type 4 : hypersensibilité retardée

Contrairement aux trois autres types, la réaction immunologique s'appuie sur les cellules T.

L'antigène présenté par une cellule de l'organisme dans un contexte de CMH de classe I, va induire, sous réserve d'une activation préalable du lymphocyte cytotoxique (TCD8), une réponse cellulaire cytotoxique contre la cellule par le TCD8, aboutir à une nécrose tissulaire et initier une réponse inflammatoire.

La question de l'initiation de la réponse immunitaire à un médicament reste ouverte. Le schéma classique connu pour les antigènes bactériens repose sur l'activation des cellules de l'immunité non spécifique (monocytes-macrophages, cellules dendritiques) qui, après activation, vont présenter l'antigène aux cellules de l'immunité spécifique en même temps que l'émission de signaux de co-stimulation. Les médicaments sont peut-être capables d'activer les cellules dendritiques mais un contexte d'activation général (infection systémique virale par exemple) pourrait générer un niveau d'activation suffisant (ces patients sont souvent allergiques à plusieurs médicaments) (Pichler, 2003).

La réactivité croisée de reconnaissance des cellules T pourrait être moins exigeante que la reconnaissance des IgE, en tout cas pour les pénicillines. De plus, la possibilité de reconnaissance de peptides comme de médicaments pourrait expliquer la réactivité croisée entre un médicament et des auto-antigènes au cours des réactions d'hypersensibilité (Pichler, 2003).

Une sous-classification tenant compte des effecteurs immunologiques identifiés a été explicitée par Pichler (2003) :

- type IVa : réponse Th1 avec production d'IFN-γ et caractérisée par une activation des monocytes se traduisant cliniquement par un eczéma,

- type IVb : réponse Th2 avec production d'IL-5 et d'IL-4 et caractérisée par une inflammation éosinophile se traduisant cliniquement par un exanthème maculopapuleux ou bulleux,

- type IVc : réponse par cellules T cytotoxiques avec production de perforine et de granzyme B et caractérisée par une cytotoxicité (vis à vis des kératinocytes entre autres) médiée par des TCD8 ou des TCD4 se traduisant cliniquement par un exanthème maculopapuleux, bulleux ou pustuleux,

- type IVd : réponse T avec production d'IL-8 caractérisée par un recrutement et l'activation de neutrophiles se traduisant cliniquement par un exanthème pustuleux.

Néanmoins des superpositions de sous-types voire de types peuvent exister lors de l'exploration immunologique chez certains patients. Roujeau (2005) dresse un bilan rapide (plus didactique mais moins précis que celui de Pichler [2003] et repris par Rozieres et coll. [2009b]) des données immunologiques associées aux différentes manifestations cliniques d'hypersensibilité. Les lymphocytes TCD8 cytotoxiques semblent prédominer dans les maladies bulleuses (éruption fixe, SJS, TEN), mais également des cellules TCD8+CD56+ à caractéristiques de NK, alors que les TCD4 prédominent dans les éruptions communes, la PEAG et le DRESS. Les lymphocytes régulateurs (T-reg) pourraient limiter la progression des bulles dans l'éruption fixe à TCD8 épidermiques. De façon globale les TCD8 semblent confinés à l'épiderme et les TCD4 au derme. De même la production de cytokines semble différente : TNF-alpha, perforine/granzyme, Fas-ligand pour SJS/TEN, IL-5 pour le DRESS, IL-8 pour la

PEAG. Il semblerait donc que les deux types de réponses immunitaires soient impliqués, peut-être avec des agents initiateurs différents.

1.6.1.5. L'exploration diagnostique dans les réactions d'hypersensibilité

Le test diagnostique d'une réaction d'hypersensibilité médicamenteuse a un double objectif : confirmer l'origine médicamenteuse d'un tableau clinique et identifier l'agent causal. Il y a encore beaucoup d'incertitudes dans le domaine des tests diagnostiques. Une analyse récente des données de la littérature a exposé didactiquement les enjeux des tests utilisés (Lochmatter et coll., 2009b).

1.6.1.5.1. *Tests diagnostiques réalisés* in vivo

Il s'agit d'une part des tests cutanés : patch-test puis si négatif, prick-test (lecture après 24h) et intradermoréaction quand le produit peut être injecté (lecture immédiate et tardive). Les patch-tests (ou tests épicutanés) faciles de préparation (toute forme commerciale au besoin diluée dans de l'eau ou de la vaseline) présentent un intérêt documenté pour les éruptions maculo-papuleuses, l'érythème pigmenté fixe, la PEAG, les photosensibilités mais sont peu sensibles pour les SJS /TEN. Ces tests ne sont pas toujours très sensibles notamment pour les bêtalactamines, mais leur valeur prédictive négative est de l'ordre de 90 %. Ils sont utiles pour déterminer l'existence d'une réaction croisée (Barbaud, 2009b). Les données de la littérature, bien que peu nombreuses, semblent plutôt favorables pour les DRESS (Barbaud, 2009a). Une série rétrospective récente semble indiquer que les tests épicutanés ont une sensibilité marquée pour les

DRESS à la carbamazépine mais nulle pour les DRESS à l'allopurinol comme déjà mentionné (Santiago et coll., 2010). Il y a d'autre part le test de provocation, considéré comme le *gold standard* malgré la possibilité de faux positifs comme de faux négatifs. Il est utile en cas d'hypersensibilité immédiate mais mal standardisé (dose, durée des symptômes, définition de la positivité du test) et donc difficile à réaliser pour les réactions retardées.

Les tests *in vivo* présentent un risque pour le patient et n'apportent pas d'éléments contributifs à l'explication de la physiopathologie de la réaction. A l'inverse, les tests réalisés *in vitro* sont sûrs pour le patient et peuvent donner des éléments de réponse mécanistiques malgré un contexte non physiologique et extra-clinique de l'exploration (absence d'enzymes hépatiques pour générer des métabolites réactifs, absence d'éléments infectieux stimulant la réponse). Certains tests *in vitro* sont de plus encore au stade expérimental et non standardisés.

1.6.1.5.2. *Tests diagnostiques réalisés* in vitro

1.6.1.5.2.1. Principes, marqueurs, limites théoriques

Les tests *in vitro* cherchent à mettre en évidence :

- une prolifération lymphocytaire : test de transformation lymphocytaire (TTL),

- des marqueurs d'activation à la surface des cellules : up-régulation du CD69,

- des cytokines orientant vers une réponse immune de type Th1 (IFN-γ, IL-2) ou de type Th2 (IL-5, IL-13)

- une cytotoxicité (granzyme B, CD107a)

L'utilisation de ces tests, parce qu'ils s'appuient sur / mettent en évidence un mécanisme physiopathologique spécifique, nécessite :

- de disposer de cellules T mémoires persistantes malgré l'éviction du médicament en cause (des données suggèrent une grande abondance de ces cellules, 1/250 à 1/10 000, peut-être entretenue par une réactivité croisée avec d'autres complexes associant molécules du CMH et peptides allogéniques),

- de bien connaître les limites mécanistiques du champ d'exploration du test afin de ne pas écarter l'agent causal d'une réaction *in vivo* en n'explorant pas les bons effecteurs immunologiques *in vitro*,

- de connaître la cinétique d'activation des lymphocytes T pour explorer les marqueurs pertinents au bon temps immunologique.

On peut distinguer les marqueurs d'activation/orientation des lymphocytes suivant :

- marqueurs d'activation lymphocytaire : IL-2, IL-4, IFN-γ, TNF-α, CD69 apparaissant dans les 1 à 2h après reconnaissance d'un antigène présenté avec les signaux de co-stimulation,

- marqueur de prolifération lymphocytaire : synthèse d'ADN après expression du CD25 (récepteur de l'IL-2 sécrétée de façon autocrine induisant la prolifération), 24h après l'activation,

- marqueur d'orientation Th1 : sécrétion d'IFN-γ (stimulation des activités des macrophages),

- marqueur d'orientation Th2 : sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-13 et IL-10 (activation des éosinophiles, switch vers les IgE),

- marqueur d'orientation Th17 : sécrétion d'IL-17 (réponse spécifique à des pathogènes non efficacement éliminés par les voies Th1 et Th2 ou plus récemment, d'après les travaux de Vocanson et coll. [2010], rôle de régulation).

- marqueur d'orientation T-reg : forte sécrétion d'IL-10 et d'TGF-β (immunosuppression),

- marqueur d'orientation cytotoxique : expression du Fas-ligand, sécrétion de granzymes, d'IFN-γ et de TNF-α.

1.6.1.5.2.2. Le test de transformation lymphocytaire (TTL)

La présence de l'antigène provoque la prolifération des lymphocytes du patient, mais pas de patients sains, mise en évidence par l'incorporation de thymidine tritiée. Le résultat du test est formalisé par un index déterminé comme le rapport de la prolifération spécifique (dépendant de l'antigène) sur la prolifération non spécifique (basale). Le test est franchement positif pour un index supérieur à 3 sans qu'une corrélation avec la gravité clinique n'existe pour des valeurs supérieures. Le test est de mise en œuvre lourde (6 jours après isolation des cellules mononucléées ou PBMC, substance pure disponible mise à incuber à une concentration tenant compte des résultats des tests de toxicité intrinsèque, test réalisé contre un groupe contrôle) mais polyvalent (diverses éruptions sévères dont bulleuses, DRESS, anaphylaxie). La sensibilité du test dépend de la molécule, elle est de 60 à 70 % mais plus importante pour les réactions cutanées. La sensibilité semble atteindre 97 % et la spécificité 100 % pour les DRESS à la

carbamazépine et à la lamotrigine. A l'inverse, l'abacavir donne des résultats de TTL négatifs. Sachs et coll. (2001) ont montré l'intérêt de ne pas limiter ce test à la molécule mère et d'y associer des enzymes microsomales.

1.6.1.5.2.3. Test d'up-regulation du CD69

Le CD69 est un des marqueurs les plus précoces et les plus fortement augmentés de l'activation des cellules T, B et NK. Sa présence n'est que transitoire sur les cellules T. Il est mis en évidence par cytométrie de flux après marquage avec un anticorps conjugué à un fluorophore. Le test est adapté pour les manifestations d'hypersensibilité cutanées de tous types et pour les DRESS. Les résultats semblent comparables avec le TTL, la sensibilité pourrait être augmentée en raison du fait que tous les T activés ne prolifèrent pas (existence de "bystanders") (Beeleer et coll., 2008). Le test est plus rapide (quelques heures), moins lourd (pas de radioactivité) mais peut-être plus difficilement standardisable (cytométrie de flux) que le TTL. L'utilité de ce marqueur a été décrite pour la distinction entre une origine médicamenteuse ou virale au cours des éruptions cutanées de l'enfant (Torres et coll., 2003).

1.6.1.5.2.4. Mesure "*ex vivo*" de la sécrétion des cytokines

Il s'agit de mesurer une production de cytokines dans les PMBC (la notion d'*ex vivo* est donc considérablement extrapolée) après stimulation en présence de l'agent causal présumé. La mise en évidence des cytokines peut se faire par mesure de l'ARNm, par cytométrie de flux après marquage ou par ELISA ou ELISPOT. La durée d'incubation est de l'ordre de 3 jours. Beaucoup de données contradictoires mettent en doute les

performances de la technique qui améliore parfois la fiabilité du TTL. Lochmatter et coll. (2009a) ont montré que seuls l'IL-2, l'IL-5, l'IL-13 et l'IFN-γ présentaient une sensibilité de 80 % (60 % pour l'IL-5) avec une spécificité de 100 % pour les réactions d'hypersensibilité aux bêtalactamines et aux sulfamides (éruptions, DRESS, SJS) avec un TTL positif. Une étude antérieure incluant uniquement des éruptions maculo-papuleuses à divers médicaments (60% d'aminopénicillines) concluait à une sensibilité maximale pour l'IL-5 (92 %), devant le TTL (75 %), les patch-tests et les autres cytokines (IFN-γ et IL-10) (< 55 %), et à une spécificité de 100 % pour l'IL-5, l'IL-10 et le TTL (IL-10 à 60%) (Sachs et coll., 2002). On peut s'interroger sur un éventuel facteur de confusion physiopathologique qui entacherait ces pourcentages puisque les cytokines étudiées dépendent de la polarisation Th1/Th2 des cellules T réactives. Toutefois, les auteurs ont mis en évidence la production d'IL-5 aussi bien au niveau de PMBC à dominante TCD4+ qu'à dominante TCD8+, concluant à une production d'IL-5 à une étape précoce d'activation, conclusion reprise dans une revue de la littérature par le directeur de l'équipe (Merk et coll., 2005). Une production d'IL-5 mixte et isolée avait été également décrite en 1995 (Mauri-Hellweg et coll.).

Rozieres et coll. (2009a) ont revalorisé l'intérêt du test par ELISPOT pour l'IFN-γ pour évaluer la responsabilité des bêtalactamines lors d'une éruption maculo-papuleuse et de mettre en évidence des réactions croisées au sein du groupe pharmaco-chimique sans contamination par les réactivités d'hypersensibilité de type 1.

1.6.1.5.2.5. Mise en évidence du granzyme B et du CD107a

Le granzyme B est un des composés cytotoxique contenu dans les granules des lymphocytes TCD4 ou TCD8 (éruptions maculo-papuleuses) ou TCD8 et NK

(CD56+CD3-) (éruptions sévères). Sa mise en évidence se fait par un test ELISPOT. Le CD107a (ou LAMP-1) est un marqueur de dégranulation mis en évidence par cytométrie de flux présent sur les TCD4+, les TCD8+ et les NK. L'intérêt de ces marqueurs est de mettre en évidence une activité cytotoxique et donc d'apporter un éclairage mécanistique à la réaction d'hypersensibilité suspectée. La durée du test est de 24-72h. La pré-incubation avec l'IL-7 et l'IL-15 renforce l'intensité du test (ces cytokines sont impliquées dans la survie et l'activation des TCD8 mémoires et des NK). Il est ainsi possible de mettre en évidence une réactivité à un médicament plusieurs années après un épisode aigu, y compris chez des patients dont le TTL donne un index faible. Le nombre de cellules exprimant le marqueur CD107a après stimulation apparaît supérieur aux cellules libérant le granzyme B (Zawodniak et coll., 2010b). Il est à noter que la concentration utilisée pour objectiver la responsabilité de la carbamazépine chez un patient atteint de DRESS n'était pas thérapeutique (50 mg/l). Le test a également permis de confirmer la responsabilité de la sulfapyridine au cours d'un DRESS. Ainsi, la positivité du test pour la mise en évidence d'un DRESS indique la mise en jeu d'une activité cytotoxique au cours du processus physiopathologique de cette entité nosologique. A l'inverse parmi les 2 patients (sur les 12 testés) qui ne répondaient pas au granzyme B, un TEN était présent. Les fluoroquinolones donnaient une forte réponse aux 2 tests.

Explorant la même voie, un test recherchant le Fas-ligand soluble émis par les PBMC de patients atteints de SJS/TEN a été publié (Lan et coll., 2006).

1.6.1.5.2.6. Test de toxicité lymphocytaire

A côté des tests recherchant une réactivité immunologique d'une molécule thérapeutique - le plus souvent la molécule mère - les tests *in vitro* de toxicité lymphocytaire cherchent à mettre en évidence une toxicité globale de la molécule parente et de ses métabolites CYP-dépendants (Neuman et coll., 2000). De façon intéressante, alors que les TTL ou les patch-tests donnent des résultats contradictoires entre eux mais prédisent un nombre limité de réactions croisées entre anticonvulsivants aromatiques, les tests de toxicité lymphocytaire prédisent au contraire un taux élevé (Romano et coll., 2006). En utilisant ce test, une réactivité croisée entre le zonisamide et les sulfamides est prédite mais pas entre zonisamide et d'autres anticonvulsivants (Neuman et coll., 2008). La confirmation clinique de cette réactivité croisée n'est pas documentée à ce jour.

1.6.1.5.2.7. Mise en œuvre des tests *in vitro*

Il est généralement admis que les tests ne doivent pas être réalisés à la phase aiguë de la manifestation clinique en raison d'une activation immunitaire globale générant un trop fort bruit de fond immunologique. Pourtant, le moment optimal de réalisation du TTL pourrait dépendre du type de la réaction : test négatif pour le DRESS en phase aiguë, mais à l'inverse meilleure prédiction en phase aiguë en cas d'éruptions maculo-papuleuses, SJS et TEN. D'où la proposition japonaise de réaliser le TTL dans la semaine d'apparition des signes cutanés pour les éruptions maculo-papuleuses, SJS et TEN, et après 5 à 8 semaines pour le DRESS (Kano et coll., 2007). Il faut cependant tenir compte d'un effet inhibiteur des molécules thérapeutiques (corticoïdes) en phase précoce et d'un éventuel épuisement de la mémoire immunologique après un certain temps. Ainsi la fenêtre d'investigation optimale serait de 3 semaines à 3 mois après

l'épisode aigu. Cependant une proportion élevée de TCD4 réactifs aux médicaments (1/250 à 1/10 000) semble se maintenir dans le sang des patients ayant été atteints d'une réaction d'hypersensibilité, et ce de façon durable (au moins 12 ans) (Beeler et coll., 2006).

1.6.2. Les hypothèses de l'activation immunologique

1.6.2.1. L'hypothèse de l'haptène : la piste des métabolites réactifs

1.6.2.1.1. *La notion d'haptène*

L'approche immunologique traditionnelle repose sur la notion de présentation de l'antigène comme préalable à toute activation du système immunitaire : les cellules de présentation de l'antigène professionnelles (macrophages, cellules dendritiques, cellules de Langerhans, lymphocytes B, et, après induction par l'IFN-γ, kératinocytes et cellules endothéliales) présentent l'antigène dans un contexte de molécule de CMH de classe II (HLA-DR, -DP et -DQ) aux lymphocytes TCD4 alors que les lymphocytes TCD8 reconnaissent les antigènes présentées par à peu près toutes les molécules de l'organisme dans un contexte de molécule de CMH de classe I (HLA-A, -B et -C).

La réactivité immunologique d'une molécule est dépendante de son poids moléculaire, si son poids est inférieur à 1 000 Da, la réactivité immunologique doit passer par la liaison covalente de la molécule à une protéine de transport pour former un ensemble suffisamment gros pour constituer un épitope reconnaissable contre lequel une réponse immunitaire peut être dirigée. La plupart des molécules n'établissent que des liaisons réversibles avec les protéines de l'organisme (protéines de transport) et la formation de

liaisons covalentes nécessite une étape d'activation (métabolisme). Les pénicillines, les céphalosporines et les molécules à groupement thiol peuvent toutefois établir directement des liaisons covalentes. Ce nouveau composé protéine-molécule est désigné sous le nom d'haptène et constitue donc un néoantigène pour le système immunitaire. La probabilité que s'initie une réponse immunitaire augmente avec la durée de présence de l'haptène dans l'organisme et la taille de la molécule (diversification des sites épitopiques potentiels associée à une plus grande probabilité de rencontrer un paratope correspondant dans le répertoire des molécules de reconnaissance de lymphocytes T et B). Enfin, la reconnaissance d'un haptène pourrait se faire de deux manières, une manière indépendante du peptide transporteur (un site de reconnaissance) et une manière dépendante du peptide transporteur (deux sites de reconnaissance) (Martin et Weltzien, 1994).

1.6.2.1.2. *Voie métabolique des cytochromes P450 et surtoxification*

Les cytochromes P450 (CYP) est le terme générique pour désigner une superfamille de protéines principalement situées sur le réticulum endoplasmique, structurellement constituées d'un hème avec un atome de fer central, et douées d'activité catalytique mono-oxygénase dépendant de la présence de NADPH. Parmi les réactions d'oxydation catalysées, on peut citer l'hydroxylation de noyaux aromatiques et l'époxydation de liaisons insaturées. D'un point de vue finaliste, ces enzymes sont là pour favoriser l'élimination de composés chimiques (détoxification) en diminuant leur chance d'interaction avec les constituants de l'organisme (augmentation de l'hydrophilie pour

donner au xénobiotique plus d'affinité pour l'ultrafiltrat que pour les protéines par exemple).

Parfois les moyens mis en jeu aboutissent à l'effet inverse (surtoxification) et favorisent la formation de métabolites qui vont réagir avec :

- l'ADN, pouvant être à l'origine des phénomènes de mutagenèse, de carcinogenèse et/ou de tératogénicité,

- des constituants cellulaires pouvant être à l'origine d'une cytotoxicité (nécrose ou apoptose),

- des protéines endogènes sans fonction cellulaire vitale, pouvant entraîner l'apparition d'une nouvel épitope pouvant être reconnu comme étranger par le système immunitaire et induire une réponse immune.

Cette surtoxification semble concerner principalement les voies métaboliques oxydatives multienzymatiques. La conjugaison avec un groupement glucuronique ou soufré limite généralement la réactivité des composés (Ruscoe et coll., 1995). Certains enzymes sont considérés comme essentiellement neutralisants pour ces composés réactifs, ce sont les époxydes hydrolases (hydratation d'un époxyde stéréosélective du diastéréoisomère *trans*), glutathion transférase (formation d'un glutathion-conjugué) et quinone réductase (formation d'une hydroquinone). Une différence d'activité des différents enzymes peut être observée sur le plan qualitatif et/ou quantitatif avec :

- *une origine génétique :*

  = activité augmentée par surexpression quantitative ou variant qualitatif à réactivité accrue (sujets dits métaboliseurs ultra-rapides),

= activité diminuée par sous-expression quantitative ou expression d'une protéine non fonctionnelle (sujets dits métaboliseurs lents),

- *une origine acquise :*

= induction de l'expression enzymatique quantitative par un ou plusieurs autres xénobiotiques ou par le composé lui-même (auto-induction),

= inhibition de l'expression enzymatique qualitative par un ou plusieurs autres xénobiotiques ou par le composé lui-même (auto-inhibition). Dans ce dernier cas, il peut s'agir d'une inhibition irréversible de l'activité de l'enzyme par liaison covalente du produit formé sur des résidus aminoacides situés au niveau du site ou de l'accès au site catalytique de la protéine.

Il est possible de citer deux situations simples de surtoxification métabolique :

- un xénobiotique toxique est normalement inactivé en un métabolite moins toxique par un enzyme, mais cet enzyme est défaillant,

- un xénobiotique peu toxique est activé en un métabolite plus toxique par un premier enzyme et un second enzyme de détoxification du métabolite est absent ou défaillant.

Au-delà de ces grandes lignes, d'autres situations de surtoxification plus complexes et plus spécifiques de certains médicaments peuvent être rencontrées (Park et coll., 1995).

1.6.2.1.3. *Adducts et CYP*

Un certain nombre d'anticorps ont été retrouvés dans le sérum de patients atteints de réactions d'hypersensibilité hépatiques à certains médicaments (**Tableau 5**). Ces anticorps étaient dirigés contre le ou les CYP impliqué(s) dans le métabolisme du

médicament incriminé, et l'épitope reconnu pouvait être un adduct médicament-CYP mais ce ne semble pas être la règle. Une réactivité croisée entre l'enzyme natif et l'enzyme altéré par la formation du métabolite réactif pourrait expliquer cette reconnaissance. Sans quoi la réaction deviendrait auto-immune et l'éviction du médicament n'interromprait pas les manifestations cliniques.

Tableau 5 - Association entre les molécules thérapeutiques mises en cause dans des réactions d'hypersensibilité, les enzymes impliqués dans le métabolisme, les organes atteints, et les épitopes reconnus par les anticorps présents dans le sérum des patients (Park et coll., 1995 ; Pearce et coll., 2008).

Molécule	CYP450 responsable du métabolisme	Organes atteints	Cible de l'anticorps
Acide tiénilique	CYP2C	Foie	Adduct Acide tiénilique-CYP2C9 / CYP2C9 natif
Carbamazépine	CYP3A4 et 2C9	Foie, peau, poumon	CYP3A4 et 2C9 natifs
Dihydralazine	CYP1A2	Foie	CYP1A2 natif
Disulfiram	CYP1A2	Foie	CYP1A2 natif
Halothane	CYP2E1	Foie	Adduct Trifluoroacétyl-CYP2E1 / CYP2E1 natif
Isoflurane	CYP2A6	Foie	CYP2A6 natif
Phénytoïne	CYP2C9	Foie, peau	CYP2C9 natif

1.6.2.1.4. *Voie métabolique des espèces réactives de l'oxygène et surtoxification*

1.6.2.1.4.1. Généralités sur les espèces réactives de l'oxygène

L'implication quantitative du stress oxydant dans la génération de métabolites lymphotoxiques a été mise en évidence en utilisant la ménadione comme agent inducteur (Wolkenstein et coll., 1995). Allen (1994) a exposé un résumé de la théorie physico-chimique des espèces réactives de l'oxygène produites par le macrophage que nous allons essayer d'expliciter.

L'oxygène moléculaire, le dioxygène (O_2), est une espèce chimique stable dont la réactivité avec des molécules organiques exige une étape chimique d'activation. Une première voie d'activation passe par la réduction de O_2 conduisant à l'eau par le gain successif de 4 électrons (**équations 1 à 4**).

$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{-\cdot}$ (ion superoxyde) (**Équation 1)**,

$O_2^{-\cdot} + e^- + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2$ (peroxyde d'hydrogène) (**Équation 2**),

$H_2O_2 + e^- \rightarrow OH^- + OH^\cdot$ (radical hydroxyle) (**Équation 3**),

$OH^\cdot + e^- + H^+ \rightarrow H_2O$ (**Équation 4**).

L'oxygène est entièrement réduit par la cytochrome oxydase (complexe IV de la chaîne de transport des électrons dans la membrane interne de la mitochondrie) au cours de la respiration, l'oxygène étant l'accepteur final d'électrons mais des enzymes intermédiaires génèrent les espèces de l'oxygène partiellement réduites décrites dans les sous-chapitres suivants.

1.6.2.1.4.2. Anion superoxyde $O_2^{-\cdot}$

L'ubiquinone (ou coenzyme Q10), la NADH-déshydrogénase mitochondriale comme la NADPH oxydase endothéliale catalysent l'addition d'un unique électron à l'oxygène aboutissant à la formation d'$O_2^{-\cdot}$. D'autres évènements métaboliques peuvent également conduire à la formation d'$O_2^{-\cdot}$ (auto-oxydations des catécholamines, des groupements thiols, des coenzymes $FMNH_2$ et $FADH_2$, métabolisme des xénobiotiques par les CYP…) (Gardès-Albert et coll., 2003).

$O_2^{-\cdot}$ a une réactivité limitée et a donc une certaine mobilité avant d'interagir avec des composés chimiques (ADN, protéines, lipides, …) ou d'autres espèces réactives générant alors des espèces plus réactives que lui (**équations 5 et 6**).

$O_2^{-\cdot} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + O_2$ (réaction de Haber Weiss) (**Équation 5**)

$O_2^{-\cdot} + NO^{\cdot} \rightarrow ONOO^-$ (anion peroxynitrite) (**Équation 6**)

$O_2^{-\cdot}$ est neutralisé par le cytochrome c (Fe^{3+}) (chaîne respiratoire mitochondriale) ou par l'acide ascorbique (vitamine C). La réactivité de l'anion superoxyde peut aussi être majorée par réduction par les superoxyde dismutases (métalloenzymes à cuivre et zinc cytosoliques, ou à manganèse mitochondriales) (**équation 7**).

$O_2^{-\cdot} + O_2^{-\cdot} \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (superoxyde dismutase) (**Équation 7**)

1.6.2.1.4.3. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2

Outre le rôle de l'activité superoxyde dismutase, la formation d'H_2O_2 est également possible à partir de diverses oxydases peroxysomales (aminoacides oxydases, glycolate oxydase, urate oxydase…).

Une voie de formation d'H_2O_2 repose sur l'activité catalytique de la NADPH oxydase (**équation 8**) :

$2\ O_2 + NADPH,H^+ \rightarrow 2\ HO_2^{\cdot} + NADP^+$ (NADPH oxydase) (**Équation 8**)

avec $HO_2^{\cdot}$ = radical perhydroxyle

L'équilibre acido-basique de l'acide hydrodioxylique (pKa = 6.4) conduit au peroxyde d'hydrogène (**équations 9 et 10**). Ainsi, en milieu acide (phagosome) H_2O_2 est formé mais en milieu alcalin, $O_2^{-\cdot}$ est l'espèce majoritaire. Notons que la voie chimique de dismutation des **équations 9 et 10** est facilitée en présence de superoxyde dismutase (**équation 7**).

$2\ HO_2^{\cdot} \leftrightarrow 2\ O_2^{-\cdot} + 2\ H^+$ (**Équation 9**)

$HO_2^{\cdot} + O_2^{-\cdot} + H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (**Équation 10**)

Le mécanisme de la réactivité d'H_2O_2 qui est un acide très faible (pKa = 11.65) dépend du pH. Ainsi, en milieu alcalin, H_2O_2 réagit directement sur la lucigénine (diméthylbisacridinium, DBA^{2+}) (**équation 11**). En revanche en milieu neutre ou faiblement acide (physiologique), la réaction passe par une activation puis une

annihilation radicalaire (**équations 12 et 13**). La réaction globale est donc une dioxygénation réductive (ajout d'oxygène et addition de 2 électrons).

$DBA^{2+} + HO_2^- \rightarrow$ 2 N-méthylacridone + photon (**Équation 11**)

$DBA^{2+} + O_2^{-\cdot} \rightarrow$ 2 N-méthylacridone + $DBA^{2+\cdot}$ + O_2 (**Équation 12**)

$DBA^{2+\cdot} + O_2^{-\cdot} \rightarrow$ 2 N-méthylacridone + photon (**Équation 13**)

Une autre voie de formation d'H_2O_2 repose sur l'activité catalytique haloperoxydasique (myéloperoxydase, peroxydase éosinophile) (**équations 14 et 15**).

$H_2O_2 + X^- \rightarrow XO^- + H_2O$ (haloperoxydase), X est un halogène (Cl ou Br) (**Équation 14**)

Puis $XO^- + H_2O_2 \rightarrow H_2O + X^- + O_2$ (**Équation 15**)

Ainsi le luminol est oxydé par la base de l'acide hypohaleux formé (perte de 2 électrons cédés à l'halogène, **équation 16**), puis est à nouveau oxydé par la deuxième molécule d'H_2O_2 (gain de 2 électrons sur les oxygènes**, équation 17**). Il s'agit donc d'une dioxygénation simple.

luminol + $XO^- \rightarrow$ diazaquinone + X^- + H_2O (**Équation 16**)

diazaquinone + $H_2O_2 \rightarrow$ aminophtalate + N_2 + photon (**Équation 17**)

Le H_2O_2 formé est réduit par la catalase (peroxysomale) (**équation 18**) et les glutathion peroxydases (cytosoliques) (**équation 19**).

$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$ (catalase) (**Équation 18**)

$H_2O_2 + 2\ GSH \rightarrow 2\ H_2O + 2\ GS\text{-}SG$ (glutathion peroxydase) (**Équation 19**)

avec GSH = glutathion

Cependant en présence de fer ou de cuivre (**équations 20**) ou d'anion superoxyde (**équation 21**), une réduction partielle supplémentaire est possible et forme alors le radical hydroxyle $OH^{\cdot}$.

$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^{-} + Fe^{3+}$ (réaction de Fenton) (**Équation 20**)

$H_2O_2 + O_2^{-\cdot} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^{-} + O_2$ (réaction de Haber Weiss) (**Equation 5**)

1.6.2.1.4.4. Le radical hydroxyle $OH^{\cdot}$

Les radicaux hydroxyles formés sont très réactifs et réagissent extrêmement vite avec les composés endogènes (ADN, protéines, lipides, …) (**équations 21 à 24**).

$OH^{\cdot} + Fe^{2+} \rightarrow OH^{-} + Fe^{3+}$ (**Équation 21**)

$OH^{\cdot} + RH \rightarrow R^{\cdot} + H_2O$ (**Équation 22**)

$OH^{\cdot} + C{=}C \rightarrow C(OH)\text{-}C^{\cdot}$ (**Équation 23**)

$OH^{\cdot} + GSH \rightarrow GS^{\cdot}$ (radical thiyle) + H_2O (**Équation 24**)

Le rôle du glutathion est ambivalent puisque qu'il déradicalise $R^{\cdot}$ évitant ainsi la formation de radicaux peroxyles ($RO_2^{\cdot}$ par action d'O_2 sur $R^{\cdot}$) mais il devient alors radicalisant potentiel pour d'autres molécules (**équation 25**). Cette réaction relativise

l'idée communément admise que la conjugaison du glutathion forme des métabolites sûrs car stables.

$GSH + R^{\cdot} \rightarrow GS^{\cdot} + RH$ (**Équation 25**)

L'acide ascorbique en revanche piège les radicaux libres de façon définitive (sans propre activation), ayant ainsi une action détoxifiante durable, notamment sur les radicaux délétères d'autres antioxydants tels que le glutathion et la vitamine E (alpha-tocophérol). D'autres *scavengers* (piégeurs de radicaux libres) sont le mannitol, le DMSO (DiMéthylSulfOxyde), la cystéine-disulfide.

1.6.2.1.4.5. L'oxygène singulet $^1O_2$

Une autre voie d'activation de O_2 passe par la formation de l'oxygène singulet $^1O_2$ (ou $^1\Delta_g$) suite à l'excitation de l'oxygène stable. Cette espèce est hautement réactive avec les molécules organiques en raison de l'abaissement de sa multiplicité moléculaire (associée à son nombre de spin quantique) à S=0 (état singulet) à la différence de l'oxygène à l'état triplet $^3O_2$, qui est une espèce diradicalaire (S=1). En effet les règles quantiques de la conservation de symétrie du spin décrivent une barrière théorique dans la réactivité entre les molécules organiques de S=0 et l'oxygène à l'état triplet (S=1). Cette barrière est levée avec l'oxygène singulet qui a la même multiplicité que les molécules organiques (S=0) (Allen, 1994). La formation de l'oxygène singulet $^1O_2$ est très débattue, elle est admise au cours des réactions suivantes découlant des **équations générales 14 et 15**.

- Suite à l'action catalytique de la lactoperoxydase (**équations 26 et 27**),

$H_2O_2 + Br^- \rightarrow BrO^- + H_2O$ (lactoperoxydase) (**Équation 26**)

$BrO^- + H_2O_2 \rightarrow H_2O + Br^- + {}^1O_2$ (**Équation 27**)

- Suite à l'action catalytique de la peroxydase des polynucléaires éosinophiles (**équations 28 puis 27**),

$H_2O_2 + Br^- \rightarrow BrO^- + H_2O$ (haloperoxydase) (**Équation 28**)

- En revanche la formation d'$^1O_2$ suite à l'action catalytique de la myéloperoxydase des polynucléaires neutrophiles théoriquement possible dans le phagosome (dérivant des **équations 14 et 15**) n'est pas démontrée expérimentalement (**équations 29 et 30**).

$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow ClO^- + H_2O$ (haloperoxydase) (**Équation 29**)

$ClO^- + H_2O_2 \rightarrow H_2O + Cl^- + {}^1O_2$ (**Équation 30**)

Il a été proposé sans confirmation spectrométrique le rôle de la NADPH oxydase (**équation 31**) dont Allen (1994) explicite le mécanisme via les **équations 32 à 34** dérivant des **équations 8, 9 et 10**).

$2\ {}^3O_2 + NADPH,H^+ \rightarrow H_2O_2 + {}^1O_2 + NADP^+$ (NADPH oxydase) (**Équation 31**)

$2\ {}^3O_2 + NADPH,H^+ \rightarrow 2\ {}^2HO_2 + NADP^+$ (NADPH oxydase) (**Équation 32**)

$2\ {}^2HO_2^{\cdot} \leftrightarrow 2\ {}^2O_2^{-\cdot} + 2\ H^+$ (**Équation 33**)

${}^2HO_2^{\cdot} + {}^2O_2^{-\cdot} + H^+ \rightarrow {}^1H_2O_2 + {}^1O_2$ (**Équation 34**)

La réaction repose donc sur la dismutation de l'anion superoxyde en milieu acide et l'énergie produite au cours de cette dismutation radicalaire devrait permettre de générer l'oxygène singulet.

Il est à noter que la superoxyde dismutase à l'origine de la dismutation autorise une élévation de la multiplicité au cours de la réaction et évite ainsi la formation de l'oxygène singulet au profit de l'oxygène triplet stable (**équation 35** dérivant de l'**équation 7**).

$^{2}O_2^{-\cdot} + {}^{2}O_2^{-\cdot} \rightarrow {}^{1}H_2O_2 + {}^{3}O_2$ (superoxyde dismutase) (**Équation 35**)

Enfin, la formation d'$^{1}O_2$ suite à l'action catalytique de la catalase est théoriquement possible mais jamais observée (**équation 36**, dérivant de l'**équation 18).**

$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + {}^{1}O_2$ (catalase) (**Équation 36**)

La réactivité chimique de l'oxygène singulet aboutit à la formation de dioxétanes, de dioxétanones, d'endoperoxydes souvent instables et à l'origine d'ouvertures de cycles insaturés (réactions de Diels-Alder, 1,2 cycloadditions, réaction de Schenk, 1,4 cycloadditions).

1.6.2.1.5. *Implication de la myéloperoxydase (MPO)*

La réactivité du système myéloperoxydase / peroxyde d'hydrogène / chlorures ($MPO/H_2O_2/Cl^-$) générateur de l'acide hypochloreux (HClO) comme modèle *in vitro* du métabolisme oxydatif potentiellement induit par la dégranulation des neutrophiles a été

notamment exploré pour la carbamazépine (Furst et Uetrecht, 1993), la mitoxantrone (Pnaousi et coll., 1994), le métabolite de l'indométacine (Ju et Uetrecht, 1998), la phénytoïne (Lu et Uetrecht, 2008). Ces travaux ont démontré la réactivité des composés générés par le HClO avec le glutathion, la N-acétylcystéine. Les familles chimiques réactives proposées étant des carbocations (carbamazépine), des radicaux libres (carbamazépine et phénytoïne), des iminoquinones (carbamazépine, indométacine).

La myéloperoxydase est un enzyme présent dans les polynucléaires neutrophiles et les monocytes qui produit du HClO à partir du H_2O_2. Le H_2O_2 est généré à partir de la NADPH oxydase qui oxyde l'oxygène moléculaire en ion superoxyde $O_2^{-\cdot}$, lequel réagit avec la superoxyde dismutase pour former H_2O_2 (Uetrecht, 1995). Les travaux d'Andersen et coll. (2003) indiquent que la voie de la MPO pourrait conduire à la formation du radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) en passant par la production de HClO. Les travaux de Kettle et Winterbourn (1994) ont cependant montré que la MPO pouvait également permettre l'hydroxylation de substrats directement à partir de $O_2^{-\cdot}$ (hydroxylation effective en présence de piégeurs de radicaux libres comme en présence de piégeurs de HClO).

Schématisation de la voie de production de l'acide hypochloreux (HClO) par le système MPO/H_2O_2/ Cl^- dans les neutrophiles et les monocytes :

O_2 + NADPH oxydase → $O_2^{-\cdot}$ (ion superoxyde)

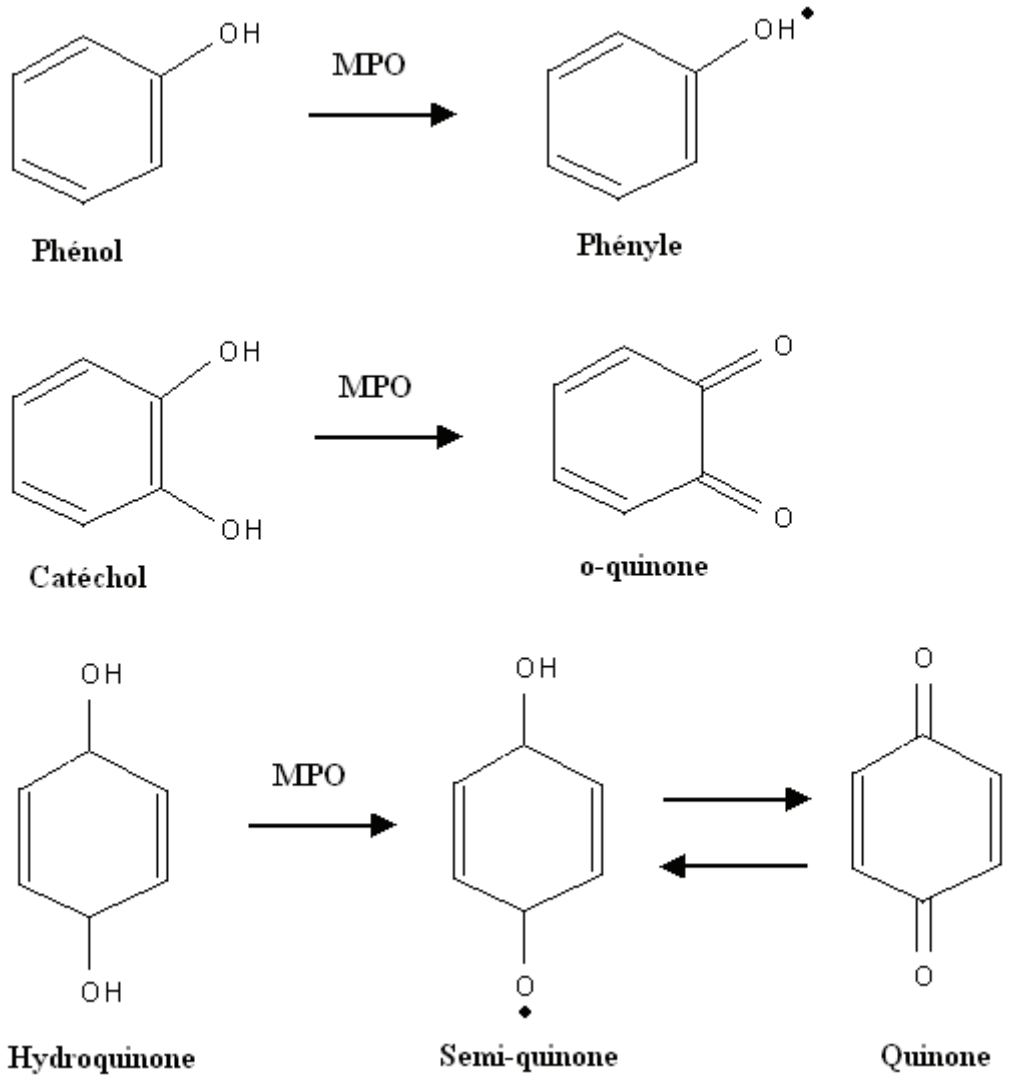
$2\ O_2^{-\cdot} + 2H_2O$ + superoxyde dismutase → $H_2O_2 + O_2 + 2OH^-$

H_2O_2 + MPO + Cl^- → HClO

Le système est cependant latent dans le sang, la MPO étant stockée dans les granules, un stimulus (bactérien par exemple) est nécessaire pour activer la NADPH oxydase et provoquer la dégranulation.

La myéloperoxydase (MPO) n'est pas le seul enzyme humain doué d'une activité peroxydasique, ont également été décrites les peroxydases éosinophile (EPOx), utérine, salivaire, thyroïdienne, la lactoperoxydase, les prostaglandines synthases H1 (plaquettaire) et H2 (cellules inflammatoires) (O'Brien, 2000). La MPO et l'EPOx sont contenues dans les lysosomes et libérées dans la vacuole de phagocytose ou directement dans le plasma. Il est à noter que la MPO catalyse la formation de HClO à partir d'ions chlorures (20 à 70 % du H_2O_2 libéré par les neutrophiles) alors que l'EPOx catalyse la formation de HBrO à partir d'ions bromures. Les peroxydases catalysent aussi la formation d'hypothiocyanite (HOSCN) moins réactifs que HClO à partir de thiocyanates (SCN^-), ces derniers pourraient être vus comme des modulateurs de la production de HClO. L'activation expérimentale des dérivés oxygénés du benzène permet d'augmenter la réactivité basale avec l'ADN différente entre les composés (Levay et Bodel, 1996). L'ordre basal étant 1,2,4-benzène-triol >> hydroquinone > phénol > catéchol, les espèces réactives associées sont quinone-semiquinone / hydroquinone, phényle / phénol et *o*-quinone / catéchol, la réactivité du 1,2,4-benzene-triol reste échangée (**Figure 1**).

Figure 1 - Activation des dérivés oxygénés du benzène par le système MPO/H_2O_2/Cl^-.



Des adducts avec l'ADN des dérivés phénoxylés de l'étoposide et du tamoxifène dépendants de l'activation par une peroxydase de ces molécules semble à la base de leurs propriétés anticancéreuses (Kagan et coll., 1999; Pathak et coll., 1995).

Les manifestations idiosyncrasiques de type agranulocytose sont associées à des médicaments dont l'activation par le système MPO/H_2O_2/Cl^- comme par les neutrophiles activés peut former des liaisons avec les protéines (**Tableau 6**).

Tableau 6 - Nature des métabolites réactifs produits par le système MPO/H_2O_2/Cl^- et par les neutrophiles activés identifiés chez des médicaments associés à des agranulocytoses (d'après la revue de la littérature d'O'Brien (2000).

Molécule	Nature du métabolite réactif
Acide 5-aminosalicylique	Iminoquinone
Amodiaquine	Iminoquinone, radical cationique
Clozapine	Nitrénium
Dapsone	Hydroxylamine et ou N-chloramine
Diclofénac	Radical hydroxyle
Indométacine	Iminoquinone
Procaïnamide	Hydroxilamine et ou N-chloramine
Sulfadiazine	Hydroxilamine et ou N-chloramine
Sulfaméthoxazole	Hydroxilamine et ou N-chloramine
Triméthoprime	Quinones
Vesnarinone	Iminoquinone

L'agranulocytose s'expliquerait par la génération de métabolites réactifs au sein des polynucléaires qui provoquerait la mort de la cellule hôte. Et l'activité thérapeutique de ces molécules pourrait également s'expliquer par la destruction de cellules inflammatoires : dapsone et dermatite herpétiforme, acide 5-aminosalicylique (sulfasalazine) et recto-colite hémorragique, maladie de Crohn et polyarthrite rhumatoïde.

Une convergence entre les voies métaboliques CYP- et MPO-dépendantes est possible. Ainsi la formation de la quinoneimine responsable de l'hépatotoxicité du paracétamol est formée aussi bien à partir du CYP2E1 et 1A2 que de la voie du MPO, cependant les CYP semblent plus efficaces car les modèles animaux déficients en ces enzymes sont résistants à la nécrose hépatique induite par le paracétamol. Cependant, contrairement

au foie, l'activité CYP-dépendante est très faible dans les leucocytes, si bien que le métabolisme oxydatif principal leucocytaire semble être MPO-dépendant (Uetrecht et Sokoluk, 1992).

1.6.2.1.6. *Autres enzymes potentiels d'activation*

Les travaux publiés sur la réactivité des métabolites issus de l'oxydation de la carbamazépine sont limités à l'exploration de la voie métabolique de la myéloperoxydase mais d'autres enzymes sont susceptibles de générer des espèces réactives.

Les leucocytes humains ne produisent peu ou pas de monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$) laissant penser que les espèces réactives de l'azote (monoxyde d'azote et peroxynitrite) sont *a priori* peu concernées. De plus la génération de ces espèces dépend majoritairement de l'anion superoxyde et sont donc en compétition avec la superoxyde dismutase pour la réaction initiatrice (**équation 37**).

$O_2^{-\cdot} + NO^{\cdot} \rightarrow ONOO^-$ (anion peroxynitrite) (**Équation 37**)

La formation par le macrophage de $NO^{\cdot}$ dépend d'une activité NO synthase auto-inductible. $ONOO^-$ réagit ensuite avec d'autres espèces pour former d'autres radicaux ($NO_2^{-\cdot}$, $CO_3^{-\cdot}$, $HO^{\cdot}$) à l'origine d'hydroxylations, de nitrations, de dimérisation, de radicalisations en cascades (Trujillo et coll., 2000 ; Linares et coll., 2001).

Concernant les autres voies générant des espèces réactives de l'oxygène, on peut citer la prostaglandine-synthase mais son activité leucocytaire est minoritaire par rapport à celle

de la myéloperoxydase. Wolkenstein et coll. (1995) a observé une augmentation de la lymphotoxicité en ajoutant du formaldéhyde dans le milieu d'incubation enrichi avec des microsomes hématiques murins, mettant ainsi en évidence une implication potentielle de l'aldéhyde déshydrogénase, l'alcool déshydrogénase, l'aldéhyde oxydase, l'aldéhyde réductase et/ou la xanthine oxydase dans la génération de métabolites cytotoxiques. Nous ne détaillerons ici que les enzymes les plus impliqués dans la production d'espèces réactives de l'oxygène.

1.6.2.1.6.1. La NADPH oxydase

La NADPH oxydase est un complexe enzymatique multiprotéique présent chez les monocytes/macrophages, les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles. Au repos, le complexe est dissocié (une partie cytosolique, une partie transmembranaire). Suite à l'activation des cellules de l'immunité innée, la NADPH oxydase devient active est génère l'ion superoxyde (**équation 38**).

$$NADPH + 2\ O_2 \rightarrow NADP^+ + H^+ + 2\ O_2^{-\cdot} \quad \text{(NADPH oxydase)} \quad \textbf{(Équation 38)}$$

1.6.2.1.6.2. L'aldéhyde oxydase

L'aldéhyde oxydase (EC 1.2.3.1) est une enzyme cytosolique présente dans le foie, le rein, le poumon et le cerveau humain. Elle est capable d'oxyder les aldéhydes en acide carboxylique, d'hydroxyler les azahétérocycles aromatiques et d'oxyder les azahétérocycles avec un ammonium quaternaire ; mais également de réduire les composés nitro-aromatiques, isoxazolés et isothiazolés. L'activité de l'aldéhyde oxydase

est génératrice d'ion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène (Kundu et coll., 2007). Le riluzole (molécule thérapeutique indiquée dans la sclérose latérale amyotrophique) semble pouvoir influencer le profil des espèces oxydées de l'oxygène (inhibition non-compétitive de la production de superoxyde et inhibition compétitive de la production de peroxyde d'hydrogène résultant dans l'augmentation globale de la production de superoxyde) (Al-Omar et coll., 2005).

Schématisation simplifiée de la voie de production d'ion superoxyde ($O_2^{-\cdot}$) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l'aldéhyde oxydase à partir de l'oxygène comme accepteur d'électron(s) :

O_2 + aldéhyde oxydase → $O_2^{-\cdot}$ (réduction mono-électronique de O_2)

+ H_2O_2 (réduction di-électronique de O_2)

Physiologiquement, l'aldéhyde oxydase oxyde le N-méthyl-nicotinamide (vitamine B3 ou PP), le pyridoxal (vitamine B6), le rétinaldéhyde et oxyde l'aldéhyde homovanillique en acide homovanillique (catabolisme de la dopamine). L'enzyme pourrait être impliqué dans les atteintes hépatiques alcooliques via la voie de l'aldéhyde déshydrogénase, l'acétaldéhyde et le NADH formés pouvant tous deux être substrat de l'aldéhyde oxydase et entraîner alors la production de superoxyde capable d'initier la peroxydation lipidique (Mira et coll., 1995).

Un certain nombre de médicaments sont des substrats pour l'aldéhyde oxydase : famciclovir, aciclovir, zonisamide, pyrazinamide, quinine, acridinecarboxamide et méthotrexate.

La carbamazépine ne réduit que très faiblement l'activité *in vitro* de cet enzyme. En revanche de nombreux composés tricycliques ont un fort effet inhibiteur : antidépresseurs tricycliques, phénothiazines, clozapine et olanzapine, antihistaminiques, dihydropyridines et vérapamil. Il est à noter que l'amsacrine et la tacrine sont également des inhibiteurs (Obach et coll., 2004).

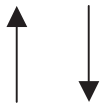
1.6.2.1.6.3. La xanthine oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase est également un enzyme cytosolique présent dans le foie, le rein humain mais ses autres localisations sont strictement complémentaires de celles de l'aldéhyde oxydase (cœur, rate, muscle squelettique, glandes surrénales et mammaires) (Strolin-Benedetti, 2010). De façon moins limitée que l'aldéhyde oxydase, la xanthine oxydoréductase a deux activités interconvertibles chez l'homme : une activité xanthine oxydase (EC 1.1.3.22) et une activité xanthine déshydrogénase (EC 1.1.1.204). La xanthine déshydrogénase oxyde $NADH,H^+$ en NAD^+, alors que la xanthine oxydase réduit l'oxygène moléculaire en produisant l'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. La forme déshydrogénase peut être définitivement convertie en forme oxydase suite à l'action de protéases ou de façon réversible suite à l'oxydation de ses résidus cystéine. L'activité la plus connue de la xanthine oxydase est l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine (avec production de NADH) puis la xanthine en acide urique (avec production de H_2O_2). Le peroxynitrite inhibe l'activité de la xanthine oxydase

mais en contrepartie, l'acide urique est un inactivateur de l'anion. L'allopurinol est l'inhibiteur de la xanthine oxydase utilisé en thérapeutique.

Schématisation simplifiée de l'interconversion des deux formes de la xanthine oxydoréductase : formation de NAD^+ par la forme déshydrogénase à partir du $NADH,H^+$, production d'ion superoxyde ($O_2^{-\cdot}$) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la forme oxydase à partir de l'oxygène comme accepteur d'électrons :

$NADH,H^+$ + xanthine déshydrogénase → NAD^+



O_2 + xanthine oxydase → $O_2^{-\cdot}$ (réduction mono-électronique de O_2)

+ H_2O_2 (réduction di-électronique de O_2)

1.6.2.1.6.4. Rôle de la NAD(P)H oxydoréductase

L'activité NAD(P)H oxydoréductase (NQO) a également été désignée sous le terme de DT-diaphorase. Cet enzyme cytosolique est impliqué dans la réduction (diélectronique) des quinones en hydroquinones notamment des dérivés aromatiques cancérogènes. L'isoforme la plus étudiée est la NQO1. A la décharge de l'aldéhyde oxydase et de la xanthine oxydase suspectées initialement, Stiborova et coll. (2003) ont montré que la NQO1 était l'agent toxifiant de l'acide aristolochique (réduction d'un nitrate en nitrénium). De façon intéressante, l'expression du gène de la NQO1 est activée par le peroxyde d'hydrogène au niveau de l'élément de réponse aux antioxydants [ARE]. [ARE] est présent au niveau de la région promotrice de nombreux gènes codant pour des enzymes de détoxification des xénobiotiques (dont les époxydes hydrolases microsomales) suite à l'activation de la voie Nrf2-Keap1 sensible à l'augmentation de l'électrophilie cellulaire. Cette voie est particulièrement impliquée dans la détoxification du paracétamol (Klaassen et Reisman, 2010). Par ailleurs, dans la cellule embryonnaire de rein humaine, l'activité NQO1 (inhibée par le dicoumarol et la ménadione) associée à une augmentation du taux de quinones réduites ont un effet positif sur la régulation de la voie MEKK1, SAPK/JNK, NF-κB stimulée par différents stress (dont les UV) et impliquant des espèces réactives de l'oxygène. MEKK1 est inducteur d'apoptose mais SAPK (Stress Activated Protein Kinase) via NF-κB serait plutôt anti-apoptotique (Cross et coll., 1999), d'où une influence mixte de la NQO1.

Cependant, hormis Lillibridge et coll. (1996) qui l'utilisent comme outil pharmacologique, aucune publication ne fait état d'un rôle de l'activité NAD(P)H oxydoréductase dans les réactions d'hypersensibilité médicamenteuses même si plusieurs études dont la plus récente (Castro-Giner et coll., 2009) ont montré une

association entre le polymorphisme de la NQO1 et la prédisposition à l'asthme suite à l'exposition à des facteurs environnementaux.

1.6.2.1.7. *Principe du concept de formation de métabolites "in situ"*

La réactivité d'un métabolite, notamment lorsque le métabolite inactive l'enzyme qui vient de le former, peut être très forte. La plupart des métabolites réactifs sont en effet des composés électrophiles qui réagissent avec les agents de détoxification nucléophiles, qu'ils soient polyvalents (glutathion, N-acétylcystéine) ou plus spécifiques de composés réactifs (acide ascorbique et acide caféique avec les semiquinones). L'activité CYP450 est essentiellement hépatique et très naturellement la prise médicamenteuse est très fréquemment associée à une réactivité hépatique à bas bruit (augmentation transitoire des transaminases et/ou des γ-GT). Un certain nombre de médicaments sont par ailleurs franchement hépatotoxiques. Avec le même raisonnement certains médicaments ont une toxicité ciblée sur tel organe parce que l'organe en question concentre le produit à des taux cytotoxiques et/ou dispose d'un équipement enzymatique CYP450 ; par exemple le rein, organes excréteur qui contient les CYP1A1, 2D6 et 3A4. Les manifestations multiviscérales observées au cours des syndromes de DRESS sont moins faciles à expliquer. Il faut soit avoir recours à des métabolites "métastables" pour reprendre la nomenclature des physiciens, lesquels se distribueraient dans l'organisme sous forme de métabolites stables et dans des conditions physiopathologiques locales (variation de pH, augmentation du potentiel oxydo-réducteur) deviendraient instables et réagiraient avec les protéines environnantes. Ou alors, imaginer que les métabolites seraient formés sur le site de la manifestation

toxique, avec l'équipement métabolique local, c'est le concept de formation *in situ*. Cette réactivité anormale pourrait découler des conditions d'apparition de surtoxification issues d'une perturbation pathologique (contexte infectieux ou parasitaire avec afflux de neutrophiles ou d'éosinophiles et libération d'espèces réactives de l'oxygène). De façon intéressante, des données d'autoradiographie réalisées dans les laboratoires pharmaceutiques japonais d'évaluation du risque médicamenteux montrent une bonne corrélation entre la production d'adducts covalents observée *in vitro* avec les microsomes hépatiques et les fixations *in vivo* de la radioactivité au niveau du foie, mais aussi une distribution de la radioactivité au niveau des sites de toxicité organique (clozapine et moelle osseuse par exemple). Il est à noter que l'extrapolation des données à l'homme n'est pas toujours sans biais. Ainsi la tacrine hépatotoxique chez l'homme forme plus d'adducts *in vitro* sur les microsomes hépatiques humains que murins, le modèle animal minorant l'hépatoxicité humaine bien réelle (Takakusa et coll., 2008).

1.6.2.1.8. *Rôle de la peau*

Les éruptions cutanées concernent 2 à 3 % des patients hospitalisés, 90 % d'entre elles sont bénignes et transitoires mais un effet indésirable cutané sévère (*Severe Cutaneous Adverse Reaction*, SCAR) concerne 1 patient hospitalisé sur 1 000 (Roujeau, 2006). La peau représente 10 % du poids corporel total et possède de nombreux enzymes et des cellules immunocompétentes (cellules de Langerhans et cellules dendritiques). Les lymphocytes périphériques CLA+, c'est-à-dire porteurs du récepteur aux molécules d'adhésion de la peau (Cutaneous Lymphocyte-Associated, CLA), sont des marqueurs des réactions d'hypersensibilité (Blanca et coll., 2000 ; Torres et coll., 2003). L'équipement enzymatique de la peau comprend des cytochromes P450 mais de profil

différent de celui du foie : les CYP 1A1, 1B1, 2B6, 2E1 et 3A5 sont bien exprimés constitutivement chez l'homme, les CYP 2C9 et 3A4 faiblement. Ces enzymes sont surtout exprimés (quantitativement) par les kératinocytes, beaucoup moins dans les monocytes, les lymphocytes ou les fibroblastes (Ahmad et Mukhtar, 2004). En tenant compte de l'activité spécifique et de la représentation tissulaire des cytochromes, l'époxydation des doubles liaisons d'un système conjugué semble dépendre des CYP 2C19, 1A2 et 3A4 au niveau hépatique mais principalement du CYP 2B6 au niveau cutané. Cette métabolisation peut stimuler la production d'IL-8 par les cellules dendritiques (Bergström et coll., 2007). A l'inverse, les arylamines (sulfamides, dapsone) semblent ne pas être activées au niveau des kératinocytes humains par les cytochromes P450, sans exclure une autre voie d'activation (Vyas et coll., 2006). Enfin, l'exposition aux UVB semble capable de modifier l'expression des CYP 1A1 et 1B1 pour augmenter la présence des enzymes au niveau épidermique, ce qui serait un des mécanismes permettant d'expliquer les photosensibilisations et l'accroissement de la prévalence des cancers cutanés chez les personnes exposées au soleil, dans la mesure où le CYP1A1 est l'enzyme principal de biotransformation des hydrocarbures polycycliques aromatiques (Katiyar et coll., 2000). Par ailleurs, l'exposition aux UV majore l'expression de la prostaglandine endoperoxyde synthase 2, de l'IL-1, IL-2, IL-8 et diminue l'expression des facteurs de croissance de la peau au sein des kératinocytes épidermiques (Pisarchik et coll., 2004).

1.6.2.2. Le "p-i" concept : l'activation spontanée

Un concept novateur a été proposé par Pichler (2002), à savoir une reconnaissance directe de la molécule par les lymphocytes T sans étape de présentation (processing) ni hapténation préalable. C'est le "p-i concept" (*pharmacological interactions of drugs with immune receptors*, *pharmaco-immune*, p-i) dénommé ainsi par rapprochement avec l'interaction ligand-récepteur de la pharmacologie. Les bases scientifiques de ce concept reposent sur les constatations suivantes réalisées par différentes équipes avec le sulfaméthoxazole (Pichler, 2003) :

- les cellules de présentation de l'antigène fixées par le glutaraldéhyde, donc incapables de processing, conservent la propriété de présenter l'antigène aux cellules T,
- l'inhibition des voies métaboliques augmente la réactivité des cellules T,
- la liaison est non covalente,
- la réactivité des cellules T est immédiate, délai excluant toute étape de métabolisation ou de processing intermédiaire.

La stimulation est néanmoins TCR et CMH-dépendante, le récepteur des cellules T doit interagir avec le médicament et le CMH pour que la stimulation de la cellule T soit complète. De plus le niveau d'activation doit être bas ainsi le p-i concept semble s'appliquer préférentiellement à des lymphocytes mémoires préalablement activés (Schnyder et Pichler, 2009). Il est à noter que l'étape d'initiation n'est pas décrite.

A partir de ce concept issu de données factuelles, de nouvelles hypothèses physiopathologiques ont été développées déplaçant la responsabilité de l'initiation de la réponse immune des métabolites réactifs à la molécule parente. Cette dernière pourrait être communément reconnue et la réponse immunitaire initiée suite à une défaillance des mécanismes régulateurs, par exemple suite à une infection virale (Roujeau, 2006).

L'avantage du p-i concept est qu'il permet de s'affranchir des postulats du concept du métabolisme *in situ* pour expliquer la diversité des cibles touchées au cours d'un syndrome.

En ce qui concerne la carbamazépine et l'oxcarbazépine, Wu et coll. (2006) ont montré que la carbamazépine et son métabolite principal, comme l'oxcarbazépine et son métabolite principal, pouvaient directement activer *in vitro* les lymphocytes T de patients atteints d'hypersensibilité à la carbamazépine ou à l'oxcarbazépine. Cette activation n'était pas observée avec les autres métabolites étudiés (c'est-à-dire la *trans*- ou la *cis*-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazépine, la 2- ou 3-hydroxy-carbamazépine). L'activation n'était pas abolie par l'ajout de glutathion, de N-acétylcystéine ou de 1-aminobenzotriazole (inhibiteur suicide des CYP450). L'analyse *in silico* des auteurs est en faveur d'une configuration spatiale propice à la liaison des molécules au récepteur des cellules T requérant :

- une mono-oxygénation en position 10,
- l'absence d'hydroxylation sur les noyaux latéraux,
- la présence du groupement amine du résidu carbamoyle (le N-acétyl-iminostilbène n'est pas activateur).

Les deux approches sont actuellement en opposition. D'un côté les tenants de l'hypothèse des métabolites réactifs explorent les voies métaboliques et de l'autre les tenants de l'hypothèse du p-i concept focalisent leurs travaux sur la réactivité immunitaire de la molécule parente et réfutent toute contribution métabolique. Ainsi de façon un peu surprenante, des travaux sur les sulfamides affirment démontrer que parce que le glutathion favorise la reconnaissance de la molécule mère par les lymphocytes en neutralisant les métabolites réactifs, les individus allergiques reconnaissent plutôt la

molécule parente que le métabolite qui a pourtant réagi avec la cellule de présentation de l'antigène (Burkhart et coll., 2001).

Toutefois, les pénicillines (dont l'amoxicilline) semblent donner raison aux deux théories puisqu'elles sont, suivant les personnes, à l'origine de plusieurs types de réactions d'hypersensibilité (anaphylaxie, anémie hémolytique, hypersensibilité retardée à manifestations cutanées variées). Or, cette diversité clinique semble bien corrélée à une reconnaissance variée de ces molécules par le système immunitaire : ce sont des molécules "haptène-like" pouvant se lier de façon covalente à des molécules solubles (type I) ou fixées aux cellules (type II), mais aussi capables de se lier directement au CMH des cellules de présentation de l'antigène (type IV), soit avec le peptide déjà engagé dans le CMH, soit à la molécule de CMH elle-même. Les raisons d'une modalité de reconnaissance particulière et donc d'un engagement dans un type de réactivité particulière restent obscures (polymorphisme sur le promoteur du TNF-α, sur les capacités métaboliques ?) (Pichler, 2003).

1.6.2.3. L'hypothèse du (signal) danger

Emprunté aux immunologistes, le terme a été appliqué aux réactions d'hypersensibilité pour rendre compte de l'existence d'un signal d'activation anormal qui enflamme le système immunitaire de certains patients pour générer les réactions sévères de l'hypersensibilité aux médicaments (Uetrecht, 1995). Ce signal d'activation serait déclenché à l'occasion des dégâts cellulaires. Plusieurs travaux ont essayé d'alimenter en faits expérimentaux cette hypothèse. Le signal d'activation pourrait être dû aux métabolites réactifs de la carbamazépine et de la phénytoïne issus du métabolisme oxydatif générant un stress oxydant à l'origine de l'activation de la voie Keap1-Nrf2-

ARE provoquant la synthèse de molécules de défenses telles que les *heat shock proteins* (HSP) (Lu et coll., 2008). Ces protéines, entre autres, en se liant aux récepteurs *toll-like* hautement conservés et activateurs de la réponse innée (non spécifique) pourraient être à l'origine d'une stimulation exagérée du système immunitaire à un médicament et plus vraisemblablement à ses métabolites. Il est à noter qu'Alfirevic et coll. (2006b) ont montré une association entre les réactions d'hypersensibilité sévères à la carbamazépine et un polymorphisme touchant un cluster du gène de la HSP70. Mais là encore une dérégulation des modulateurs de cette stimulation non spécifique, induite dans d'autres situations de stress (traumatisme, infection bactérienne), doit intervenir car, comme l'immunité spécifique, leur finalité est la protection de l'organisme (Li et Uetrecht, 2010).

1.6.3. La piste de l'immunodépression

Une étude rétrospective portant sur les réactions d'hypersensibilité aux antiépileptiques (carbamazépine, phénytoïne, phénobarbital et zonisamide étaient étudiées, l'hyperéosinophilie ne concernait que 50 % des patients) a clairement montré une diminution de l'activité des lymphocytes B (sous-représentation du marqueur CD69) ainsi qu'une hypogammaglobulinémie (IgG, IgA, IgM) au moment de l'hospitalisation des patients, suite à cette immunodépression les signes d'activité de réplication de l'HHV6 étaient objectivés avec succès (ADN viral et IgG anti-HHV6) (Kano et coll., 2004). L'hypothèse d'une diminution de l'immunité comme préalable à l'apparition du DRESS est confortée par l'étude de Boccara et coll. (2006). Les auteurs ont comparé dans une étude rétrospective cas-témoin la prévalence d'hypogammaglobulinémie (<6.6 g/l) chez les patients atteints de DRESS par rapport aux patients atteints d'une

simple érythrodermie, facteur prédisposant à une hypoalbuminémie (<31 g/l). L'hypogammaglobulinémie est apparue plus associée au DRESS et sans corrélation avec l'hypoalbuminémie. Une partie des médicaments impliqués ont une activité immunomodulatrice connue (antiépileptiques, allopurinol, salazopyrine, minocycline). Cette hypogammaglobulinémie pourrait être liée à un effet immunomodulateur de certains médicaments sur les lymphocytes B et le délai d'apparition des effets indésirables correspondrait au temps nécessaire pour que l'immunité soit suffisamment abaissée pour permettre une réactivation virale.

Un cas intéressant publié en 2 temps par Aihara et coll. (2003 et 2005) semble confirmer l'hypothèse de l'immunosuppression couplée à la réactivation virale. Un jeune patient de 14 ans avait été atteint d'une réaction de type DRESS/DIHS à la carbamazépine avec diminution de l'immunité et réactivation de l'HHV6. Plus d'1 an après, suite à un traitement par céfaclor, il développe une éruption cutanée fébrile généralisée de type maculopapuleux mais sans élévation importante des cytokines ni perturbation biologique importante. Il n'y a pas de diminution de l'immunité ni réactivation de l'HHV6. Les TTL montrent une réactivité au céfaclor et à la carbamazépine. Les auteurs font porter la différence d'intensité des signes dans l'association immunodépression/réactivation virale.

1.6.4. Orientation de la réponse immunologique

Une étape importante de l'orientation de la réponse immunologique est l'étape de présentation du néoantigène dans le contexte d'une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (voie des endoantigènes, dégradation dans le protéasome, association dans le réticulum endoplasmique avec les molécules de CMH

de classe I naissantes, expression en surface, reconnaissance par les lymphocytes TCD8, réponse de type cytotoxique) ou de classe II (voie des exoantigènes, après internalisation par endocytose et dégradation dans les lysosomes, reconnaissance par les lymphocytes TCD4, réponse de type humorale). Il faut nuancer cette vision manichéenne en précisant que la séparation des voies endogènes et exogènes n'est pas aussi étanche et que des signaux de co-stimulation sont également requis.

Dans le cadre de l'hypothèse de l'haptène, l'orientation de la réponse effectrice immunologique va dépendre de la phase d'association de l'haptène à la molécule de CMH. Dans ce cas, il paraît logique que l'activation d'une molécule au sein même d'une cellule de présentation de l'antigène devrait augmenter ses chances d'être reconnue par une cellule capable d'initier une réponse immunitaire, d'où l'intérêt d'explorer les capacités métaboliques de molécules de présentation de l'antigène professionnelles ou occasionnelles, de la même façon que dans le cadre de la théorie de l'immunodépression, la réactivité d'un métabolite réactif peu induire la mort de la cellule dans laquelle le métabolite est formé. Une molécule médicamenteuse peut activer la voie des TCD4 (molécule extérieure à la cellule donc voie exogène) mais aussi la voie des TCD8 si la molécule est suffisamment lipophile pour diffuser dans la cellule et si sa réactivité n'est pas trop grande avec les constituants cellulaires (dont l'ADN). Une voie plus directe de réactivité du métabolite avec établissement d'une liaison covalente avec les molécules de CMH exposées à la surface des cellules est sans doute impossible (Martin et Weltzien, 1994).

Ainsi un néoantigène circulant ou exogène issu de l'hapténation pourra initier une réaction d'hypersensibilité de type 1 ou 3, un néoantigène formé à la surface d'une cellule par liaison covalente avec une macromolécule de surface pourra initier une réaction d'hypersensibilité de type 2, et une molécule qui aura pu pénétrer à l'intérieur

de la cellule, y être métabolisée, réagir avec les constituants cellulaires et s'associer à une molécule de CMH de classe I (ou II) pourra initier une réaction d'hypersensibilité de type 4 (Park et coll., 1998).

Une réactivité croisée avec un antigène viral partageant le même épitope peut aussi être responsable d'une réaction du système immunitaire contre le néoantigène sans étape d'initiation, en recourant à la mémoire immunologique. La nature des effets toxiques mis en jeu lors de l'activation immunitaire dirigée contre le néoantigène va dépendre du type de la réaction immunologique induite et de la localisation du néoantigène.

Il a été montré que le niveau de glutathion à l'intérieur des cellules de présentation de l'antigène pouvait orienter le type de réponse, ainsi une déplétion en glutathion chez la souris inhibe les cytokines orientant vers la réponse Th1 (IFN-γ et IL-12), stimule les cytokines orientant vers la réponse Th2 (IL-4) et donc polarise la réponse vers la voie Th2 (Peterson et coll., 1998). L'effet semble dépendre du taux de glutathion à l'intérieur des cellules dendritiques, une déplétion modifie la maturation de ces cellules et leur sécrétion d'IL-12 entraînant une diminution de la production d'IFN-γ. La N-acétylcystéine restaure l'orientation Th1 (Kim et coll., 2007).

Plusieurs autres facteurs nutritionnels, hormonaux et minéraux semblent également capables d'influencer la balance Th1/Th2 (Kidd, 2003).

1.7. Prise en charge et traitements

L'hospitalisation ainsi que l'arrêt de tout médicament impliqué est de règle dès l'apparition d'une fièvre inexpliquée associée à une éruption survenant dans les 2 mois après l'introduction d'un nouveau médicament. Dès lors, la déclaration au Centre de Pharmacovigilance est réglementairement obligatoire. Un bilan hématologique doit rechercher une anomalie de toute la lignée blanche, le bilan biologique standard doit également rechercher une atteinte hépatique, rénale et pancréatique. Le diagnostic différentiel doit exclure les phases aiguës d'infections virales (HIV, EBV, hépatite virale, grippe) ou bactériennes (streptocoques), un lymphome, une maladie inflammatoire systémique. Un bilan thyroïdien initial doit être complété par un nouveau bilan dans les 2 mois pour détecter une atteinte auto-immune fréquente. Une biopsie cutanée peut être réalisée pour caractériser la nature de l'infiltrat inflammatoire en cas de pustules ou de bulles.

Le prurit peut être soulagé par des antihistaminiques (hydroxyzine) ou des corticoïdes en topiques locaux. Le traitement par glucocorticoïdes par voie générale (prednisone 1 à 2 mg/kg/j ou bolus de méthylprenisolone) peut être proposé dans la plupart des cas graves. Le traitement doit être prolongé et diminué très progressivement sous peine de rechutes. Toutefois, dans les syndromes de Stevens-Johnson et les toxidermies bulleuses, les glucocorticoïdes peuvent conduire à des aggravations sans réduire le délai de guérison (Knowles et coll., 1999). Notamment dans les cas de SJS/TEN, l'administration intraveineuse d'immunoglobulines peut être proposée (Mayorga et coll., 2003). La présence d'IgG, anti-HHV6 notamment, dans les immunoglobulines pourrait être bénéfique dans le cadre de l'hypothèse de l'hyperactivation immunitaire liée à une

réplication virale (Kano et coll., 2005). De même un traitement par anti-herpétique peut être proposé (Gentile et coll., 2010). La plasmaphérèse est parfois entreprise.

Au décours de la phase aiguë, le patient doit être informé du risque de réactions croisées avec d'autres médicaments et son entourage familial (premier degré) doit être également informé du risque encouru de réactions similaires. Un traitement de désensibilisation peut être proposé, mais les chances de succès sont probablement moindre chez les patients ayant eu une atteinte organique (Knowles et coll., 1999).

1.8. Evolution

Après retrait de l'agent causal, une aggravation transitoire de tous les signes survient dans les 3 jours puis une régression clinique et biologique est observée jusqu'à disparition complète en un mois environ. En cas de réintroduction du même médicament ou d'un autre médicament qui présente une réaction croisée, les signes réapparaissent très rapidement (quelques jours) même de nombreuses années après l'épisode inaugural. Des complications à distance (quelques mois à plusieurs années) d'un épisode aigu peuvent survenir, plutôt de nature auto-immune : diabète de type 1, thyroïdite, lésions sclérodermoïdes systémiques, lupus érythémateux systémique. Des arguments cliniques et biologiques sont en faveur d'un continuum pathologique ayant pour agent étiologique commun un virus (HHV6 ou EBV), mais dans un contexte restreint de DIHS (Aota et coll., 2009). L'hypothèse physiopathologique avancée par les auteurs repose sur les étapes suivantes : abaissement de l'immunité (hypogammaglobulinémie, leucopénie) induite par un médicament désinhibant la réplication virale, réaction intense du système immunitaire à la présence virale conduisant à la phase aiguë du DIHS avec prolifération des T-reg. La réactivation

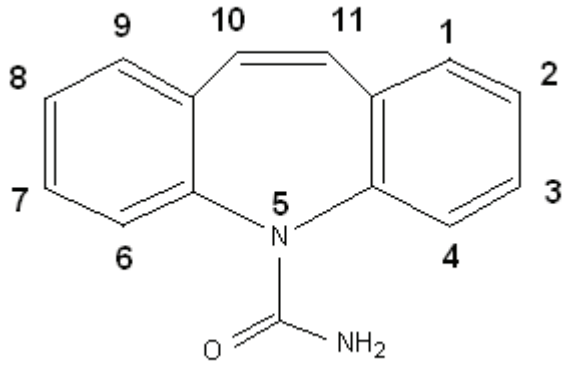
séquentielle de différents virus provoque des décharges immunitaires successives favorisant les réactions croisées entre les antigènes viraux, le médicament et des antigènes autologues, les T-reg contiennent l'auto-réactivité jusqu'à un certain point au-delà duquel leur capacité de contrôle s'épuise. Un certain nombre de lymphocytes auto-réactifs sont alors présents à bas bruit jusqu'à ce qu'une nouvelle stimulation engendre une maladie auto-immune.

2. Propriétés pharmaco-toxicologiques de la carbamazépine

2.1. Propriétés physico-chimiques

La carbamazépine est la dénomination commune internationale désignant le 5*H*-dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide de numéro CAS 298-46-4 (**Figure 2**). C'est un dérivé carboxamide de l'iminostilbène de formule brute $C_{15}H_{12}N_2O$, de masse moléculaire 236.3 g/mol. Le composé pur est une poudre cristalline blanche à blanc-jaune dont le point de fusion est de 191 ± 2 °C, pratiquement insoluble dans l'eau et l'éther, soluble dans l'éthanol, l'acétone et le chloroforme (log P (ou log $K_{O/W}$) = 2.45. C'est une espèce neutre (pKa = 7.0) (Clarke's Analysis of drugs and poisons, 2004).

Figure 2 – Formule développée de la carbamazépine et sa numérotation chimique



2.2. Utilisation thérapeutique

La première utilisation thérapeutique de la carbamazépine remonte à 1960 en Suisse. La première Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) française remonte à 1974. Les indications thérapeutiques françaises de la carbamazépine (TEGRETOL®) sont nombreuses:

Épilepsies de l'adulte et de l'enfant :

En monothérapie de préférence ou en association à un autre traitement antiépileptique :

- Traitement des épilepsies partielles, avec ou sans généralisation secondaire.

- Traitement des épilepsies généralisées : crises tonico-cloniques.

Psychiatrie :

- Prévention des rechutes dans le cadre des troubles bipolaires, notamment chez les patients présentant une résistance relative, des contre-indications ou une intolérance au lithium.

- Traitement des états d'excitation maniaque ou hypomaniaque.

Douleurs :

- Traitement des névralgies du trijumeau et du glossopharyngien.

- Traitement des douleurs neuropathiques de l'adulte.

Posologies :

- Dans le traitement de l'épilepsie, la posologie habituelle est de 10 à 15 mg/kg/j chez l'adulte et 10 à 20 mg/kg/j chez l'enfant en 2 prises (formes à libération prolongée) ou 2 à 3 prises pour les formes à libération immédiate (une forme suspension buvable existe pour les enfants de moins de 6 ans).

- En psychiatrie les posologies vont de 400 à 800 mg/j pour la prévention des rechutes des troubles bipolaires et sont un peu plus élevées, 600 à 1200 mg/j pour le traitement des épisodes maniaques et hypomaniaques.

- En algologie, les posologies sont de l'ordre de 200 à 400 mg/j avec recherche de la dose efficace la plus faible.

2.3. Pharmacodynamie

La pharmacodynamie de la carbamazépine est habituellement simplifiée sous le terme générique de blocage des canaux sodiques voltage-dépendants. Cette propriété associée à un effet inhibiteur sur la libération de glutamate constitue la base de la pharmacodynamie antiépileptique. Un effet supplémentaire pourrait être dû à un effet inhibiteur sur la production des médiateurs de l'inflammation : monoxyde d'azote, prostaglandine E2, phospholipase A2 (Matoth et coll., 2000). Une action dépressive sur la régénération de la dopamine et de la noradrénaline pourrait être à l'origine des propriétés antimaniaques. Enfin, un effet lymphopéniant marqué de la carbamazépine a été observé chez une patiente âgée atteinte de leucémie lymphoïde chronique, associé à de forts effets indésirables digestifs (Silverman et Chapron, 1995).

2.4. Effets indésirables

Les effets secondaires décrits dans le résumé des caractéristiques des produits (RCP) dépassent largement le domaine thérapeutique neuropsychiatrique (**Tableau 7**). Leur incidence a été estimée autour de 30 à 50 % des patients traités (Bu et coll., 2007). Les effets indésirables gastro-intestinaux et hépatiques paraissent banals et communs à la plupart des médicaments, cependant, associés aux effets indésirables cardio-vasculaires, une activité anticholinergique apparaît sous-jacente. La structure tricyclique de la carbamazépine renvoie d'ailleurs à celle des antidépresseurs tricycliques aux propriétés anticholinergiques classiques. Les altérations hépatiques peuvent être reliées au caractère inducteur enzymatique de la carbamazépine. Un certain nombre d'effets indésirables de la carbamazépine peuvent donc être expliqués par l'activité pharmacodynamique de la molécule. Ces manifestations dose-dépendantes sont logiquement retrouvées dans les situations prédisposant à une surexposition des patients : instauration du traitement, dose initiale trop élevée, personnes âgées. Elles s'atténuent habituellement en quelques jours, soit spontanément, soit après une diminution transitoire de la posologie.

La carbamazépine est également à l'origine de manifestations dont le lien de causalité avec les propriétés pharmacodynamiques connues est obscur. De plus, si le RCP sépare clairement les réactions d'hypersensibilité et les effets indésirables hématologiques, cutanés, rénaux, hépatiques et ostéomusculaires, force est de constater que le premier groupe contient des éléments des autres groupes laissant présager un flou sur les mécanismes physiopathologiques des effets indésirables.

Une distinction effet dose-dépendant/dose-indépendant peut toutefois être faite sur la base des délais d'apparition et d'évolution des signes cliniques et la recherche d'une surexposition par dosage de la carbamazépine dans le sang.

Tableau 7- Effets indésirables de la carbamazépine classés par systèmes et organes et par fréquences

Légende des fréquences (F) en nombre de cas par patient traités :
Très fréquent : F ≥ 1/10 ; fréquent : 1/10 > F ≥ 1/100 ; peu fréquent : 1/100 > F ≥ 1/1000 ; rare : 1/1000 > F ≥ 1/10 000 ; très rare : F < 1/10 000.
(source : RCP mise à jour 2008)

Fréquence	Effets neurologiques	Effets psychiatriques	Effets gastro-intestinaux	Effets cardiovasculaires	Effets hépatiques
Très fréquent	Vertiges Ataxie Somnolence Fatigue		Nausées Vomissements		Augmentation isolée de la γ-glutamyl-transpeptidase
Fréquent	Céphalées Diplopie Troubles de l'accommodation		Sécheresse de la bouche		Elévation des phosphatases alcalines
Peu fréquent	Tremblements Mouvements anormaux Nystagmus		Diarrhée Constipation		Elévation des transaminases
Rare	Troubles oculomoteurs Troubles de la parole	Agitation Confusion	Douleurs abdominales	Troubles de la conduction Hypertension ou hypotension artérielle Accidents thromboemboliques	Hépatites
Très rare	Syndrome malin des neuroleptiques		Glossite Stomatite Pancréatite	Bradycardie Arythmies Bloc auriculo-ventriculaire Tachycardie Embolie pulmonaire	

Tableau 7 (suite) - Effets indésirables de la carbamazépine classés par systèmes et organes et par fréquences

Fréquence	Effets hématologiques	Effets cutanés	Réactions d'hypersensibilité
Très fréquent	Leucopénie	Réactions cutanées allergiques Urticaire parfois sévère	
Fréquent	Thrombocytopénie Hyperéosinophilie		
Peu fréquent		Dermatite exfoliative Erythrodermie	
Rare	Hyperleucocytose Polyadénopathies Carence en acide folique	Syndrome lupique Prurit	Réactions d'hypersensibilité multi-systémiques avec fièvre, éruption cutanée, conjonctivites, vascularite, polyadénopathies, pseudo-lymphome, arthralgie, leucopénie, hyperéosinophilie, hépatosplénomégalie et hépatite De façon exceptionnelle, l'atteinte multisystémique peut concerner le rein, le pancréas, le poumon, le côlon, le myocarde.
Très rare	Agranulocytose Anémie hémolytique Crise de porphyrie Aplasie médullaire Pancytopénie Anémie Porphyrie variegata Porphyrie cutanée tardive	Syndrome de Stevens-Johnson Syndrome de Lyell Photosensibilité Erythème polymorphe Purpura Chute des cheveux Pustulose exanthématique aiguë généralisée	Méningite aseptique Syndrome lupique Réaction anaphylactique et œdème de Quincke

Tableau 7 (suite et fin) - Effets indésirables de la carbamazépine classés par systèmes et organes et par fréquences

Fréquence	Effets endocriniens et métaboliques	Effets génito-urinaires	Effets ostéomusculaires	Effets sur les organes des sens
Très fréquent	Prise de poids Hyponatrémie liée à un syndrome de sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique			
Fréquent				
Peu fréquent				
Rare				
Très rare	Diminution du taux de T3 et T4	Rétention urinaire Insuffisance rénale Néphrite interstitielle Trouble de la fonction rénale	Arthralgie Myalgies Crampes Trouble du métabolisme osseux pouvant être à l'origine d'une d'ostéomalacie	Dysgueusies Troubles de l'audition Conjonctivites

2.5. Toxicologie clinique

La dose létale minimale est estimée à 5 g chez l'homme. Une dose supérieure à 3 g chez l'adulte et à 30 mg/kg chez l'enfant, doit être considérée comme toxique. Des concentrations plasmatiques supérieures à 15 mg/l doivent faire craindre des réactions toxiques, au-delà de 50-60 mg/l l'intoxication est grave. De façon attendue, les signes cliniques révèlent les propriétés pharmacodynamiques dose-dépendantes de la carbamazépine :

- *Effets sur le système nerveux central :* coma profond avec mydriase réactive, convulsions, dyskinésies, dystonies, signes anticholinergiques, détresse respiratoire, hypothermie

- *Effets cardiovasculaires :* tachycardie, bradycardie, hypotension, modifications de l'électrocardiogramme (troubles de la conduction auriculo-ventriculaire et intraventriculaire, allongement du QT), pouvant conduire à un collapsus, une défaillance et un arrêt cardiaque

- *Anomalies biologiques :* hypokaliémie, hyponatrémie, acidose métabolique

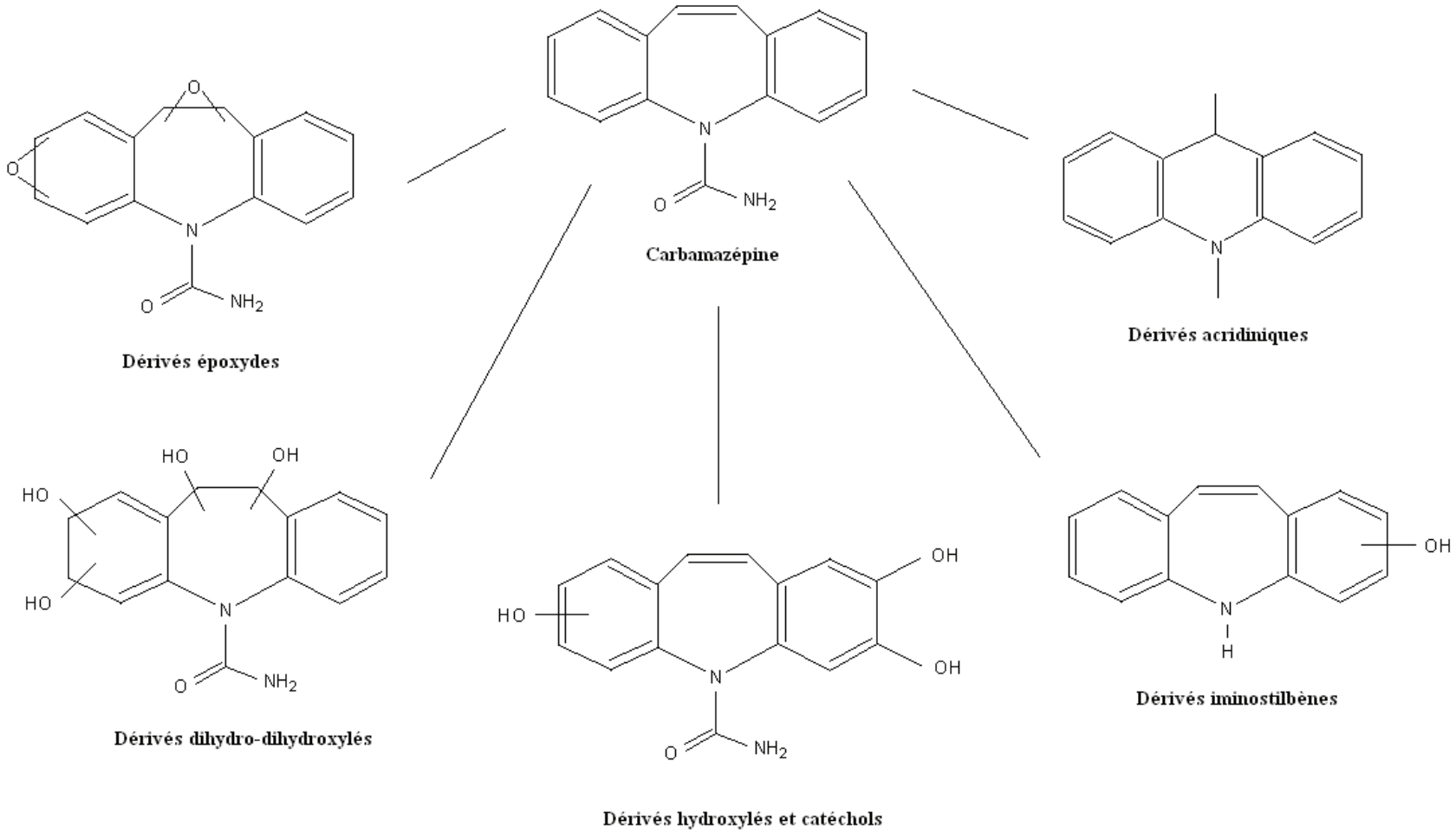
Les manifestations hématologiques et cutanées ne font pas partie du tableau clinique aigu.

A noter qu'un retard dans l'apparition du pic plasmatique et dans l'acmé des signes cliniques peut survenir si le traitement par charbon végétal activé n'est pas prolongé en raison de la combinaison de 3 facteurs concourants : ingestion massive, vidange gastrique retardée par les propriétés anticholinergiques et absorption de formes à libération prolongée. Pour cette raison les concentrations plasmatiques ne sont pas toujours corrélées à la gravité de l'intoxication si le prélèvement sanguin est trop précoce.

2.6. Pharmacocinétique et métabolisme

Par voie orale, la biodisponibilité de la carbamazépine est de l'ordre de 70 % mais pourrait être dose-dépendante, son volume de distribution est de 1.4 l/kg avec un rapport plasma/sang total de 1.6 et un rapport plasma/salive de 3 à 5. La carbamazépine est liée à 75 % aux protéines plasmatiques. Le métabolisme de la carbamazépine est intense et n'est pas entièrement élucidé à ce jour, les principaux squelettes chimiques des métabolites sont présentés dans la **Figure 3**. L'excrétion des métabolites de la carbamazépine est mixte atteignant à peine 40 % dans l'urine.

Figure 3 - Principaux squelettes chimiques des métabolites de la carbamazépine.



2.6.1. Métabolites de la carbamazépine

2.6.1.1. Métabolites présents au niveau sanguin

Chez l'homme les métabolites majoritaires retrouvés dans le sang sont le carbamazepine-10,11-époxyde (CBZ-EP) (Kerr et coll., 1994), la *trans*-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepine (DiOH-CBZ) (Fretland et Omiecinski, 2000) et le 9-hydroxymethyl-10-carbamoylacridan (9ac) dont la glucuroconjugaison dans le sérum est de l'ordre de 42 à 65 % (Wad et coll., 1997). La 2-hydroxy-carbamazépine (2-OH-CBZ) et la 3-hydroxy-carbamazépine (3-OH-CBZ) sont présentes à des niveaux moindres. Notre équipe a également retrouvé de l'acridine (AI), de l'acridone (AO) et de l'iminostilbène (IM) dans le sang de patients traités (Breton et coll., 2005).

2.6.1.2. Métabolites urinaires

La première étude de grande envergure sur l'identification des métabolites de la carbamazépine a été publiée par Lertratanangkoon et Horning en 1982. Les auteurs ont identifié plus de 30 métabolites chez l'homme et le rat, ces derniers ne partageant pas le même profil métabolique. A ce niveau nous présentons l'exhaustivité des métabolites identifiés avec leurs filiations métaboliques probables, les voies métaboliques démontrées seront exposées au chapitre 2.6.2.

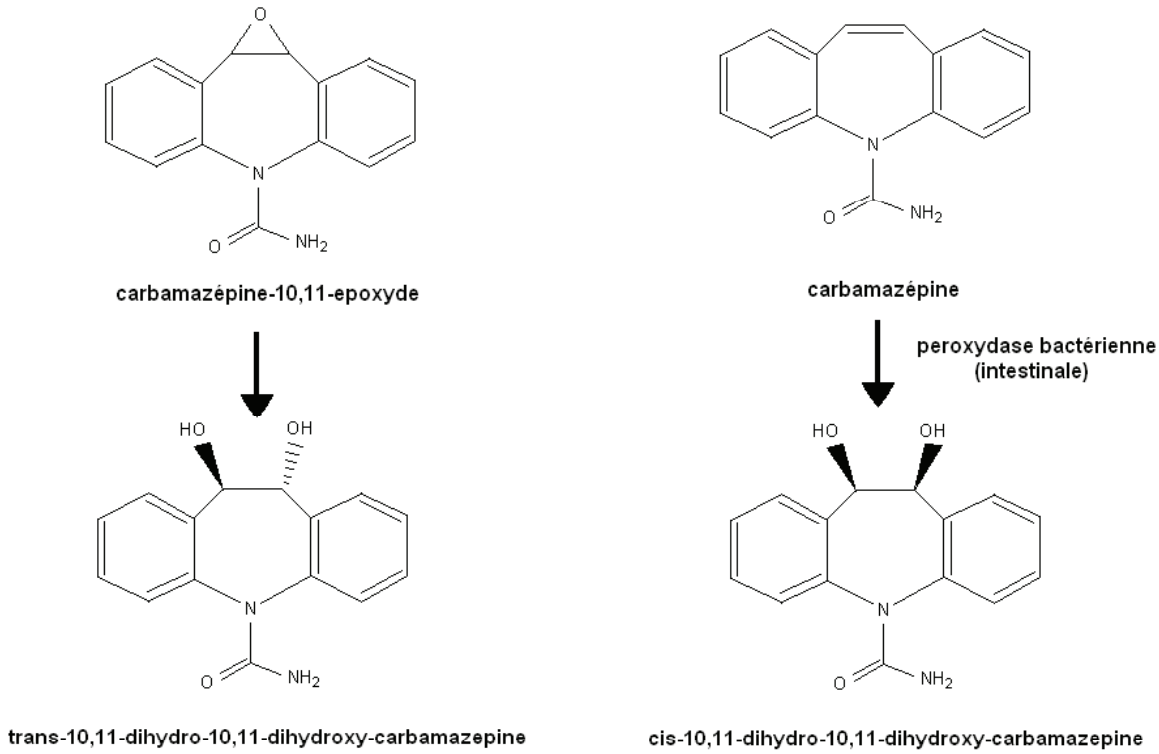
2.6.1.2.1. *Carbamazépine*

Seuls 2% de la carbamazépine sont retrouvés dans les urines sous une forme inchangée.

2.6.1.2.2. *Dérivés époxydes et dihydro-dihydroxylés*

L'époxydation de la carbamazépine conduit au carbamazépine-10,11-epoxyde, seul époxyde stable, pharmacologiquement actif, lui-même transformé en *trans*-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepine, l'ouverture de l'époxyde orientant toujours vers le stéréo-isomère *trans*. La présence de *cis*-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepine pourrait être due à l'action d'une peroxydase, d'origine intestinale bactérienne selon Lertratanangkoon et Horning (1982) (**Figure 4**). La formation du carbamazépine-2,3-epoxyde instable pourrait expliquer la présence de la *trans*-2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-carbamazepine dans l'urine humaine.

Figure 4 - Origine métabolique probable des diastéréoisomères de la 10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepine



2.6.1.2.3. *Dérivés hydroxy-*trans*-dihydro-dihydroxylés*

L'urine humaine, et non celle de rat, contient les 2- et 3-hydroxy-*trans*-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepine. L'origine de ces composés peut être due à l'oxygénation de la *trans*-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepine via une 2,3 époxydation, mais aussi de la 10-11 époxydation des hydroxy-carbamazépines correspondantes ou du carbamazépine-2,3-époxyde (**Figure 5**).

2.6.1.2.4. *Dérivés hydroxylés (phénols ou catéchols)*

Plusieurs dérivés mono-hydroxylés de la carbamazépine sont retrouvés dans l'urine humaine : 2-hydroxy-carbamazépine, 3-hydroxy-carbamazépine, 1- ou 4-hydroxy-carbamazépine (l'un de ces composés est strictement humain l'autre strictement murin mais l'attribution chimique n'a pas pu être réalisée). La 2-hydroxy-carbamazépine peut subir une oxygénation supplémentaire et former la 1,2-dihydroxy-carbamazépine puis la 1-méthoxy-2-hydroxy-carbamazépine. La 3-hydroxy-carbamazépine peut également subir une oxygénation supplémentaire et former la 2,3-dihydroxy-carbamazépine puis la 2-hydroxy-3-méthoxy-carbamazépine, mais aussi la 2,7-dihydroxy-carbamazépine (ou 3,7-dihydroxy-carbamazépine, non déterminé) et la 3,4-dihydroxy-carbamazépine. La présence de 1,4-dihydroxy-carbamazépine n'est pas certaine, elle pourrait être formée à partir du carbamazépine-1,4-époxyde ou de 1-(ou 4-)hydroxy-carbamazépine (**Figure 6**).

Figure 5 - Origines métaboliques potentielles des 2- et 3-hydroxy-*trans*-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepine

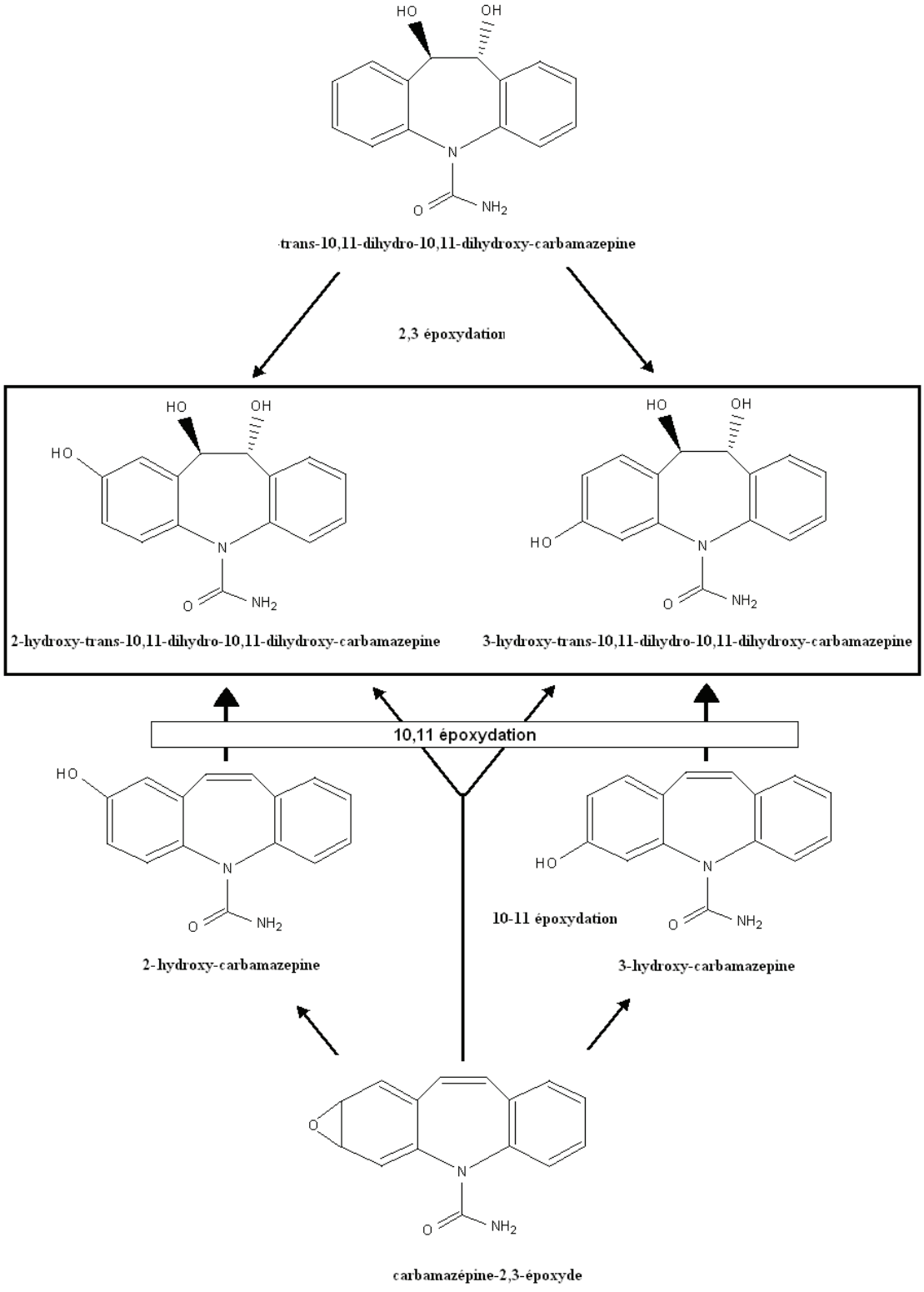
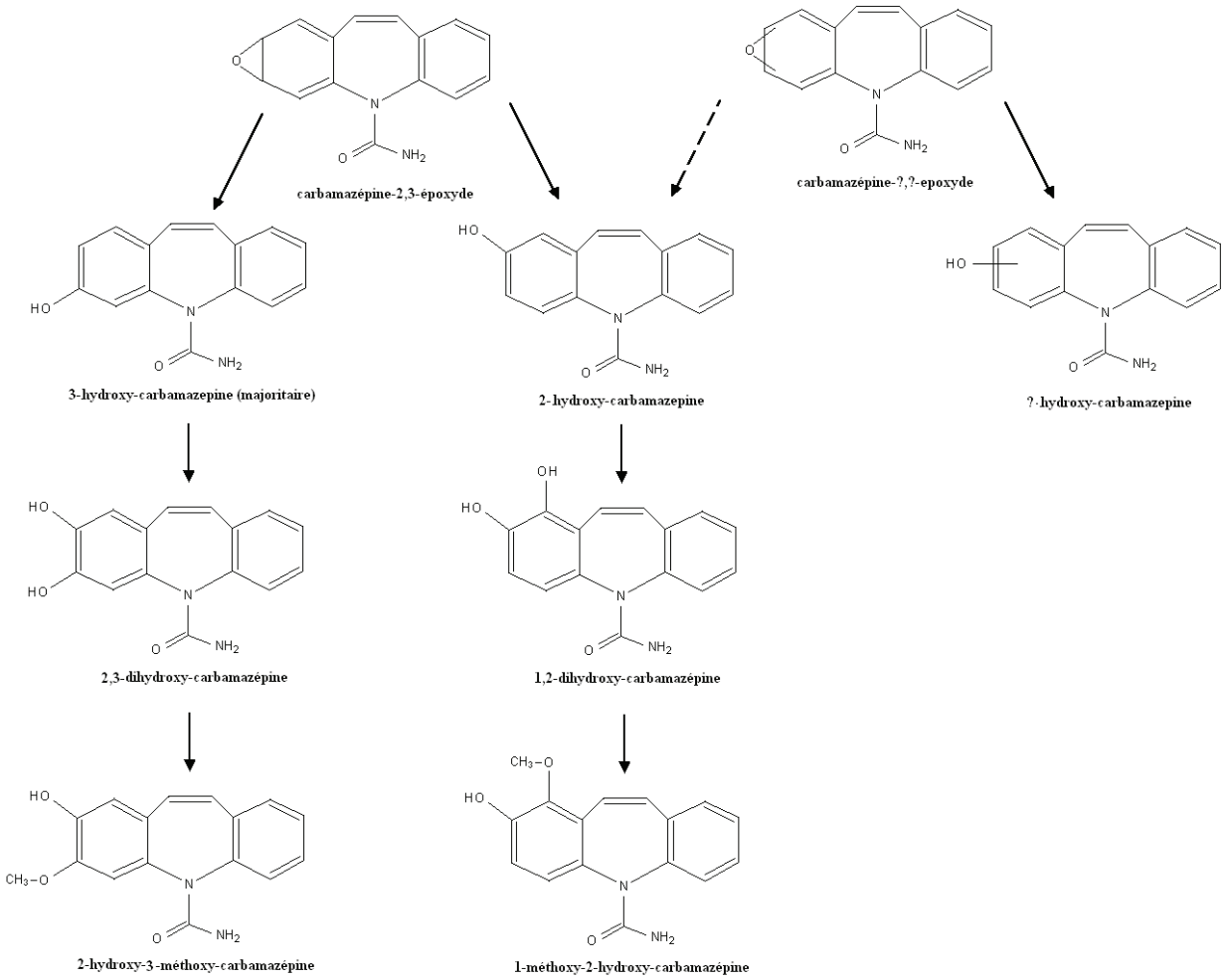


Figure 6 - Origines métaboliques probables des principaux dérivés hydroxylés (phénols et catéchols)

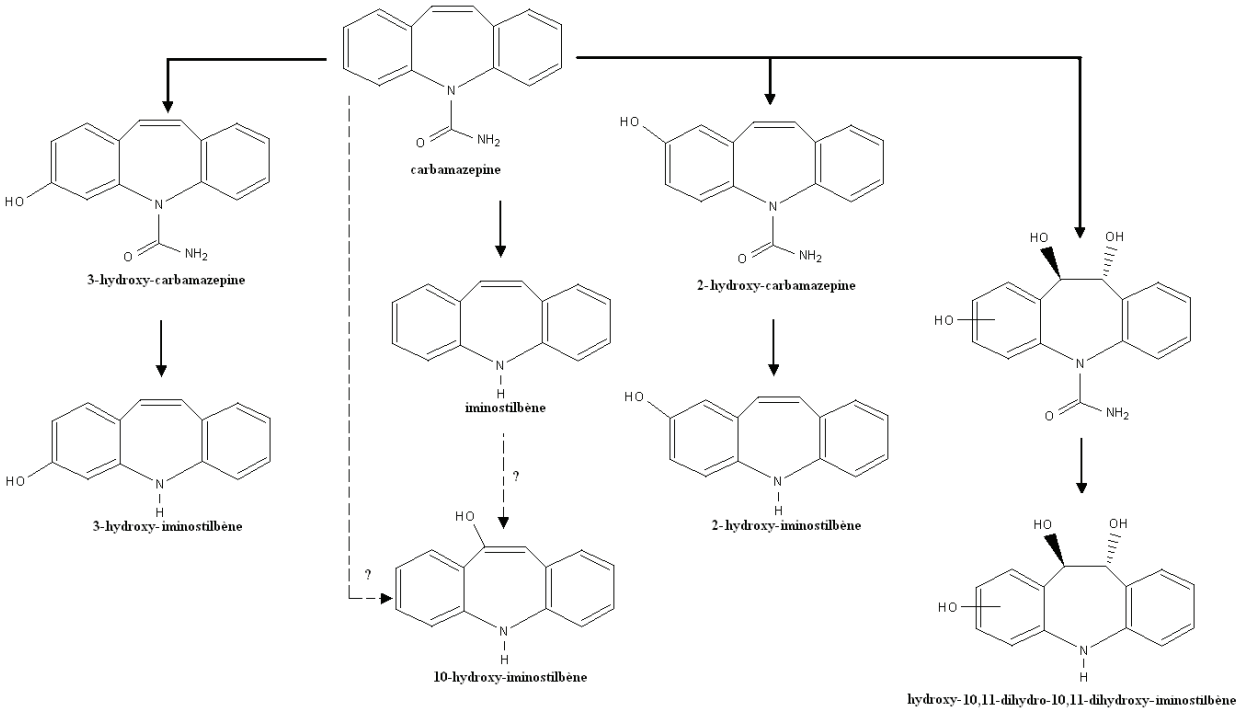


2.6.1.2.5. *Dérivés décarbamoylés ou iminostilbènes*

La décarbamoylation peut s'opérer sur la plupart des métabolites à différents niveaux, ainsi ont été identifiés dans l'urine : l'iminostilbène issu de la carbamazépine, un hydroxy-10,11-dihydro-10,11-dihydroxyiminostilbène, métabolite d'aval de la voie des hydroxy-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazépines, le 2-hydroxy-iminostilbène issu de la 2-hydroxy-carbamazépine (**Figure 7**). Le 3-hydroxy-iminostilbène n'a pas été retrouvé chez l'homme mais le rat métabolise le 3-hydroxy-iminostilbène en 3-hydroxy-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazépine. Le 10-hydroxy-iminostilbène est

retrouvé dans l'urine, son origine pourrait éventuellement être la 10-hydroxy-10,11-dihydro-carbamazépine, connue comme le métabolite actif de l'oxcarbazépine et ayant récemment reçu la dénomination commune internationale de licarbazépine, mais l'insaturation de la liaison 10-11 resterait alors à expliquer. Il est à noter que la présence de la 10-hydroxy-10,11-dihydro-carbamazépine elle-même et/ou son iminostilbène correspondant (perte du carbamoyle lors de la chromatographie en phase gazeuse) est caractérisée dans l'urine humaine mais non murine.

Figure 7 - Origines métaboliques probables des dérivés iminostilbènes de la carbamazépine



2.6.1.2.6. *Dérivés acridiniques*

Le 9-hydroxyméthyl-10-carbamoylacridan est retrouvé sous forme d'O-glucuroconjugué (moins de 5 % de la dose de carbamazépine absorbée). L'existence d'un hydroxy-9-hydroxyméthyl-10-carbamoylacridan est probable (Lertratanangkoon et Horning [1982]). Aucune donnée humaine n'est disponible sur la présence urinaire d'AI et d'AO.

2.6.2. Principales voies métaboliques

2.6.2.1. Voie métabolique des composés hydroxylés de la carbamazépine (phénols):

2.6.2.1.1. *Données humaines* in vitro

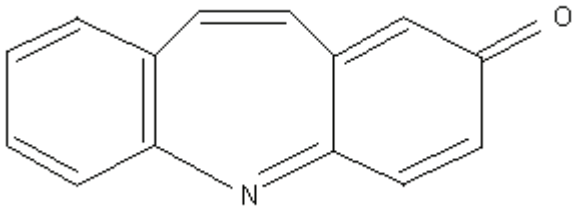
2.6.2.1.1.1. Voie dépendante des cytochromes P450

Ce paragraphe reprend les importants travaux de Pearce et coll., publiés en 3 parties dans le journal Drug Metabolism and Disposition en 2002, 2005 et 2008, auxquels a participé JP Uetrecht, chercheur spécialisé dans l'exploration du métabolisme des dérivés acridiniques.

In vitro, les CYP450 microsomaux hépatiques humains favorisent l'oxydation de la CBZ en 3-OH-CBZ plutôt qu'en 2-OH-CBZ (rapport d'abondance de 25). Ces deux réactions sont NADPH dépendantes. Les CYP3A4 et CYP2B6 sont les deux enzymes majoritairement responsables de la 3-hydroxylation de la carbamazépine. Ces deux enzymes contribuent également à formation de la 2-OH-CBZ qui est cependant majoritairement catalysée par le CYP2E1. Les CYP1A2 et CYP2A6 participent aussi

quantitativement aux 2 réactions mais à un degré moindre. Le CYP3A4, et à un degré moindre les CYP1A1 et 2C19, permet également la transformation de la 2-OH-CBZ en 2-OH-IM. Toutes ces réactions sont NADPH dépendantes et non limitées par les produits de formation. Bien que non mise en évidence, les auteurs proposent que la formation du 2-OH-IM à partir de la 2-OH-CBZ passe par un intermédiaire iminoquinone (IQ, **Figure 8**) soit la séquence 2-OH-CBZ → IQ → 2-OH-IM.

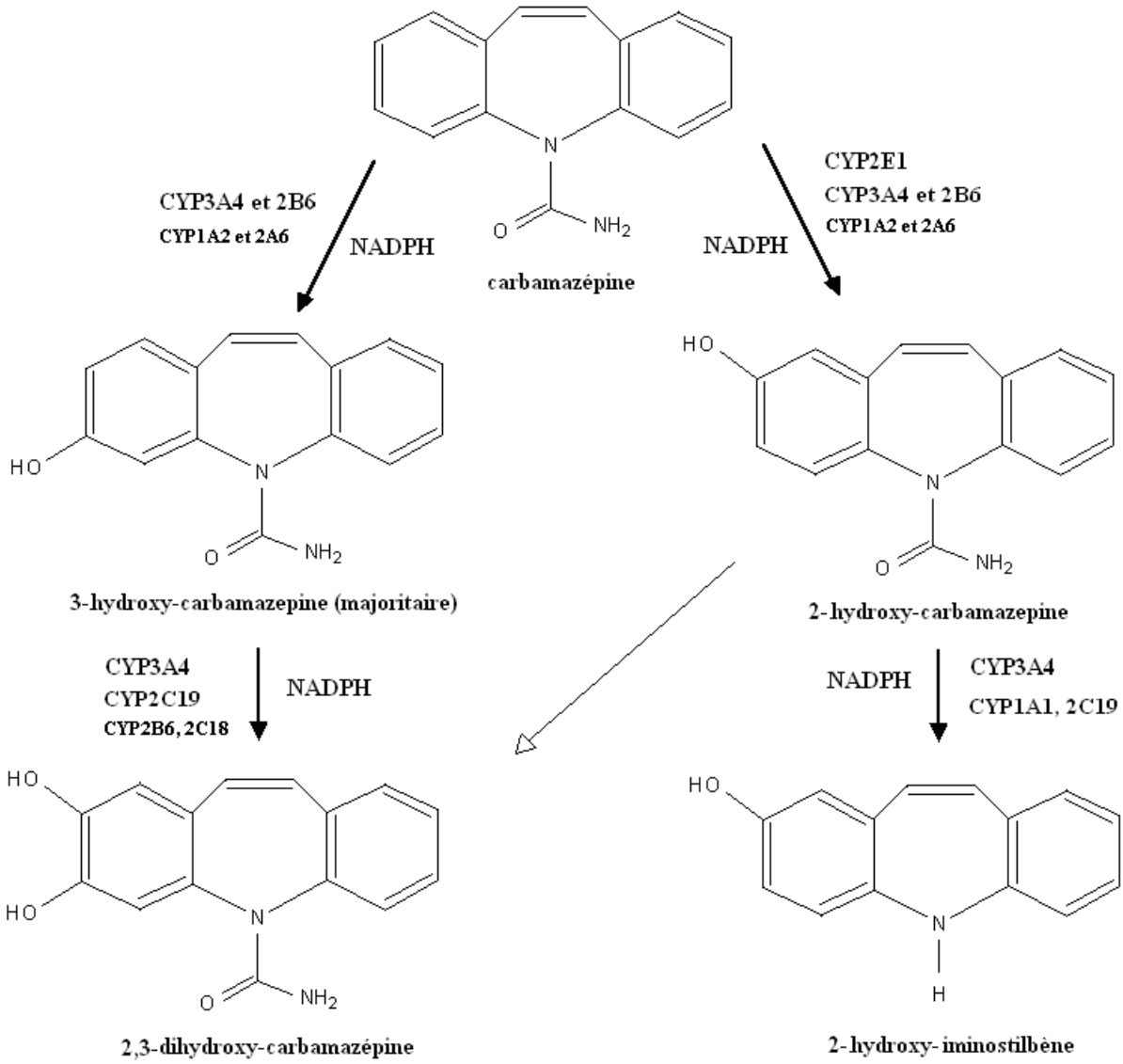
Figure 8 - Formule développée de l'iminoquinone (IQ).



La formation du catéchol-carbamazépine, la 2,3-dihydroxy-carbamazépine (2,3-DiOH-CBZ), provient davantage de l'hydroxylation de la 3-OH-CBZ que de la 2-OH-CBZ, d'une part parce que le rendement de formation est supérieur à partir de la 3-OH-CBZ (facteur > 5 *in vitro*) et d'autre part parce que le métabolisme de la CBZ est d'avantage orienté vers la 3-hydroxylation (facteur 26 à 80 *in vitro*). Les enzymes impliquées dans l'oxydation de la 3-OH-CBZ sont le CYP3A4 majoritairement puis le CYP2C19, d'autres enzymes peuvent être impliqués mais leur contribution n'est significative que si l'expression de l'activité de ces 2 enzymes principaux est réduite (CYP2B6, et autres CYP pouvant générer des catéchols tels que le 2C18). De plus le CYP3A4 présente la

plus grande affinité (contribution unique à faible concentration de 3-OH-CBZ). Toutes les réactions sont NADPH dépendantes (**Figure 9**).

Figure 9 - Isoformes des cytochromes P450 identifiés *in vitro* dans le métabolisme de phase I des dérivés hydroxylés de la carbamazépine chez l'homme (enzymes microsomaux hépatiques).



2.6.2.1.1.2. Voie dépendante de la myéloperoxydase

L'équipe d'Uetrecht (Lu et Uetrecht, 2008) a montré que l'oxydation dépendante de la myéloperoxydase se faisait préférentiellement sur la 3-OH-CBZ plutôt que sur la 2-OH-CBZ (et davantage encore que sur la CBZ elle-même, facteurs respectivement d'environ 3 et 4). Les composés intermédiaires générés sont très probablement les radicaux libres 2- et 3-hydroxyles correspondants.

2.6.2.1.2. *Données humaines* in vivo

Ju et Uetrecht (1999) ont mis en évidence dans l'urine humaine la présence de l'O-glucuroconjugué du 2-OH-IM ainsi que l'iminoquinone (IQ) correspondant à l'oxydation du 2-OH-IM (**Figure 8**). Pour discuter leur résultats (antérieurs aux données issues de expérimentation *in vitro*), Ju et Uetrecht ont montré que le 2-OH-IM est facilement oxydé en IQ en présence de HClO, mais également avec une cinétique plus lente avec le H_2O_2, et même en présence d'air (demi-vie de 2h dans une solution tampon à pH=4.7). Les auteurs suggèrent que l'iminoquinone soit un métabolite normal de la carbamazépine et proposent :

- qu'une partie du 2-OH-IM soit oxydée et aussitôt neutralisée dans le sang par la voie des sulfoconjugués pour former le 4-méthylthio-2-hydroxy-iminostilbène qu'ils pensent avoir identifié dans l'urine,

- qu'une autre partie soit éliminée sous forme inchangée mais détectée dans l'urine sous forme d'iminoquinone par l'oxygène de l'air,

- et enfin que la majeure partie soit excrétée dans l'urine après avoir subi une O-glucuroconjugaison. Les auteurs concluent que la relative lenteur de cette voie

métabolique pourrait permettre de générer l'iminoquinone à distance de la formation hépatique de la 2-OH-CBZ. La séquence métabolique proposée est donc 2-OH-CBZ → 2-OH-IM → IQ.

2.6.2.1.3. *Rapprochement des données* in vitro *et* in vivo

Les données de Pearce et coll. sur le CYP3A4 obtenues à partir de microsomes hépatiques n'excluent pas un métabolisme extra-hépatique puisque cet isoforme est présent dans le rein, la peau, l'intestin et le sang (Lamba et coll., 2002). Par ailleurs, les résultats *in vitro* ne rendent pas compte de la présence de l'iminoquinone retrouvée par Ju et Uetrecht (1999) chez des patients traités sans effets indésirables notoires. De plus les auteurs proposent 2 séquences différentes : 2-OH-CBZ → 2-OH-IM → IQ (*in vivo*) et 2-OH-CBZ → IQ → 2-OH-IM (*in vitro*). La question de l'interconversion 2-OH-IM / IQ mérite d'être éclaircie d'autant que d'un point de vue chimique l'étape de décarbamoylation est incluse dans la transformation en une étape, 2-OH-CBZ → IQ, qu'elle favoriserait dans la séquence proposée par Pearce alors que dans la réaction en une étape, 2-OH-IM → IQ, la décarbamoylation a eu lieu auparavant. Dans ses expérimentations *in vitro*, Pearce n'a jamais obtenu d'IQ au cours de la transformation NADPH dépendante 2-OH-CBZ → 2-OH-IM. Mieux, ses expérimentations démontrent clairement que le NADPH est un poison pour la réaction 2-OH-IM → IQ, pourtant spontanée à l'air libre, qu'il inverse avec un rendement excédent 95%. Les données *in vivo* de Ju et Uetrecht plaident pour une séquence 2-OH-CBZ → 2-OH-IM → IQ mais il faut souligner que les extractions de l'urine avaient été faites en milieu acide (urine brute à pH 4.5 et hydrolyse de l'urine à pH 5.1) approchant les conditions de formation à l'air libre de l'IQ à partir du 2-OH-IM pour lesquelles la demi-vie de réaction était

déterminée à 2h. De plus ces extractions avaient été faites en l'absence de NADPH ou autre agent réducteur. Il est donc possible que l'IQ ait été générée au cours du traitement de l'urine. De plus, l'identification du sulfoconjugué du 2-OH-IM n'était pas certaine faute d'étalon.

La séquence 2-OH-CBZ → 2-OH-IM → IQ paraît la plus probable compte tenu de la nécessité de la présence de NADPH (poison de l'IQ) pour catalyser la transformation 2-OH-CBZ → 2-OH-IM (décarbamoylation) et la facilité de l'oxydation 2-OH-IM → IQ avec les espèces oxygénées du sang.

2.6.2.2. Voie métabolique des dérivés acridiniques

2.6.2.2.1. *Données humaines* in vitro

2.6.2.2.1.1. Voie dépendante des cytochromes P450

Myllynen et coll. (1998) ont mis en évidence la formation de 9ac dans les microsomes hépatiques humains.

2.6.2.2.1.2. Voie dépendante de la myéloperoxydase

L'ensemble des données disponibles sont issues des travaux de l'équipe canadienne d'Uetrecht. Nous présentons à ce stade seulement les grandes lignes des résultats publiés, le détail des expérimentations sera mis en perspective de notre étude sur le métabolisme sanguin *ex vivo* dans la 4ème partie de cette thèse.

Dans un premier temps, en utilisant des conditions très oxydatives non physiologiques, Furst et Uetrecht (1993) établissent la filiation métabolique suivante correspondant à l'oxydation de la carbamazépine par l'acide hypochloreux (HClO) :

CBZ → intermédiaire carbonium (noyau central à 7 atomes) → intermédiaire aldéhyde (noyau central à 6 atomes) → 9-acridinecarboxaldéhyde → acridine → acridone → chloro-acridones → dichloro-acridones

Cette suite métabolique obtenue à pH=6, à 25°C et en l'absence de cellules humaines, requiert la myéloperoxydase (MPO), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et des chlorures (Cl^-) de façon obligatoirement conjointe. La réaction est favorisée par l'augmentation de la quantité de H_2O_2 employée jusqu'à atteindre un maximum (0.4mM), les concentrations plus hautes provoquant l'inhibition de la MPO. Lorsque des polynucléaires neutrophiles activés par du PMA (PhorbolMyristateAcétate, activateur de la libération de l'ion superoxyde par les neutrophiles) sont utilisés comme initiateurs de la réaction, cette voie se limite à la production d'acridine. Enfin, en l'absence d'activation des neutrophiles aucune formation d'acridine n'est observée.

L'iminostilbène suit la même voie métabolique mais de façon plus rapide (60 fois) :

IM → 9-acridinecarboxaldéhyde → acridine → acridone → chloro-acridones → dichloro-acridones

Contrairement à la CBZ, cette réaction reste complète pour l'IM en présence de polynucléaires neutrophiles activés par du PMA.

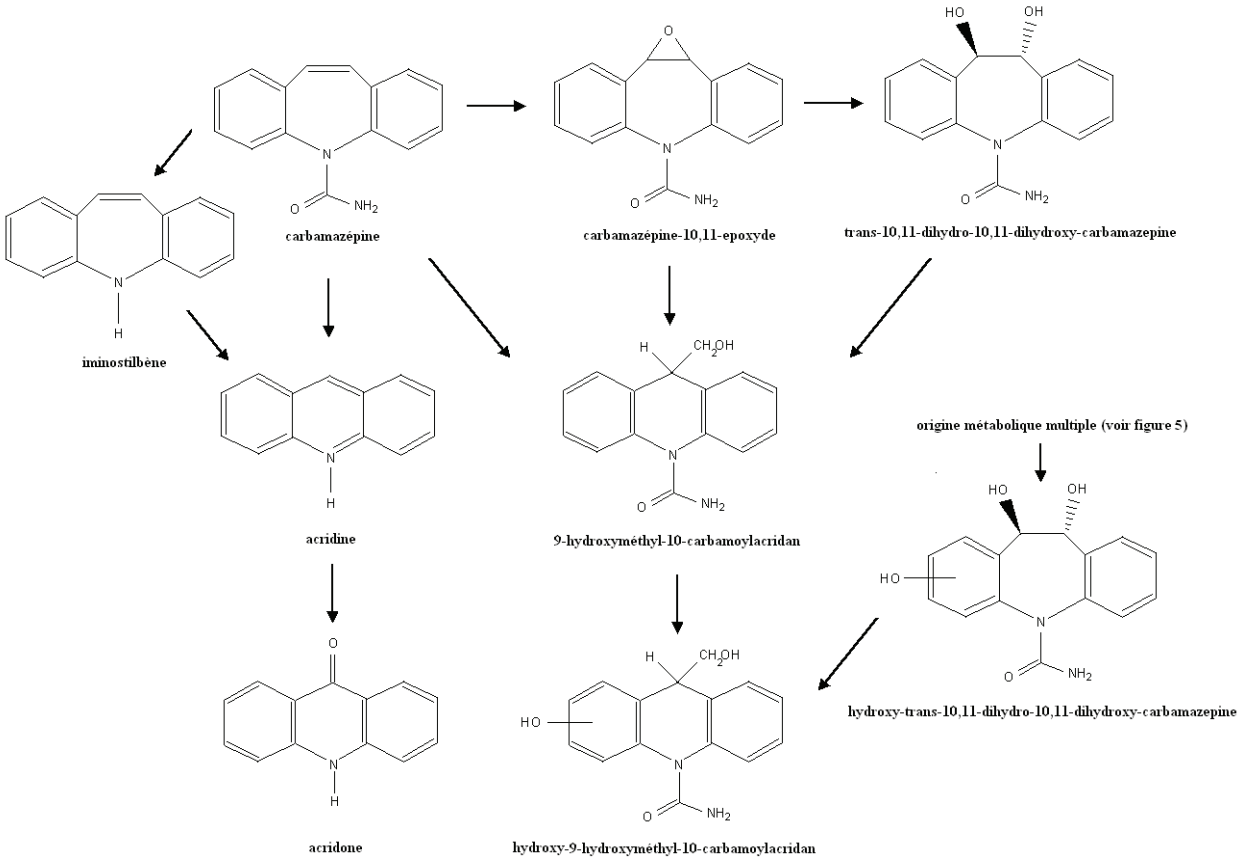
En première conclusion, la décarbamoylation est donc une étape difficilement franchie par l'oxydation par le HClO. L'explication proposée s'appuie sur la plus grande facilité relative de la N-chloration de l'iminostilbène que la chloration de la double liaison en

10,11 de la carbamazépine. La conjugaison électronique des molécules formées permet ensuite la contraction du noyau central selon le principe du réarrangement pinacolique (**annexe 1**).

2.6.2.2.2. *Données humaines* in vivo

Le 9-hydroxyméthyl-10-carbamoylacridan semble pouvoir provenir directement de la carbamazépine, ou après époxydation en carbamazépine-10,11-époxyde, ou à l'étape du *trans*-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepine (Eichelbaum et coll., 1985; Wad et coll., 1997). L'existence d'un hydroxy-9-hydroxyméthyl-10-carbamoylacridan est probable, ce composé pouvant provenir de l'oxygénation du 9-hydroxyméthyl-10-carbamoylacridan ou de contraction du noyau central suivi de la décarbamoylation du 2- et/ou du 3-hydroxy-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazépine (**Figure 10**). L'oxygénation des noyaux aromatiques semble facilitée dans le métabolisme murin contrairement au métabolisme humain, en effet les dérivés aromatiques oxygénés (dont 2- et 3-hydroxy-carbamazépine) sont plus abondants dans l'urine murine que dans l'urine humaine. En revanche, chez l'homme l'attaque de la double liaison située en 10,11 de la molécule semble être la voie métabolique favorisée. Ainsi aucun dérivé hydroxy-10,11-dihydro-10,11-dihydroxyiminostilbène ni de 2- ou 3- hydroxy-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazépine n'est retrouvé dans l'urine murine. La présence d'un hydroxy-9-hydroxyméthyl-10-carbamoylacridan chez le rat est un argument en faveur de la formation de ce composé à partir du 9-hydroxyméthyl-10-carbamoylacridan puisque la voie des hydroxy-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazépines est impossible. Enfin l'acridine et l'acridone ont été retrouvées dans le sang de certains patients traités par carbamazépine (Breton et coll., 2005) (**Figure 10**).

Figure 10 - Origines proposées des métabolites acridiniques de la carbamazépine chez l'homme.



2.6.2.3. Réactions de conjugaison

2.6.2.3.1. *N-glucuroconjugaison*

Le N-glucuroconjugué de l'iminostilbène a été mis en évidence par Csetenyi et coll. en 1973 dans l'urine du rat ; cette N-glucuroconjugaison est d'ailleurs majoritaire par rapport à la O-glucuroconjugaison (Madden et coll., 1996). Amore et coll. (1997) ont mis en évidence les N-glucuroconjugués de la carbamazépine et du carbamazépine-10,11-époxyde chez la souris SWV/Fnn (modèle chez lequel l'activité époxyde hydrolase microsomale est réduite). La formation de ce dernier conjugué est fortement

augmentée en présence de stiripentol, un inhibiteur à large spectre des cytochromes P450. Chez l'homme, le carbamazépine-N-glucuronide et la carbamazépine-10,11-époxyde-N-glucuronide ont été mis en évidence, mais ce dernier composé semble moins abondant que dans l'urine murine (Maggs et coll., 1997). Chez le rat la N-glucuroconjugaison est clairement la voie d'excrétion urinaire majoritaire de la CBZ et de la CBZ-EP, mais plus de 70 % de la dose de ces molécules sont excrétés dans la bile (Madden et coll., 1996). Nous présentons dans le **Tableau 8** l'ensemble des glucuroconjugués trouvés dans l'urine humaine par Maggs et coll. (1997) qui reprennent et complètent les données de Lynn et coll. (1978) et Lertratanangkoon et Horning (1982).

Tableau 8 - Excrétion urinaire de la carbamazépine et de ses métabolites chez l'homme.

	Nom de la molécule	Concentration (mg/l)
Formes libres		
	CBZ	2.4 - 3.8
	CBZ-EP	9.6 - 15.0
	DiOH-CBZ	273 - 383
N-glucuroconjugués		
	CBZ- N-glucuronide	
	CBZ-EP- N-glucuronide	
O-glucuroconjugués		
	2-OH-CBZ- O-glucuronide	
	3-OH-CBZ- O-glucuronide	
	2 autres OH-CBZ- O-glucuronides	
	DiOH-CBZ-O-glucuronide	
	cis et *trans* 10-OH-CBZ- O-glucuronides	
	catéchol-CBZ- O-glucuronide	
	O-méthyl-catéchol-CBZ- O-glucuronide	
	9ac- O-glucuronide	
	OH-9ac- O-glucuronide	

Données obtenues chez des volontaires sains, deux hommes et une femme (30-36 ans), traités en monothérapie depuis plus d'un an à des posologies de 1200 à 1800 mg/j sans co-médications inductives ou inhibitrices enzymatiques (Maggs et coll., 1997).

2.6.2.3.2. *O-glucuroconjugaison*

Les premières études de conjugaison menées chez le rat par Lertratanangkoon et Horning (1982) indiquaient que 85 % des métabolites éliminés dans l'urine des premières 24h sont sous formes glucuroconjuguées et sulfoconjuguées (les N-conjugués sont exclus car seuls les O-glucuroconjugués sont sensibles à l'action de la glusulase utilisée). Dans la même étude, les formes conjuguées ne représentaient qu'un peu plus de la moitié des excréta urinaires des 48-72h. La O-glucuroconjugaison concerne un grand nombre de métabolites différents et principalement la *trans*-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepine et les catéchols suivants : la 1,2-dihydroxy-carbamazépine, la 2,3-dihydroxy-carbamazépine, la 2,7-dihydroxy-carbamazépine (ou 3,7-dihydroxy-carbamazépine), la 3,4-dihydroxy-carbamazépine. Les O-glucuroconjugués du 9ac sont également présents (**Tableau 8**).

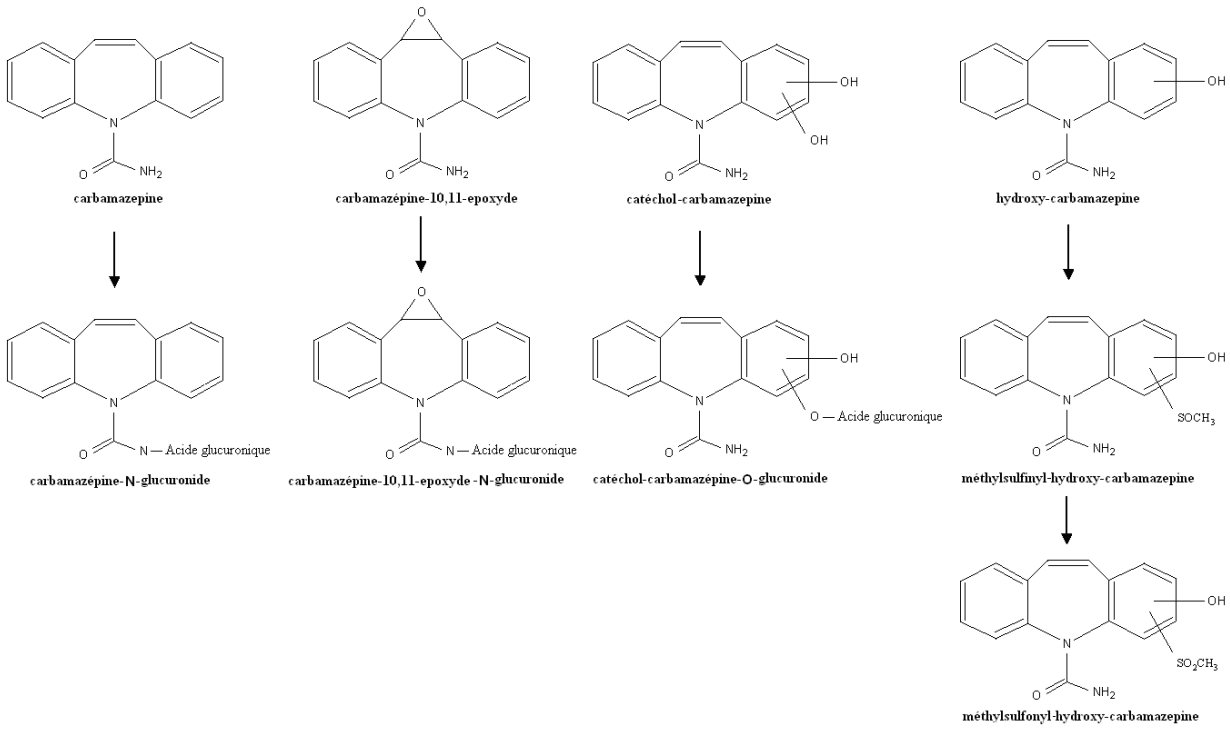
2.6.2.3.3. *Sulfoconjugaison*

Contrairement à l'O-glucuroconjugaison, la sulfoconjugaison s'effectue préférentiellement sur la 2-hydroxy-carbamazépine et la 3-hydroxy-carbamazépine avec oxydation en dérivés méthylsulfinyles et méthylsulfonyles. Cette sulfoconjugaison préférentielle est sans doute à rapprocher de la réactivité des espèces mono-hydroxylées qui forment rapidement un adduct avec le glutathion. Notons que, logiquement, chez le rat les dérivés méthylsulfinyles et méthylsulfonyles des hydroxy-carbamazépines sont plus représentés que chez l'homme. De même, des conjugués méthylthiolhydroxycarbamazépine ont été retrouvés uniquement chez le rat. Par ailleurs, des sulfoconjugués des noyaux aromatiques non oxygénés de la carbamazépine ont été retrouvés chez le rat mais sont absents chez l'homme. Ces derniers éléments

confirment bien que le métabolisme humain est polarisé sur l'attaque de la double liaison située en 10,11 de la carbamazépine (**Figure 11**).

Amore et coll. (1997) n'ont pas retrouvé de 10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazepine dans l'urine de la souris SWV/Fnn pour laquelle l'activité époxyde hydrolase microsomale est réduite. En revanche, confirmant les hypothèses de Lertratanangkoon et Horning (1982) sur la voie de formation des méthylthiolhydroxycarbamazépines, les auteurs ont mis en évidence la présence de 2,3-dihydro-2(ou 3)-hydroxy-carbamazépine conjuguée à la N-acétylcystéine, de S-cystéinyl-carbamazépine et de méthylsulfonyl-carbamazépine-10,11-époxyde. La formation de ces intermédiaires étant augmentée lorsque les souris étaient co-traitées avec du phénobarbital (inducteur des mono-oxygénases) et diminuée lorsque les souris étaient co-traitées avec du stiripentol (inhibiteur des mono-oxygénases).

Figure 11 - Voies préférentielles de conjugaison des métabolites de la carbamazépine chez l'homme



2.7. Suivi pharmacologique thérapeutique

La relation entre la concentration plasmatique de carbamazépine et la dose n'est pas linéaire. En recherchant les relations entre la dose, les concentrations plasmatiques et les clairances urinaires apparentes de la carbamazépine et de ses métabolites chez des adultes épileptiques à l'équilibre pharmacocinétique, Bernus et coll. (1996a) ont clarifié les étapes enzymatiques auto-inductibles en s'affranchissant en partie de la question non résolue d'une dose-dépendance de la biodisponibilité en travaillant sur les clairances urinaires. L'auto-induction de l'époxydation de la carbamazépine catalysée par les CYP3A4 et CYP2C8 est dose-dépendante avec un effet marqué sur le CYP3A4 (Andreasen et coll., 2007). L'hydratation de l'époxyde en diol mettant en jeu des époxydes hydrolases microsomales est auto-inductible d'une façon dose-dépendante uniquement pour la forme libre, la formation du conjugué sous la dépendance d'enzymes de conjugaison est en effet saturable. Il est à noter que cette auto-induction n'est pas ubiquitaire chez l'homme puisque les époxydes hydrolases microsomales lymphocytaires ne sont pas inductibles par la carbamazépine (Pirmohamed et coll., 1994). Au cours de la grossesse, l'induction des enzymes microsomales conduit à l'augmentation de la clairance apparente de ces voies et à une diminution des taux de CBZ (augmentation de la clairance vers la plupart des métabolites (carbamazépine-époxyde [CBZ-EP], *trans*-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazépine [DiOH-CBZ], 9-hydroxyméthyl-10carbamoylacridan [9ac] et 2-hydroxy-carbamazépine [2-OH-CBZ] urinaires libres, mais diminution vers la 3-hydroxy-carbamazépine [3-OH-CBZ]), sans modification de la clairance vers les voies de glucuroconjugaison (Bernus et coll., 1997). Une étude japonaise a mis en évidence un polymorphisme génétique au niveau du gène EPHX1 codant pour les époxydes hydrolases microsomales, certains variants générant une modification quantitative de l'hydratation du carbamazépine-époxyde

(Nakajima et coll., 2005). L'oxygénation de la carbamazépine en 2- ou 3-hydroxy-carbamazépine catalysée par la CYP1A2 est également dose-dépendante alors que la formation des conjugués correspondants est saturable. Enfin, de façon intéressante, la formation de 9-hydroxyméthyl-10-carbamoylacridan est saturable. Dans la même étude incluant le dosage urinaire de la carbamazépine, son époxyde et le diol correspondant, les dérivés 2 et 3 hydroxylés, le 9-hydroxyméthyl-10-carbamoylacridan et leurs conjugués, la part des substances mesurées dans l'urine par rapport à la dose de carbamazépine administrée diminue avec l'augmentation des doses (variation de 20 à 90 % pour des doses variant de 200 à 1200 mg/j. Il est à noter que seuls les dérivés glucuroconjugués étaient recherchés laissant penser que la saturabilité de cette voie pouvait majorer la contribution des dérivés sulfoconjugués dépendants du glutathion.

Si la carbamazépine est intensivement métabolisée, notamment par le CYP3A4, CYP2C8 (Kerr et coll., 1999) et les époxyde hydrolases microsomales, elle n'est en revanche pas un substrat pour la P-glycoprotéine (Owen et coll., 2001). La carbamazépine est un inducteur enzymatique mais son métabolisme peut également être influencé par d'autres substances ou médicaments inducteurs ou inhibiteurs enzymatiques associés au traitement, ainsi que par l'héritage enzymatique issu du polymorphisme génétique dont a hérité le patient. C'est la raison pour laquelle un suivi thérapeutique pharmacologique des taux de carbamazépine est recommandé dans les situations de co-médications ainsi qu'une recherche de l'allèle HLA-B*1502 avant instauration d'un traitement par carbamazépine chez les sujets d'origines thaïlandaises ou chinoises Han. La concentration plasmatique à l'équilibre (après une semaine de traitement au moins), doit s'inscrire dans la fourchette [4 - 12 mg/l] (soit [17 - 50 µmol/l]).

3. Réactivité de la carbamazépine et de ses métabolites

Si certaines molécules peuvent posséder une toxicité intrinsèque, le potentiel toxique de certaines voies métaboliques ne réside pas dans les métabolites isolément identifiés par un détecteur de masse dans le sang ou l'urine de patients mais dans le processus chimique métabolique lui-même. Plusieurs études ont ainsi démontré *in vitro* la formation d'adducts de certains métabolites de la carbamazépine avec les protéines humaines en mettant en évidence la formation de liaisons covalentes grâce à des analogues radio-marqués. Ces adducts peuvent ensuite constituer des néoantigènes reconnus comme étranger par le système immunitaire et être à l'origine d'une réponse immunologique délétère. L'identification de voies métaboliques aboutissant à des glutathion-conjugués est un autre moyen d'envisager une réactivité d'un métabolite avec les molécules endogènes.

3.1. Réactivité de la carbamazépine

Les données de plusieurs auteurs indiquent que la CBZ en absence de métabolisme ne se lie pas de façon covalente à l'albumine et aux protéines plasmatiques (Furst et Uetrecht, 1993, Bu et coll., 2005).

Par ailleurs, Marmurowska-Michałowska et coll. (2004) ont montré que la carbamazépine (1 μM) modifie la sécrétion de cytokines *in vitro* des PBMC issus de volontaires sains. Ainsi, la production d'IL-10 et de TGF-β est augmentée après stimulation par phytohémagglutine et LPS (IL-10 augmentée également sans stimulation) alors que la sécrétion d'IL-2, d'IL-4 et de TNF-β (lymphotoxine) est diminuée uniquement après stimulation. La carbamazépine ne semble pas modifier la

sécrétion d'IFN-γ et d'IL-12 par les PBMC. Les variations sont toujours rapportées par comparaison à l'effet du solvant de dilution de la CBZ, le DMSO. La production de certaines cytokines semble corrélée positivement (IL-2 et TNF-β, cytokines Th1) ou négativement (IFN-γ et IL-10, IFN-γ et TGF-β, IL-2 et TGF-β, IL-4 et TGF-β). En revanche, les données obtenues à partir de patients épileptiques traités depuis 1 an montrent une augmentation de la production d'IL-1, IL-2 et IL-6 par les PBMC stimulés *ex vivo* par du mitogène (Verrotti et coll., 2001). Ces résultats sont en faveur d'un effet immunosuppresseur à court terme de la carbamazépine chez des sujets sains. Il est difficile d'interpréter l'effet apparemment stimulant observé chez les patients épileptiques qui inclut l'effet des métabolites, l'effet de la maladie en plus de l'effet temps d'exposition.

Enfin, la carbamazépine semble augmenter la production d'ion superoxyde par les neutrophiles isolés de volontaires sains uniquement après stimulation (PHA+LPS), par rapport au solvant (DMSO). La variation est cependant modeste sans dose-dépendance significative (Marmurowska-Michałowska et coll., 2004).

D'un point de vue immunologique, la carbamazépine aurait donc tendance à produire en début de traitement une immunosuppression (down-regulation de l'IL-2 et de l'IL-4, up-regulation de l'IL-10 et du TGF-β) sans effet propre sur la production d'ion superoxyde des neutrophiles en l'absence de stimulation.

Les clones de lymphocytes périphériques issus de patients ayant présenté des réactions d'hypersensibilité cutanées diverses présentent un marquage CD4+ ou CD4+CD8+, secrètent de l'IFN-γ, un TCR αβ et sont cytotoxiques. La reconnaissance de la CBZ se fait dans un contexte de CMH II (HLA-DQ/DR) et une réactivité croisée est possible mais pas systématique selon les clones avec le CBZ-EP et la DiOH-CBZ ; l'IM ne réagit

pas (les autres métabolites n'ont pas été testés) (Naisbitt et coll., 2003a). Les TCD4+ présentent une forte prolifération après stimulation avec la carbamazépine (sans processing) mais une faible cytotoxicité à la différence des TCD8+ qui prolifèrent peu mais ont une forte activité cytotoxique (perforine) restreinte à un contexte de présentation CMH I mais aussi CMH II. Les TCD4+CD8+ (probablement échappés de la délétion thymique, retrouvés dans d'autres pathologies telles que la polyarthrite rhumatoïde et les dermatites atopiques) ont le même profil que les TCD4+ mais leur stimulation semble non restreinte à un contexte de présentation. La stimulation par la carbamazépine sans cellule de présentation de l'antigène induit la production d'IL-5 et d'IFN-γ mais pas d'IL-4 ni d'IL-10 par les 3 sous-types de cellules T, de plus les récepteurs de "skin homing" sont présents sur les 3 sous-types. L'IFN-γ favorise l'expression des molécules de CMH I et II par les kératinocytes favorisant ainsi l'orientation vers la réponse cytotoxique, et l'IL-5 favorise le recrutement des éosinophiles. Enfin, les 3 sous-types présentent les marqueurs CD11a+CD27- des cellules effectrices mémoires, des marqueurs de résidence des cellules mémoires dans la peau saine (CCR8, ainsi que son ligand I-309 formant ainsi une boucle de recrutement vers la peau) et dans la peau inflammatoire (CCR4 et CCR10, retrouvées dans les dermatites de contact, atopiques et le psoriasis) (Wu et coll., 2007). Une partie de ces résultats a été retrouvée avec la lamotrigine par la même équipe (Naisbitt et coll., 2003b).

Alors que le traitement par phénobarbital et par phénytoïne est associé à l'augmentation du risque de développer certains cancers chez l'homme, que l'activité inhibitrice sur les histone-déacétylases semble être responsable d'un effet protecteur de l'acide valproïque sur le développement tumoral, peu de données sont disponibles pour évaluer un effet du traitement par carbamazépine sur la survenue d'un cancer (Singh et coll., 2005).

3.2. Réactivité des carbamazépine-époxydes

Les carbamazépine-époxydes font partie de la famille chimique des arènes oxydes identifiés comme des métabolites réactifs hépatotoxiques dont la toxicité serait limitée par des époxydes hydrolases (Spielberg et coll., 1981). L'époxydation de la carbamazépine en position 10,11 forme le seul époxyde stable, le CBZ-EP, qui est un des métabolites majeurs retrouvés dans le sang. Les autres positions d'époxydation (1,2 ; 2,3 ; 3,4) donnent des époxydes instables, non détectés dans le sang, pouvant évoluer vers les trans-diols, les composés hydroxylés (dont 2-OH-CBZ et 3-OH-CBZ entre autres) et les catéchols pouvant s'oxyder en quinones (dont la 2,3-dihydroxy-carbamazépine) correspondantes. L'induction des CYP3A (par le phénobarbital ou la dexaméthasone) s'accompagne chez la souris d'une augmentation de la formation d'adducts sur les CYP3A mis en évidence par des anticorps anti-CYP3A dirigés contre une protéine de 52 kDa (Pirmohamed et coll., 1992a). L'inhibition (gestodène) produit l'effet inverse.

Les travaux de Bu et coll. (2005) indiquent que le CBZ-EP peut former davantage de liaisons covalentes avec les protéines microsomales qu'avec le plasma humain, que la réactivité existe spontanément mais est accrue en présence de NADPH et limitée en présence de glutathion. La formation de CBZ-EP n'a pas d'effet inhibiteur sur les cytochromes (Lillibridge et coll., 1996).

Une cytotoxicité NADPH dépendante des arènes oxydes (car inhibée par l'époxyde hydrolase microsomale humaine) a été mise en évidence sur les lymphocytes, sans toxicité préférentielle vis-à-vis des lymphocytes T ou B (Pirmohamed et coll., 1992b). Cette cytotoxicité était réduite par les thiols mais pas par l'acide ascorbique laissant penser à une toxicité non médiée par les quinones.

Une toxicité particulière révélatrice d'adducts métabolite-protéine ou métabolite-ADN (arène oxydes et quinones) ou d'oxydation de l'ADN (quinone) est la tératogénicité. Cette tératogénicité s'accroît chez les souris SWV/Fnn co-exposée à l'effet inducteur enzymatique du phénobarbital et diminue au cours de la co-exposition avec l'effet inhibiteur enzymatique du stiripentol (Finnell et coll., 1995). La tératogénicité de la carbamazépine ne semble pas liée à une activation placentaire de la carbamazépine par la voie de l'époxyde. En effet, Pienimäki et coll. (1997) ont montré que le placenta humain ne métabolisait pas la carbamazépine en époxyde et n'induisait pas la voie du CYP3A4 très faiblement exprimé dans le placenta (mesure de l'ARNm des CYP3A4). Après perfusion de placenta, les auteurs n'ont pas retrouvé le carbamazépine-10,11-époxyde, le diol, le 9ac, le 2-OH-CBZ et le 3-OH-CBZ. En revanche, les concentrations plasmatiques de ces composés dans le sang de la mère étaient voisines des concentrations retrouvées dans le sang de cordon. Bennett et coll. (1996) ont montré avec le modèle de la souris SWV/Fnn que l'incidence des malformations augmentait avec les doses de CBZ-EP administrées. Amore et coll. (1997) ont montré avec le même modèle que les malformations semblaient corrélées à la présence du conjugué N-acétylcystéine du 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-carbamazépine, de la S-cystéinyl-carbamazépine et du méthylsulfonyl-carbamazépine-10,11-époxyde considérant ces composés comme des marqueurs potentiels des voies métaboliques associées aux effets tératogènes. De façon intéressante, le métabolite d'amont serait l'époxyde correspondant, le carbamazépine-2,3-époxyde, dont la voie de formation passerait par la trans-hydratation. L'incidence des malformations restait voisine de celle du groupe contrôle lorsque les souris étaient exposées à de hautes doses d'oxcarbazépine, y compris en présence de phénobarbital (Bennett et coll., 1996). L'oxcarbazépine possédant la voie métabolique de la DiOH-CBZ en commun avec la carbamazépine, ces

données semblent donc situer l'origine de la formation des métabolites réactifs au niveau des voies secondaires de métabolisation de la CBZ-EP. Bu et coll. (2005) ont montré que le CBZ-EP formait en égale quantité les 2 diastéréoisomères de la 10-hydroxy-11-glutathionyl-10,11-dihydro-carbamazépine en présence de glutathion seul et avec un rendement supérieur en présence de NADPH et d'enzymes microsomales. Les travaux ultérieurs de Bu et coll. (2007) confirment la formation de 2 conjugués glutathion du CBZ-EP lorsque la CBZ et le CBZ-EP sont mis en présence d'un système complet [microsomes humains hépatiques (pool de 60 donneurs)-NADPH-glutathion] ; les adducts du CBZ-EP étant majoritaires dans les deux cas et exclusifs pour le CBZ-EP.

Un argument supplémentaire est trouvé dans les travaux de Lillibridge et coll. (1996) montrant que la formation d'adducts sur des protéines était diminuée lorsque des époxyde hydrolases microsomales étaient ajoutées au milieu d'incubation. La mise en évidence des adducts étant basée sur le radio-marquage au carbone 14 du radical carbamoyle de la carbamazépine, on peut en déduire que les adducts formés mettaient en jeu des dérivés non décarbamoylés. Confirmant d'étude de Pirmohamed et coll. (1992), les auteurs caractérisent la voie du glutathion (supplémentation en glutathion, N-acétylcystéine, glutathion transférase) comme une voie de détoxification complémentaire de celle des époxydes hydrolase microsomales. De façon plus détaillée, leurs expérimentations utilisaient la souris SWV/Fnn à faible activité époxyde hydrolase microsomale et les auteurs ont mis en évidence le rôle inhibiteur sur la fixation aux protéines de la carbamazépine de la catéchol-O-méthyl-transférase (voie d'activation des catéchols) et de la NAD(P)H quinone oxydoréductase (ancienne DT-diaphorase) (voie d'activation des quinones), l'inhibition de la voie des quinones apparaissant comme réduisant davantage la fixation covalente de la carbamazépine. L'époxyde microsomale

humaine recombinante avait une activité inhibitrice sur la formation plus importante que la protéine recombinante murine, l'époxyde hydrolase soluble étant sans effet.

Ainsi le CYP3A4 activerait la carbamazépine en époxydes lesquels seraient aussitôt hydratés par les époxydes hydrolases microsomales en diols correspondants. La fraction d'époxydes qui aurait échappé à ce premier niveau protecteur évoluerait spontanément en arène oxyde et/ou quinone, espèces électrophiles hautement réactives avec les protéines. La voie du glutathion, piégeur de composés électrophiles, constituerait la seconde ligne de défense. Un équilibre entre voies activatrices et voies protectrices serait garant de l'innocuité du traitement par carbamazépine et un déséquilibre en faveur de la voie activatrice serait propice à la formation d'adducts, ce déséquilibre pouvant soit être porté par un phénotype surexprimant le CYP3A4 soit survenir à l'occasion d'une association thérapeutique avec des médicaments inducteurs. Cependant David et coll. (1995) n'ont pas retrouvé de différence dans l'activité de l'époxyde hydrolase microsomale dans les lymphocytes des patients présentant une hypersensibilité à la carbamazépine par rapport à l'activité retrouvée chez des patients sans effets indésirables comme chez des volontaires sains. L'auto-induction par la carbamazépine de l'époxyde hydrolase microsomale lymphocytaire est d'ailleurs modeste (Pirmohamed et coll., 1994). Enfin, la comparaison inter-espèce de l'activité époxyde hydrolase microsomale indique que l'hydratation du CBZ-EP n'est retrouvée que chez l'enzyme hépatique humain et non chez le rat ni la souris (Kitteringham et coll., 1996). D'ailleurs, le métabolite majoritaire retrouvé dans l'urine de rats traités par CBZ-EP est le CBZ-EP-N-glucuronide (Madden et coll., 1996). De façon intéressante, la même équipe dirigée par Park retrouve uniquement des dérivés soufrés, indicateurs probables de détoxification d'arène oxydes, dans l'urine de rat et pas dans l'urine humaine (Madden et

coll., 1996 et Maggs et coll., 1997). Les travaux d'Amore et coll. (1997) sur la souris laissent penser que cette différence métabolique peut s'étendre aux rongeurs.

Alors que la réactivité des arènes oxydes est établie, l'implication directe des époxyde hydrolases microsomales lymphocytaires dans les manifestations d'hypersensibilité semble écartée par les travaux de Davis et coll. (1995) qui ont montré que l'activité enzymatique spécifique chez les patients atteints d'hypersensibilité était égale à celle des volontaires sains et des patients traités sans effets indésirables.

3.3. Réactivité des dihydro-dihydroxy-carbamazépines

Ces composés peuvent potentiellement rejoindre la voie d'activation des dérivés hydroxylés lors de leur transformation en hydroxy-dihydro-dihydroxy-carbamazépines. Cependant cette voie apparaît comme mineure par rapport aux importantes concentrations de DiOH-CBZ inchangée retrouvées dans l'urine. Ces composés sont donc très certainement peu réactifs.

3.4. Réactivité des 2- et 3-hydroxy-carbamazépines et de leur catéchol 2,3-dihydroxy-carbamazépine

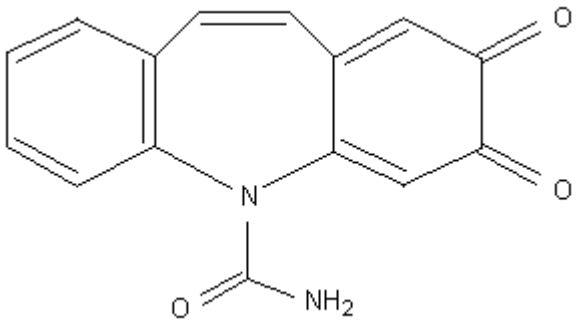
Alors que la 2-OH-CBZ paraît être un métabolite stable, l'IQ (le 2-OH-IM également mais après conversion non enzymatique en IQ dans des conditions suffisamment oxydantes) forme des adducts avec le glutathion et la N-acétylcystéine en l'absence de NADPH. Cependant l'activité du CYP3A4 n'est pas inhibée après formation de 2-OH-IM à partir de la 2-OH-CBZ. La formation d'un adduct avec le CYP3A4 est donc à

exclure sauf liaison avec un site de l'enzyme non indispensable à l'activité. La stabilité du 2-OH-IM est acquise dans les conditions physiologiques mais des modifications de l'équilibre métabolique physiologique (acidose, stress oxydant) pourraient néanmoins avantager la formation d'IQ au dépend du 2-OH-IM et, si les possibilités de sulfoconjugaisons sont dépassées, des liaisons covalentes entre IQ et molécules endogènes seraient possibles. A l'instar du raisonnement de Ju et Uetrecht (1999), cette voie métabolique dépendant d'altérations métaboliques générales ou locales pourrait permettre de générer l'iminoquinone à distance de la formation hépatique de la 2-OH-IM et donc exercer une toxicité systémique sur la moelle osseuse et la peau par exemple. Le 2-OH-IM serait donc une bombe à retardement que seule la glucuroconjugaison pourrait désamorcer définitivement.

La formation de la 2,3-DiOH-CBZ passe par la formation d'un dérivé intermédiaire non caractérisé, peut-être la carbamazépine-*o*-quinone (CBZ-o-Q, **Figure 12**) ou une forme radicalaire de la 3-OH-CBZ (Lu et Uetrecht, 2008). La présence urinaire de l'O-glucuroconjugué de la 2,3-DiOH-CBZ (Lertratanangkoon et Horning, 1982) plutôt que de son sulfoconjugué laisserait à penser à une certaine stabilité de l'intermédiaire de formation du catéchol. Les données de Bu et coll. (2007) ouvrent considérablement l'horizon des possibilités métaboliques et les observations issues de l'urine humaine ne s'opposent pas à l'existence des composés proposés. Les données sont encore incomplètes sur la caractérisation exacte des adducts incluant le positionnement des substituants ainsi que les relations stéréoisomériques entre adducts. Cet intermédiaire inhibe l'activité du CYP3A4 (la formation de la 2,3-DiOH-CBZ n'est en effet pas temps-dépendante). Cette inhibition de l'activité du CYP3A4 est levée en présence de glutathion et de N-acétylcystéine. L'inhibition de l'activité du CYP3A4 serait

probablement liée à la formation d'un adduct formé par la réaction de l'intermédiaire formé lors de l'oxygénation du 3-OH-CBZ sur le cytochrome avec formation d'un néoantigène potentiellement capable d'initier une réaction d'hypersensibilité de type IV. La réactivité du catéchol 2,3-dihydroxy-carbamazépine est intéressante à considérer car elle rejoindrait la même voie que la 3',4'-dihydroxy-phénytoïne, métabolite réactif de la phénytoïne identifié comme pouvant former des liaisons covalentes avec les protéines microsomales hépatiques après oxydation spontanée en quinone (Munns et coll., 1997). De plus, des anticorps reconnaissant une séquence linéaire d'acides aminés de l'hélice K des CYP3A du rat ont été mis en évidence dans les sérums de patients atteints de syndromes d'hypersensibilité à la carbamazépine et à la phénytoïne (Leeder et coll., 1996). Ces anticorps ne reconnaissent pas l'hélice K humaine (variation sur un acide aminé : lysine chez l'homme, valine chez le rat) mais des travaux ont montré que l'inactivation du CYP3A4 par un hydroperoxyde était associée à une modification des résidus aminoacides situés sur l'hélice K (He et coll., 1998).

Figure 12 - Formule développée de la carbamazépine-*o*-quinone (CBZ-o-Q)



Les enzymes qui sont associés à la formation d'adducts microsomaux en présence de CBZ sont majoritairement : les CYP2B6, 3A4 et 3A5, puis CYP3A7, 1A1 et 1A2 de façon moindre, et enfin CYP2C8 et 2C19. Les CYP2C9 et 2C18 ne semblent pas concourir à la formation d'adducts. En aval du métabolisme, au niveau de la formation d'adducts à partir de la 3-OH-CBZ, le CYP3A4 est le plus impliqué, suivi par les CYP3A5, 3A7, 2C19 et 1A2, puis 1A1, 2C9, 2B6. La voie de formation des adducts n'est donc pas unique puisque d'une part la formation d'adducts à partir de la CBZ provient en proportions voisines des CYP3A4 et 3A5 alors que le CYP3A4 active davantage la 3-OH-CBZ, d'autre part le CYP2B6 est un cytochrome très activateur de la CBZ mais par une voie différente de celle de la 3-OH-CBZ (**Tableau 9**). La formation de ces adducts est considérablement réduite en présence de glutathion.

Tableau 9 - Contribution relative des différents isoformes des CYP450 à la formation d'adducts à partir de la carbamazépine et de la 3-hydroxy-carbamazépine. Les cytochromes écrits en gras indiquent que l'origine des adducts ne passe pas uniquement par la 3-hydroxy-carbamazépine (Pearce et coll., 2008)

	A partir de la carbamazépine	A partir de la 3-OH-carbamazépine
Forte formation	**2B6**, **3A4, 3A5**	**3A4**
Formation moyenne	3A7, 1A1, 1A2	**3A5**, 3A7, 2C19, 1A2
Formation faible	2C8, 2C19	1A1, 2C9, **2B6**
Absence de formation	2C9, 2C18	2C8, 2C18

La contribution de la 3-OH-CBZ dans la formation des adducts apparaît majoritaire dans les études de Bu et coll. (2007) puisque parmi les 14 adducts (hors adducts du CBZ-EP) formés après incubation de la CBZ avec le système complet [microsomes

humains hépatiques (pool de 60 donneurs)-NADPH-glutathion], 6 d'entre eux étaient communs à ceux retrouvés après incubation avec la seule 3-OH-CBZ. Il s'agirait d'adducts du glutathion de la 3-hydroxy-7,8-dihydro-carbamazépine oxygénés en position 6 à 9, deux à deux isomères. La même incubation avec la 2-OH-CBZ donne lieu à plusieurs adducts non communs avec ceux de la CBZ. Cette singularité n'est que relative, en effet, les travaux de Pearce indiquent que la 2-OH-CBZ est minoritairement formée et les travaux de Bu ont été réalisés en utilisant des concentrations énormes de 2-OH-CBZ (200µM). Enfin, après incubation avec des taux thérapeutiques de CBZ (100 µM), 8 adducts indépendants des voies du CBZ-EP et des 2- et 3-OH-CBZ ont été retrouvés prouvant l'existence d'une quatrième voie quantitative d'oxydation microsomale NADPH dépendante issue exclusivement de la CBZ. Il s'agirait de 4 glutathion-conjugués de carbamazépine mono-hydroxylée sur le même noyau benzénique (voie des iminoquinones issues des 1- et 4-OH-CBZ ?) dont 2 seraient isomères, 2 glutathion-conjugués de la 2,3-dihydro-carbamazépine mono-hydroxylée sur le même noyau benzénique (voie des arènes oxydes passant par le carbamazépine-2,3-CBZ), et de 2 adducts isomères de la 2,3-dihydro-carbamazépine di-hydroxylée sur le même noyau benzénique.

La réactivité *in vitro* (à pH 7.4) de la 3-OH-CBZ avec le complexe oxydatif de la myéloperoxydase est forte, supérieure à celle de la 2-OH-CBZ et de la CBZ. Cet ordre de réactivité est retrouvé dans la capacité à générer des espèces réactives de l'oxygène et à former des dimères $(3\text{-OH-CBZ})_2$ mais aussi des adducts avec la tyrosine (à pH=8.0). La prévalence du radical libre de la 3-OH-CBZ s'explique par le nombre plus important de mésomères. Ce type de réaction est typique de la réactivité de radicaux libres phénoxyles. La 4-hydroxy-phénytoïne donne lieu au même type de réaction laissant

penser à une voie physiopathologique commune pouvant expliquer les réactions d'hypersensibilité croisées entre carbamazépine et phénytoïne.

3.5. Réactivité de l'iminostilbène

Furst et coll. (1995) ont montré que l'iminostilbène ne se lie pas aux polynucléaires neutrophiles (en l'absence de métabolisation). La toxicité systémique intrinsèque de l'iminostilbène n'est pas documentée.

3.6. Réactivité des dérivés acridiniques

3.6.1. Réactivité du 9-hydroxy-méthyl-10-acridan

Aucune donnée n'est disponible sur la réactivité ou la toxicité de ce composé.

3.6.2. Réactivité du 9-acridinecarboxaldéhyde

La formation du 9-acridinecarboxaldéhyde serait issue d'un carbocation par définition électrophile (Furst et Uetrecht, 1993).

Furst et Uetrecht (1993) ont montré que le 9-acridinecarboxaldéhyde se liait aux neutrophiles non activés et davantage avec des neutrophiles activés par le PMA. La réaction chimique possible serait une liaison avec les radicaux aminés des protéines conduisant à une imine. Mais cette réaction est réversible au pH physiologique et les auteurs n'ont pas réussi à mettre en évidence un mécanisme de réduction permettant de

former une amine stable. La liaison aux neutrophiles des métabolites directs du 9-acridinecarboxaldéhyde, l'acridine et l'acridone, est par ailleurs négligeable.

Le 9-acridinecarboxaldéhyde réagit avec le glutathion pour former un hémithioacétal, mais la réaction est également réversible.

Le 9-acridinecarboxaldéhyde modifie l'activité des cellules immunitaires *in vitro*. Furst et Uetrecht (1995) rapportent une cytotoxicité du 9-acridinecarboxaldéhyde temps et concentration dépendante provoquant plus de 50 % de mort cellulaire après 1h d'incubation à la concentration de 100 µM avec un effet plus marqué sur les lymphocytes que sur les polynucléaires. Cette concentration apparaît excessivement élevée d'un point de vue thérapeutique, bien qu'à concentration égale la CBZ, l'AI et l'AO ne présentent pas d'effet sur la viabilité. Pour des concentrations testées plus basses, le 9-acridinecarboxaldéhyde provoque une augmentation de la réponse à la stimulation des lymphocytes à différentes stimulations (réaction lymphocytaire mixte autologue, réaction lymphocytaire mixte allogénique, mitogénèse induite à la phytohémagglutinine et au *S. aureus*). Puis à une concentration seuil inférieure à la limite de toxicité retenue (cytotoxicité maximale de 10 % pour des incubations de 30 minutes avec des concentrations de 20 µM), la réponse s'effondre, l'effet semblant plus marqué sur les lymphocytes B. La réponse plus intense obtenue dans la partie croissante des courbes de réponse dans les tests de réaction lymphocytaire mixte autologue semble pouvoir être expliquée par une interaction du 9-acridinecarboxaldéhyde et des molécules de CMH de classe II.

Furst et coll. (1995) ont indiqué que le 9-acridinecarboxaldéhyde se transformait en milieu acide (pH=2) et en présence de lumière en acridine.

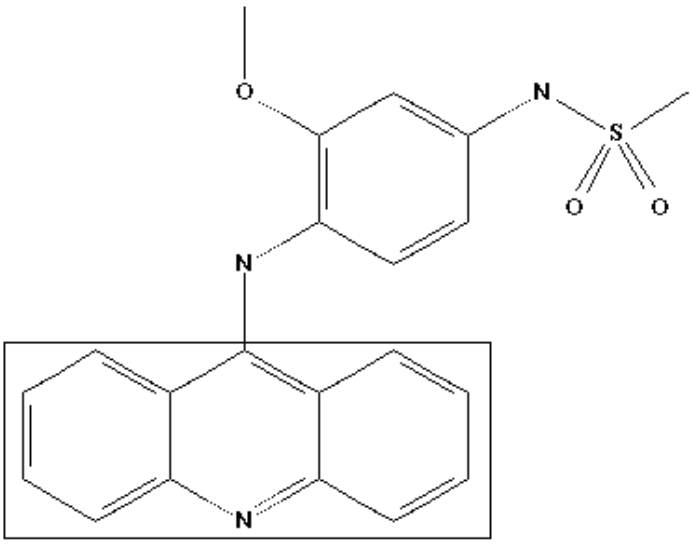
3.6.3. Réactivité de l'acridine

L'acridine est très photocytotoxique et très photogénotoxique (Struwe et coll., 2007). De plus, la conjugaison des doubles liaisons confère à la structure tricyclique une géométrie plane caractéristique des agents intercalants de l'ADN. Ainsi un dérivé simple de l'acridine, l'amsacrine (**Figure 13**) ou N-[4-(acridin-9-ylamino)-3- méthoxyphényl] méthanesulfonamide, est commercialisé sous le nom de spécialité AMSALYO® et indiqué dans le traitement d'induction et d'entretien des leucémies aiguës lymphoblastiques et myéloblastiques, principalement en cas de rechute ou d'échec aux traitements conventionnels.

La tacrine (1,2,3,4-tétrahydro-9-amino-acridine) est une molécule qui a été utilisée dans la maladie d'Alzheimer et dont l'utilisation a été associée à une hépatotoxicité. La cytotoxicité semble être initiée par une activation métabolique dépendante du CYP1A2 (inhibée par l'enoxacine et la furafylline) évoluant vers la formation d'un quinone-méthide (Spaldin et coll., 1994 et 1995). La tacrine est avant tout un inhibiteur de l'acétylcholinestérase, mais l'activité peut également être majorée par un rôle inhibiteur sur les cellules microgliales (monocytes / macrophages) pouvant être impliquées dans l'avancée de la maladie. En effet, le peptide bêta-amyloïde pourrait activer la NADPH oxydase initiant la dégranulation et la libération d'espèces réactives de l'oxygène par les macrophages (Andersen et coll., 2003). Le métabolisme intra-macrophagique de la tacrine pourrait aboutir à la formation d'adducts délétères détruisant les cellules microgliales et limitant ainsi les dégranulations toxiques.

Un certain nombre d'autres dérivés de l'acridine ont une activité anticancéreuse potentielle en tant qu'inhibiteur de la topoisomérase II (Alberti et coll., 2001, Gunaratnam et coll., 2007; Vispé et coll., 2007).

Figure 13 - Formule développée de l'amsacrine, agent intercalant dérivé de l'acridine



3.6.4. Réactivité de l'acridone

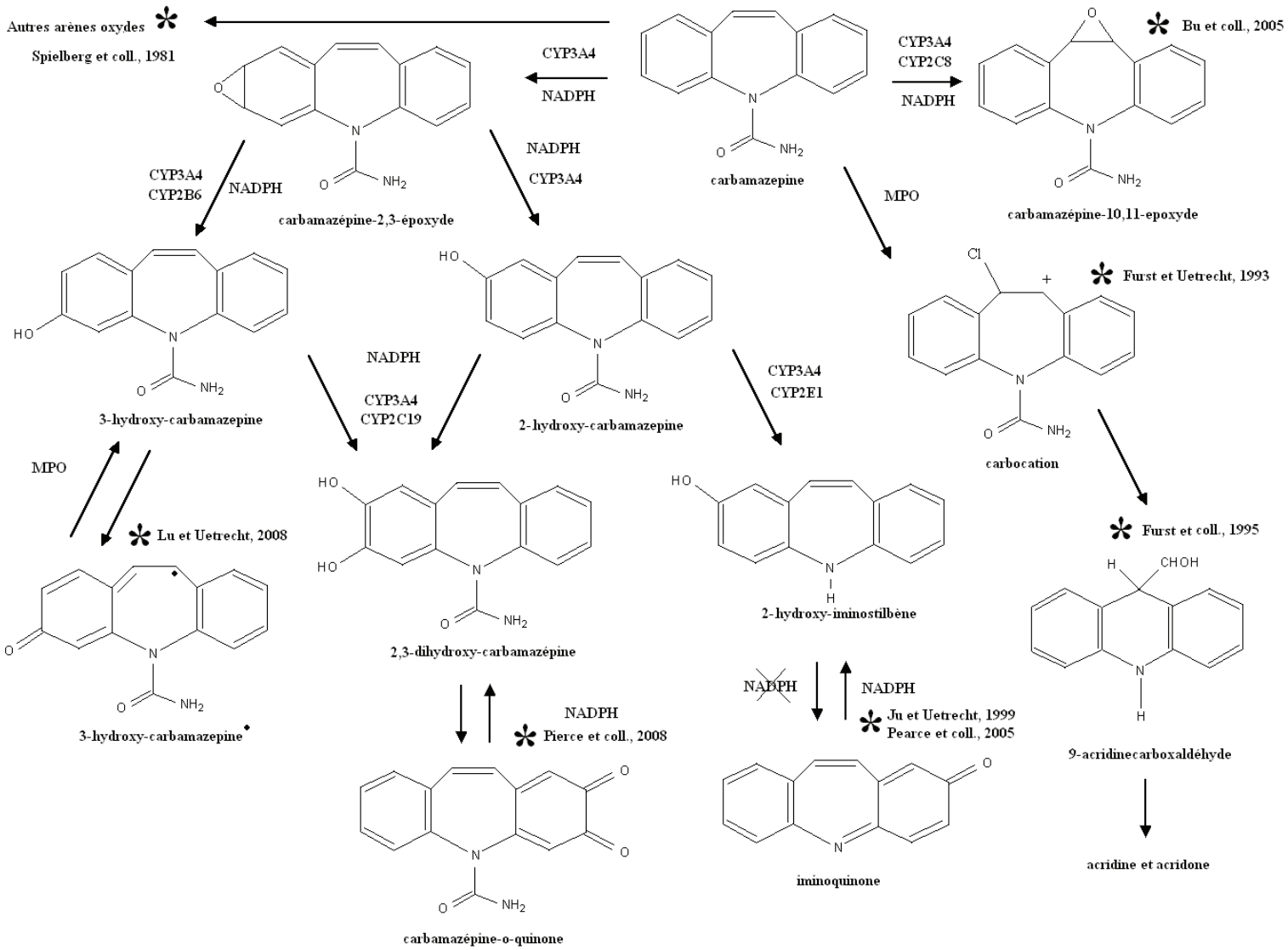
Des données intéressantes sont issues de l'étude du métabolisme de la moule chez laquelle l'acridone pourrait être considérée comme un marqueur de l'efficacité des voies de détoxification de l'acridine (Kraak et coll., 1997). Les dérivés de l'acridone ont un effet protecteur *in vivo* vis à vis de l'activation des virus Epstein-Barr chez la souris et présentent une faible toxicité cellulaire *in vitro* (Itoigawa et coll., 2003).

3.6.5. Réactivité des dérivés chlorés de l'acridone

Elle est inconnue.

La récapitulation schématique des principaux métabolites réactifs déterminés *in vitro* détaillés précédemment est présentée dans la **Figure 14**.

Figure 14 - Voies métaboliques des principaux métabolites réactifs déterminés *in vitro* à partir d'études de liaisons irréversibles de radio-marqueurs (les doubles flèches indiquent une dualité dans la filiation métabolique).



4. Discussion

Le champ d'investigation scientifique des réactions idiosyncrasiques aux médicaments apparaît clairement comme gigantesque. L'angle d'attaque de la question n'est pas tranché, les uns voyant une chance de succès dans une vision clinique synthétique, les autres engageant leur force dans une stratégie analytique. Dans les avancées mécanistiques, si le besoin de reconnaissance par le système immunitaire fait consensus, nous retrouvons plusieurs écoles pour expliquer les modalités de cette reconnaissance. D'un côté, les tenants de la responsabilité de la molécule mère, ou éventuellement de ses métabolites chimiquement intègres, ont montré que les lymphocytes peuvent reconnaître des petites molécules chimiques, dont la carbamazépine, sans réaction préalable avec les constituants cellulaires pour former des haptènes. D'un autre côté, les partisans de la réactivité des métabolites ont démontré que diverses voies métaboliques dépendant des cytochromes P450 ou des espèces réactives de l'oxygène peuvent générer plusieurs métabolites hautement réactifs conduisant à la formation d'haptènes potentiels. La dichotomie se poursuit sur le type de réponse immunologique engagée, réponse cytotoxique ou humorale, avec des arguments dans les deux camps reposant sur la mise en évidence de marqueurs de cytotoxicité et d'anticorps spécifiques et s'appuyant également sur les profils de cytokines identifiés. Enfin, les conséquences de l'activation immunologique sont débattues avec le recours ou non à un agent viral catalyseur.

Pour délimiter le champ de leurs investigations, les auteurs ont eu recours à des désignations de syndromes spécifiques associés à des critères quasi-personnalisés, rendant difficile l'extrapolation des résultats.

Pour contribuer à l'avancée des connaissances dans ce domaine, nous avons retenu que la carbamazépine était la molécule impliquée avec la plus grande fréquence dans les

réactions d'hypersensibilité cutanées associées à une hyperéosinophilie et une atteinte générale, ce que nous retenons comme définition du DRESS. La carbamazépine donne également lieu à des réactions cutanées de type SJS/TEN, mais nous considérerons dans en premier temps que ces syndromes constituent une entité à part sur la base de la fréquence plus faible de l'hyperéosinophilie associée. En tant que pharmacologue, nous nous intéressons plus volontiers aux hypothèses mécanistiques s'appuyant sur les voies métaboliques, leur réactivité et les facteurs pouvant les modifier conduisant alors vers la manifestation pathologique ; et nous laissons humblement aux immunologistes le soin d'explorer les raisons des déséquilibres immunitaires initiés par la reconnaissance directe des molécules par les cellules immunocompétentes. Dans ce cadre défini, nous proposons de récapituler sous un angle critique les données de la littérature.

La plupart des données publiées explorant l'hypothèse des métabolites réactifs reposent sur des études *in vitro* avec des protéines murines ou des protéines humaines dont l'activité peut différer. Nous n'avons pas trouvé de publication rapportant l'exploration métabolique chez les patients atteints d'un syndrome d'hypersensibilité à la CBZ. Les études de liaison covalente requièrent l'utilisation de radio-traceurs mais les résultats obtenus sont influencés par le marquage et l'interprétation des données de la littérature doit tenir compte du site de marquage du radio-traceur :

- le marquage ^{14}C du carbonyle méconnaît la réactivité des dérivés iminostilbènes et exclut la réactivité des dérivés acridiniques décarbamoylés,

- le marquage ^{3}H ou ^{14}C de la double liaison 10-11 inclut la réactivité des dérivés iminostilbènes mais ne trace qu'une partie de la réactivité des dérivés acridiniques.

De façon assez contradictoire plusieurs études montrent que la formation *in vitro* d'adducts de la carbamazépine est considérablement plus importante lorsque l'incubation

est faite en présence de NADPH (Pirmohamed et coll., 1992b; Wolkenstein et coll., 1998) alors que les travaux de Pearce et coll. (2002, 2005 et 2008) concluent à l'inverse pour la réactivité des métabolites réactifs explorés. Il faut donc admettre une réactivité immédiate du métabolite généré supérieure et donc une affinité électrophile très supérieure du métabolite réactif pour les sites nucléophiles des protéines que pour la NADPH. L'hypothèse physiopathologique des effets indésirables multiviscéraux repose en partie sur la notion de réactivité *in situ*. Les données obtenues doivent être rapprochées de la distribution tissulaire des CYP identifiés comme générateurs de métabolites réactifs. Nous avons déjà précisé que le CYP3A4 avait une distribution adéquate. Les données de Wolkenstein et coll. (1998) présentent un intérêt particulier car ils ont mis en évidence la présence inductible (par le coaltar) du CYP1A1 au niveau de l'épiderme et la capacité de ce cytochrome à générer des métabolites qui réagissent avec lui-même. De plus, ce sont les seules expérimentations rapportées qui ont utilisé un marquage ^{14}C de la carbamazépine sur les carbones de la double liaison, pour les autres études le marquage était fait sur le carbonyle. Ces travaux décrivent une réactivité globale de la CBZ après incubation avec différents cytochromes et n'ont pas exploré le détail des voies métaboliques. Il apparaît à nouveau que le CYP 3A4 est le pourvoyeur premier de réactions de liaisons covalentes (65 %) suivi pour moitié par le CYP1A1 (31 %) puis les CYP2C8 et 1A2 (2 % chacun). Ils sont donc en accord avec les travaux de Pearce et coll. (2008) obtenus avec la ^{3}H-CBZ qui présente le même profil de marquage métabolique. De façon intéressante les auteurs montrent que ces 4 cytochromes forment des produits auto-réactifs mais sans étude de cinétique enzymatique permettant de caractériser une altération fonctionnelle des enzymes.

Dans les travaux de Pearce et coll. de 2008, il n'apparaît pas de différences significatives sur la formation d'adducts en présence ou en l'absence de NADPH pour

les enzymes les moins impliqués dans la formation d'adducts respectivement pour la CBZ et la 3-OH-CBZ. Des données significatives ont été obtenues avec des manipulations utilisant du CYP3A4 purifié nécessitant impérativement l'adjonction fonctionnelle de glutathion. La formation d'adducts dans les manipulations utilisant du CYP3A4 purifié est globalement plus faible qu'avec les manipulations utilisant du CYP3A4 non purifié, cette diminution est plus marquée pour l'investigation de la voie de la 3-OH-CBZ. Un effet facilitateur du NADPH est révélé sur la formation d'adducts par le CYP3A4 purifié supplémenté en glutathion par rapport au CYP3A4 recombinant sans glutathion uniquement pour la CBZ. Ces données sont probablement la résultante d'un dépassement de la capacité de neutralisation du glutathion en raison d'une origine des adducts extérieure et excédant à la voie de la 3-OH-CBZ. Les travaux sur la 3-OH-CBZ utilisaient un marquage ^{14}C sur le carbonyle alors qu'un marquage ^{3}H radio-traçait la carbamazépine, par conséquent on peut supposer que le CYP3A4 génère une grande quantité de métabolites réactifs extérieurs à la voie du 3-OH-CBZ, incluant potentiellement les iminostilbènes et les dérivés acridiniques.

Le métabolisme médié par la peroxydation est capable de générer *in vitro* des espèces réactives issues des hydroxy-carbamazépines et des dérivés acridiniques. Plusieurs enzymes situés dans les organes/tissus atteints au cours des réactions d'hypersensibilité ont une activité peroxydasique : myéloperoxydase dans la moelle osseuse et le sang périphérique (neutrophiles, éosinophiles et solubles), prostaglandine synthase dans la peau et cellules de Kupffer dans le foie (Lu et Uetrecht, 2008). Un modèle d'investigation préclinique de la réactivité des molécules, construit avec des cellules hépatiques de rat transfectées avec des gènes codant pour le CYP3A4 (CYP3A4+) et/ou la délétion de la superoxyde dismutase (SOD-), a été appliqué à la CBZ et a montré que les cellules CYP3A4+/SOD- exposées à la carbamazépine avaient une viabilité réduite

par accroissement des espèces réactives de l'oxygène et peroxydation lipidique (Yoshikama et coll., 2009).

L'exploration de la voie métabolique des dérivés acridiniques repose sur les travaux isolés et déjà anciens d'une seule équipe (Furst-Ju-Uetrecht) spécialisée dans la recherche des voies métaboliques mettant en jeu la cascade oxydative médiée par la myéloperoxydase neutrophile. Des travaux récents (Lu et Uetrecht, 2008 ; Yoshikama et coll., 2009) réaffirment l'intérêt de l'exploration de la voie de la peroxydation notamment parce qu'elle apparaît comme une voie métabolique ubiquitaire d'intérêt. Néanmoins, il faut souligner qu'aucune donnée clinique n'est disponible sur cette voie. Enfin, nous n'avons pas retrouvé de travaux explorant l'influence d'un des composés de la voie métabolique permettant d'expliquer l'origine de l'hyperéosinophilie retrouvée fréquemment dans les manifestations d'hypersensibilité. Nous retenons cependant que l'IL-5 semble apparaître comme un marqueur précoce de l'activation lymphocytes T, à ce stade initial indifférent à l'orientation Th1/Th2. Nous commencerons donc par explorer l'influence des métabolites de la voie acridinique sur la production des cytokines.

<u>Deuxième partie :</u> Exploration de l'effet de la carbamazépine et de ses métabolites sur la sécrétion des cytokines : étude *ex vivo*, sur le sang de patients épileptiques traités, de la stimulation de la production d'IL-2, IL-5, IL-6, IL-10 et IFN-γ par la carbamazépine, le carbamazépine-10,11-époxyde, l'acridine et l'iminostilbène. Influence de la co-médication par l'acide valproïque et la lamotrigine.

1. Justification scientifique des expérimentations

L'orientation de la réponse immunitaire mise en jeu lors des manifestations d'hypersensibilité à la carbamazépine n'est pas clairement établie même si des différences de populations lymphocytaires sont mises en évidence selon le type de la manifestation clinique. Cette orientation dépend en grande partie des cytokines produites au cours de la phase d'initiation de la réponse immunitaire que l'événement initiateur s'inscrive dans la théorie de la reconnaissance directe de la molécule (p-i concept) ou de celle de la réactivité d'un métabolite. Il est important de souligner que la production d'interleukines est influencée par la maladie épileptique (Młodzikowska-Albrecht et coll., 2007) et que les antiépileptiques modifient également la production basale des cytokines, cette modification reflétant peut-être leur activité thérapeutique. Ainsi, Marmurowska-Michałowska et coll. (2004) ont montré *in vitro* la modification de la production de cytokines après stimulation par la carbamazépine de cellules mononucléées de volontaires sains. Les cytokines explorées étaient : l'IL-2, le TNF-α, l'IFN-γ, et l'IL-12 pour la voie de la cytotoxicité (voie Th1) et l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6 et l'IL-10 pour la voie de la réponse humorale (voie Th2). Nous n'avons cependant pas

trouvé d'étude explorant la production basale de cytokines *in vivo* chez les patients traités par la carbamazépine. De plus, aucune donnée n'est disponible sur l'effet propre des métabolites de la carbamazépine sur la stimulation des cytokines.

La question des cytokines les plus utiles pour la mise en évidence *in vitro* de lymphocytes T sensibilisés a été explorée par Lochmatter et coll. (2009). Sur la base de travaux étudiant les hypersensibilités retardées aux β-lactames et aux sulfamides, les auteurs ont montré que l'IL-2, l'IL-5, l'IL-13 et l'IFN-γ étaient les marqueurs les plus sensibles. Il est intéressant de rappeler que parmi ces marqueurs, l'IL-5 est également le facteur de croissance principal des éosinophiles dont l'élévation est un critère diagnostique du DRESS.

La carbamazépine est fréquemment associée à d'autres molécules anticonvulsivantes. Si parmi celles-ci les benzodiazépines ne semblent pas associées aux réactions d'hypersensibilité, l'acide valproïque et la lamotrigine sont en revanche directement ou indirectement impliquées dans des cas cliniques de réactions cutanées sévères.

Afin de préciser le rôle éventuel des métabolites et des co-médications sur l'orientation de la réponse immunologique au cours des DRESS, nous avons étudié la production basale d'IL-2, d'IL-5, d'IL-6, d'IL-10 et d'IFN-γ dans le sang de patients épileptiques traités de façon chronique. Nous avons ensuite exploré *ex vivo* l'effet de la CBZ, le CBZ-EP, l'AI et l'IM sur la production sanguine de ces cytokines. Nous avons également analysé l'influence des co-médications sur la production des cytokines.

2. Méthodologie

2.1. Patients sources

L'étude a été menée sur le sang de patients hospitalisés au CHRU de Montpellier dans le cadre d'un appel d'offre interne après accord du Comité de Protection des Personnes local.

Les critères d'inclusion étaient :

- épilepsie diagnostiquée depuis plus d'un an

- âge compris entre 18 et 90 ans

- consentement éclairé recueilli

- traitement bien toléré et efficace avec de la carbamazépine depuis au moins un an

- co-traitement par acide valproïque ou lamotrigine possible et renseigné

Les critères de non inclusion étaient :

- grossesse

- co-traitement avec des médicaments non antiépileptiques connus pour être des inducteurs ou des inhibiteurs enzymatiques

2.2. Prélèvements sanguins

15 ml de sang étaient prélevés dans des tubes héparinés juste avant la prise de carbamazépine (12-14h après la dernière dose).

2.3. Réactifs

La carbamazépine et les métabolites (CBZ-EP, AI, IM) utilisés pour la stimulation étaient des produits purs achetés chez Sigma™ (Saint Quentin Fallavier, France) et dissous dans de l'acétonitrile pour HPLC (Merck™, Nogent/Marne, France). Les solutions stocks étaient titrées à 10 mM.

2.4. Expérimentation *ex vivo*

Des aliquots de 500 µl étaient immédiatement répartis dans des tubes en verre de 5ml, puis les molécules utilisées pour la stimulation étaient rajoutées à des concentrations thérapeutiques : 33 µM et 100 µM pour la CBZ, 10 µM et 33 µM pour le CBZ-EP, ou des concentrations *a priori* supra-thérapeutiques dans le plasma : 10 µM et 33 µM pour l'AI et l'IM. Afin de ne pas générer un effet solvant ou de dilution, le volume ajouté de 5 µl correspondait à un ajout de 1 % du volume de sang. Aussitôt, les aliquots étaient mis à incuber pendant 3h sous agitation à l'air libre, le pH contrôlé toutes les heures restait physiologique (7.4 ± 0.1).

2.5. Méthodes analytiques

La concentration des cytokines a été déterminée directement dans le sang par le kit FastImmune Cytokine System® (Becton Dickinson™, USA, New Jersey) avant et après l'incubation. La limite de quantification de la méthode était de 0.01 pg/ml.

Comme pour le suivi thérapeutique des patients au sein de notre service, la concentration de CBZ dans le plasma des patients était déterminée avec le kit carbamazépine PETINIA® sur automate Xpand® (Siemens™, USA, New York).

2.6. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée par l'équipe du Département d'Information Médicale du CHRU de Montpellier.

Un éventuel effet solvant de l'acétonitrile a été recherché en comparant les concentrations mesurées après incubation de l'addition de soit 5 µl d'acétonitrile soit 5 µl de sérum physiologique dans le sang. Le test statistique utilisé était un test de Wilcoxon non-paramétrique sur séries appariées. La durée d'incubation a été portée à 6h pour cette manipulation sur les solvants.

Pour éviter tout effet solvant, les concentrations nettes de cytokines ont été utilisées, c'est-à-dire les concentrations mesurées déduites de la concentration mesurée dans l'acétonitrile. Un test de Wilcoxon non-paramétrique sur séries appariées a été utilisé pour mettre en évidence un effet des molécules testées sur la production des cytokines en fin d'incubation.

Un test de Mann et Whitney a été utilisé pour mettre en évidence un effet traitement sur la production de cytokines.

Le seuil de significativité retenu pour tous les tests était $p < 0.05$.

3. Résultats

3.1. Description des patients sources

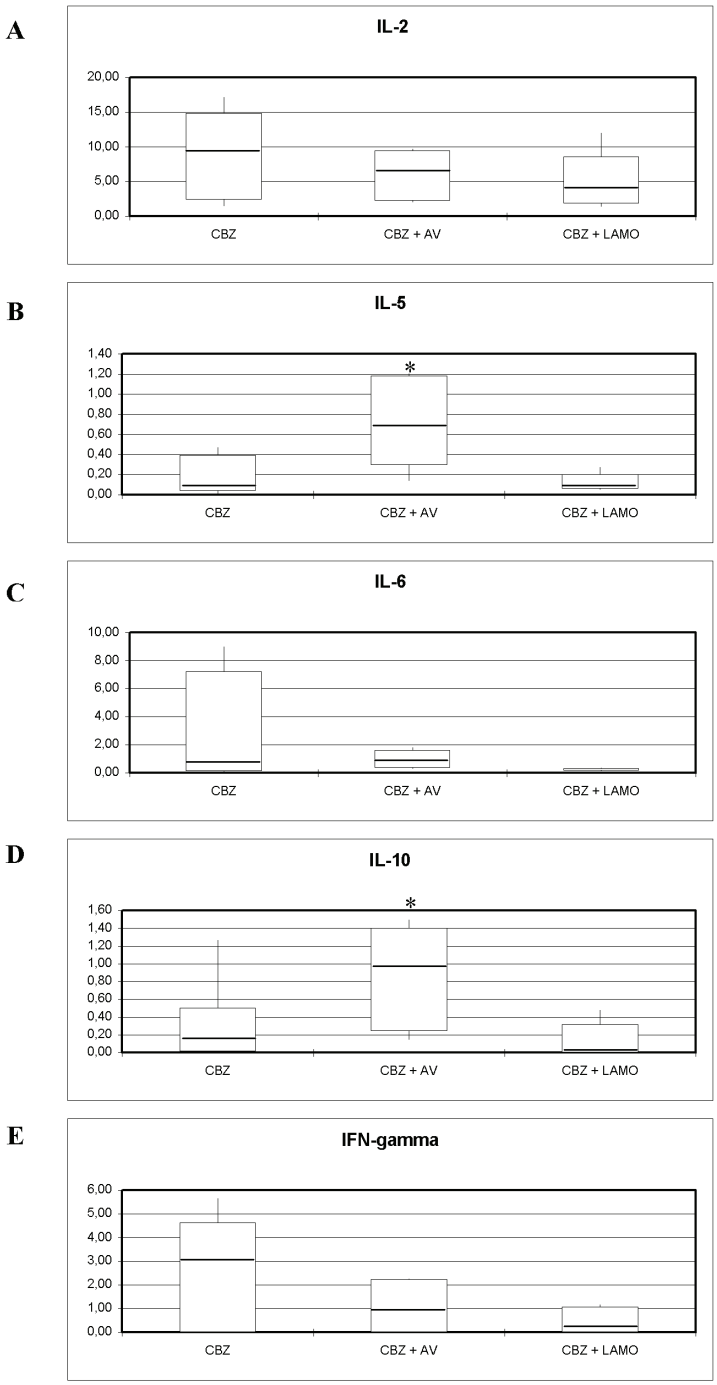
24 patients ont été recrutés, majoritairement des hommes (8 femmes pour 16 hommes). L'âge médian des hommes était de 43 ans (âges extrêmes de 30 et 55 ans) et celui des femmes de 36 ans (âges extrêmes de 21 et 66 ans). 18 patients étaient traités en monothérapie par la carbamazépine, 6 en bithérapie CBZ/AV et 6 autres par bithérapie CBZ/LAMO. Les concentrations plasmatiques en CBZ variaient entre 1.8 et 17.1 mg/l (médiane de 8.5 mg/l) soit une population constituée de 2 patients en sous-dosage, 19 patients équilibrés et 5 patients en léger surdosage (normales, 4 - 12 mg/l).

3.2. Profil basal des taux de cytokines

Le profil basal des taux de cytokines selon le régime thérapeutique est présenté sur la **Figure 15**. Peu de données sont disponibles sur la production basale de cytokines chez l'homme, aussi avons nous choisi la valeur déjà publiée de 0.1 pg/ml comme seuil de positivité pour mettre en évidence une augmentation de la production de cytokines (Aihara et coll., 2005). Ainsi, la production basale de cytokines semble augmentée chez tous les patients mais de façon moindre chez ceux bénéficiant de la co-thérapie avec la lamotrigine. L'IL-2 est la cytokine majoritaire chez tous les patients, à un taux toujours

au-dessus du seuil de positivité quel que soit le traitement (**Figure 15.A**). De plus, le taux minimal d'IL-2 observé est toujours au-dessus des taux maximaux des autres cytokines pour les patients en bithérapie (**Figure 15.A-E**). A l'inverse, la distribution des taux d'IL-6 et d'IFN-γ empiètent sur les taux d'IL-2 chez les patients en monothérapie (**Figure 15.A, C et E**) mais l'étude de détail des données issues d'un même individu indiquent que l'IL-2 reste la cytokine la plus abondante. Les taux d'IL-5 et d'IL-10 sont bas quel que soit le traitement (médianes entre 0.03 et 0.97 pg/ml). Les patients co-traités avec l'acide valproïque présentent une élévation très significative ($p=0.003$) des taux basaux d'IL-5 (**Figure 15.B**) et également d'IL-10 mais de façon moins significative ($p=0.02$) (**Figure 15.D**). Les patients traités en monothérapie semblent présenter un taux basal d'IL-6 et d'IFN-γ plus dispersé que les patients en bithérapie (**Figure 15.C et E**).

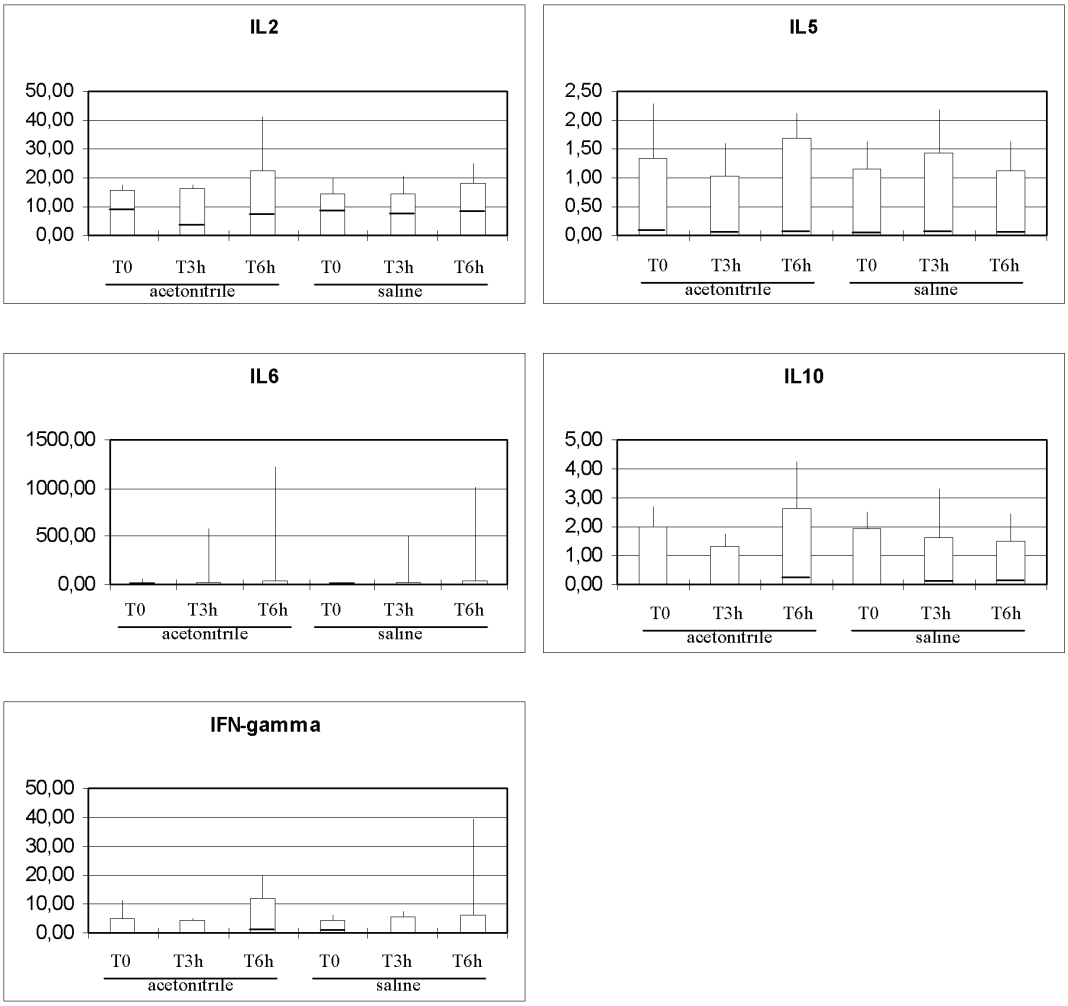
Figure 15 - Taux basaux (pg/ml) d'IL-2, d'IL-5, d'IL-6, d'IL-10 et d'IFN-γ chez des patients épileptiques traités de façon chronique par carbamazépine seule (CBZ) ou en association avec l'acide valproïque (CBZ + AV) ou avec la lamotrigine (CBZ + LAMO). Les box-plots représentent l'interquantile 10-90% et indiquent les valeurs minimales, médianes et maximales. * : $p<0.05$.



3.3. Production des cytokines après stimulation *ex vivo*

Aucun effet acétonitrile n'a été mis en évidence par rapport à l'effet sérum physiologique (**Figure 16**). Les distributions des concentrations d'IL-2, d'IL-5, d'IL-10 et d'IFN-γ partagent le même motif : plus de 10 % des taux sont en dessous de la limite de détection de la méthode et les distributions des valeurs sont serrées quelle que soit les conditions pour une même cytokine. La plupart des concentrations sont inférieures à 2.0, 3.0, 20 et 30 pg/ml pour l'IL-5, l'IL-10, l'IFN-γ et l'IL-2 respectivement. A l'inverse, les distributions de l'IL-6 sont très contrastées : taux bas en début d'incubation et très élevés en fin d'incubation. Néanmoins les valeurs extrêmes ne concernent que moins de 10 % des observations pour chaque condition expérimentale et ce type de réponse est observé avec l'acétonitrile comme pour le sérum physiologique.

Figure 16 - Effet solvant sur la production de cytokines évalué au début de l'incubation (T0), après 3h (T3h) et après 6h (T6h) pour l'acétonitrile et la solution saline (sérum physiologique). Les box-plots représentent l'interquantile 10-90 % et indiquent les valeurs minimales, médianes et maximales. Les concentrations sont exprimées en pg/ml.



Le **Tableau 10** résume le résultat de l'analyse statistique réalisée. Une forte variation des taux d'IL-6 est observée dans toutes les conditions sauf lorsque la stimulation a été réalisée avec une faible concentration d'IM. Les concentrations médianes varient entre 0.94 pg/ml (AI 10 µM) et 4.29 pg/ml (IM 33 µM) ce qui correspond à une augmentation

relative de 16 à 91 % comparée à l'effet solvant seul. De façon intéressante, la stimulation avec le niveau bas de CBZ-EP conduit à une augmentation du taux d'IL-6 mais le niveau élevé conduit à une diminution du taux d'IL-6 (-91 %) comparé à la production dans l'acétonitrile. Une production d'IL-5 n'est observée qu'au cours de la stimulation avec le haut niveau d'AI. La valeur médiane des concentrations nettes était de 1.06 pg/ml ce qui correspond à une augmentation de 33 % par rapport au solvant. Aucune variation significative dans la production d'IL-2, d'IL-10 et d'IFN-γ n'a été observée.

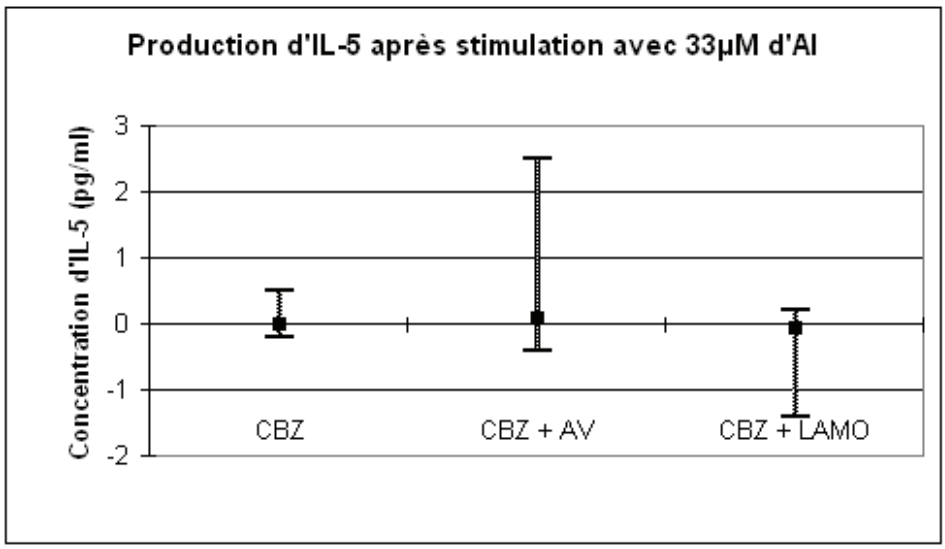
Tableau 10 - Résultats de l'analyse statistique des expérimentations *ex vivo*. Pour chaque molécule testée, le test non-paramétrique de Wilcoxon pour échantillons appariés a été appliqué pour rechercher une différence significative dans la production des cytokines par rapport au solvant seul après 3 heures d'incubation. Les résultats significatifs sont indiqués par des astérisques, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. Le sens de la variation est indiqué : (↑) pour une augmentation ou (↓) pour une diminution. n.s. : non significatif.

Molécule testée	**CBZ**		**CBZ-EP**		**AI**		**IM**	
Niveau de stimulation	**33µM**	**100µM**	**10µM**	**33µM**	**10µM**	**33µM**	**10µM**	**33µM**
IL-6	*** ↑	*** ↑	** ↑	*** ↓	** ↑	** ↑	n.s	*** ↑
IL-5	n.s.					* ↑	n.s.	
IL-2, IL-10, IFN-γ	n.s.							

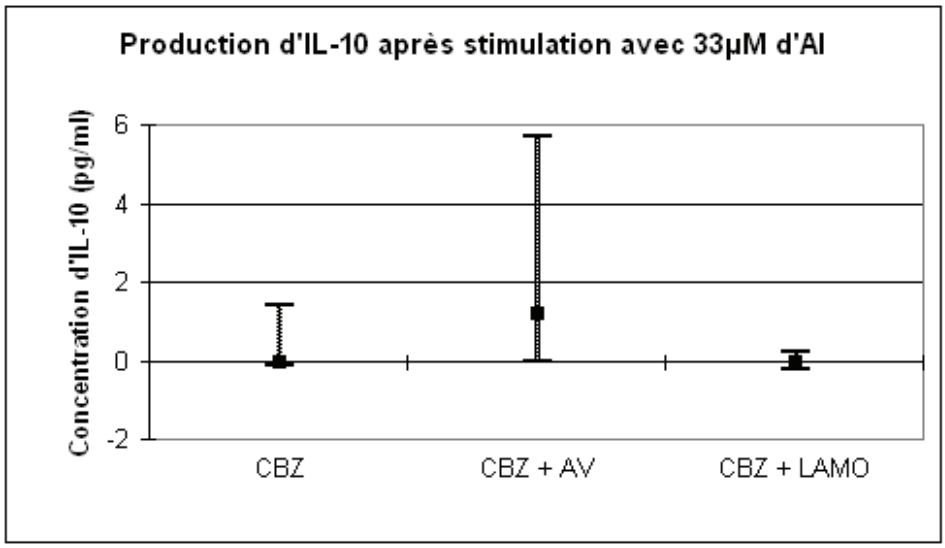
Une analyse de sous-groupe des variations de la production d'IL-5 et d'IL-10 avant et après stimulation avec l'AI à 33µM ne montre pas une différence significative entre le sang des patients co-traités avec l'acide valproïque par rapport aux autres, malgré une apparente tendance à être plus importante (**Figure 17**).

Figure 17 - Production nette (déduite du taux basal) d'IL-5 et d'IL-10 à la fin de l'incubation de 3h en conditions *ex vivo* de sang de patients épileptiques stimulés avec de l'acridine à une concentration finale de 33 µM. Les valeurs médianes (■), minimales et maximales sont indiquées.

A



B



4. Discussion

4.1. Absence de groupe contrôle

Dans cette étude, nous avons comparé chaque patient avec lui-même dans le contexte restreint de patients épileptiques traités de façon chronique par CBZ. Nous n'avons pas inclus de groupe contrôle dans les expérimentations en raison de difficultés scientifiques pour en définir un. Le groupe contrôle idéal aurait été constitué par une expérimentation semblable menée à partir du sang de patients récemment diagnostiqués pour leur épilepsie et relevant d'un traitement par CBZ non encore mis en place. Le recrutement de tels patients s'annonçait long et mis en perspective avec la nécessité de réaliser extemporanément les expériences *ex vivo* aurait conduit à isoler les tests de stimulation et aurait ainsi introduit une variabilité expérimentale délétère pour des groupes contrôles. Une autre stratégie aurait été de comparer les résultats obtenus chez des volontaires sains traités pendant un mois, pas moins car le temps de traitement influence la réponse des celles immunitaires (Marmurowska-Michałowska et coll., 2004). Un tel groupe contrôle est éthiquement impossible à constituer. Le recrutement de volontaires sains présentait un biais majeur en raison de l'influence de l'épilepsie sur la sécrétion de cytokines (Młodzikowska-Albrecht et coll., 2007).

4.2. Augmentation de la production d'IL-2

L'augmentation de la sécrétion basale d'IL-2 a déjà été rapportée (Marmurowska-Michałowska et coll., 2004) (**Figure 15.A**). Verrotti et coll. (2001) ont mis en évidence une augmentation du taux d'IL-2 dans les cellules mononucléées de volontaires sains traités par CBZ par rapport au taux basal avant la prise de médicament, mais

l'augmentation n'apparaît pas chez les patients traités par AV seulement. Les mêmes observations ont été rapportées chez les patients épileptiques traités (Pacifici et coll., 1995). Nos résultats directement obtenus à partir du sang de patients traités permettent de confirmer que le co-traitement par l'AV ne modifie pas l'effet de la CBZ sur la production d'IL-2 et indiquent que le co-traitement par la LAMO ne semble pas davantage avoir d'influence sur cette production.

4.3. Modulation de la production d'IL-6

L'augmentation de la sécrétion d'IL-6 au cours du traitement par CBZ (**Figure 15.C**) a également été décrit (Młodzikowska-Albrecht et coll., 2007). Shiah et coll. (2005) ont observé chez 10 volontaires sains que le traitement par AV induisait une augmentation dans les taux plasmatiques d'IL-6 après 7 jours de traitement par AV. Les auteurs ont constaté que la production d'IL-6 était significativement plus importante chez les patients co-traités par AV et CBZ que chez les patients non traités mais similaire entre les deux traitements. Ichiyama et coll. (2000) ont démontré que l'AV inhibe la production d'IL-6 dans des conditions *in vitro* au cours d'une étude explorant l'inhibition de la voie NF-κB sur des cellules humaines issues de leucémie monocytaire. Nous n'avons pas retrouvé de données rapportant l'effet de la lamotrigine sur la production des cytokines. Comme nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives dans la production d'IL-6 dans nos 3 groupes de patients, nous en concluons que l'AV et la lamotrigine ne modifient pas l'effet propre de la CBZ, sans préjuger de l'effet intrinsèque de chacune des molécules en l'absence de CBZ. Les résultats obtenus après incubation avec la CBZ et ses métabolites ont montré une grande capacité de ces molécules à modifier les taux d'IL-6 en comparaison avec les effets du

solvant (**Tableau 10**). De façon surprenante, la stimulation avec le niveau élevé (mais dans la zone thérapeutique) de CBZ-EP a réduit la production d'IL-6 par rapport à l'effet de l'acétonitrile, alors que dans presque toutes les autres stimulations le taux d'IL-6 a augmenté. Une partie de l'effet thérapeutique du CBZ-EP, métabolite principal et actif de la CBZ, pourrait reposer sur une activité anti-inflammatoire liée à l'inhibition de la production d'IL-6. La stimulation de la production d'IL-6 par l'IM nécessite une probablement trop haute concentration pour contribuer à l'effet global d'augmentation de l'IL-6, sous réserve d'une accumulation intracellulaire toujours possible. On pourrait incriminer une réponse non spécifique due aux conditions expérimentales dans l'augmentation de la production d'IL-6 mais dans ce cas cela renforcerait l'observation de l'effet inhibiteur du CBZ-EP sur la production d'IL-6. L'augmentation de la production d'IL-6 chez les patients traités par la CBZ semble donc être due à la fois à un effet propre de la CBZ mais également à un effet d'une partie de ses métabolites, même si le CBZ-EP pourrait avoir un effet inverse. Comme le taux de CBZ-EP dépend de l'activité du CYP450 3A4, une modulation de la production d'IL-6 pourrait exister chez les patients polymédiqués ou chez les patients ayant une forte activité du CYP3A4. Par ailleurs, Gidal et coll. (1996) ont suggéré que l'IL-6 elle-même pourrait modifier l'activité des isoenzymes, ouvrant la voie sur des inter-régulations plus complexes encore.

4.4. Modulation de la production d'IL-10 et d'IFN-γ

Marmurowska-Michałowska et coll. (2004) ont incubé des fractions de cellules mononuclées (PBMC) de 16 volontaires sains pendant 72h avec une solution de CBZ dans du DMSO (concentration finale de 1 μM). Deux séries d'expérimentations

contrôlées ont été réalisées, d'un côté des expérimentations avec des PBMC non stimulées et d'un autre côté des expérimentations avec des PBMC stimulées avec un mélange d'hémagglutinine et de LPS. Les concentrations d'IL-2, d'IL-10 et d'IFN-γ ont été déterminées. Dans nos expériences nous avons préféré utiliser l'acétonitrile au DMSO car nous avons observé au cours de travaux préliminaires un effet du DMSO sur la production d'IL-10 après une incubation de 3h. Nous n'avons pas mis en évidence d'effet de la CBZ et de ses métabolites sur la production d'IL-2, d'IL-10 et d'IFN-γ dans nos expérimentations avec du sang non stimulé. Marmurowska-Michałowska et coll. (2004) ont obtenu les mêmes résultats sauf pour l'IL-10 pour laquelle une augmentation de la production d'IL-10 avait été observée dans les PBMC stimulées comme non stimulées. Aucune modification significative du taux d'IL-10 n'a été observée dans nos manipulations, incluant le sous-groupe des patients co-traités par CBZ et AV mais la valeur de p était de 0.08 et l'absence de significativité pourrait être due à une puissance statistique insuffisance de notre étude. Cependant, comme notre effectif est comparable, nous expliquons la différence observée sur la production d'IL-10 par un effet facilitateur du DMSO dans les travaux de Marmurowska-Michałowska. Nous n'avons trouvé qu'une donnée bibliographique indirecte sur l'influence de l'AV sur la production d'IL-10 dans un sous-groupe de patients dans une étude de Boufidou et coll. (2004) étudiant la production de cytokines chez des patients traités par lithium pour des troubles bipolaires. Les données *in vitro* montraient que le lithium augmente le nombre de cellules secrétant l'IL-10 après stimulation par hémagglutinine et que les résultats obtenus à partir de patients co-traités par lithium et CBZ ou lithium et AV ne différaient pas des résultats obtenus à partir de patients traités par lithium seul. En l'absence de stimulation il n'y avait pas d'effet sur la production d'IL-10 par rapport au groupe

contrôle. D'autres études sont nécessaires pour confirmer un effet spécifique d'une bithérapie CBZ-AV sur la production d'IL-10.

4.5. Modulation de la production d'IL-5 et influence de l'acide valproïque

L'exploration de la modulation de la production d'IL-5 par la CBZ n'a semble-t-il jamais été rapportée. Dans notre étude, les taux basaux d'IL-5 étaient significativement plus élevés dans le sang des patients traités par bithérapie CBZ-AV par rapport aux patients traités en monothérapie par CBZ. Makis et coll. (2005) ont mesuré un double impact de l'AV sur la production d'IL-5 : l'AV augmente le taux d'IL-5 et conduit de façon dose-dépendante (mais pas de façon égale chez tous les patients) à une meilleure réponse thérapeutique et/ou une hyperéosinophilie. Plusieurs observations cliniques de réactions croisées entre CBZ et AV conduisant à un syndrome d'hypersensibilité ont été publiées (Conilleau et coll., 1999 ; Cogrel et coll., 2001 ; Arévalo-Lorido et coll., 2003 ; Yun et coll., 2006). Yun et coll. (2006) ont décrit le cas d'une patiente épileptique coréenne initialement traitée avec de l'AV sans effets indésirables. Elle est ensuite traitée en monothérapie par CBZ et développe alors une éruption cutanée. Elle développe enfin un DRESS après réintroduction d'AV seul. L'hyperéosinophilie était intense à chaque réaction et des auto-anticorps ont été mis en évidence, suggérant une implication de l'IL-5 et l'activation de la voie Th2. Cependant la réaction croisée n'est pas la règle. Aouam et coll. (2008) ont décrit le cas d'un traitement par AV bien toléré avant et après un DRESS à la CBZ (associé à une infection primaire par HHV6). L'apparition d'un DRESS a également été observée dans un contexte clinique complexe associant l'AV, l'éthosuximide et une réactivation de l'HHV6 (Conilleau et coll., 1999).

Malheureusement aucune détermination des métabolites de la CBZ n'avait été réalisée au cours de ces cas cliniques. Nous avons montré que la CBZ peut initier la production d'IL-5 par son métabolite, l'AI (**Tableau 10**). La concentration d'AI nécessaire à la stimulation ne peut être retrouvée dans le sang mais on ne peut écarter une accumulation cellulaire de l'AI provoquant de fortes concentrations locales. De plus, l'AI n'est pas retrouvée chez tous les patients (Breton et coll., 2005) mais les réactions d'hypersensibilité sont rares. L'augmentation de la production d'IL-5 semble donc obéir à un effet seuil. De façon intéressante, l'activation des cellules T dépend également d'un seuil qui est plus bas si les cellules ont déjà été sensibilisées. Chez les patients réactifs, une telle sensibilisation pourrait être due à une infection virale antérieure et une réaction croisée de l'antigène viral avec la CBZ dans le cadre du p-i concept sans recourir à la formation d'haptène. A ce propos, le taux basal d'IL-2 élevé dû à l'activité immunologique anticonvulsivante de la CBZ pourrait maintenir un niveau d'alerte permanent (**Figure 15.A**). L'AI pourrait devenir un métabolite déclencheur de la production d'IL-5 dans des circonstances propices diminuant le seuil de sécrétion des cellules T (Th2) (affaiblissement de l'immunité après réactivation virale asymptomatique, déficience dans les cellules T régulatrices ou augmentation de la production de cytokines due aux médicaments antiépileptiques ou à une banale agression). Un abaissement du seuil pourrait également être dû à l'AV puisque l'association CBZ-AV augmente le taux basal d'IL-5 et d'IL-10 (**Figure 15**) et ainsi faciliter la stimulation par l'AI (**Figure 17**). Comme Bernus et coll. (1997) ont montré que l'AV diminue le catabolisme du CBZ-EP sans augmenter le taux de CBZ, nous proposons que l'AV est capable de détourner le métabolisme principal de la CBZ vers les voies minoritaires, incluant la formation d'AI, et donc faciliter la production d'IL-5. D'après nos résultats, l'augmentation des concentrations du CBZ-EP due au co-

traitement par AV pourrait également limiter la production d'IL-6 et contrecarrer le processus d'inflammation et les effets indésirables. Ce subtil équilibre pourrait expliquer les différentes formes cliniques de réaction croisées décrites plus haut. La lamotrigine a été identifié comme une cause importante de réactions d'hypersensibilité aux anticonvulsivants mais l'AV est souvent associé (Mansur et coll., 2008). L'AV a également été suspecté d'augmenter le risque de réactions cutanées allergiques à la lamotrigine (Li et coll., 1996 ; Kocak et coll., 2007). L'effet inhibiteur de l'AV sur le métabolisme de la LAMO est probablement impliqué (Morris et coll., 2000), laissant penser que la LAMO elle-même est le facteur déclenchant plutôt que ses métabolites.

5. Conclusion

Un déséquilibre dans la production des cytokines est sans doute un des facteurs déclenchant des réactions d'hypersensibilité aux anticonvulsivants de façon cumulative : par leur propre impact sur la production des cytokines, par la perturbation de la sécrétion basale due à l'épilepsie, par les évènements occasionnels comme les infections / réactivations virales. La complexité du mécanisme peut être accrue par le rôle des métabolites des médicaments sur la production des cytokines, incluant le polymorphisme touchant les capacités métaboliques et les potentielles boucles de feed-back des cytokines sur le métabolisme. Nos résultats sont en faveur de fortes interactions potentielles entre la CBZ, le co-traitement par AV, la production d'IL-5 et le DRESS. Ainsi, l'association thérapeutique CBZ-AV pourrait augmenter le risque de DRESS comme l'illustrent différents cas cliniques. Néanmoins, plus de données issues de patients atteints de DRESS à l'état aigu sont nécessaires pour conclure. Enfin, la CBZ et ses métabolites semblent favoriser la réponse humorale puisque l'IL-5 et l'IL-10

favorisent la polarisation vers la voie Th2 et l'IL-6 stimule la différenciation des plasmocytes. Comme proposé par Pearce et coll. (2008), l'activation immunologique Th2 pourrait conduire à la production d'auto-anticorps comme ceux mis en évidence par Yun et coll. (2006).

Les résultats de l'étude pilote de ces travaux ont fait l'objet d'un poster à l'occasion du congrès P2T qui a eu lieu à Marseille du 15 au 17 avril 2009. L'abstract a été publié (**Fundam Clin Pharmacol 2009, 23 [suppl 1], abstract n°338**).

L'intégralité de ces travaux a fait l'objet d'une publication qui paraîtra dans le numéro 1 (January – February) de "**Pharmacological Reports**", 2011, vol. 63 (**annexe 2**) :

EFFECTS OF CARBAMAZEPINE AND METABOLITES ON IL-2, IL-5, IL-6, IL-10 AND IFN-γ SECRETION IN EPILEPTIC PATIENTS, INFLUENCE OF COMEDICATION.

Olivier MATHIEU[1], Marie-Christine PICOT[2], Philippe GELISSE[3], Hélène BRETON[1], Pascal DEMOLY[4], Dominique HILLAIRE-BUYS[1]

[1]Département de Pharmacologie Médicale et Toxicologie, [2]Département d'Information Médicale, [3]Département de Neurologie, [4]Département de Pneumologie du CHRU de Montpellier.

Nous avons donc montré que la voie des métabolites acridiniques est d'intérêt. Dans le cadre du concept de formation *in situ* et pour confirmer l'hypothèse argumentée *in vitro* par l'équipe d'Uetrecht, il convient de déterminer *ex vivo* si la formation de ces métabolites est possible dans le sang des patients.

<u>Troisième partie :</u> Présence et formation *ex vivo* d'acridone dans le sang de patients chroniquement traités par carbamazépine : exploration de la voie métabolique du 9-acridinecarboxaldéhyde.

1. Justification scientifique des expérimentations

Furst et Uetrecht (1993) ont observé la formation *in vitro* du 9-acridinecarboxaldéhyde (9-AI-ald), de l'acridine (AI), de l'acridone (AO) et de dérivés chlorés à partir de la carbamazépine (CBZ) dans des conditions très oxydatives et non physiologiques requérant du peroxyde d'hydrogène, des ions chlorures et de la myéloperoxydase. Toutes ces molécules sont issues de la contraction du noyau à 7 atomes de la carbamazépine (CBZ) en un noyau à 6 atomes (molécules à noyau contracté issues d'un réarrangement pinacolique, **annexe 1**). Furst et coll. (1995) ont montré que le 9-AI-ald et l'iminostilbène (IM) peuvent se lier de façon covalente aux neutrophiles. De plus Furst et Uetrecht (1995) ont mis en évidence une altération de la prolifération des lymphocytes après incubation avec le 9-AI-ald. Ces travaux indiquent que la CBZ est métabolisée en réactifs intermédiaires par les leucocytes activés et suggèrent que ces métabolites peuvent être responsables de certains effets indésirables dus à la CBZ comme l'agranulocytose ou le lupus qui touchent les globules blancs. Cependant, cette hypothèse liée à la formation extra-hépatique d'AI et d'AO dans des conditions oxydatives physiologiques n'a jamais été explorée et confirmée *in vivo*. Récemment, des études environnementales ont décrit la formation d'AO à partir de la CBZ et de ses dérivés (Chiron et coll., 2006 ; Leclercq et coll., 2009) mais une telle transformation chez l'homme n'a pas été documentée.

Nous avons donc d'abord exploré les métabolites de la CBZ dans le sang de patients traités de façon chronique par la CBZ pour confirmer la présence de métabolites à noyau contracté. Ensuite nous avons réalisé des incubations *ex vivo* dans le sang de patients traités par la CBZ pour déterminer si des métabolites acridiniques pouvaient être physiologiquement produits dans du sang chroniquement exposé à la CBZ sans contribution du métabolisme hépatique.

2. Méthodologie

2.1. Patients sources

95 patients hospitalisés au CHRU de Montpellier ont été recrutés après accord du Comité de Protection des Personnes local.

Les critères d'inclusion étaient :

- épilepsie diagnostiquée depuis plus d'un an,

- âge compris entre 18 et 65 ans,

- consentement éclairé recueilli,

- traitement bien toléré et efficace avec de la carbamazépine depuis au moins un an.

Les critères de non inclusion étaient :

- grossesse,

- co-traitement ou traitement antérieur avec l'oxcarbazépine (OxCz),

- co-traitement avec des médicaments non-antiépileptiques connus pour être des inducteurs ou des inhibiteurs enzymatiques.

2.2. Prélèvements sanguins

2 ml de sang étaient prélevés dans des tubes héparinés juste avant la prise de carbamazépine (12-14h après la dernière dose). Le plasma était ensuite aussitôt recueilli après centrifugation (1500 tr/min pendant 10 min à 4°C) puis congelé à -20°C jusqu'à l'analyse. Un volume supplémentaire de 15 ml de sang était prélevé pour les expériences *ex vivo* qui étaient réalisées aussitôt.

2.3. Réactifs

La CBZ et ses métabolites (AI, AO, IM) utilisés pour l'incubation et la calibration de la méthode analytique étaient des produits purs achetés chez Sigma™ (Saint Quentin Fallavier, France), de même que l'acide formique et son sel d'ammonium utilisés pour la préparation de la phase mobile. L'OxCz, la 10-OH-CBZ, le CBZ-EP, la DiOH-CBZ et l'étalon interne (10,11-dihydro-carbamazépine) utilisés pour la calibration de la méthode analytique ont été achetés chez LGC Standards (Molsheim, France). Les 2-OH-CBZ et 3-OH-CBZ ont été achetées chez Toronto Research Chemicals (North York, Ontario). L'acétone et l'acétonitrile utilisés étaient de qualité HPLC (Merck™, Nogent/Marne, France).

2.4. Expérimentation *ex vivo*

Une première fraction (1 ml) de chaque échantillon de sang total a été utilisée pour déterminer le taux plasmatique basal de CBZ et de ses métabolites chez chaque patient. Le reste a été divisé en 24 aliquots de 500µl pour tester l'influence de la CBZ (2 niveaux testés : 33 µM et 100 µM), le CBZ-EP, l'AI et l'IM (2 niveaux testés à chaque fois : 10 µM et 33 µM) sur la formation des métabolites de la CBZ. Les aliquots étaient mis à incuber sous agitation dans des tubes en verre non clos de 5 ml à 37°C comme précédemment décrit pour l'étude de l'influence des métabolites sur la sécrétion des cytokines (2ème partie). Trois temps d'incubation ont été testés : 30 minutes (T0.5h), 3 heures (T3h) et 6 heures (T6h). A chaque temps, l'échantillon correspondant était centrifugé immédiatement puis le plasma recueilli et congelé à -20°C jusqu'à l'analyse. Afin d'évaluer la dégradation spontanée des composés testés, une solution aqueuse de chaque molécule a été mise à incuber 6h dans de l'eau (échantillons de contrôle négatif).

2.5. Méthodes analytiques

La concentration de la CBZ et de ses métabolites a été mesurée dans le plasma des patients traités par CBZ et dans les échantillons ayant subi les incubations *ex vivo* avec une méthode de chromatographie liquide couplée à un détecteur de masse validée et publiée par notre équipe (Breton et coll., 2005 ; **annexe 3**). L'OxCz était également recherchée pour vérifier son absence et exclure un traitement non déclaré avec ce médicament. Le 9ac a été détecté grâce à son spectre de masse, sans étalon de référence disponible à ce moment là. Les limites de détection et de quantification de la méthode sont indiquées dans le **Tableau 11**.

Tableau 11 - Limites de détection et de quantification de la méthode de chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse pour le dosage de la CBZ et de l'OxCz et de leurs métabolites

Molécule	Limite de quantification (µM)	Limite de détection (µM)
CBZ	2.12	0.017
OxCz	1.59	0.198
CBZ-EP	0.400	0.028
10-OH-CBZ	1.19	0.079
DiOH-CBZ	1.48	0.111
2-OH-CBZ	0.091	0.012
3-OH-CBZ	0.091	0.012
AI	0.128	0.056
AO	0.118	0.012
IM	0.124	0.012

2.6. Analyse statistique

Un test de Student pour échantillon apparié a été utilisé pour analyser les variations de concentration entre les temps T0.5h et T6h des incubations *ex vivo*. Le coefficient de corrélation de Pearson a été calculé pour évaluer la significativité des relations entre le niveau testé du médicament et la concentration d'un métabolite. Le seuil de significativité retenu pour tous les tests était $p < 0.05$.

3. Résultats

3.1. Description des patients

42 femmes et 53 hommes traités par CBZ ont été inclus pour l'exploration sanguine de la CBZ et de ses métabolites. L'âge des patients variait de 18 à 64 ans (moyenne de 42 ± 13.4 ans) et le poids de 42 à 140 kg (moyenne de 70 ± 16.5 kg). La posologie était différente selon les patients, soit de 1.11 à 24.6 mg/kg/j (moyenne de 10.9 ± 4.5 mg/kg/j). Des co-traitements étaient retrouvés chez 34 patients (36 %) et étaient représentés comme suit :

Molécule	Nombre de patients
Acide valproïque	23
Lamotrigine	6
Phénobarbital	4
Clonazépam	3
Lithium	2
Amisulpride	1
Citalopram	1
Diazépam	1
Hydroxyzine	1
Lévétiracétam	1
Lévomépromazine	1
Phénytoïne	1
Rispéridone	1

45 patients ont été inclus dans le groupe des expérimentations *ex vivo*. Les paramètres descriptifs pour ce groupe ne différaient pas de façon significative avec les données de l'échantillon global inclus.

3.2. Exploration des taux circulant de CBZ et de se métabolites chez les patients traités de façon chronique

Les concentrations mesurées de CBZ et de ses métabolites sont récapitulées dans le (**Tableau 12**).

Tableau 12 - Concentrations de la CBZ et de ses métabolites dans le plasma de patients traités par CBZ ; la moyenne des concentrations supérieures à la limite de quantification est indiquée ± l'écart-type (omis si N≤3), l'intervalle entre les valeurs minimales et maximales est précisé.

Molécules	Concentration plasmatique (µM)	N (n) ; %
CBZ	29.8 ± 13.7 [5.30-82.2]	95 (0) ; 100 %
OxCz	< LLOD	0 (0) ; 0.0 %
CBZ-EP	4.13 ± 4.64 [0.40-29.0]	89 (6) ; 100 %
10-OH-CBZ	1.28 [1.27-1.29]	2 (43) ; 47 %
DiOH-CBZ	8.85 ± 6.11 [1.48-24.1]	92 (3) ; 100 %
2-OH-CBZ	0.183 [0.095-0.310]	3 (32) ; 37 %
3-OH-CBZ	0.667 ± 0.944 [0.091-3.04]	21 (44) ; 68 %
AI	0.257 ± 0.151 [0.128-0.670]	16 (70) ; 91 %
AO	< LLOQ	0 (8) ; 8 %
IM	0.295	1 (18) ; 20 %
9ac	Non calculée	100 %

N = nombre de patients pour lesquels la concentration du métabolite est au-dessus de la LLOQ de la méthode analytique. **n** = nombre de patients pour lesquels la concentration du métabolite est comprise entre la LLOD et la LLOQ. **%** = nombre de patients pour lesquels la concentration du métabolite est au-dessus de la LLOD de la méthode analytique. < LLOQ : composé détecté en dessous de la limite de quantification. < LLOD : composé non détecté.

Les taux de CBZ étaient dans l'intervalle thérapeutique (16.9 - 50.8 μM) chez 73 patients (76.8 %), en-dessous chez 14 (14.7 %) et au-dessus chez 8 (8.4 %). Malgré une variabilité inter-individuelle considérable dans les concentrations de CBZ et de ses métabolites, la CBZ, le CBZ-EP, la DiOH-CBZ étaient présentes chez tous les patients. Les 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ et 10-OH-CBZ ont été détectées respectivement chez 68, 37 et 47 % des patients. L'AI a été détectée dans 91 % des échantillons analysés alors que l'AO et l'IM étaient présents chez moins de 20 % des patients. Comme attendu, l'OxCz n'a été détectée chez aucun patient.

3.3. Expérimentations *ex vivo*

La **Figure 18** représente les capacités du métabolisme sanguin pour produire de l'IM (**Figure 18.A**), de l'AI (**Figure 18.B**) et de l'AO (**Figure 18.C**) à partir de la CBZ, du CBZ-EP, de l'IM et de l'AI. L'occurrence d'un métabolite est définie par le nombre d'échantillons analysés dans lesquels le métabolite se trouvait à une concentration supérieure au seuil de détection de la méthode. L'incubation avec la CBZ ne modifie pas la production d'IM, d'AI ou d'AO quel que soit le taux ajouté et/ou le temps d'incubation (**Figure 18.A, B et C**). De la même façon, l'occurrence de l'IM (**Figure 18.A**) n'est pas modifiée quelles que soient les conditions expérimentales. En revanche, la production d'AI a été stimulée mais seulement avec le niveau élevé d'IM (33 μM) (**Figure 18.B**), alors que la production d'AO a été induite par incubation avec des taux croissants de CBZ-EP, AI et particulièrement d'IM (**Figure 18.C**). La production d'AO dépend du niveau de la stimulation (plus forte avec le niveau le plus fort) mais apparaît comme limitée dans le temps. En effet, les concentrations d'AO atteignent leur niveau maximum 30 minutes après le début de l'incubation pour une condition expérimentale

donnée et ne change pas entre T0.5h et T6h (**Figure 19**). Nous avons donc utilisé la valeur moyenne des concentrations observées pour les 3 temps d'incubation dans la suite de l'exploitation des résultats.

Figure 18 – Occurrences de la formation d'IM (A), d'AI (B) et d'AO (C) dans le sang de patients traités par carbamazépine incubés *ex* vivo avec différents précurseurs métaboliques potentiels.

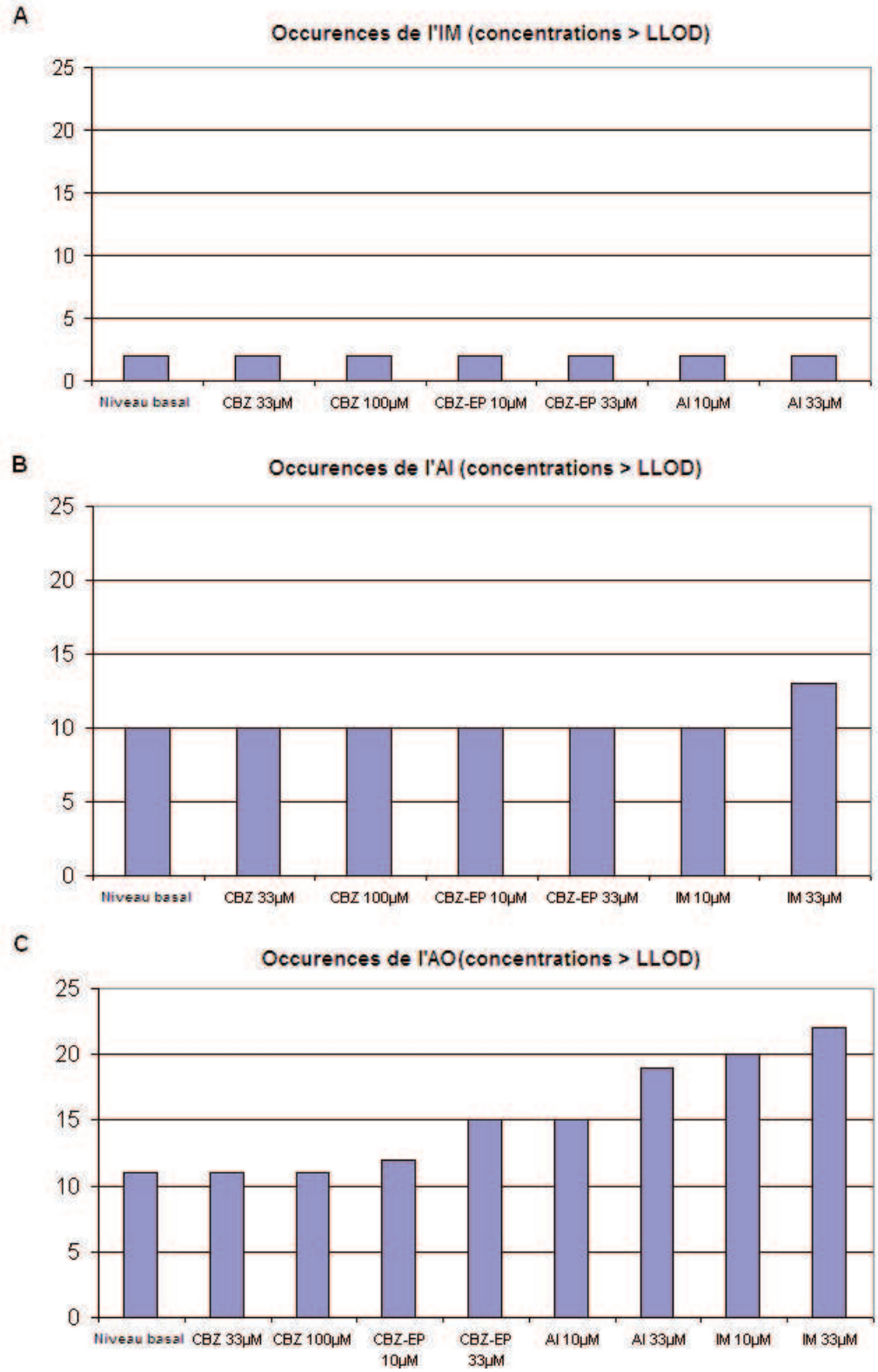
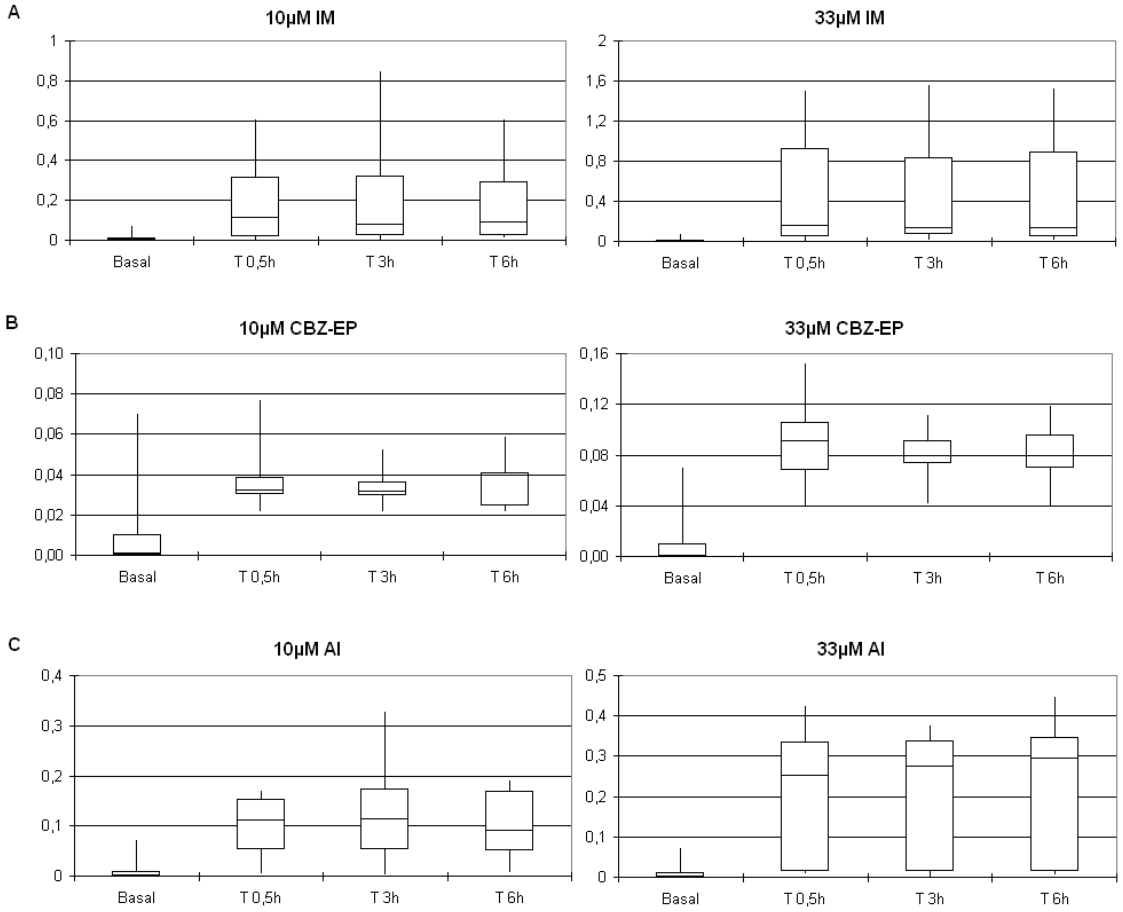


Figure 19 - Formation d'AO (µM) après incubation *ex* vivo dans le sang de patients traités par CBZ après différents temps d'incubation. 2 niveaux de stimulation ont été testés avec les précurseurs métaboliques : IM (A), CBZ-EP (B) and AI (C). Les box plots représentent les deuxièmes et troisièmes quartiles, les valeurs minimales, médianes et maximales. Dans toutes les conditions, le niveau maximal d'AO a été atteint en 30 minutes (pas de différences significatives entre les temps T0.5h et T6h, $p > 0.1$).

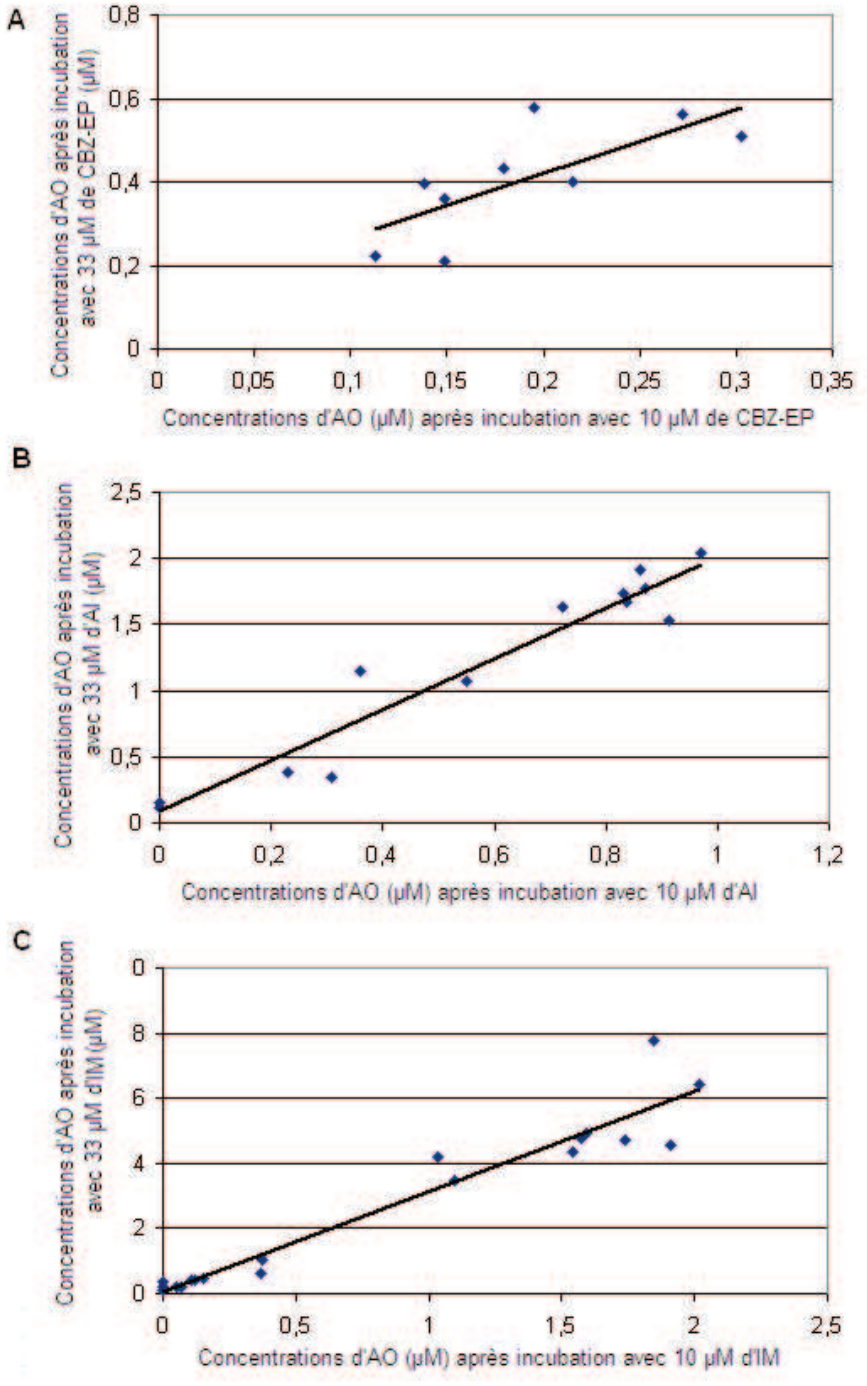


Le coefficient de Pearson a été appliqué pour confirmer que le taux d'AO formée était corrélé avec le niveau (bas/haut) testé de CBZ-EP (**Figure 20.A**), d'AI (**Figure 20.B**), et d'IM (**Figure 20.C**). La concentration d'AO est positivement corrélée avec le taux de CBZ-EP ($r^2 = 0.736$, $p = 0.024$), d'AI ($r^2 = 0.969$, $p = 1.3\ 10^{-8}$) et d'IM ($r^2 = 0.966$, $p = 5.6\ 10^{-12}$) utilisé pour la stimulation. De plus, la production d'AO paraît plus quantitative avec l'AI et l'IM. En effet, les concentrations médianes d'AO sont de 0.14 et 0.27 µM avec le CBZ-EP, 0.55 et 1.06 µM avec l'AI, 0.65 et 0.82 µM avec l'IM (résultats obtenus avec les niveaux bas et haut de stimulation respectivement). Ce résultat est confirmé par le ratio de la concentration en AO sur la concentration du métabolite testé (**Tableau 13**). Le ratio décroît avec l'augmentation du niveau du métabolite suggérant une saturation du mécanisme de transformation.

Tableau 13 - Formation d'AO (µM) après incubation avec différentes concentrations de précurseurs métaboliques testées. Ratio médian = concentration médiane d'AO formée / concentration du précurseur testé.

	Médiane	Minimum	Maximum	Ratio médian
10µM CBZ-EP	0.14	0.021	0.33	1.4 %
33µM CBZ-EP	0.27	0.097	0.58	0.8 %
10µM AI	0.55	0.026	0.97	5.5 %
33µM AI	1.06	0.067	2.04	3.2 %
10µM IM	0.65	0.051	2.02	6.5 %
33µM IM	0.82	0.072	7.77	2.5 %

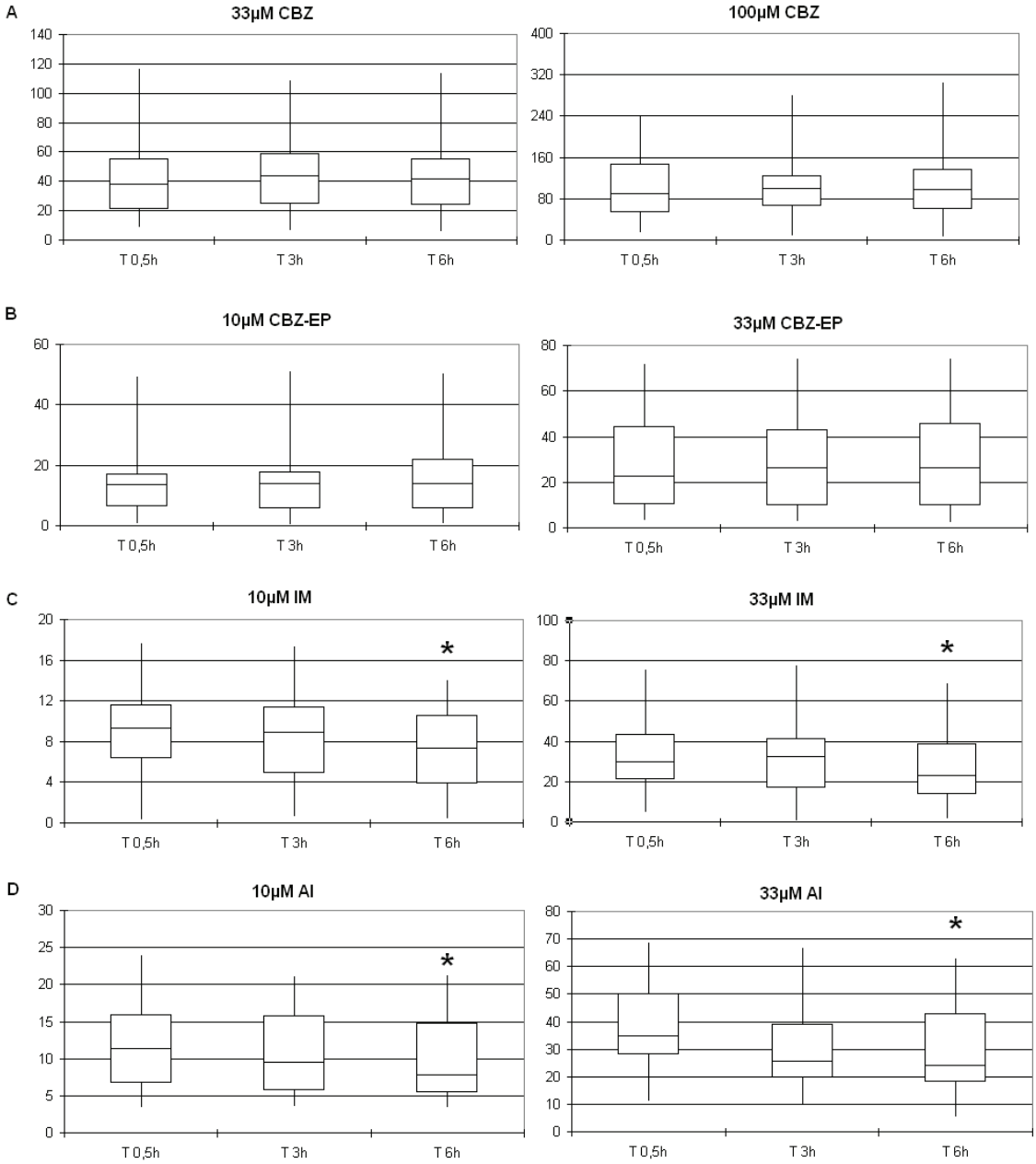
Figure 20 – Une corrélation positive significative est observée entre les concentrations d'AO obtenues après incubation dans le sang de patients traités par CBZ avec les 2 niveaux (bas et haut) du précurseur métabolique testé. Seules les concentrations supérieures à la LLOQ ont été prises en compte pour le niveau haut (p du coefficient de Pearson < 0.05 dans tous les cas).



Des différences dans les capacités métaboliques des échantillons de sang des patients sont également mises en évidence. Ainsi, la concentration d'AO produite au cours des incubations *ex vivo* est toujours supérieure dans le sang des patients ayant un taux circulant détectable d'AO (données non représentées).

Afin d'exclure tout biais lié à une variation spontanée des concentrations des molécules testées, nous avons mesuré leurs concentrations à la fin de l'incubation. Les concentrations de CBZ et de CBZ-EP ont été stables entre T0.5h et T6h mais les concentrations d'AI et d'IM décroissaient, sans que cette baisse ne soit corrélée à la formation d'AO (**Figure 21**). Nous attribuons cette différence de comportement aux capacités de diffusion ou d'adsorption cellulaires supérieures pour l'AI et l'IM. Aucune dégradation spontanée de CBZ, CBZ-EP, AI ou IM n'a été mise en évidence dans les échantillons de contrôle négatif, pas plus qu'une formation d'AO.

Figure 21 - Variation des concentrations de CBZ (A), CBZ-EP (B), IM (C) et AI (D) (µM) pour les 3 temps d'incubation testés (2 niveaux de concentrations testés). Les box plots représentent les deux quartiles intermédiaires, les valeurs minimales, médianes et maximales. * : Différence statistiquement significative entre T6h et T0.5h ($p<0.05$).



4. Discussion

4.1. Exploration des taux circulants des métabolites de la carbamazépine chez les patients traités chroniquement

Malgré une hétérogénéité dans les âges, le sexe et les poids, le CBZ-EP, la DiOH-CBZ et le 9ac sont les métabolites principaux de la CBZ retrouvés chez nos patients de façon similaire aux données de la littérature (Eichelbaum et coll., 1985 ; Kerr et coll., 1994 ; Wad et coll., 1997). La présence de la 10-OH-CBZ, le métabolite actif de l'OxCz, que nous avons retrouvée chez près de la moitié de nos patients a été peu décrite. Dans des études *in vitro*, Myllynen et coll. (1998) ont observé une métabolisation de la CBZ en 10-OH-CBZ dans les microsomes hépatiques de souris et humains. Beyer et Spiteller (1992) ont rapporté la présence du glucuronide de 10-OH-CBZ dans le dialysat d'un patient urémique traité par CBZ pour épilepsie. Mandrioli et coll. (2001) a retrouvé la 10-OH-CBZ chez 8 patients traités par CBZ. Les concentrations publiées sont du même ordre de grandeur que les nôtres.

Nos résultats montrent que la 3-OH-CBZ est plus souvent détectée que la 2-OH-CBZ chez les patients traités avec la CBZ. Pearce et coll. (2002) ont obtenu les mêmes résultats dans des études *in vitro* avec des microsomes hépatiques humains. Pienimaki et coll. (1995) ont exploré ces métabolites chez des patients traités par CBZ et ont détecté la 3-OH-CBZ chez 4 patients sur 23 mais à un niveau supérieur à la LLOQ chez un seul des 4 patients. La 2-OH-CBZ n'a été retrouvée que chez un seul des 23 patients.

Les niveaux d'AI et d'AO sont du même ordre de grandeur que ceux de la 2- et la 3-OH-CBZ, et leurs fréquences de détection chez les patients sont comparables à celles de

la seule autre étude publiée chez le patient (Breton et coll., 2005). Ainsi, l'AI et l'AO doivent être considérées comme des métabolites mineurs normaux de la CBZ.

4.2. Expérimentations *ex vivo*

Dans nos manipulations, seul l'équipement enzymatique sanguin des patients traités par CBZ, en particulier celui des cellules nucléées, était disponible pour la transformation chimique de la CBZ et de ses métabolites. Nos résultats ont été obtenus uniquement à partir de l'exploration analytique de la fraction plasmatique et par conséquent les quantités réellement produites sont probablement sous-estimées. Aucun dérivé hydroxylé n'a été retrouvé au cours de nos stimulations confirmant leur origine exclusivement hépatique.

En ce qui concerne les molécules à noyau contracté, nous avons démontré une production d'AO dose-dépendante à partir de CBZ-EP, IM et AI (**Figure 20**) mais pas de CBZ (**Figure 18.C**). La production d'AO était stable après 30 minutes d'incubation ce qui peut être expliqué soit par un état d'équilibre entre la formation et la transformation d'AO ou l'arrêt de la production d'AO. Nous préférons la seconde hypothèse parce que la production d'AO est positivement corrélée avec la concentration d'AI alors que le ratio (AO/AI) décroît suggérant une saturation des capacités métaboliques (**Tableau 13**). La formation d'AO à partir d'AI a été décrite dans le foie de rat (McMurtrey et Knight, 1984), au cours du processus de détoxification de l'acridinecarboxamide (Robertson et Bland, 1993), ainsi que dans la moule et d'autres invertébrés aquatiques (Kraak et coll., 1997 et de Voogt et coll., 1999). La formation d'AO dans les leucocytes humains a été explorée par Furst et coll. (1993), cependant dans leurs travaux, l'incubation avec l'AI n'a pas été réalisée et la production d'AI n'a

été testée qu'au cours de l'incubation avec la CBZ et l'IM après supplémentation avec la myéloperoxydase en l'absence de cellules, ou avec des neutrophiles activés au PMA. Une telle activation déclenche le burst respiratoire et aboutit à la dégranulation et à la libération de peroxyde d'hydrogène et de myéloperoxydase (Siddiqui et coll., 1995). Les auteurs ont montré que la production d'AI atteignait un pic après 80 minutes d'incubation incluant le temps de conversion de la CBZ en AI. Le taux d'AI était d'environ 2.5 µM après incubation avec 100 µM de CBZ et de myéloperoxydase, soit un ratio de 2.5 %, et d'environ 0.7 µM après incubation avec 10 µM d'IM avec des neutrophiles activés au PMA (ratio = 7 %). Les cinétiques d'AO étaient différées et les concentrations correspondantes en AO étaient d'environ 0.25 µM et 0.08 µM avec un ratio (AO/AI) d'environ 10 %. Puisque une partie de la CBZ était consommée pour la production d'AI, on peut imaginer que le ratio aurait été plus grand si l'AI avait directement été utilisée. De plus, dans les expériences sans cellule, la concentration d'AO augmentait avec le taux d'acide hypochloreux (HClO) utilisé. Dans notre étude, les concentrations d'AO étaient stables après 30 minutes d'incubation, ce qui est proche du temps rapporté par Furst et coll. malgré le fait que nos conditions soient beaucoup moins oxydatives. Néanmoins, dans nos conditions expérimentales les rendements de formation d'AO (ratio respectivement de 5.5 % et de 3.2 % avec 10 µM et 33 µM d'AI) sont plus bas en relation avec une activité myéloperoxydasique physiologique plus basse dans les leucocytes non activés par le PMA. Nous en concluons que la réaction chimique conduisant à la formation d'AO à partir d'AI est très intense et rapide mais limitée par la consommation d'un facteur en relation avec la production d'HClO et l'épuisement en oxygène.

La formation d'AI n'était détectable qu'après incubation avec un niveau élevé d'IM (**Figure 18.B**). La transformation d'IM en AI n'est pas beaucoup rapportée et la plupart

des auteurs mentionnent seulement la conversion de l'IM en 2-hydroxy-iminostilbène (2-OH-IM) (Ju et Uetrecht, 1998 ; Pearce et coll., 2008). Il a été également montré que l'époxydation de l'IM par le réactif de Fenton [Fe(II)/H_2O_2] conduit à un dérivé instable évoluant en 9-AI-ald puis en AO (Zbaida et Kariv, 1988). Furst et Uetrecht (1993) ont proposé que le 9-AI-ald soit l'intermédiaire entre l'IM et l'AI, et plus tard, ont démontré que le 9-AI-ald se lie de façon covalente aux neutrophiles sans requérir une activation préalable (Furst et coll., 1995). Le 9-AI-ald pourrait donc être considéré comme un autre facteur limitant de la formation d'AO. Nous proposons que la N-chloration de l'IM ait lieu en premier, conduisant très rapidement à la formation du 9-AI-ald et consommant de l'HClO. Une grande partie du 9-AI-ald formé se lie aux cellules et limite ainsi la formation d'AI. L'incubation avec de grandes quantités d'IM augmente la production de 9-AI-ald au-dessus des capacités de liaison des cellules conduisant à une production observable d'AI. L'oxydation de l'AI en AO est limitée par le pool d'agents oxydants. Lorsque les cellules activées par le PMA sont mises à incuber avec l'IM, Furst et Uetrecht (1993) ont noté un délai (10 minutes) avant la détection d'AI alors que ce délai n'apparaît pas au cours des manipulations d'oxydation purement chimique.

L'incubation avec le CBZ-EP conduit à un très faible ratio (AO/CBZ-EP) avec un niveau non détectable d'AI, suggérant que le facteur limitant de la conversion est précoce dans la chaîne. Vogna et coll. (2004) ont obtenu de l'AI à partir de la CBZ-EP après exposition à un système UV/H_2O_2 et ont considéré le 9-AI-ald comme un possible intermédiaire. Nous concluons que les cellules sanguines périphériques sont capables de former de l'AO à partir du CBZ-EP en utilisant leur pool oxydatif mais que le rendement de la réaction est faible. L'exposition aux UV pourrait favoriser cette réaction et majorer la production de 9-AI-ald et d'AI.

Nous n'avons pas observé de formation d'IM, d'AI ou d'AO à partir de la CBZ, même à haute concentration. Furst et Uetrecht (1993) ont démontré que le 9-AI-ald est un métabolite intermédiaire de la CBZ et de l'IM au cours de la production d'AI et d'AO. La métabolisation de la CBZ en IM est décrite uniquement dans le foie. Nos données incitent à penser que la CBZ n'est pas facilement transformée en IM dans le sang, en accord avec les expérimentations de Furst et Uetrecht (1993) au cours desquelles la formation d'AI à partir de CBZ n'a été observée qu'après activation des neutrophiles. Notre étude présente donc un lien métabolique oxydatif sanguin direct entre le métabolite majeur de la CBZ, le CBZ-EP et son métabolite peu étudié, l'AO.

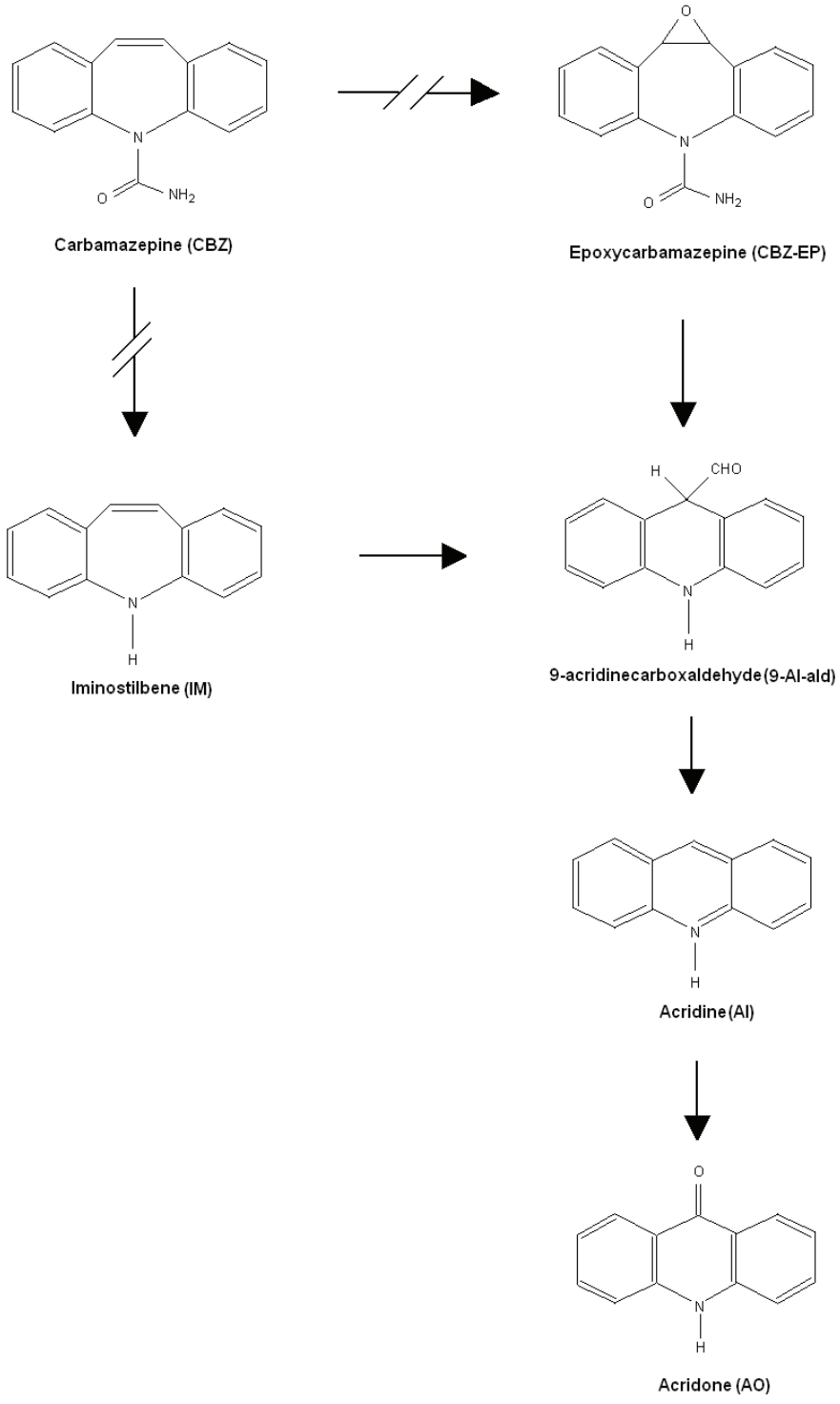
5. Conclusion

La production *in situ* d'AI et d'AO a été observée à partir du métabolite mineur de la CBZ, l'IM, et à un degré moindre à partir de la CBZ-EP, l'un des métabolites principaux (**Figure 22**). Le métabolite réactif 9-AI-ald qui est formé par les leucocytes pourrait être impliqué dans les effets indésirables associés aux leucocytes. Une défaillance dans la métabolisation du 9-AI-ald très toxique et très réactif due à une altération des capacités détoxifiantes pourrait conduire à des modifications cellulaires comme proposé par Friedmann et coll. (1994). Nos données appuient la notion que l'AO pourrait être le métabolite final, mineur mais physiologique, de la CBZ. Compte tenu la haute toxicité et réactivité de l'AI et du 9-AI-ald, l'AO pourrait être considéré comme un marqueur de l'efficacité de leur voie de détoxification (Robertson et Bland, 1993 ; Kraak et coll., 1997).

Ainsi, bien que le métabolisme hépatique joue un rôle majeur dans le métabolisme de la CBZ, la voie extra-hépatique du 9-AI-ald avec la production de composés acridiniques

toxiques doit être considérée comme un acteur important dans le développement d'anomalies hématologiques et immunitaires observées chez les patients traités par CBZ.

Figure 22 - Métabolisme de la CBZ proposé dans le sang périphérique de patients traités de façon chronique par la carbamazépine. La formation sanguine i*n situ* des métabolites est indiquée par des flèches continues. Les flèches interrompues indiquent les voies métaboliques qui n'ont pas lieu de façon physiologique car requérant l'équipement enzymatique hépatique.



Les résultats de l'étude pilote de ces travaux ont fait l'objet d'un poster à l'occasion du congrès P2T qui a eu lieu à Toulouse en 2007. L'abstract a été publié (**Fundam Clin Pharmacol 2007, 21 [suppl 1], abstract n°167**).

L'intégralité de ces travaux a fait l'objet d'une publication qui paraîtra dans un prochain numéro de "**Xenobiotica**" en 2011 (**annexe 4**) :

PRESENCE AND EX VIVO FORMATION OF ACRIDONE IN BLOOD OF PATIENTS ROUTINELY TREATED WITH CARBAMAZEPINE: EXPLORATION OF THE 9-ACRIDINECARBOXALDEHYDE PATHWAY.

Olivier Mathieu[1], Olivier Dereure[2], Dominique Hillaire-Buys[1]

[1] Département de pharmacologie médicale et toxicologie, [2] Départment de dermatologie du CHRU de Montpellier.

<u>Quatrième partie :</u> Comparaison des concentrations plasmatiques de carbamazépine et de ses métabolites chez des patients hypersensibles à la carbamazépine, chez des patients traités sans effets indésirables avec la carbamazépine seule ou co-traités avec de l'acide valproïque.

1. Justification scientifique des expérimentations

L'acridine (AI) et l'acridone (AO) sont donc des métabolites mineurs mais habituels chez les patients traités par la carbamazépine (CBZ). Les expérimentations *in vitro* ont montré que la voie métabolique de ces dérivés acridiniques était associée à la formation de métabolites réactifs mais nous n'avons trouvé aucune donnée sur les concentrations plasmatiques de ces métabolites chez des patients atteints d'un syndrome d'hypersensibilité.

Plusieurs observations cliniques de réactions croisées entre la CBZ et l'acide valproïque (AV) conduisant à des réactions d'hypersensibilité ont été publiées questionnant l'influence de l'AV sur le métabolisme de la CBZ dans le cadre de l'hypothèse de métabolites réactifs à l'origine des manifestations (Conilleau et coll., 1999 ; Cogrel et coll., 2001 ; Arévalo-Lorido et coll., 2003 ; Yun et coll., 2006 ; Gau et coll., 2008). L"AV est connu pour augmenter le taux de CBZ-EP au cours des co-thérapies avec la CBZ (Potter et Donnelly, 1998 ; Patsalos et coll., 2002). Bernus et coll. (1997) ont étudié en détail l'influence de l'AV sur le métabolisme de la CBZ et ont conclu à un effet inhibiteur touchant à la fois l'hydrolyse du CBZ-EP en DiOH-CBZ et la glucuroconjugaison de la DiOH-CBZ. Dans leurs études, les auteurs se sont concentrés sur les clairances de formation et d'excrétion urinaire de la CBZ, du CBZ-EP, de la

DiOH-CBZ, du 9ac, de la 2-OH-CBZ, de la 3-OH-CBZ et de leurs conjugués mais leur étude statistique des concentrations plasmatiques se limitait à la CBZ, au CBZ-EP et à la DiOH-CBZ. De plus, la 10-OH-CBZ, l'IM, l'AI et l'AO n'ont pas été étudiés.

Dans notre étude, nous avons recherché les différences dans les concentrations des métabolites entre des patients tolérant bien leur traitement par CBZ pris comme référence et des patients atteints de réactions d'hypersensibilité de type DRESS syndrome.

Nous avons analysé l'effet du co-traitement par AV sur le métabolisme de la CBZ afin de rechercher des similarités entre les profils métaboliques des patients co-traités CBZ-AV et des patients atteints de DRESS et de documenter les relations entre cette co-médication et le DRESS syndrome.

2. Méthodologie

2.1. Patients et profil de l'étude

Groupes de référence :

Nous avons recruté 2 groupes de patients dans le cadre de notre activité de routine de suivi thérapeutique pharmacologique :

- patients traités efficacement par CBZ uniquement sans effet secondaire (groupe CBZ),

- patients traités efficacement par l'association CBZ-AV sans effet secondaire (groupe CBZ-AV).

Nous avons choisi d'inclure plus de patients dans le groupe CBZ (ratio 3:1) afin d'augmenter la variabilité dans ce groupe pour permettre une meilleure comparaison avec les patients atteints de DRESS. Tous les patients étaient traités depuis au moins un mois (équilibre pharmacocinétique).

Les critères d'inclusion étaient :

- diagnostic d'épilepsie établi depuis un an au moins,

- âge entre 18 et 90 ans

- traitement bien toléré depuis plus d'un mois.

Les critères de non inclusion étaient :

- patients mineurs,

- grossesse,

- traitement passé ou présent par OxCz,

- co-traitements par des médicaments connus comme inhibiteur ou inducteur enzymatique ou connus pour être associés au DRESS (phénytoïne, phénobarbital, lamotrigine),

- effet secondaire en cours ou de moins d'un mois potentiellement associé à un médicament,

- atteintes dermatologiques en cours,

- altération de la fonction hépatique (ALAT, ASAT, γ-GT) ou rénale (créatininémie).

Groupe DRESS :

Les patients du groupe DRESS ont été inclus lorsque des dosages étaient possibles. Les critères d'inclusion cumulatifs étaient :

- suspicion de réaction d'hypersensibilité à la CBZ,

- présence de lésions cutanées,

- hyperéosinophilie,

- atteint hépatique et/ou rénale.

Un cas d'urticaire survenu au cours du traitement par l'association CBZ-AV inclus initialement pour DRESS a été conservé pour comparaison.

2.2. Echantillons sanguins

Un échantillon sanguin de 2 ml a été collecté dans des tubes héparinés avant la dose du matin (résiduelle) dans le cadre du suivi thérapeutique pharmacologique du patient pour les groupes CBZ et CBZ-AV. Après centrifugation, le plasma récupéré a été conservé à -20°C jusqu'à l'analyse. Pour le groupe pathologique, le sang a été collecté aussi souvent que possible après le diagnostic potentiel de DRESS à la CBZ. Pour ces patients et un patient épileptique sans effet secondaire pris comme contrôle, le culot globulaire a été conservé après centrifugation en supplément du plasma.

2.3. Réactifs

Les réactifs utilisés étaient les mêmes que ceux de l'étude décrite dans la troisième partie. En l'absence de matériau de référence, la concentration du 9ac a été déterminée comme le rapport de la surface du pic correspondant au 9ac sur la surface de l'étalon interne multipliée par le facteur de réponse de la DiOH-CBZ.

2.4. Méthode analytique

Nous avons utilisé la même méthode analytique que celle décrite dans la troisième partie.

2.5. Analyse statistique

Les analyses de régression, les tests de Student et du X^2 ont été réalisés avec le logiciel R (R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche).

3. Résultats

3.1. Description des patients

112 patients ont été recrutés dans les groupes de référence, 86 dans le groupe CBZ et 26 dans le groupe CBZ-AV. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les 2 groupes en rapport avec le sexe, l'âge, le poids ou la posologie (**Tableau 14**).

Tableau 14 - Description et comparaison des caractéristiques des groupes CBZ et CBZ-AV de référence.

	Groupe CBZ (moyenne ± écart-type) n=86	**Groupe CBZ -AV (moyenne ± écart-type) n=26**	**p**
Sexe	39 femmes ; 47 hommes	11 femmes ; 14 homme	0.91
Age (ans)	46.9 ± 17.6	45.3 ± 14.1	0.65
Poids (kg)	69.1 ± 14.5	71.7 ± 20.5	0.56
Posologie de CBZ (mg/kg/j)	10.3 ± 4.4	10.7 ± 4.8	0.68
Taux d'AV (mg/l)	-	51.6 ± 20.7	-

La concentration plasmatique d'AV était de 51.6 ± 20.7 mg/l chez les patients co-traités et aucune trace d'AV n'a été retrouvée dans le groupe CBZ. On retrouvait dans les traitements associés : amisulpride, amitriptyline, clonazépam, citalopram, clobazam, diazépam, lévétiracétam, lévomépromazine, lithium et rispéridone.

Le groupe DRESS était constitué de 2 patients typiques. Le premier (D1) était une femme de 26 ans atteinte d'un exanthème maculopapuleux généralisé, fébrile (40.7°C), avec hyperéosinophilie (1 917/mm^3 à l'acmé), élévation des enzymes hépatiques (10-20 fois la normale) et un syndrome inflammatoire (CRP à 44 mg/l). Les signes sont apparus 3 semaines après le début du traitement par monothérapie de CBZ pour épilepsie. Le second patient (D2) était une femme de 48 ans traitée depuis 6 semaines en monothérapie par la CBZ comme stabilisant de l'humeur. Elle a ensuite présenté un rash avec fatigue, hépatite cytolytique (élévation des enzymes jusqu'à 30 fois la normale), forte hyperéosinophilie (2 800/mm^3 à l'acmée) et un syndrome inflammatoire (CRP à 28 mg/l). L'évolution clinique a été favorable pour les 2 patientes.

Nous avons également exploré le profil métabolique d'un homme (U1) atteint d'urticaire 1 semaine après l'initiation d'un traitement par CBZ pour épilepsie. Ce patient recevait également de l'AV et le dernier dosage indiquait une valproatémie à 74.1 mg/l. A part les lésions cutanées, le patient ne présentait aucune atteinte organique ou anomalie hématologique.

Dans ce cas pathologique, nous n'avons obtenu de prélèvements sanguins qu'au moment de l'hospitalisation après arrêt de la CBZ. 4 échantillons ont pu être exploités pour le patient D1 (concentrations de CBZ entre 0.14 et 5.84 mg/l), 5 pour le patient D2 (concentrations de CBZ entre 0.07 et 0.54 mg/l) et 3 pour le patient U1 (concentrations de CBZ entre 0.97 et 1.53 mg/l). Nous avons déterminé le profil métabolique dans les globules rouges de D2 et U1. La prednisolone et l'hydroxyzine ont été administrés à D1, D2 et U1 en traitements symptomatiques.

3.2. Résultats analytiques

La CBZ, le CBZ-EP et la DiOH-CBZ ont été détectées chez tous les patients traités en routine mais une grande variabilité interindividuelle a été observée chez les 2 groupes de patients (**Tableau 15**). L'analyse de régression dans le groupe CBZ a montré une bonne corrélation entre la CBZ, le CBZ-EP, la DiOH-CBZ et le 9ac, et la dose (**Tableau 16**).

Tableau 15 - Moyenne ± écart-type (mg/l) des concentrations de CBZ, CBZ-EP, DiOH-CBZ dans nos groupes de référence CBZ (n=86) et CBZ-AV (n=26). Les valeurs entre parenthèses sont celles données par Potter and Donnelly (1998) avec n= 17 dans leur groupe CBZ et n=6 dans leur groupe CBZ-AV.

	CBZ	CBZ-EP	DiOH-CBZ	Ratio (CBZ/CBZ-EP)
Groupe CBZ	7.01 ± 3.15 (5.8 ± 0.58)	0.94 ± 0.96 (1.2 ± 0.13)	2.33 ± 1.54 (-)	8.70 ± 7.44 (5.3 ± 0.47)
Groupe CBZ-AV	6.44 ± 3.14 (5.4 ± 1.20)	1.33 ± 1.45 (1.4 ± 0.35)	2.77 ± 1.69 (-)	17.7 ± 26.3 (4.2 ± 0.81)

Tableau 16 - Régressions (y= a + bx) entre les concentrations plasmatiques ou les ratios de concentations plasmatiques, et la dose de CBZ ou les concentrations du précurseur métabolique dans le groupe CBZ (n=86). Les valeurs entre parenthèses sont celles données par Bernus et coll. (1996) (n=17).

	a	b	x	r^2	p
CBZ	4.35 (3.88)	0.0038 (0.0047)	Dose (mg/j)	0.398 (0.385)	< 0.001 (0.0079)
CBZ-EP	0.226 (0.805)	0.0010 (0.0008)	Dose (mg/j)	0.349 (0.385)	0.001 (0.0079)
DiOHCBZ	1.113 (0.494)	0.0017 (0.0033)	Dose (mg/j)	0.375 (0.635)	< 0.001 (0.0001)
CBZ-EP	-0.226 (0.0587)	0.167 (0.106)	CBZ	0.545 (0.389)	< 0.001 (0.0075)
CBZ-EP/CBZ ratio	0.0787 (0.199)	0.00007 (-0.0002)	Dose (mg/j)	0.229 (0.0460)	< 0.05 (0.92)
DiOHCBZ	1.35 (-0.717)	1.036 (2.54)	CBZ-EP	0.647 (0.612)	< 0.001 (< 0.001)
DiOHCBZ/CBZ-EP ratio	2.67 (0.930)	0.281 (0.109)	Dose (mg/kg/j)	0.099 (0.548)	0.37 (0.007)

Nous avons comparé les pentes obtenues par régression dans le groupe CBZ et le groupe CBZ-AV et n'avons pas mis en évidence un effet de l'AV sur la concentration plasmatique de CBZ, CBZ-EP ou DiOH-CBZ (**Tableau 17**). Nous avons en revanche observé une diminution significative des taux de 9ac pour une même dose dans le groupe CBZ-AV. En effet, la concentration plasmatique de 9ac diminue avec la dose de même que les ratios (9ac/CBZ-EP) et (9ac/DiOH-CBZ). De plus, le ratio (9ac/CBZ) présente une tendance à décroître ($p = 0.08$). L'AV réduit la pente de la régression entre les concentrations plasmatiques de 9ac et de CBZ-EP mais cet effet n'apparaît pas sur la régression entre les concentrations plasmatiques de 9ac et de CBZ ou de DiOH-CBZ (**Tableau 18**).

Tableau 17 - Equations des régressions linéaires (y = a + bx) entre les concentrations plasmatiques (mg/l) et le ratio dose/poids (x) pour le groupe CBZ (n=86) et le groupe CBZ-AV (n=26). Les valeurs entre parenthèses sont celles données par Bernus et coll. (1996) (groupe CBZ, n=17; groupe CBZ-AV, n=10).

	Groupe CBZ	Groupe CBZ-AV	Différence	p
[CBZ] plasmatique				
a	4.04 (4.67)	3.93 (3.12)		
b	0.288 (0.42)	0.234 (0.410)	0.054 (-0.168)	n.s. (n.s.)
Moyenne ± é.-t.	7.01 ± 3.15 (6.89 ± 2.22)	6.44 ± 3.14 (7.18 ± 2.06)		
[CBZ-EP] plasmatique				
a	0.167 (0.918)	0.190 (-0.256)		
b	0.0747 (0.043)	0.106 (0.199)	-0.031 (-0.155)	n.s. (< 0.05)
Moyenne ± é.-t.	0.94 ± 0.96 (1.32 ± 0.38)	1.33 ± 1.45 (1.72 ± 0.74)		
[DiOH-CBZ] plasmatique				
a	0.906 (0.536)	1.48 (-0.667)		
b	0.139 (0.228)	0.120 (0.364)	0.019 (-0.136)	n.s. (n.s.)
Moyenne ± é.-t.	2.33 ± 1.54 (2.64 ± 1.23)	2.77 ± 1.69 (2.93 ± 1.41)		
[9ac] plasmatique				
a	0.0035	0.497		
b	0.0498	0.0159	0.0340	< 0.05
Moyenne ± é.-t.	0.517 ± 0.460	0.668 ± 0.492		
Ratio (9ac/CBZ)				
a	0.0267	0.103		
b	0.00419	-2.10^{-5}	0.0042	0.08
Moyenne ± é.-t.	0.0698 ± 0.0490	0.103 ± 0.062		
Ratio (9ac/CBZ-EP)				
a	0.185	1.249		
b	0.086	-0.046	0.133	< 0.05
Moyenne ± é.-t.	1.075 ± 2.61	0.754 ± 0.736		
Ratio (9ac/DiOHCBZ)				
a	0.144	0.293		
b	0.00730	-0.0044	0.0117	< 0.01
Moyenne ± é.-t.	0.219 ± 0.106	0.245 ± 0.076		

Tableau 18 - Equations des régressions linéaires (y = a + bx) entre les concentrations de 9ac et de CBZ, CBZ-EP et DiOH-CBZ pour le groupe CBZ (n=86) et le groupe CBZ-AV (n=26).

	Groupe CBZ	Groupe CBZ-AV	Différence	p
9ac vs CBZ				
a	-0.118	0.0101		
b	0.0905	0.102	-0.0116	n.s.
Moyenne ± é.-t.	0.07 ± 0.05	0.103 ± 0.06		
9ac vs CBZ-EP				
a	0.182	0.390		
b	0.354	0.209	0.145	0.01
Moyenne ± é.-t.	1.07 ± 2.60	0.754± 0.74		
9ac vs DiOH-CBZ				
a	-0.0555	-0.0537		
b	0.246	0.261	-0.0150	n.s.
Moyenne ± é.-t.	0.22 ± 0.11	0.668 ± 0.49		

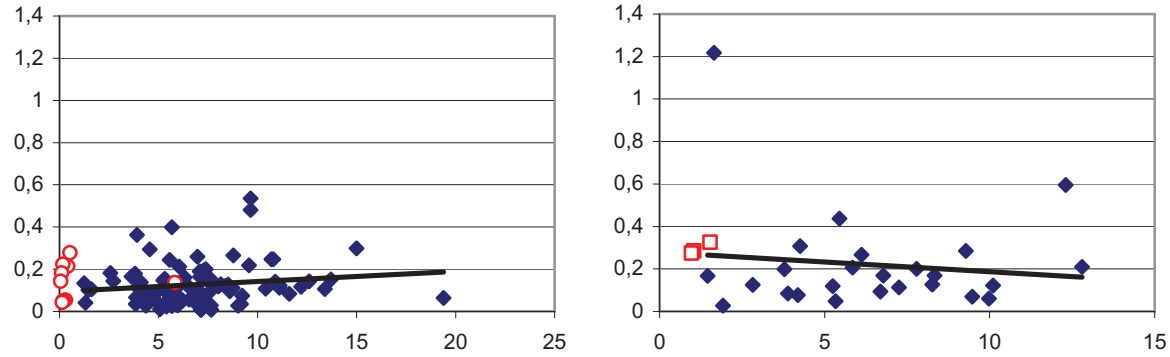
Les données des patients atteints de DRESS ont été superposées aux données des patients du groupe CBZ pris comme référence et de la même façon les données du patient atteint d'urticaire ont été superposées aux données des patients du groupe CBZ-AV pris comme référence (**Figure 23**). Une régression linéaire a été utilisée pour décrire la distribution du ratio (CBZ-EP/CBZ) *versus* la concentration plasmatique de CBZ, le ratio (CBZ-EP/DiOH-CBZ) *versus* la concentration plasmatique de CBZ-EP, le ratio (9ac/DiOH-CBZ) *versus* la concentration plasmatique de DiOH-CBZ et le ratio (9ac/ CBZ) *versus* la concentration plasmatique de CBZ. A partir de ces représentations, les patients atteints de DRESS présentent une distribution distincte par rapport aux patients traités par CBZ non atteints de DRESS, principalement pour le ratio (CBZ-EP/DiOH-CBZ) *versus* la concentration plasmatique de CBZ-EP, mais probablement

aussi pour le ratio (9ac/DiOH-CBZ) *versus* la concentration plasmatique de DiOH-CBZ et le ratio (9ac/ CBZ) *versus* la concentration plasmatique de CBZ. Plus précisément, les patients atteints de DRESS semblent ne plus produire, ou très faiblement, de 9ac. En revanche, les ratios (CBZ-EP/CBZ) sont comparables chez les patients atteints ou non atteints de DRESS. Aucune des pentes de régression n'est significative exceptée celle mesurant la relation entre le ratio (CBZ-EP/DiOH-CBZ) et la concentration plasmatique de CBZ-EP (groupe CBZ : pente = 0.176, $p < 1.10^{-8}$; groupe CBZ-AV : pente = 0.124, $p < 0.05$; différence entre les pentes non significative). Aucune variation significative n'a été observée entre le profil métabolique du patient atteint d'urticaire et son groupe contrôle.

Figure 23 page suivante - Régressions linéaires entre le ratio (CBZ-EP/CBZ) et la concentration plasmatique de CBZ, le ratio (CBZ-EP/DiOH-CBZ) et la concentration plasmatique de CBZ-EP, le ratio (9ac/DiOH-CBZ) et la concentration plasmatique de DiOHCBZ, et le ratio (9ac/CBZ) et la concentration plasmatique de CBZ pour nos 2 groupes de patients sans effets indésirables (groupe CBZ, n=86; groupe CBZ-AV, n=26). Les données obtenues des patients atteints de réaction d'hypersensibilité sont superposées dans leur groupe de référence respectif (O: DRESS, 2 patients; □: urticaire, 1 patient).

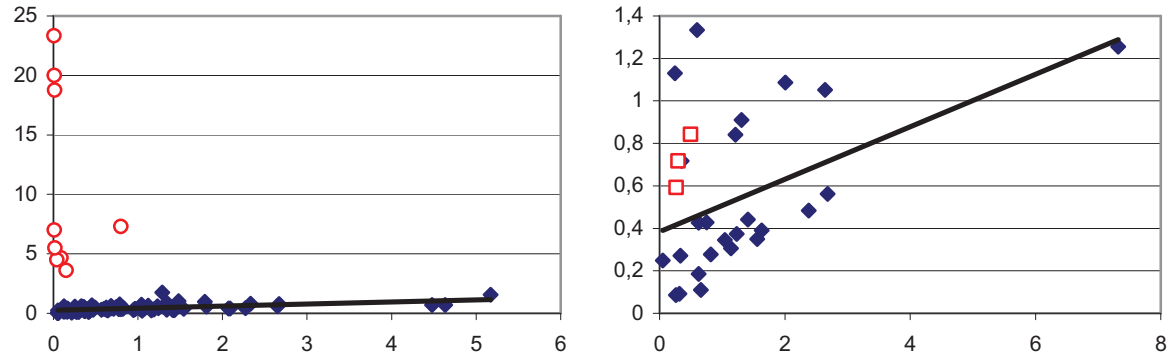
Groupe CBZ **Groupe CBZ-AV**

Ratio (CBZ-EP/CBZ)



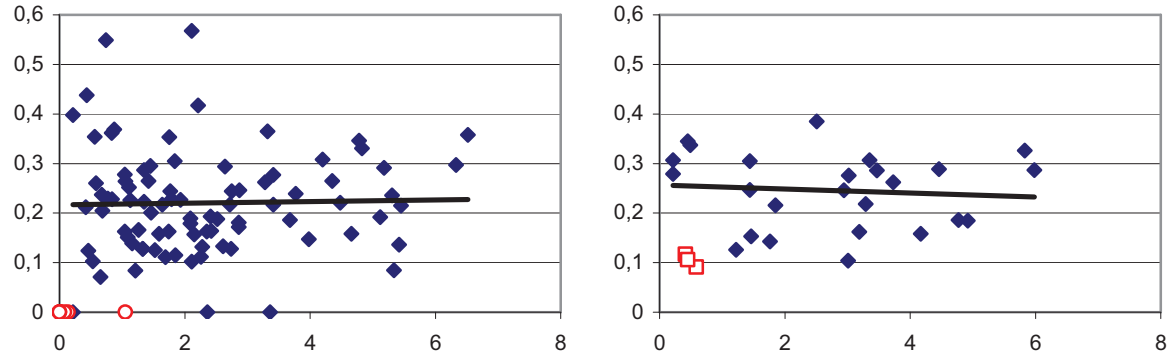
CBZ (mg/l)

Ratio (CBZ-EP/DiOH-CBZ)



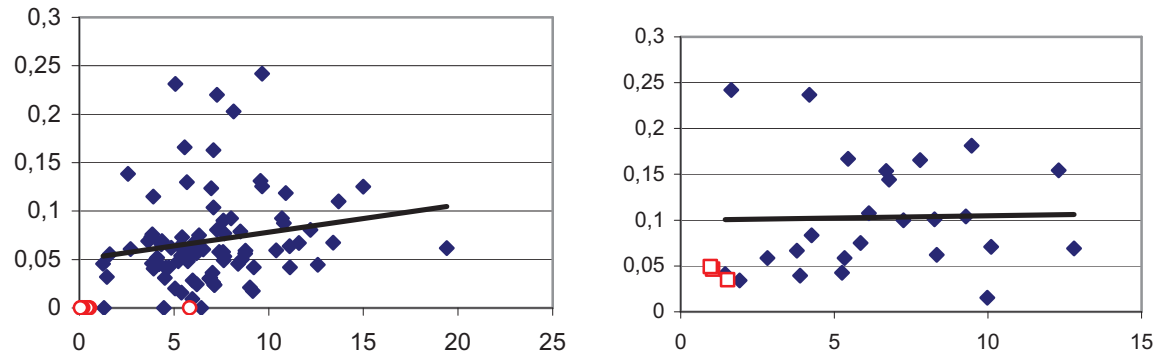
CBZ-EP (mg/l)

Ratio (9ac/DiOH-CBZ)



DiOH-CBZ (mg/l)

Ratio (9ac/CBZ ratio)



CBZ (mg/l)

L'analyse du culot globulaire montre une accumulation plus importante de CBZ dans le DRESS et un déficit en DiOH-CBZ et 9ac en comparaison du groupe contrôle (**Tableau 19**). Dans le cas de l'urticaire, les ratios (concentration intra-érythrocytaire / concentration plasmatique) de la CBZ, de la DiOH-CBZ et du 9ac sont à peu près les mêmes que ceux des contrôles. Les variations dans les ratios du CBZ-EP sont moins évidentes à interpréter mais une plus grande accumulation du CBZ-EP semble exister dans le DRESS.

Tableau 19 - Comparaison entre le ratio (concentration intra-érythrocytaire / concentration plasmatique) (%) des patients traités par CBZ sans hypersensibilité (contrôle), un patient atteint de DRESS, et un patient atteint d'urticaire simple.

	CBZ	**CBZ-EP**	**DiOH-CBZ**	**9ac**
Contrôle	38.1	63.9	117	71.8
DRESS	85.7	88.9	0.0	n.d.
Urticaire	53.5	80.0	90.2	63.0

n.d. : le 9ac n'a été détecté ni dans le plasma ni dans les érythrocytes.

L'analyse statistique appliquée aux métabolites mineurs montre clairement que le groupe CBZ produit plus d'AI que les patients atteints de DRESS, mais en contre partie les patients atteints de DRESS produisent plus d'AO que le groupe contrôle (**Tableau 20**).

Tableau 20 - Pourcentage de présence des métabolites mineurs de la CBZ dans différents groupes cliniques.

	2-OH-CBZ	3-OH-CBZ	AI	AO	IM	10-OH-CBZ
Groupe CBZ n=86	**36.1**	**72.1**	**91.9**	**5.81**	**20.9**	**46.5**
DRESS n=2	50	50	0*	100*	0	50
Groupe CBZ-AV n=26	**34.6**	**53.9**	**88.5**	**11.5**	**19.2**	**50**
Urticaire n=1	100	100	0	100	0	100

* $p < 0.002$ (groupe CBZ pris comme groupe de référence)

4. Discussion

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de données comparant le profil des métabolites de la CBZ de patients atteints de DRESS avec celui des patients traités qui n'ont pas présenté de réactions d'hypersensibilité dans l'année qui a suivi l'initiation de leur traitement par CBZ. La représentativité de nos données utilisées comme référence a été testée en les comparant avec les données publiées. Les variations interindividuelles entre nos patients traités par CBZ est supérieure à celle décrite par Potter et Donnelly (1998) mais nous avons inclus un nombre de patient supérieur (**Tableau 15**). De plus, les valeurs des paramètres estimés par notre analyse de régression sont proches de celles de Bernus et coll. (1996) dans la plupart des cas (**Tableau 16**).

La comparaison entre les données plasmatiques obtenues chez les patients atteints de DRESS et notre population de référence montre une augmentation du ratio (CBZ-EP/DiOH-CBZ) et une extinction de la production de 9ac dans le groupe DRESS

(**Figure 23**). Un tel profil n'a pas été observé dans le cas d'urticaire indiquant donc un profil cinétique particulier dans l'état de DRESS au cours duquel les taux de DiOH-CBZ et de 9ac diminuent. Le ratio (CBZ-EP/CBZ) ne semble pas affecté au cours du DRESS. L'examen de la distribution relative de la CBZ et de ses principaux métabolites CBZ-EP, DiOH-CBZ et 9ac dans les érythrocytes montre clairement une accumulation de CBZ, et probablement de CBZ-EP, alors que la DiOH-CBZ et le 9ac sont considérablement réduits par rapport à la population de référence (**Tableau 19**). Une cassure doit intervenir dans la biotransformation du CBZ-EP en DiOH-CBZ au cours du DRESS. L'implication de la défaillance hépatique doit être prise en considération mais l'élévation des enzymes hépatiques était trop modérée chez D1 et D2 pour conduire à une insuffisance hépatique. Une autre spécificité significative du DRESS est l'inversion dans la production des métabolites mineurs AI et AO (**Tableau 20**). L'AI a été détectée chez plus de 90 % des patients dans la population de référence et l'AO seulement chez moins de 6 % des patients ($p<0.002$). Dans leurs expérimentations très oxydatives *in vitro*, Furst et Uetrecht (1993) ont clairement montré que l'AO était produite après et à partir de l'AI. L'inflammation très intense au cours du DRESS conduit probablement à une intense transformation de l'AI en AO.

Dans notre étude, l'AV diminue le taux absolu de 9ac ($p<0.05$), l'abondance relative du 9ac par rapport au CBZ-EP ($p<0.05$), à la DiOH-CBZ ($p<0.01$), et dans une moindre mesure à la CBZ ($p=0.08$) (**Tableau 17**). La DiOH-CBZ a d'abord été présentée comme le précurseur du 9ac (Lertratanangkoon et Horning, 1982) mais une transformation directe de la CBZ elle-même ou du CBZ-EP en 9ac a été proposée plus tard (Eichelbaum et coll., 1985 ; Wad et coll., 1997). Enfin, Myllynen et coll. (1998) ont montré que les microsomes humains hépatiques catalysent la transformation de la CBZ en 9ac. Nous ne sommes pas en mesure de déterminer l'origine du 9ac à partir de nos

résultats parce que les concentrations de 9ac étaient corrélées avec la CBZ ($r^2 = 0.62$, $p < 0.001$), le CBZ-EP ($r^2 = 0.75$, $p < 0.001$) et la DiOH-CBZ ($r^2 = 0.90$, $p < 0.001$). Il est à noter que la pente de la régression est supérieure avec le CBZ-EP. Nous avons trouvé un effet négatif significatif de l'AV sur la pente de la régression entre les concentrations plasmatiques de 9ac et de CBZ-EP, mais pas d'effet sur la régression entre les concentrations plasmatiques de 9ac et de CBZ ni de DiOH-CBZ (**Tableau 18**). Comme une formation directe de 9ac à partir du CBZ-EP ne peut être exclue, la réduction du taux de 9ac au cours du co-traitement avec l'AV pourrait être due à une inhibition de cette voie directe de transformation.

Notre étude présente deux limites liées aux circonstances d'apparition du DRESS syndrome. En premier lieu, le très petit nombre de patients atteints de DRESS dans notre étude doit être mis en perspective de la faible incidence des DRESS induits par la CBZ. Ensuite, les concentrations mesurées ont potentiellement pu être affectées par les traitements symptomatiques, mais seuls des effets inhibiteurs sur les voies enzymatiques de transformation auraient pu modifier la pharmacocinétique à court terme. Cependant, l'hydroxyzine et la prednisolone ne sont pas des inhibiteurs enzymatiques notoires. La grande variabilité dans les concentrations de CBZ-EP de nos patients co-traités avec de l'AV doit être la cause de l'absence de significativité de la supériorité de la concentration du CBZ-EP chez les patients co-traités CBZ-AV rapportée (Bernus et coll., 1997). Nous observons néanmoins la tendance de l'effet global du traitement sur le ratio (CBZ-EP/CBZ) et une différence concordante (**Tableau 17**). De plus, une analyse statistique globale destinée à mettre en évidence un effet traitement montre que le ratio (CBZ-EP/CBZ) tend à être supérieur dans le groupe CBZ-AV ($p = 0.08$). Cette dernière analyse était significative ($p<0.05$) dans les travaux de Ramsay et coll. (1990)

avec un nombre de patients proche du nôtre mais un peu plus petit (n=31 pour le groupe CBZ et n=26 pour le groupe CBZ-AV).

Les patients atteints de DRESS et ceux co-traités CBZ-AV présentent une diminution du taux plasmatique de 9ac par rapport aux patients en monothérapie sous CBZ. L'interprétation de ces données est complexe parce qu'elles peuvent résulter de la même inhibition de la production de 9ac (blocage de la voie CBZ-EP/DiOH-CBZ/9ac), mais aussi d'une oxydation complète du 9ac en son analogue aldéhyde pour donner de l'AI, lui-même intensivement oxydé en AO au cours du DRESS (Furst et Uetrecht, 1993). Dans la première hypothèse, l'AV donnerait un profil métabolique identique à celui observé au cours du DRESS, avec une possible implication comme agent prédisposant en détournant la biotransformation du CBZ-EP vers une autre voie, et en corollaire, la voie métabolique du 9ac serait probablement protectrice vis-à-vis du DRESS syndrome. Dans la seconde hypothèse, la disparition du 9ac serait la conséquence des conditions oxydatives associées au DRESS syndrome et, s'il existe, l'effet de l'AV sur les manifestations de type DRESS serait ailleurs. Comme le rapport AI/AO ne diffère pas entre les patients co-traités ou non par AV, le 9ac ne peut être disculpé.

5. Conclusion

Bien que cité très rarement, mais alors avec le statut de métabolite majeur de la CBZ d'un point de vue quantitatif, le 9ac apparaît à la fin de ces travaux comme un métabolite majeur également d'un point de vue qualitatif, soumis à des variations beaucoup plus fortes que le CBZ-EP ou la DiOH-CBZ suite à l'influence de situations pathologiques ou de co-médications comme l'AV. Le lien entre le 9ac et la voie 9-AI-

ald / AI / AO n'est encore pas établi mais, comme le 9ac, cette voie semble pouvoir être bouleversée dans de grandes proportions au cours du DRESS, sans commune mesure avec les modifications touchant les autres métabolites.

<u>Cinquième partie :</u> Données relatives à la présence des métabolites de la carbamazépine chez les patients traités par oxcarbazépine.

1. Justification scientifique

L'oxcarbazépine (OxCz) est le céto analogue et concurrent thérapeutique de la CBZ. L'OxCz se lie de façon plus importante aux macromolécules que la CBZ mais la fréquence des réactions idiosyncrasiques semble plus faible, de plus des réactions croisées avec la CBZ ont été décrites (Myllynen et coll., 1998 ; Kallis et Huff, 2001). En raison de cette réactivité croisée et de cette parenté chimique, il nous a paru intéressant de rechercher les métabolites étudiés dans une population de patients épileptiques traités par OxCz.

2. Méthodologie

Nous avons utilisé le même protocole et la même méthode analytique que pour la CBZ. Les caractéristiques des patients inclus sont résumées dans le **Tableau 21**.

Tableau 21 - Caractéristiques des patients traités par OxCz pour lesquels la recherche des métabolites a été réalisée.

Sex-ratio	22 hommes / 23 femmes
Age	39.2 ± 20.5 ans [5 - 90 ans]
Poids	63.0 ± 16.0 kg [13 - 87 kg]
Posologie	10-15 mg/kg/j
Co-traitements	Lamotrigine (5 patients) Acide valproïque (2 patients) Lévétiracétam (2 patients) Phénobarbital (1 patient) Phénytoïne (1 patient)

3. Résultats et discussion

La présence des métabolites et les concentrations mesurées sont résumées dans le **Tableau 22**. Les concentrations retrouvées pour la 10-OH-CBZ et la DiOH-CBZ sont très proches de celles rapportées par Mandrioli et coll. (2003). Très peu de données sont disponibles dans la littérature sur la présence des autres métabolites hydroxylés de la carbamazépine dans le sang de patients traités par OxCz en monothérapie. Pienimaki et coll. (1995) ont retrouvé la 3-OH-CBZ chez 2 patients sur 12 (16.7 %) et Mandrioli chez 1 patient sur 12 (8.3 %) soit des fréquences de présence un peu inférieures aux nôtres, mais les LLOD étaient un peu supérieures (0.02 à 0.03 µM). Comme pour la CBZ, la 2-OH-CBZ semble moins abondante que la 3-OH-CBZ. Wad et coll. (1997)

mentionnent l'absence de 9ac chez 20 patients traités par OxCz. Nous n'avons pas trouvé de données publiées concernant une production d'AI, d'AO ou d'IM à partir de l'OxCz. Chez nos patients traités par OxCz, la présence d'AI est deux fois moindre que chez les patients traités par CBZ, la présence d'AO est en revanche plus fréquente (**Tableau 12**). Il est à noter qu'une origine extrinsèque (environnementale) de ces molécules est peu probable puisqu'au cours de la mise au point de la méthode de dosage et des calibrations ultérieures nous n'avons pas retrouvé ces molécules dans les nombreux lots différents de plasma blanc utilisés.

4. Conclusion

Il apparaît que le CBZ-EP, l'IM et le 9ac sont les seuls métabolites spécifiques de la CBZ par rapport à l'OxCz. Ainsi, dans le cadre de l'hypothèse des métabolites réactifs, les réactions croisées d'hypersensibilité sont davantage à rechercher au niveau de la voie de la DiOH-CBZ, des dérivés 2- et 3- mono-hydroxylés et des dérivés acridiniques. Le 9ac semble ne semble pas constituer une voie de passage obligée pour la formation des dérivés acridiniques et son implication directe, au moins dans les réactions croisées d'hypersensibilité, est exclue sauf activation spécifique de la voie métabolique chez les patients hypersensibles. Ainsi, la dissociation entre la voie du 9ac et de la 9-AI-ald semble légitime, bien qu'une relation d'oxydation puisse relier ces 2 molécules. Enfin, l'absence simultanée de la CBZ et du CBZ-EP d'une part et du 9ac d'autre part, semble écarter la DiOH-CBZ comme origine potentielle du 9ac au profit de la CBZ et du CBZ-EP.

Tableau 22 - Concentrations de l'OxCz et des métabolites potentiels dans le plasma de patients traités par OxCz ; la médiane des concentrations supérieures à la limite de quantification est indiquée, l'intervalle entre les valeurs minimales et maximales est précisé (omis si N=1).

Molécules	Concentration plasmatique (µM)	N (n) ; %
CBZ	< LLOD	0 (0) ; 0 %
OxCz	2.16 [1.67-31.3]	11 (25) ; 80.0 %
CBZ-EP	< LLOD	0 (0) ; 0 %
10-OH-CBZ	66.3 [2.78-180]	45 ; 100 %
DiOH-CBZ	5.78 [1.50-55.6]	39 (6) ; 100 %
2-OH-CBZ	0.484	1 (3) ; 8.9 %
3-OH-CBZ	0.337 [0.167-1.89]	13 (2) ; 33.3 %
AI	0.821 [0.352-2.99]	3 (18) ; 46.7 %
AO	0.503 [0.138-0.944]	6 (3) ; 20 %
IM	< LLOD	0 (0) ; 0 %
9ac	< LLOD	0 (0) ; 0 %

N = nombre de patients pour lesquels la concentration du métabolite est au-dessus de la LLOQ de la méthode analytique. **n** = nombre de patients pour lesquels la concentration du métabolite est comprise entre la LLOD et la LLOQ. **%** = nombre de patients pour lesquels la concentration du métabolite est au-dessus de la LLOD de la méthode analytique. < LLOD : composé non détecté.

<u>Sixième partie :</u> Aperçu du devenir post-excrétionnel de la carbamazépine et de ses métabolites : effet des procédés de traitement des eaux usées et exposition environnementale.

1. Justification scientifique des expérimentations

Nous avons donc démontré la formation sanguine d'AI et d'AO comme voie métabolique physiologique de la CBZ chez l'homme. Il est néanmoins difficile d'expliciter les mécanismes chimiques mis en jeu sans requérir à des expérimentations à visée mécanistique avec les espèces réactives de l'oxygène ciblées. De façon intéressante, les voies de dégradation des molécules pharmaceutiques intéressent de plus en plus les chimistes de l'environnement qui ont l'habitude de gérer les réactions radicalaires initiées avec les rayonnements UV et mettant en jeu l'oxygène et le chlore. Il y a donc une superposition exceptionnelle des thématiques et il serait dommage de ne pas croiser les résultats expérimentaux au moins, à défaut de mettre en commun les compétences et les savoir-faire.

Par une heureuse synchronicité spatio-temporelle, les thématiques de la thèse ont rencontré celles de l'équipe des Hydrosciences de Montpellier qui s'intéressait au devenir environnemental de la carbamazépine, laquelle est devenue en quelques années un marqueur de l'activité humaine incontournable, au même titre que le sont les composés oestrogéniques depuis plus longtemps. Nos équipes, rejoignant l'équipe marseillaise qui a publié des travaux sur l'effet du réactif UV/H_2O_2 sur la CBZ, se sont associées dans le cadre de 2 projets successifs financés le premier par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et des conditions de Travail

(AFSSET, programme de recherche 2007-2010 « Environnement-Santé-Travail ») et pour le second par l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR, programme de recherche 2009-2012 « Contaminants Ecosystèmes Santé », **annexe 5**). Les premiers travaux ont donné lieu à la publication ci-après correspondant principalement aux travaux de thèse de Marie Leclercq et s'appuyant sur nos compétences pour le choix et la méthode analytique de dosage des métabolites.

Présence et devenir de la carbamazépine, l'oxcarbazépine et 7 de leurs métabolites dans les stations de traitement des eaux usées.

Auteurs :

Marie Leclercq, Olivier Mathieu, Elena Gomez, Claude Casellas, Hélène Fenet, Dominique Hillaire-Buys.

L'article original en langue anglaise intitulé **"Presence and Fate of Carbamazepine, Oxcarbazepine, and Seven of Their Metabolites at Wastewater Treatment Plants"** a été publié dans le **numéro 56(3) de "Archives of Environmental Contamination and Toxicology", de la page 408 à la page 415.**

Les travaux ont également été présentés au **5° congrès SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry)** qui s'est tenu à Sydney du 3 au 7 août **2007.**

Arch Environ Contam Toxicol
DOI 10.1007/s00244-008-9202-x

Presence and Fate of Carbamazepine, Oxcarbazepine, and Seven of Their Metabolites at Wastewater Treatment Plants

Marie Leclercq · Olivier Mathieu · Elena Gomez · Claude Casellas · Hélène Fenet · Dominique Hillaire-Buys

Received: 10 April 2008 / Accepted: 8 July 2008
© Springer Science+Business Media, LLC 2008

Abstract Many pharmaceuticals are excreted in wastewater as parent substances or metabolites subsequent to therapeutic or diagnostic application in medical care. This includes the antiepileptic carbamazepine, which is not removed during conventional wastewater treatment and was found to be ubiquitous in the aquatic environment. Some carbamazepine metabolites have also been found in treated wastewater, but only five of them have been studied to date. However, at least 30 carbamazepine metabolites have been identified in humans, including some pharmacologically active or genotoxic compounds. Oxcarbazepine, an antiepileptic which is increasingly used, generates metabolites common to those of carbamazepine. The present work focuses on the presence of carbamazepine, oxcarbazepine, and seven of their metabolites (carbamazepine-10,11-epoxide, 10-hydroxy-10,11-dihydrocarbamazepine, 10,11-dihydro-10,11-*trans*-dihydroxycarbamazepine, 2-hydroxycarbamazepine, iminostilbene, acridine, and acridone) at three different treatment plants (conventional activated sludge, trickling filter, and stabilization ponds) selected in France. The main aim of this work was to identify selected compounds in wastewater after therapeutic use and to measure concentrations in influents and effluents at the three wastewater treatment plants. Except for iminostilbene, all of these compounds were detected in wastewater. The metabolite common to carbamazepine and oxcarbazepine, i.e., 10,11-dihydro-10,11-*trans*-dihydroxycarbamazepine, was detected at a higher concentration than the parent substances in wastewater. The presence of parent molecules was noted in inlet and outlet water samples. Carbamazepine, as expected, was not removed by conventional activated sludge treatment. Nevertheless, in a wastewater treatment plant with a 78-day hydraulic retention time, a 73% decrease in carbamazepine concentration was observed. For the first time, oxcarbazepine was found in environmental samples. A decrease in oxcarbazepine concentrations was observed at the three sewage treatment plants, with removal ranging from 24 to 73%. No metabolite removal was observed after activated sludge treatment. In the two other sewage treatments plants, the fate of the metabolites differed. The concentration of some metabolites, e.g., 10,11-dihydro-10,11-*trans*-dihydroxycarbamazepine and acridine, increased, possibly via different processes such as cleavage of glucuronide conjugates or biotic and abiotic degradation of parent compounds. The behavior of the studied substances is discussed in terms of the treatment process and hydraulic retention time.

M. Leclercq · E. Gomez · C. Casellas · H. Fenet (✉)
UMR 5569 'Hydrosciences Montpellier', University of Montpellier I, 15 Avenue Ch. Flahault, BP 14 491, 34093 Montpellier Cedex 5, France
e-mail: hfenet@univ-montp1.fr

O. Mathieu · D. Hillaire-Buys
Department of Medical Pharmacology and Toxicology, Lapeyronie Hospital, Avenue du Doyen G. Giraud, 34295 Montpellier, France

In recent years, a large number of pharmaceutical residues have been detected in the aquatic environment. Among them, the antiepileptic drug carbamazepine is commonly found in sewage and surface waters at low concentrations (a few micrograms per liter). Transformation of this antiepileptic in the human body has been extensively studied. Carbamazepine is predominantly metabolized in the liver, and at least 30 different metabolites have been identified (Lertratanangkoon and Horning 1982). Three key metabolic pathways have been listed (Breton et al. 2005), with

the main route being the formation of carbamazepine-10,11-epoxide (Cbz-Ep), a pharmacologically active compound with anticonvulsivant properties. Cbz-Ep is further metabolized into 10,11-dihydro-10,11-*trans*-dihydroxy-carbamazepine (DiOH-Cbz). DiOH-Cbz leads to the formation of 9-hydroxymethyl-10-carbamoylacridan (9ac). A second metabolic route involves the production of hydroxylated compounds 2-hydroxycarbamazepine (2-OH-Cbz) and 3-hydroxycarbamazepine. The third minor metabolic route leads to iminostilbene (IM) formation. Furthermore, within leukocytes, Cbz and IM are metabolized into oxidative products, including acridine (AI) and acridone (AO), which are known to be genotoxic (Bleeker et al. 1999).

Oxcarbazepine, a keto analogue of carbamazepine which is used as an anticonvulsant, also generates the metabolites DiOH-Cbz and 9ac. However, OxCz is mainly metabolized into 10-hydroxy-10,11-dihydro-carbamazepine (10-OH-Cbz), its therapeutically active metabolite. In humans treated with OxCz, the metabolites 3-hydroxy-carbamazepine, AI, AO, and Cbz-Ep have also been detected in plasma (Breton et al. 2005).

Following human administration of carbamazepine and oxcarbazepine, parent compounds and some of their metabolites are subsequently excreted in wastewater. Recently, a hydroxylated metabolite of carbamazepine, i.e., DiOH-Cbz, has been recognized to occur in wastewater at a higher concentration than the parent compound (Miao and Metcalfe 2003; Hummel et al. 2006). These findings illustrate that metabolites derived from the human metabolism or microbial activities must be studied in order to gain greater insight into the behavior of pharmaceuticals in wastewater treatment.

Despite increased knowledge about the presence and fate of carbamazepine at wastewater treatment plants, much remains unknown regarding the occurence of oxcarbazepine and the metabolites of these two parent compounds (Cbz and OxCz). The aim of this study was to screen for the presence of carbamazepine, oxcarbazepine, and seven of their metabolites in influents and effluents at three sewage treatment plants (STP). As elimination rates during the STP process vary according to the treatment technology, hydraulic retention time, and STP performance, three different treatment plants were selected for this study.

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

Cbz, Cbz-Ep, IM, AO, AI, and the internal standard (IS) 10,11-dihydroxycarbamazepine were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). OxCz, 10-OH-Cbz, DiOH-Cbz, and 2-OH-Cbz were supplied by Novartis Pharma (Basel, Switzerland). The structures of these molecules are presented in Fig. 1. HPLC-grade acetonitrile and acetone were obtained from Merck (Nogent/Marne, France). Pesticide-grade methanol was purchased from Carlo Erba Reactifs (Val de Reuil, France). Whatman GF/C filters (Maidstone, UK), 150 mm, were used to filter water before extraction. Solid-phase extraction (SPE) of the samples was performed with Oasis HLB cartridges (Waters, Milford, USA). Stock solutions of the nine analytes were prepared in acetone and stored at 4°C. A stock solution mixture was prepared by pooling each stock solution and by addition of IS. Seven working solutions were prepared by diluting the standard stock solution in methanol.

Sewage Treatment Plants and Sampling

Three French wastewater treatment plants (Fig. 2), with different treatment technology, hydraulic retention time (HRT), and performance, were selected for this study: STP 1 involved biological treatment in activated sludge with a 3-day HRT; STP 2 consisted of a trickling filter (2-day HRT) followed by a posttertiary pond (20-day HRT), leading to a total 22-day HRT; and STP 3 involved a series of different waste stabilization ponds with depths between 1.4 and 3.1 m, with a total HRT of 78 days. The number of inhabitants, influent flow, biological and chemical oxygen demand, and hydraulic retention time of each STP are presented in Table 1.

Daily composite samples, proportional to the influent and effluent flows, were collected at each STP. At STP 2, instantaneous sampling was performed after the posttertiary ponds. At STP 3, instantaneous sampling was performed after the step-fed facultative ponds. Samples were stored at +4°C and extracted within 48 h.

Analytical Procedure

Sample Treatment

Water samples containing IS were filtered through a solvent-rinsed Whatman GF/C filter to remove suspended material and then extracted with preconditioned (3 mL methanol and 3 mL milliQ-water) 60-mg Oasis HLB SPE cartridges. The cartridges were then vacuum-dried and stored at −20°C. After thawing at room temperature, SPE cartridges were eluted by 2 × 5 ml ethyl acetate. Eluates were dried on anhydrous sodium sulfate and rotary evaporated to dryness. The residue was taken up with methanol to obtain a preconcentration factor of 10,000. Two independent extractions were performed for each sample. Each

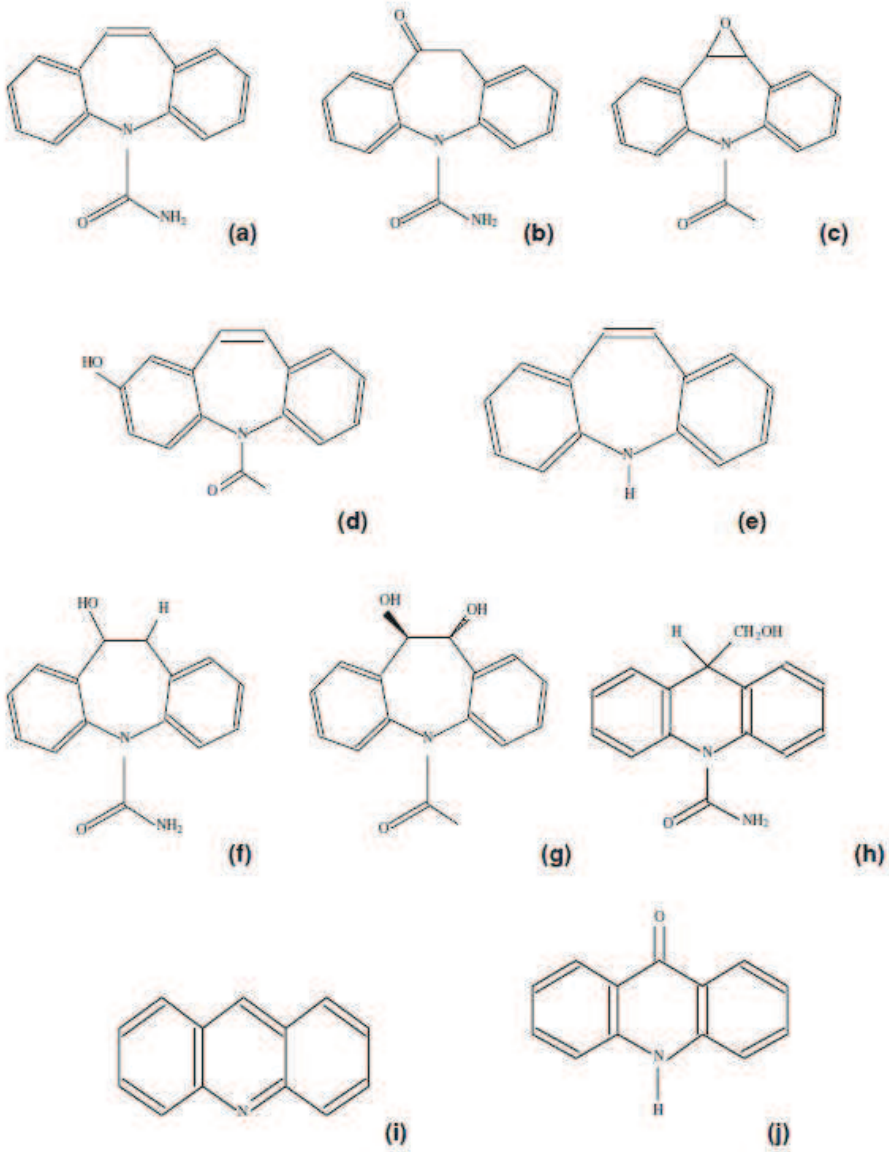


Fig. 1 Chemical structures of the analyzed compounds. Studied compounds included two parent substances—(a) carbamazepine (Cbz) and (b) oxcarbazepine (OxCz)—and seven metabolites: (c) carbamazepine-10,11-epoxide (Cbz-Ep), (d) 2-hydroxy-carbamazepine (2-OH-Cbz), (e) iminostilbene (IM), (f) 10-hydroxy-10,11-dihydro-carbamazepine (10-OH-Cbz), (g) 10,11-dihydro-*trans*-10,11-dihydroxy-carbamazepine (DiOH-Cbz), (h) 9-hydroxymethyl-10-carbamoylacridan (9ac), (i) acridine (AI), and (j) acridone (AO)

extract was analyzed in duplicate by liquid chromatography-mass spectrometry.

Liquid Chromatography

The analytical procedure was based on a previously reported validated method for the determination of carbamazepine, oxcarbazepine, and their metabolites in plasma (Breton et al. 2005). Analytical determination was performed on an HP Series 1100 LC/MS system (Hewlett Packard, Les Ulis, France) equipped with a quaternary pumping unit, an autosampler, and a simple quadruple mass detector. Separations were carried out with a ZORBAX Eclipse XDB-C8 column (150 mm × 4.6-mm i.d., 4 µm). The eluent mixture used consisted of acetonitrile (solvent A) and formate buffer (2 mM, pH 3; solvent B). The flow rate was 0.8 ml/min and the mobile phase used was a linear gradient over 30 min from 15 to 60% (solvent A) followed by a linear gradient over 10 min from 60 to 70% (solvent A). The column was thermostated at 25°C. The column was then washed for 5 min with the final gradient solution, brought back to the initial condition over 1 min, and re-equilibrated for 8 min. The injection volume was 20 µl.

The mass spectrometer used an electrospray interface and was calibrated in positive ion mode (ESI +). The drying gas temperature and flow rate were maintained at 350°C and 10 L/min, respectively, and the nebulizer

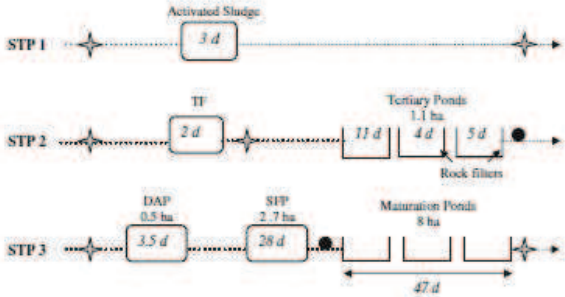


Fig. 2 Description of sewage treatment plants (STPs). STP 1 consisted of a conventional biological treatment in activated sludge. STP 2 consisted of a water treatment by a trickling filter (TF) followed by a posttertiary pond. STP 3 consisted of a series of different waste stabilization ponds. Sampling location: daily composite samples (stars) and instantaneous samples (filled circles). Hydraulic retention time, as days (d), given in italics. DAP, deep aerated ponds; SFP, step-fed facultative ponds; ha, hectares

pressure was set at 15 psi. Mass spectra were acquired between 105 and 170 V.

From the full-scan spectra, two specific ions were selected for each compound: a protonated molecular ion (M + H +) and a daughter ion. For quantification, mass spectrometric data were acquired in simple ion recording mode. The ions selected for each compound were as follows: *m/z* 271 (DiOH-Cbz), 253 (2-OH-Cbz), 237 (Cbz and 10-OH-Cbz), 236 (Ox-Cz), 196 (AO), 194 (IM), 180 (Cbz-Ep and AI), and 139 (IS). For 9-acridan (9ac), the level was expressed as the peak height ratio 9-ac/Cbz because no reference substance for this molecule was available. The ion used to determine 9-ac was *m/z* 238.

Calibration Curves and Recovery Rates

Seven standard samples used for the calibration curves were prepared by mixing 100 µl of working solutions in 1 L of distilled water, and these were subsequently extracted and analyzed as wastewater samples. For each analyte, quadratic calibration curves were obtained using the ratio R, where R = analyte area/IS area. Three control samples (low, middle, and high concentrations) were prepared by diluting the stock solution mixture in methanol containing IS at 1 ppm and further processed as standard samples. Extraction recoveries were calculated with the middle control sample (i.e., 0.74, 1.57, 0.35, 0.53, 1.14, 0.39, 0.60, 0.37, and 0.61 mg/L for Cbz, OxCz, Cbz-Ep, 10-OH-Cbz, DiOH-Cbz, 2-OH-Cbz, IM, AI, and AO, respectively) and confirmed with the low control sample (i.e., 0.18, 0.39, 0.09, 0.13, 0.28, 0.10, 0.15, 0.09, and 0.15 mg/L for Cbz, OxCz, Cbz-Ep, 10-OH-Cbz, DiOH-Cbz, 2-OH-Cbz, IM, AI, and AO, respectively). The recovery rates, detection limits, and quantification limits of the method are listed in Table 2. The accuracy ranged from 87 to 115%, and the relative standard deviations for the calibration points were <15%.

Table 1 Characteristics of the studied sewage treatment plants (STPs) given by the treatment plant operators

	Capacity (person-equivalent)	Sample	Influent flow (m^3/day)	SS (mg/L)	COD (mg/L O_2)	BOD (mg/L O_2)	HRT (days)
STP 1	470,000	Inlet	72,040	265	564	232	3
		Outlet	67,220	28	86	15	
STP 2	3,500	Inlet	466	268	532	260	2
		Outlet	628	35	92	92	
STP 3[a]	19,000	Inlet	3,120	265	557	347	78

Note: BOD, biological oxygen demand; COD, chemical oxygen demand; SS, suspended solids; HRT, hydraulic retention time

[a] Data on STP 3 outlet samples were not available

Table 2 Analytical parameters of carbamazepine, oxcarbazepine, and analyzed metabolites

	Ions (m/z)	Retention time (min)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Recovery (%)
Cbz	194, 237	13.9	2.4	9.5	92.9
OxCz	236, 253	12.5	5.0	20.1	77.0
Cbz-Ep	180, 236	11.9	2.6	5.2	95.8
10-OH-Cbz	237, 255	10.7	2.5	7.5	93.1
DiOH-Cbz	253, 271	9.7	10.8	13.5	96.5
2-OH-Cbz	210, 253	11.2	2.5	5.0	98.3
IM	179, 194	20.6	3.9	7.9	84.4
AI	152, 180	10.1	1.8	5.7	96.3
AO	167, 196	13.0	1.9	7.2	90.3

Note: LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification. Two specific ions (*m/z*) were selected to identify molecules (underlined ion was used for quantification)

Removal Rates in STPs

The removal rates of the studied compounds in STPs were calculated as follows: $(C_{inf} - C_{eff}) \times 100/C_{inf}$, where C_{inf} is the concentration measured in influent wastewater and *Ceff* is the concentration measured in effluent wastewater.

Results

Carbamazepine and oxcarbazepine were quantified in influents and effluents from the three studied STPs (Table 3). Carbamazepine concentrations ranged from 208 to 416 ng/L in influents and from 112 to 258 ng/L in effluents. Oxcarbazepine concentrations ranged from 85 to 476 ng/L in influents and from 51 to 255 ng/L in effluents. All metabolites, except IM, were found at the three STPs. DiOH-Cbz and 9ac were found in all influents and effluents: DiOH-Cbz concentrations ranged from 311 to 1415 ng/L and the 9ac concentration, expressed as a percentage of the Cbz concentration, ranged from 3 to 18%. Cbz-Ep was detected at concentrations lower than 30 ng/L. 10-OH-Cbz and 2-OH-Cbz, when detected, had concentrations that ranged from less than the quantification limit (7.5 and 5 ng/L, respectively) to 1170 and 48 ng/L, respectively. The acridine and acridone concentrations, when detected, ranged from less than the quantification limit (5.7 and 7.2 ng/L, respectively) to 26 and 23 ng/L, respectively.

Carbamazepine and oxcarbazepine removal rates varied between STPs, as expected. For carbamazepine, no removal was observed in STP 1, 30% in STP 2, and 73% in STP 3. Oxcarbazepine removal rates ranged from 25% in STP 2 to 73% in STP 1. 10-OH-Cbz, DiOH-Cbz, and 2-OH-Cbz were found in STP 1 and STP 2 effluents at higher concentrations than in the influents, whereas their concentrations were similar in STP 3. Acridine was found in STP 3 effluents at a higher concentration than in influents, whereas no variation was observed in STP 1 and STP 2.

Instantaneous samples gave us supplementary information on the metabolite behavior in STP 2 (Fig. 3) and in STP 3 (Fig. 4). The sample performed after the tertiary treatment pond in STP 2 and after SFP in STP 3 did not undergo great daily variations, as the HRT was 20 days and 28 days, respectively. In STP 2, refining in the tertiary

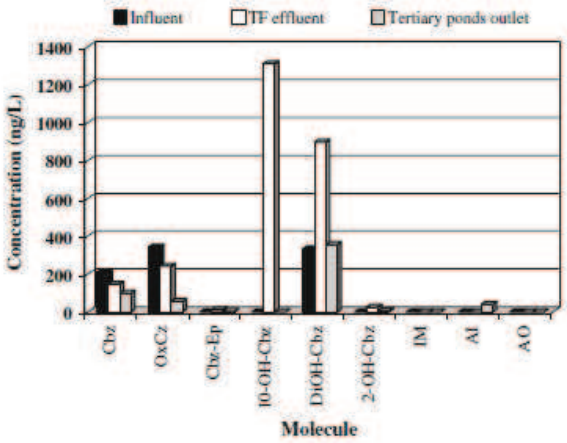


Fig. 3 Fate of compounds inside STP 2 system. Concentrations (ng/L) of Cbz, OxCz, and metabolites measured by liquid chromatography in daily composite samples—i.e., influent water samples (black bars) and effluent water samples (white bars)—and in instantaneous samples (gray bars)—i.e., tertiary pond outlet. TF, trickling filter

Table 3 Concentrations of Cbz, OxCz, and metabolites in influent and effluent water samples (ng/L)[a]

	STP 1		STP 2		STP 3	
	Influent	Effluent[b]	Influent	TF effluent	Influent	Effluent
Cbz	235 *(235–236)*	258	208 *(193–224)*	146 *(145–147)*	416 *(412–420)*	112 *(86–139)*
OxCz	476 *(447–505)*	129	341 *(338–344)*	255 *(248–262)*	85 *(84–86)*	51 *(47–56)*
Cbz–Ep	26 *(25–27)*	29	nd	12 *(12–13)*	*nd–12*	*<LOQ–8*
10–OH–Cbz	1065 *(1014–1115)*	1170	<LOQ	1048 *(984–1112)*	nd	<LOQ
DiOH–Cbz	1415 *(1370–1460)*	1500	333 *(323–344)*	896 *(809–984)*	325 *(264–386)*	311 *(311–311)*
2–OH–Cbz	37 *(36–39)*	48	<LOQ	26 *(25–27)*	nd	*<LOQ–12*
AI	18 *(5–31)*	14	nd	<LOQ	nd	26 *(15–38)*
AO	19 *(19–19)*	23	<LOQ	nd	*nd-18*	<LOQ
IM	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9ac[c]	14% *(14–15)*	13%	14% *(9–19)*	18% *(17–20)*	*nd-6%*	4% *(4–5)*

Note: STP, sewage treatment plant; TF, trickling filter; LOQ, limit of quantification; nd, not detected

[a] Data given are mean concentrations of two aliquots per sample (replicate values)

[b] For STP 1 effluent, only results for first aliquot were available

[c] For 9ac, results are expressed as a percentage of the Cbz concentration

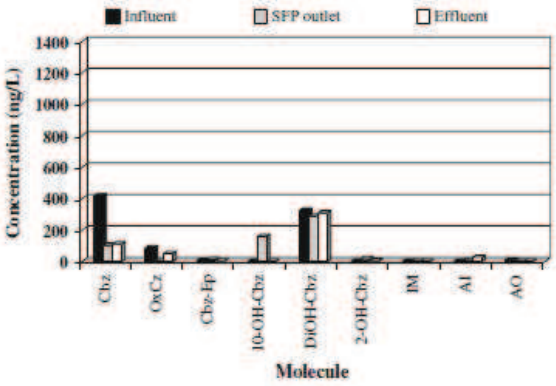


Fig. 4 Fate of compounds in STP 3 system. Concentrations (ng/L) of Cbz, OxCz, and metabolites measured by liquid chromatography in daily composite samples—i.e., influent water samples (black bars) and effluent water samples (white bars)—and in instantaneous samples (gray bars)—i.e., SFP outlet. SFP, step-fed facultative ponds

treatment pond led to a decrease in metabolite concentrations, except for acridine. This molecule was present in the tertiary pond effluent at a 42 ng/L concentration. In STP 3, with a 78-day HRT, the instantaneous sample performed after 31.5-day HRT highlighted the formation of 10-OH-Cbz, a metabolite of OxCz, at a 159 ng/L concentration.

Discussion

Carbamazepine is commonly found in influents at STPs in many countries. The influent concentrations could be explained by the extent of consumption of this anticonvulsant drug in different countries and, also, are dependent on the population pressure. Influent concentrations of Cbz in the south of France (noted in the present study) are thus consistent with those reported in Canada (Miao and Metclafe 2003), Spain (Gomez et al. 2007), Japan (Nakada et al. 2006), and Finland (Vieno et al. 2006). Higher concentrations (a few micrograms per liter) have been noted in Germany (Heberer 2002; Hummel et al. 2006), Sweden (Bendz et al. 2005), and Austria (Clara et al. 2005a).

To our knowledge, this is the first time that oxcarbazepine has been analyzed in STPs. In France, OxCz consumption is lower than that of Cbz. Nevertheless, there was an increase in prescribed quantities from 2002 to 2005, ranging from 2.9 to 6.7 t, respectively.[1] As there has been an increase in other countries, such as Norway and Denmark (Landmark et al. 2007), the concentration of this substance and its metabolites in wastewater is expected to rise in the coming years.

[1] Quantities calculated on the basis of the general scheme published by the French health insurance program.

The metabolites selected for the present study correspond to the main ones that occur in human metabolic pathways. Little information is available on excreted concentrations in urine and feces after therapeutic use. Among the metabolites considered in this work, DiOH-Cbz is one of the main compounds found in human plasma (Breton et al. 2005) and urine (Maggs et al. 1997). It was also the main metabolite detected in influents at the three STPs studied, with concentrations in the same range as those found by Miao and Metcalfe (2003) in Canada (1572 ng/L) and by Hummel et al. (2006) in Germany (2000 ng/L). In contrast, Cbz-Ep, which is present in human plasma at 3- to 4-fold lower concentrations than DiOH-Cbz, was found at concentrations at least 50-fold lower than those of DiOH-Cbz in sewage. This is consistent with the known instability of epoxides in aquatic solutions. Cbz-Ep is probably excreted at much lower concentrations and also transformed into DiOH-Cbz in sewage. The Cbz-Ep and 2-OH-Cbz concentrations detected in this study were similar to those detected by Miao and Metcalfe (2003), i.e., 47 and 121 ng/L, respectively. When detected, 10-OH-Cbz concentrations (up to 1170 ng/L) were much higher than those detected by Miao and Metcalfe (2003), i.e.,9.3 ng/L. As 10-OH Cbz is the major metabolite of oxcarbazepine, the high concentration noted in our study could be due to the increase in oxcarbazepine consumption. It is not excluded that other metabolites and degradation products were also present after sewage treatment.

Carbamazepine has been found to be partially excreted as glucuronide conjugates. DiOH-Cbz, detected as one of the main Cbz metabolites, is excreted in urine in free or *O*-glucuronide conjugate form (Maggs et al. 1997). OxCz and metabolites are essentially (95%) excreted in urine, and mainly (62%) in conjugate form (10-OH Cbz, 49%; OxCz, 13%). 10-OH Cbz is the major excreted metabolite and its free form is only half of the conjugate one (Schütz et al. 1986; official data about TRILEPTAL, Novartis). Activated sludge was found to have glucuronidase activity (Ternes et al. 1999), so cleavage of the glucuronic acid moiety is possible in STPs, thus leading to the release of parent compounds and metabolites in free form, as suggested by several authors (Ternes 1998; Vieno et al. 2006). It is likely that cleavage occurs in the sewage network, especially when the residence time in the sewage network is long, as observed for the STP 1 influent with the presence of metabolites in free form. The conversion of glucuronide conjugates issued from parent compounds and from metabolites by enzymatic processes in treatment plants utilizing activated sludge or trickling filter systems is the most probable explanation for the constant presence of 10-OH-Cbz, DiOH-Cbz, and 2-OH-Cbz metabolites in effluent samples. In the waste stabilization pond system, a strong increase in 10-OH-Cbz concentration was observed

in the step-fed facultative pond. Considering the forms of excretion of OxCz in urine, such an increase is not very amazing if the cleavage hypothesis is accepted.

Concerning removal rates, carbamazepine is considered to be not very biodegradable regardless of the hydraulic retention time (Santos et al. 2007). Carbamazepine elimination was previously argued to be negligible during sewage treatment (Ternes 1998; Heberer 2002; Comoretto et al. 2005; Joss et al. 2005; Castiglioni et al. 2006; Gomez et al. 2006), but gluruconide forms have never been quantified in influents due to the lack of an analytical standard. Vieno et al. (2007) conducted a qualitative assessment of Cbz-gluruconide cleavage in wastewater treatment plants and found a decrease in gluruconide forms after wastewater treatment.

An increase in the sludge retention time has been found to enhance the elimination of several pharmaceuticals (Kreuzinger et al. 2004; Clara et al. 2005b), possibly due to the enrichment of microbial communities expressing enzymes able to break down these pharmaceuticals (Jones et al. 2007). In the current study, this probably contributed to the decrease in the carbamazepine concentration in STP 3 with a long HRT (selected for this purpose). Carbamazepine sorption probably occurred in the maturation ponds of the studied STP 3, which have a 42% organic matter content, as described in a previous report (Picot et al. 2005). Indeed, Cbz sorption increased with the organic matter content of sediment, as shown in previous batch experiments; Sheytt et al. (2005) observed distribution coefficients (K_d) up to 5.32 for Cbz in sandy sediment, while Williams et al. (2006) observed a K_d of up to 19.8 in biosolid amended soil. No studies have focused on the sorption of OxCz or its metabolites.

Photodegradation may also contribute to the removal of Cbz and the other studied molecules and lead to the formation of degradation compounds. Chiron et al. (2006) showed that direct photolysis of Cbz leads to the formation of acridine and acridone. In maturation ponds, humic substances in the wastewaters absorb light and allow the formation of singlet oxygen or hydrogen peroxide in tertiary ponds (Maynard et al. 1999), which could contribute to carbamazepine degradation and acridine formation. This degradation process probably occurred in the maturation ponds and could contribute to the increased acridine concentration observed at the pond effluent outlet. However acridine could be derived from other nonquantified sources such as aerosol deposition (Osborne et al. 1997).

The fate of carbamazepine, oxcarbazepine, and their metabolites in wastewater treatment involves different processes which occur together, such as glucuronide cleavage, along with some biotic and abiotic degradation, including sorption and photolysis. Studies under controlled conditions would be necessary to evaluate the importance of these different processes.

Our results show that metabolites were released in surface water associated with the parent compounds, some of them (e.g., DiOH-Cbz) in the micrograms per liter concentration range. This indicates that aquatic ecosystems are exposed to all of these molecules. In the published literature, environmental risk assessments have been carried out with respect to Cbz (Jones et al. 2002; Ferrari et al. 2003; Santos et al. 2007; Kim et al. 2007). The chronic toxicity of Cbz has been assessed in algae (*P. subcapitata*), rotifers (*B. calyciflorus*), ceriodaphnids (*C. dubia*), and fish (*D. rerio*) through standardized tests. Experimental lowest-observed-effect concentrations (LOECs) were between 100 and > 100,000 µg/L. No-observed-effect concentrations (NOECs) ranged from 25 to > 100,000 µg/L (Ferrari et al. 2003). Although Cbz concentrations in effluents and surface waters are lower than NOECs, the potential ecological risk cannot be ruled out. Ecotoxicity data are only available for Cbz. Note that in human toxicity processes, Cbz reactive metabolites were found to be involved in adverse side effects (Furst and Uetrecht 1993, 1995). This situation has been widely discussed with respect to human health but should now be assessed from an ecotoxicology viewpoint. Considering the concentrations found in STP effluents, it would be essential to conduct environmental risk assessments on major metabolites.

Acknowledgment This work was supported by the French Agency for Environmental and Occupational Health Safety, Programme de recherche Environnement-Santé-Travail 2007.

References

Bendz D, Paxeus NA, Ginn TR, Loge FJ (2005) Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden. J Hazard Mater 122:195–204. doi:10.1016/j.jhazmat.2005.03.012

Bleeker EAJ, Van der Geest HG, Klamer HJC, De Voogt P, Wind E, Kraak MHS (1999) Toxic and genotoxic effects of azaarenes: isomers and metabolites. Polycyclic Aromat Comp 13:191–203. doi:10.1080/10406639908020563

Breton H, Cociglio M, Bressolle F, Peyriere H, Blayac JP, Hillaire-Buys D (2005) Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry determination of carbamazepine, oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma. J Chromatogr B 828:80–90. doi:10.1016/j.jchromb.2005.09.019

Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R, Pomati F, Calamari D, Zuccato E (2006) Removal of pharmaceuticals in sewage treatments plants in Italy. Environ Sci Technol 40:357–363. doi:10.1021/es050991m

Chiron S, Minero C, Vione D (2006) Photodegradation process of the antiepileptic drug carbamazepine, relevant ro estuarine waters. Environ Sci Technol 40:5977–5983. doi:10.1021/es060502y

Clara M, Strenn B, Gans O, Martinez E, Kreuzinger N, Kroiss H (2005a) Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. Water Res 39:4797–4807. doi:10.1016/j.watres.2005.09.015

Clara M, Kreuzinger N, Strenn B, Gans O, Kroiss H (2005b) The solids retention time-a suitable design parameter to evaluate the

capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. Water Res 39:97–106. doi:10.1016/j.watres.2004.08.036
Comoretto L, Chiron S (2005) Comparing pharmaceutical and pesticide loads into a small Mediterranean river. Sci Total Environ 349:201–210. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.01.036
Ferrari B, Paxeus N, Lo Giudice R, Pollio A, Garric J (2003) Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. Ecotox Environ Safe 55:359–370. doi:10.1016/S0147-6513(02)00082-9
Furst SM, Uetrecht JP (1993) Carbamazepine metabolism to a reactive intermediate by the myeloperoxidase system of activated neutrophils. Biochem Pharmacol 45:1267–1275. doi:10.1016/0006-2952(93)90279-6
Furst SM, Uetrecht JP (1995) The effect of carbamazepine and its reactive metabolite, 9-acridine carboxaldehyde, on immune cell function in vitro. Int J Immunopharmacol 17:445–452. doi:10.1016/0192-0561(95)00019-X
Gomez MJ, Petrovic M, Fernandez-Alba AR, Barcelo D (2006) Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. J Chromatogr A 1114:224–233. doi:10.1016/j.chroma.2006.02.038
Gomez MJ, Martinez Bueno MJ, Lacorte S, Fernandez-Alba AR, Aguera A (2007) Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. Chemosphere 66:993–1002. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.07.051
Heberer T (2002) Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. J Hydrol 266:175–189. doi:10.1016/S0022-1694(02)00165-8
Hummel D, Löffler D, Fink G, Temes T (2006) Simultaneous determination of psychoactive drugs and their metabolites in aqueous matrices by liquid chromatography mass spectrometry. Environ Sci Technol 40:7321–7328. doi:10.1021/es061740w
Jones OAH, Voulvoulis N, Lester JN (2002) Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. Water Res 36:5013–5022. doi:10.1016/S0043-1354(02)00227-0
Jones OAH, Voulvoulis N, Lester JN (2007) The occurrence and removal of selected pharmaceutical compounds in a sewage treatment works utilising activated sludge treatment. Environ Pollut 145:738–744. doi:10.1016/j.envpol.2005.08.077
Joss A, Keller E, Alder AC, Gobel A, McArdell CS, Temes T, Siegrist H (2005) Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. Water Res 39:3139–3152. doi:10.1016/j.watres.2005.05.031
Kreuzinger N, Clara M, Strenn N, Kroiss H (2004) Relevance of the sludge retention time (SRT) as design criteria for wastewater treatment plants for the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals from wastewater. Water Sci Technol 50:149–156
Landmark CJ, Rytter E, Johannessen SI (2007) Clinical use of antiepileptic drugs at a referral centre for epilepsy. Seizure 16(4):356–364
Lertratanangkoon K, Horning MG (1982) Metabolism of carbamazepine. Drug Metab Dispos 10:1–10
Maggs JL, Pirmohamed M, Kitteringham NR, Park BK (1997) Characterization of the metabolites of carbamazepine in patient urine by liquid chromatography/mass spectrometry. Drug Metab Dispos 25:275–280
Maynard HE, Ouki SK, Williams SC (1999) Tertiary lagoons: a review of removal mechanisms and performance. Water Res 33:1–13. doi:10.1016/S0043-1354(98)00198-5
Miao XS, Metcalfe CD (2003) Determination of carbamazepine and its metabolites in aqueous samples using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. Anal Chem 75:3731–3738. doi:10.1021/ac030082k
Nakada N, Tanishima T, Shinohara H, Kiri K, Takada H (2006) Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. Water Res 40:3297–3303. doi:10.1016/j.watres.2006.06.039
Osborne PJ, Preston MR, Chen H (1997) Azaarenes in sediments, suspended particles and aerosol associated with the River Mersey estuary. Mar Chem 58(1–2):73–83. doi:10.1016/S0304-4203(97)00027-3
Picot B, Sambuco JP, Brouillet JL, Riviere Y (2005) Wastewater stabilization ponds: sludge accumulation, technical and financial study on desludging and sludge disposal case studies in France. Water Sci Technol 51:227–234
Santos JL, Aparicio I, Alonso E (2007) Occurrence and risk of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain). Environ Int 33:596–601. doi:10.1016/j.envint.2006.09.014
Scheytt T, Mersmann P, Lindstädt R, Heberer T (2005) Determination of sorption coefficients of pharmaceutically active substances carbamazepine, diclofenac, and ibuprofen, in sandy sediments. Chemosphere 60:245–253. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.12.042
Schütz H, Feldmann KF, Faigle JW, Kriemler HP, Winkler T (1986) The metabolism of ^{14}C-oxcarbazepine in man. Xenobiotica 16:769–778
Temes TA (1998) Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. Water Res 32:3245–3260. doi:10.1016/S0043-1354(98)00099-2
Temes TA, Kreckel P, Mueller J (1999) Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants. II. Aerobic batch experiments with activated sludge. Sci Total Environ 225:91–99. doi:10.1016/S0048-9697(98)00335-0
Vieno NM, Tuhkanen T, Kronberg L (2006) Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection. J Chromatogr A 1134:101–111. doi:10.1016/j.chroma.2006.08.077
Vieno N, Tuhkanen T, Kronberg L (2007) Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. Water Res 41:1001–1012. doi:10.1016/j.watres.2006.12.017
Williams CF, Williams CF, Andamsen FJ (2006) Sorption-desorption of carbamazepine from irrigated soils. J Environ Qual 35:1779–1783. doi:10.2134/jeq2005.0345
Kim Y, Choi K, Jung J, Park S, Kim PG, Park J (2007) Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. Environ Int 33:370–375. doi:10.1016/j.envint.2006.11.017

2. Résumé des résultats expérimentaux

La recherche comparative de la carbamazépine, de l'oxcarbazépine et de leurs métabolites a été réalisée en entrée et en sortie de 3 stations d'épuration utilisant des processus de traitement différents (boues activées STP1), lits bactériens (STP2) et lagunage (STP3)). Les résultats mettent en évidence une disparité non négligeable dans les différents modes de traitements des eaux usées. Les boues activées ont peu d'effet sur l'ensemble des métabolites, en particulier la carbamazépine n'est pratiquement pas dégradée alors que sa dégradation atteint plus de 70 % au cours des procédés de lagunage à longue rétention. Les procédés d'épuration par lits bactériens et lagunage modifient le profil des métabolites au cours du transfert, notamment les taux d'acridine augmentent. De façon générale, les taux rencontrés sont inférieurs aux seuls LOECs et NOELs connus, concernant la CBZ. Quand il peut être calculé (STP1 uniquement), les rapports des taux d'AI ou d'AO sur ceux de CBZ semblent plus élevés que dans le sang (facteur 10). Ce résultat doit être mis en perspective avec de nombreux facteurs : pouvoir concentrateur sélectif des voies d'excrétion, contribution de l'oxcarbazépine et d'autres sources d'AI, distribution au niveau des affluents…

L'exploitation plus approfondie des données se heurte aux limites des connaissances sur les actions biotiques et abiotiques possibles sur ces molécules : déconjugaison, adsorption et photolyse. Nous retiendrons essentiellement la présence de tous les métabolites recherchés sur la base des connaissances de pharmacologie humaine, notamment le 9ac, l'AI et l'AO, et l'existence d'une influence différentielle des différents procédés de traitement, donnant plus ou moins de temps à la photolyse en milieu oxygéné.

Les résultats de deux publications sont à citer en complément à propos de la dégradation de la CBZ en AI en milieu environnemental. Vogna et coll. (2004) ont montré que le traitement du CBZ-EP par le système UV/H_2O_2 provoque la formation d'AI et de ses dérivés 1- et 2- hydroxylés. Ils proposent ainsi une 10-hydroxylation radicalaire de la CBZ évoluant ensuite vers le CBZ-EP puis vers le 9-AI-ald pour former l'AI. Les travaux de l'équipe de Serge Chiron (2006) ont démontré qu'une photolyse directe de la CBZ conduit à l'AI, alors que les autres dérivés hydroxylés et oxydés nécessitent la présence du radical hydroxyle et les dérivés chlorés la présence d'ions chlorures et de fer(III) (réaction radicalaire mettant en jeu l'espèce $Cl^{\cdot}$ initiée par le fer[III]).

Septième partie : **Discussion générale**

1. Contribution à la connaissance des propriétés pharmaco-toxicologiques des métabolites sanguins acridiniques

Les dérivés acridiniques associés au métabolisme humain décrits dans la littérature sont le 9-hydroxyméthyl-10-carbamoylacridan (9ac) identifié au niveau plasmatique et urinaire, son glucuroconjugué, ainsi qu'un hydroxy-9-hydroxyméthyl-10-carbamoylacridan.

La formation d'acridine, d'acridone et des dérivés mono et di-chlorés de l'acridone a été démontrée *in vitro* à partir de la carbamazépine et de l'iminostilbène. La formation d'acridone à partir de l'époxydation de l'iminostilbène a également été décrite *in vitro* de même que la formation d'acridine à partir du CBZ-EP. Le réactif commun était toujours le peroxyde d'hydrogène.

Confirmant pour la première fois les données *in vitro*, nos résultats *ex vivo* démontrent la possibilité de formation sanguine d'acridone à partir du CBZ-EP, de l'iminostilbène et de l'acridine chez les patients épileptiques. Cette réaction est intense mais rapidement saturable, laissant penser à un épuisement du stock de réactif disponible, très compatible avec la notion d'une dégranulation des cellules à fonction bactéricide telles que les monocytes et les polynucléaires éosinophiles et neutrophiles. Le stimulus de dégranulation n'a pas été recherché mais la transduction est très rapide puisqu'en 30 minutes la réaction est achevée. Si on prend en considération à la fois l'aspect cinétique de l'apparition de l'hyperéosinophilie au cours du DRESS et l'hypothèse du rôle

initiateur de métabolites réactifs issus du métabolisme médié par les espèces de l'oxygène, force est d'écarter l'activité myéloperoxydasique des éosinophiles au profit de celle des polynucléaires majoritaires au stade initial. En revanche, au cours de l'état de DRESS, les spécificités de la myéloperoxydase éosinophile notamment en termes de production de l'oxygène singulet est à prendre en considération et peut être à l'origine d'un profil métabolique spécifique.

Le rapprochement des données obtenues à partir des profils métaboliques de patients traités par la CBZ ou l'OxCz semblent conduire à une séparation des voies métaboliques du 9ac et de son métabolite hydroxylé et la voie de l'acridine et de l'acridone. L'origine métabolique probable du 9ac semble être exclusivement la CBZ et/ou le CBZ-EP et son catabolisme passer par la conjugaison hépatique. L'origine évoquée de son dérivé hydroxylé à partir d'un hydroxy-DiOH-CBZ (**Figure 10**) semble également devoir être abandonnée par le même raisonnement, l'origine de ce dernier composé ne pouvant alors qu'être l'hydroxylation du 9ac. Ces conclusions sur la voie métabolique du 9ac semblent permettre de trancher et de compléter les hypothèses énoncées dans la quatrième partie à propos de l'influence de l'AV sur le métabolisme de la CBZ. L'AV inhiberait la formation du 9ac à partir du CBZ-EP (la pente b est d'ailleurs la plus forte, [**Tableau 17**] et seule la différence de pente de la régression entre les concentrations de 9ac et CBZ-EP est significative dans le sens d'un effet inhibiteur de l'AV [**Tableau 18**]) et donc serait agent candidat pour favoriser l'état de DRESS en orientant le métabolisme de la CBZ vers le même profil métabolique que celui observé au cours du DRESS (diminution des taux de 9ac). L'absence d'effet majeur de l'AV sur la fréquence de détection de l'AI ou de l'AO confirme une origine de ces composés indépendante de la voie du 9ac chez les patient non atteints de DRESS.

D'après les données *in vitro* de la littérature, l'AI et l'AO sont issues du 9-AI-ald, lui-même issu de la CBZ, du CBZ-EP ou de l'IM. Nos résultats plaident pour la possibilité d'une formation de l'AI et l'AO (et donc du 9-AI-ald) au niveau sanguin à partir du CBZ-EP et de l'IM, mais pas de la CBZ. En dehors d'une transformation hépatique de la CBZ en CBZ-EP et IM, une éventuelle formation d'AI et d'AO à partir de la CBZ pourrait requérir des voies d'activation immunologiques et/ou infectieuses supplémentaires.

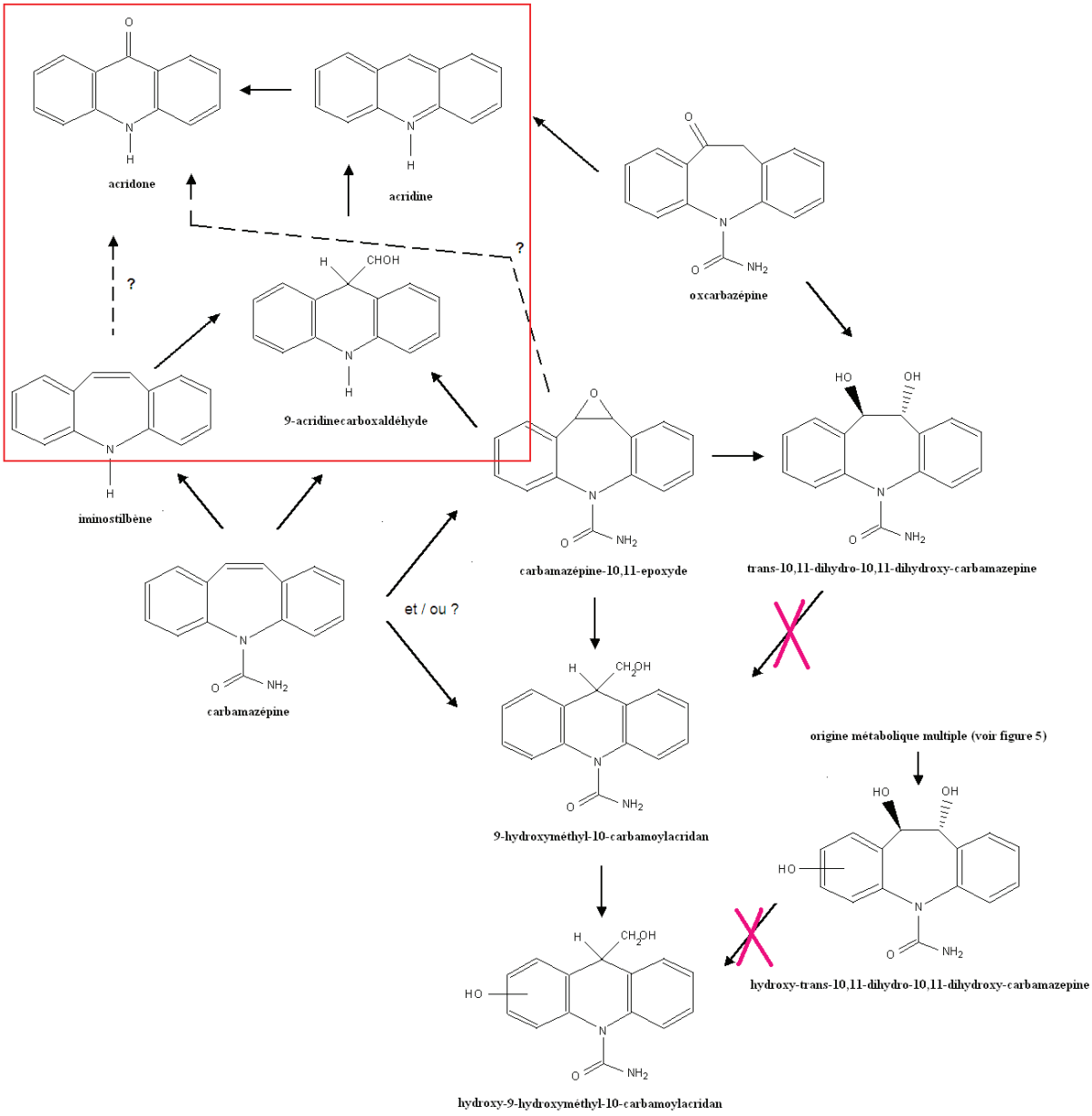
Nous avons montré que l'acridine est capable de stimuler la libération d'IL-5, ce qui n'est pas le cas de la CBZ, du CBZ-EP ni de l'IM. En revanche, toutes ces molécules stimulent la production d'IL-6, avec une activité néanmoins duale pour le CBZ-EP selon la concentration. L'analyse des données semble mettre en contradiction nos résultats cinétiques de formation de l'AI (troisième partie) et ceux obtenus lors de la stimulation immunologique (deuxième partie). En effet, d'une part la formation d'AO à partir du CBZ-EP et de l'IM est très rapide (30 minutes), d'autre part la production d'IL-5 n'est observée après 3 heures d'incubation qu'avec l'AI alors que ses précurseurs ont eu le temps de former l'AI. Deux explications peuvent lever cette contradiction. D'abord, comme l'indique le **Tableau 10**, un effet seuil régit la stimulation d'IL-5 puisque seul le niveau haut testé (33 µM) d'AI permet une production significative. Ensuite la cinétique de formation sanguine d'AO est intense et complète, l'AI étant un intermédiaire transitoire. Ainsi, la production sanguine d'AI à partir de CBZ-EP et d'IM est sûrement insuffisante pour stimuler la production d'IL-5 dans des conditions thérapeutiques bien tolérées par le patient.

De façon surprenante, chez les patients atteints de DRESS le ratio de la fréquence de présence de l'AI et de l'AO est inversé par rapport aux patients non hypersensibles. Cette observation, mise en regard des données *ex vivo* indiquant une formation

exclusive d'AO, force à penser que la filiation AI/AO pourrait ne pas décrire la réalité métabolique. Autrement dit, si l'AI peut générer de l'AO, l'origine métabolique de l'AO pourrait également contourner cet intermédiaire. Un argument possible peut être trouvé dans les résultats de la quatrième partie. Le **Tableau 20** présente des proportions remarquablement voisines entre les profils métaboliques des patients traités par CBZ en monothérapie ou en bithérapie par CBZ-AV. Dans ce contexte, deux anomalies attirent l'attention : les proportions de 3-OH-CBZ et d'AO qui évoluent en sens opposés comme si l'AV détournait une partie de la voie du 3-OH-CBZ au profit de celle de l'AO. De façon intéressante, les pourcentages d'AI sont en revanche très peu modifiés. Cette hypothèse reste cependant entièrement à démontrer.

En conclusion, la voie métabolique des dérivés acridiniques reste obscure **Figure 24**. Deux sous-voies semblent pouvoir être séparées à présent: celle du 9ac et celle du 9-AI-ald. Ces deux composés différant du degré d'oxydation de la fonction alcool/aldéhyde (mais pas uniquement), un croisement de ces voies n'est pas à exclure dans des conditions physiopathologiques particulières modifiant le potentiel oxydo-réducteur sanguin. Par ailleurs, bien que la formation d'AO soit démontrée à partir d'AI, il n'est pas impossible que cette formation ne passe pas exclusivement par l'AI expliquant la plus grande fréquence de présence de l'AI par rapport à l'AO chez les patients traités par CBZ ou OxCz non hypersensibles alors que l'AI semble un intermédiaire transitoire dans nos données expérimentales. A l'inverse en milieu très oxydatif non exploré ici, on peut là encore supposer une oxydation complète de l'AI en AO comme l'oxydation du 9ac en 9-AI-ald, l'ensemble augmentant la fréquence de présence de l'AO par rapport à l'AI.

Figure 24 - Origines métaboliques des dérivés acridiniques tenant compte de nos conclusions. La partie du schéma encadrée correspond aux biotransformations ne mettant en jeu que l'équipement métabolique sanguin reposant sur le système myéloperoxydasique. Les flèches en pointillées associées à un point d'interrogation sont des hypothèses pour expliquer les variations dans les proportions d'AI et d'AO observées. Les flèches pleines barrées correspondent aux hypothèses de la littérature infirmées par nos observations.



2. Autres molécules médicamenteuses pouvant générer des dérivés acridiniques

La place des dérivés acridiniques dans le métabolisme des médicaments mérite d'être davantage explorée. En premier lieu au titre de leur implication potentielle dans la physiopathologie des réactions d'hypersensibilité et des possibles réactions croisées, mais également, en raison du potentiel toxique intrinsèque à l'acridine, au titre du rejet environnemental des composés thérapeutiques. A l'occasion de l'accueil d'une élève ingénieur-chimiste, Emeline LAURENT, il a été possible d'identifier un certain nombre de composés thérapeutiques candidats pour être des précurseurs potentiels de dérivés acridiniques et d'évaluer la faisabilité chimique de la formation d'acridine.

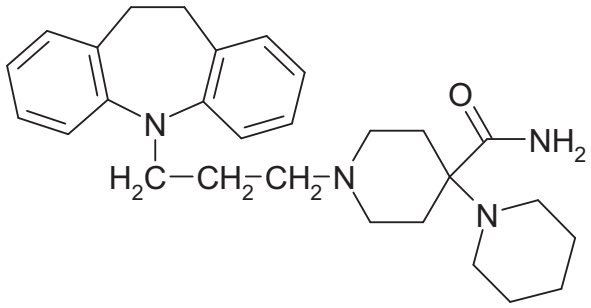
2.1. Dérivés directs de la carbamazépine et de l'oxcarbazépine

L'eslicarbazépine a été inscrite sur la liste I des substances vénéneuses mais ne dispose pas d'AMM en France à ce jour (Journal Officiel de la république française du 2 février 2010). Cette molécule est en revanche commercialisée en Europe sous les noms de spécialité ZEBINIX® et EXALIEF®. Il s'agit simplement de l'énantiomère actif du métabolite actif de l'oxcarbazépine, c'est-à-dire la S-10-hydroxy-carbamazépine, la formation d'AI et d'AO est donc attendue mais non documentée.

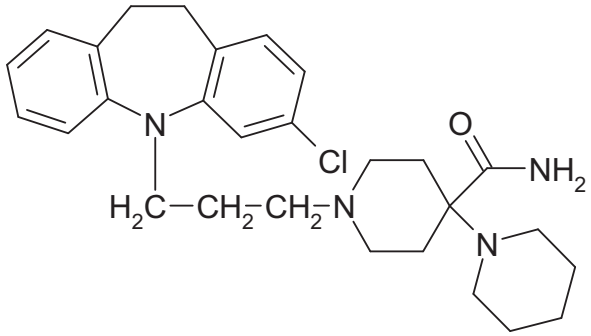
2.2. Molécules possédant un squelette chimique proche de celui de la carbamazépine

On peut citer :

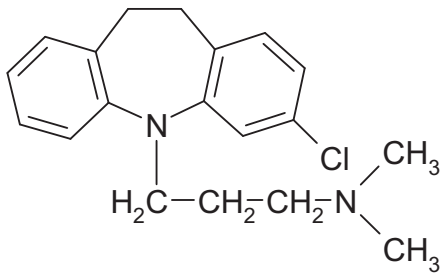
La carpipramine (PRAZINIL®, antipsychotique désinhibiteur):



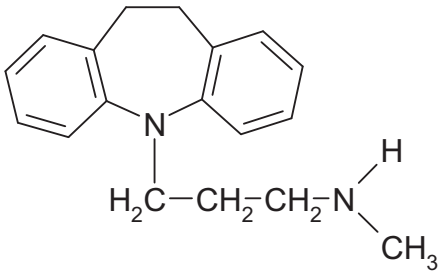
La clocapramine (antipsychotique désinhibiteur non commercialisé en France):



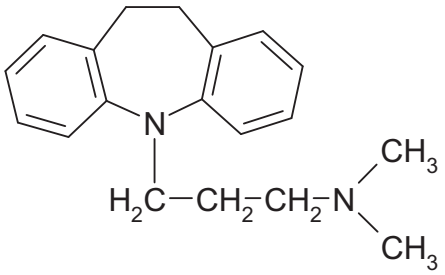
La clomipramine (ANAFRANIL®, antidépresseur tricyclique) :



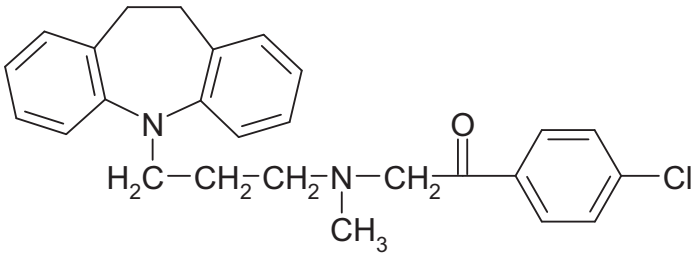
La désipramine (spécialité retirée PERTOFRAN®, antidépresseur tricyclique) :



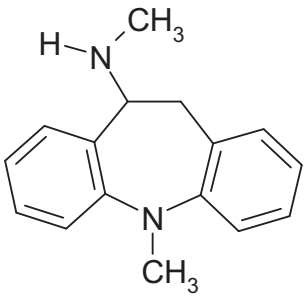
L'imipramine (TOFRANIL®, antidépresseur tricyclique) :



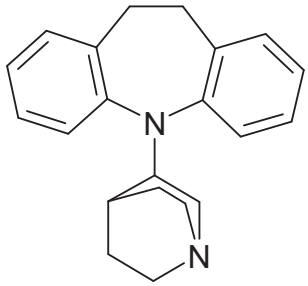
La lofépramine (antidépresseur tricyclique commercialisé en Europe mais pas en France) :



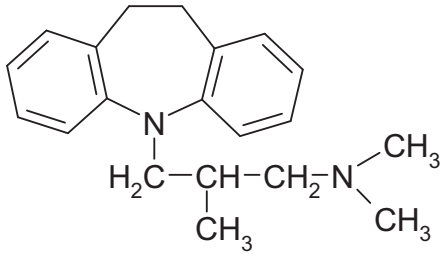
La métapramine (spécialité TIMAXEL® retirée en France en 1992, antidépresseur tricyclique) :



La quinupramine (spécialité KINUPRIL® retirée en France en 2000, antidépresseur tricyclique) :



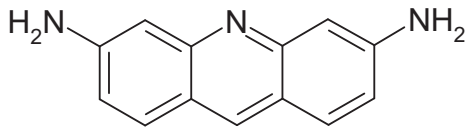
La trimipramine (spécialité SURMONTIL®, antidépresseur tricyclique) :



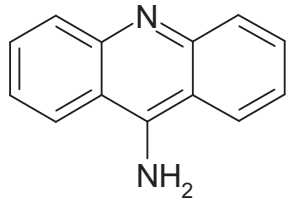
La décomposition de la carbamazépine et de l'oxcarbazépine en acridine est due à la présence d'une part d'un groupement carbonyle greffé à l'azote du cycle à sept carbones, et d'autre part à la grande réactivité de ce même cycle due à la double liaison carbone-carbone de la carbamazépine ou à la fonction carbonyle de l'oxcarbazépine. Aucun des autres composés ciblés dans cette catégorie ne possède ces deux caractéristiques, empêchant ainsi leur décomposition en acridine.

2.3. Molécules possédant déjà le noyau acridine

L'acriflavine (spécialité CHROMARGON®, antiseptique local)



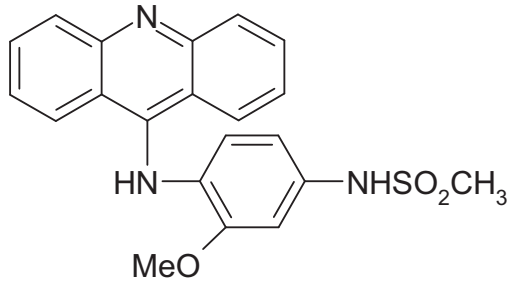
et l'acrisorcine (ancienne association antifongique contenant la 9-amino-acridine)



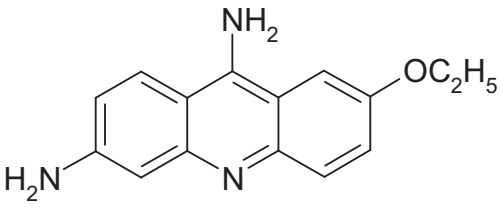
semblent chimiquement aptes à se dégrader en acridine.

Les autres molécules de cette catégorie présentées ci-dessous ne se décomposent que partiellement :

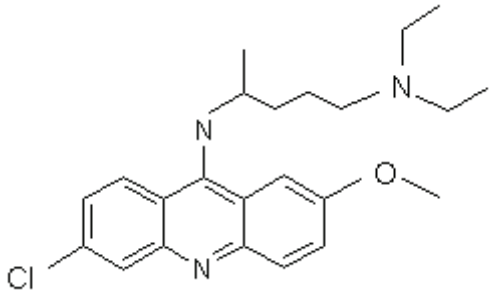
L'amsacrine, anticancéreux inhibiteur de la topoisomérase II (AMSALYO®):



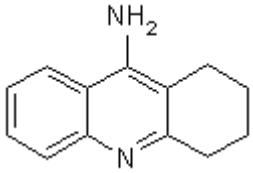
L'éthacridine (antiseptique présent dans la pâte dentifrice PYOREX®) :



La mépacrine (ou quinacrine, antiparasitaire distribué par l'AP-HP contre les giardiases résistantes au métronidazole mais également à l'essai dans le traitement du variant de Creutzfeldt-Jakob) :



La tacrine, dérivé du noyau acrine (spécialité COGNEX® retirée en France en 2004, inhibiteur de l'acétylcholine estérase indiqué dans la maladie d'Alzheimer) :



En définitive, il n'y a donc que peu de médicaments susceptibles de se métaboliser en acridine. On retrouve la carbamazépine et l'oxcarbazépine, et un certain nombre d'antiseptiques et antifongiques. Ainsi, la carbamazépine et l'oxcarbazépine sont les seuls médicaments pris sur le long terme et se métabolisant en acridine.

3. Métabolisme oxydatif de la carbamazépine et effets indésirables de type hypersensibilité

Les données de la littérature font état de travaux importants concernant les pistes physiopathologiques mettant en jeu la carbamazépine elle-même (ou l'oxcarbazépine) via l'hypothèse du p-i concept, la formation d'adducts via les dérivés 2- et/ou 3-hydroxylés ou via la voie du 9-AI-ald. Une façon de discriminer les voies les plus impliquées dans l'étiologie des réactions d'hypersensibilité est de tenir compte de l'existence des réactions croisées d'hypersensibilité. En laissant de côté la voie étiologique des molécules mères reposant sur le p-i concept, il reste à considérer les métabolites réactifs potentiels. Nos données relatives aux métabolites sanguins circulants de l'OxCz indiquent que la 10-OH-CBZ, la DiOH-CBZ, la 2-OH-CBZ, la 3-OH-CBZ, l'AI et l'AO sont des métabolites communs à la CBZ et à l'OxCz pouvant être à l'origine de la réactivité croisée. L'implication du CBZ-EP, de l'IM et du 9ac semblent plus douteuse puisque ces composés sont spécifiques de la CBZ. Les dérivés hydroxylés peuvent avoir une origine métabolique mixte et conduire à des adducts sur les CYP à l'origine de leur formation ou à des espèces radicalaires lorsque leur formation passe par les espèces réactives de l'oxygène. Concernant les dérivés acridiniques, seule la voie métabolique mettant en jeu les espèces réactives de l'oxygène formées au niveau sanguin est à présent documentée chez l'homme, le métabolite réactif potentiel étant le 9-AI-ald.

Parce que plus explorée, la voie des dérivés hydroxylés a une certaine avance et a un pouvoir explicatif potentiel supérieur car elle pourrait expliquer les réactivités croisées avec la phénytoïne sur un plan épitopique. Cependant aucune voie ne peut être exclue ni être favorisée sur la base d'une exploration mécanistique complète restant encore à faire.

L'explication épitopique si séduisante soit-elle pour expliquer les réactions croisées trouve ses limites dans la diversité chimique des molécules impliquées dans un syndrome pourtant assez restrictif tel que le DRESS. Il semble donc qu'il y ait un autre aspect dans le niveau d'activation immunologique qui est encore à l'état de concept dans l'hypothèse du signal danger. L'activité stimulante de la CBZ et d'une partie de ses métabolites sur la production de cytokines est peut-être une voie de réponse. Le retrait de la molécule suivi de la disparition complète des signes cliniques aigus est en faveur du concept immunologique classique associant disparition de l'antigène stimulant et retour à l'état quiescent du système immunitaire. Mais cette séquence clinique ne contredit pas l'hypothèse d'une activité immunostimulante propre de la molécule. Ainsi plus un agent thérapeutique possède un profil immunostimulant favorisant l'élévation du signal danger, plus il a la potentialité de créer une réaction d'hypersensibilité. Dans l'hypothèse d'une sommation du signal dans le temps, un peu à la manière d'un potentiel d'action nerveux appliqué à l'immunologie, le potentiel activateur serait plus important pour une molécule stimulante de demi-vie lente et/ou dont l'activité stimulante pourrait être prolongée par ses métabolites doués des mêmes propriétés. Dans le cas de la CBZ, la molécule mère comme ses métabolites stimule directement et à court-terme l'IL-6 entraînant une élévation durable d'un signal immunologique. Dans cette théorie, la formation de néoantigène reste contributive expliquant certaines réactions croisées par voie métabolique conduisant à des néoantigènes communs mais encore davantage le raccourcissement du délai d'apparition des manifestations cliniques observées après réadministration de la molécule après une première réaction d'hypersensibilité. L'activité immunomodulatrice des antiépileptiques probablement constitutive d'une partie de leur activité thérapeutique pourrait alors justifier le lien étroit entre ces médicaments et les réactions

d'hypersensibilité. L'AV pourrait jouer un double rôle dans ce contexte. D'abord, par son rôle inhibiteur enzymatique il peut modifier le profil métabolique vers des composés soutenant davantage l'augmentation du potentiel d'action immunologique. Ensuite, il est lui-même un stimulant de la production d'IL-5 et peut contribuer à abaisser le seuil de déclenchement de la réaction immunologique hypersensible. L'association LAMO-AV donne lieu à une forte élévation du risque d'apparition d'une réaction d'hypersensibilité de type DRESS syndrome. Longtemps le métabolisme de la lamotrigine a été résumé à une voie unique très majoritaire alimentant l'hypothèse de la responsabilité de la molécule mère elle-même dans les réactions d'hypersensibilité, et confirmant ainsi la validité du p-i concept. La découverte récemment publiée (Chen et coll., 2010) d'une voie métabolique minoritaire impliquant un époxyde permet d'appliquer plus légitimement la théorie des métabolites réactifs à la lamotrigine. Comme pour la CBZ, l'AV pourrait favoriser la durée de vie de l'époxyde potentiellement immunologiquement actif et contribuer à l'activation immunologique via la stimulation d'IL-5. L'apparition de DRESS favorisée par une escalade des doses trop rapide peut également être lue comme une saturation de la voie principale au profit de la voie de l'époxyde.

L'activation ou la réactivation virale plus ou moins associée, ou constitutive selon les auteurs, des réactions d'hypersensibilité, concourrait au même mécanisme d'élévation du potentiel d'action immunologique et contribuerait à l'effet mémoire pouvant générer une contribution immunologique stimulante en cas d'expression des antigènes viraux. Ainsi le caractère délétère de l'arrêt précoce de la corticothérapie au cours du traitement d'un syndrome d'hypersensibilité pourrait se lire ainsi. La corticothérapie limite l'hyperactivité immunologique tout en étant permissive pour l'expressivité virale. Ainsi l'arrêt précoce de la chimiothérapie immunosuppressive n'ayant pas permis une baisse

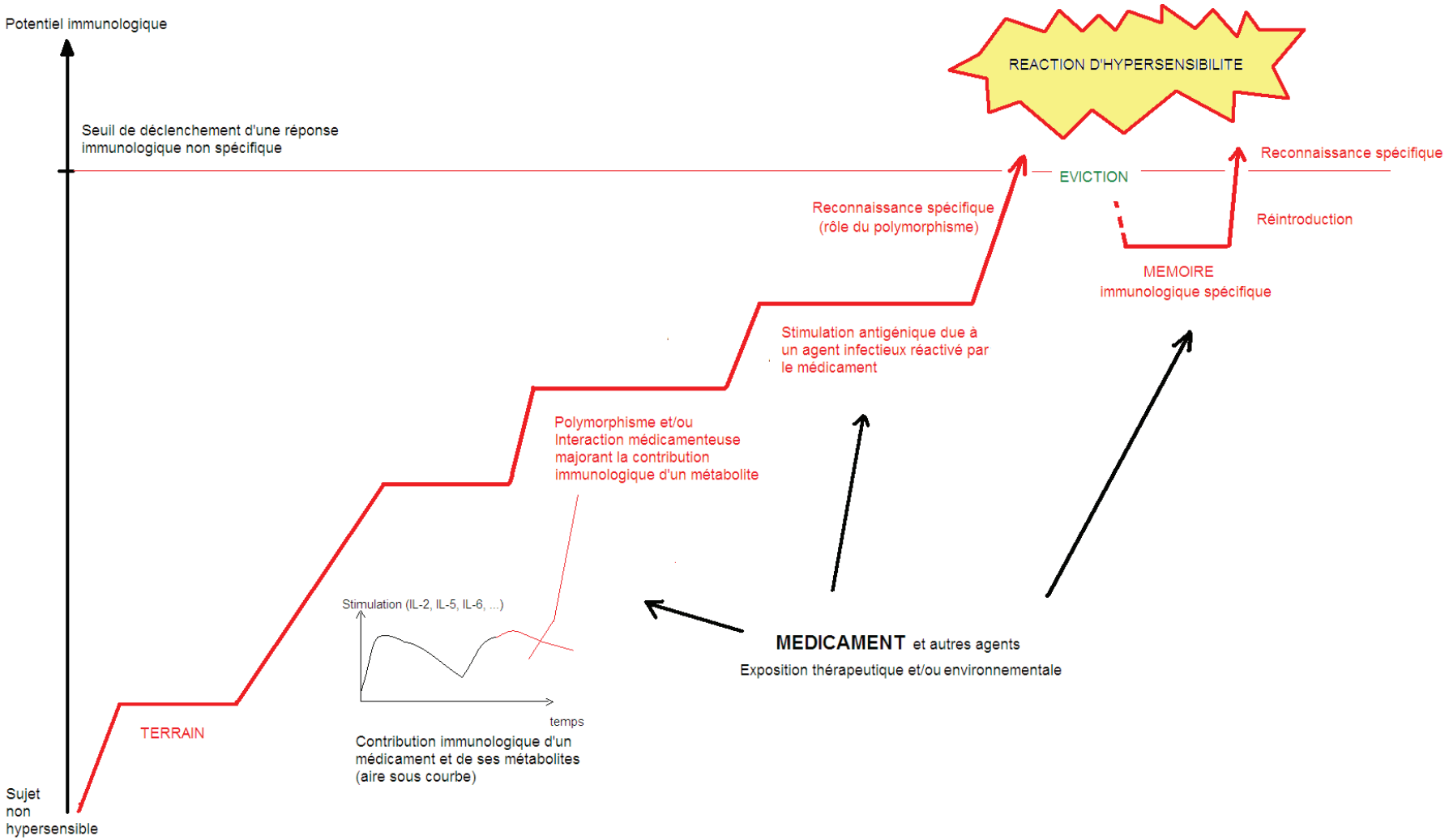
suffisante du potentiel d'action immunologique, le système immunitaire est toujours incapable de cibler efficacement les antigènes viraux et, sitôt déréprimé, il reprend son action toxique non sélective du NON-SOI avec une amplification de son action due à l'augmentation des signaux stimulants par l'antigénicité des particules virales. Tant que la corticothérapie n'a pas permis d'abaisser le potentiel d'action à un seuil suffisant pour rendre le système immunitaire discriminant et efficace contre les antigènes viraux, l'arrêt est délétère et la séquence de réactivation virale peut avoir lieu comme décrit dans la littérature.

Ainsi les données contradictoires de la littérature sur l'orientation Th1 ou Th2 révèleraient la dualité des mécanismes effecteurs mis en jeu selon l'orientation de la résultante des stimuli immunologiques contribuant au potentiel d'action immunologique. L'orientation de la résultante effectrice pourrait être différente d'un patient à l'autre d'où des symptomatologies cliniques très différentes selon les patients mais la polarisation traduite en mécanismes effecteurs en s'inscrivant dans la mémoire immunologique figerait la reproduction symptomatologique du syndrome premier. La prédisposition génétique observée avec certaines molécules s'inscrit bien dans le modèle. Une reconnaissance antigénique facilitée par une molécule de CMH de classe I comme le HLA-B*1502 semble très propice à une orientation Th1 et explique bien la fréquence de SJS/TEN augmentée dans les populations porteuses de l'allèle.

L'hypothèse proposée reposant sur le concept du signal danger s'inscrirait donc dans l'école des « mergers » puisque le mécanisme initiateur est commun pour des conséquences différentes. Toutefois il est plus difficile de rendre compte des syndromes tardifs tels que les pseudo-lymphomes qu'il faudrait peut-être classer à part.

D’après cette lecture des données pharmacologiques humaines, l’exposition environnementale de l’homme aux métabolites libérés et plus ou moins dégradés par les procédés de traitement des eaux usées, est à prendre en considération bien que les concentrations mesurées soient quantitativement négligeables à un instant donné. La concentration dans l’eau n’est d’ailleurs pas la donnée à prendre en considération puisque le cycle de l’eau implique une « distillation » et donc une purification vis-à-vis des molécules organiques médicamenteuses. En revanche la bioaccumulation et la consommation d’organismes aquatiques (poissons, coquillages mais aussi les agents techniques agroalimentaires d’origine algale) peut conduire à l’absorption de composés immunologiquement actifs en quantités importantes. On ne peut alors exclure qu’une consommation chronique ou des phénomènes de bioaccumulation humaine des composés issus de la CBZ et de nombreux autres médicaments consommés à grande échelle ne contribuent à l’élévation du potentiel d’action immunologique (arguant en faveur de la notion de "dose-cumulée" comme cela a déjà été décrit dans d'autres pathologies d'origine médicamenteuse). La **Figure 25** montre une représentation schématique tentant d’intégrer les différents éléments de cette discussion.

Figure 25 - Représentation schématique de la contribution cumulative des différents acteurs impliqués dans l'élévation du potentiel immunologique.



CONCLUSION

A la différence des effets indésirables prévisibles et dose-dépendants qui sont expliqués par les propriétés pharmacodynamiques d'une substance médicamenteuse, les hypothèses mécanistiques des réactions d'hypersensibilité font appel à une réactivité imprévisible de l'organisme à des agents dont la nature importe plus que leur abondance. Ce type de réaction fait également appel à la notion de terrain atopique pour rendre compte d'une susceptibilité particulière à développer des manifestations d'hypersensibilité à l'endroit de substances bien tolérées par la majorité des personnes exposées. Nos travaux explorant une voie métabolique minoritaire de la carbamazépine, celle des dérivés acridiniques, nous ont conduits à nous interroger sur les propriétés d'activation immunologique propres de ces métabolites, qui peuvent se cumuler entre elles au cours du devenir de la carbamazépine dans l'organisme, mais aussi à l'influence des co-médications telles que l'acide valproïque pour augmenter le niveau d'activation immunologique basal. Les voies métaboliques sanguines objectivées ici mettent en jeu à la fois des enzymes comme la myéloperoxydase impliquée dans la défense innée, mais également la génération de métabolites à proximité de cellules de l'immunité acquise. En s'appuyant sur le concept du signal danger, un lien immunologique entre un organisme placé à un niveau d'alerte élevé (terrain atopique) et une réactivité exagérée à un agent étranger a été entrevu. Le terme même d'hypersensibilité apparaît alors bien choisi, même si les éléments contributifs à la constitution de ce niveau d'hypersensibilité restent mystérieux. Des prédispositions génétiques ont été identifiées dans la littérature, sélectionnant peut-être le type de mécanismes immunologiques effecteurs et donc la manifestation clinique préférentielle liée à l'état sous-jacent d'hypersensibilité. Au-delà de l'étincelle causée par une intervention thérapeutique médicamenteuse pouvant initier l'embrasement immunologique, les données environnementales d'apparition récente

laissent entrevoir une exposition chronique probable à un grand nombre de composés chimiques d'origine pharmaceutique potentiellement immunologiquement stimulants. Peut-être faut-il y voir une des explications à l'augmentation de la prévalence des personnes "allergiques" par une élévation progressive du potentiel immunologique de base de la population ? Si cette hypothèse est exacte, une élévation de l'incidence des réactions d'hypersensibilité est à craindre en monothérapie mais davantage encore en cas de polythérapie, à l'image du risque augmenté de développer une réaction d'hypersensibilité par l'association thérapeutique acide valproïque-lamotrigine et, d'après nos travaux, probablement de l'association thérapeutique acide valproïque-carbamazépine. De façon stimulante pour le pharmacologue, la prévention des interactions médicamenteuses à risque de réactions d'hypersensibilité reviendrait, mais à un degré supérieur d'exhaustivité, à l'analyse pharmacologique classique se basant sur les connaissances pharmacodynamiques (propriétés immunologiques propres des molécules thérapeutiques et de tous leurs métabolites) et pharmacocinétiques (voie métabolique complète incluant les métabolites quantitativement minoritaires, inhibition/majoration des voies générant des métabolites chimiquement réactifs mais aussi immunologiquement actifs sur les cytokines) des molécules candidates à l'association thérapeutique. Les données de pharmacogénétique, associées à des marqueurs immunologiques du potentiel immunologique basal restant à déterminer, permettraient de surcroît de mieux cerner les populations à risques. L'apparition d'une dose-dépendance (cumul de stimuli immunologiques issus de la molécule mère et/ou de ses métabolites) ferait alors glisser les réactions d'hypersensibilités médicamenteuses du type B au profit du type A, et par là-même permettrait de leur appliquer, au moins en partie, le terme "prévisible".

Références Bibliographiques (257 références)

Ahmad N, Mukhtar H. Cytochrome p450: a target for drug development for skin diseases. J Invest Dermatol (2004) 123(3):417-425.

Aihara Y, Ito SI, Kobayashi Y, Yamakawa Y, Aihara M, Yokota S. Carbamazepine-induced hypersensitivity syndrome associated with transient hypogammaglobulinaemia and reactivation of human herpesvirus 6 infection demonstrated by real-time quantitative polymerase chain reaction. Br J Dermatol (2003) 149(1):165-169.

Aihara Y, Ito S, Aihara M, Kobayashi Y, Yokota S. Different patterns of cytokines, ECP and immunoglobulin profiles at two adverse drug reactions in a patient. Pediatr Int (2005) 47(6):616-621.

Al-Omar M, El-Subbagh HI, Beedham C, Smith J. Role of molybdenium hydroxylases in diseases. Saudi Pharm J (2005) 13(1):1-13.

Alberti P, Ren J, Teulade-Fichou MP, Guittat L, Riou JF, Chaires J, Hélène C, Vigneron JP, Lehn JM, Mergny JL. Interaction of an acridine dimer with DNA quadruplex structures. J Biomol Struct Dyn (2001) 19(3):505-513.

Alfirevic A, Jorgensen AL, Williamson PR, Chadwick DW, Park BK, Pirmohamed M. HLA-B locus in Caucasian patients with carbamazepine hypersensitivity. Pharmacogenomics (2006a) 7(6):813-818.

Alfirevic A, Mills T, Harrington P, Pinel T, Sherwood J, Jawaid A, Smith JC, March RE, Barratt BJ, Chadwick DW, Kevin Park B, Pirmohamed M. Serious carbamazepine-induced hypersensitivity reactions associated with the HSP70 gene cluster. Pharmacogenet Genomics (2006b) 16(4):287-296.

Allen RC. Role of oxygen in phagocyte microbicidal action. Environ Health Perspect (1994) 102 Suppl 10:201-208.

Amacher DE. Reactive intermediates and the pathogenesis of adverse drug reactions: the toxicology perspective. Curr Drug Metab (2006) 7(3):219-229.

Amore BM, Kalhorn TF, Skiles GL, Hunter AP, Bennett GD, Finnell RH, Nelson SD, Slattery JT. Characterization of carbamazepine metabolism in a mouse model of carbamazepine teratogenicity. Drug Metab Dispos (1997) 25(8):953-962.

Andersen JM, Myhre O, Aarnes H, Vestad TA, Fonnum F. Identification of the hydroxyl radical and other reactive oxygen species in human neutrophil granulocytes exposed to a fragment of the amyloid beta peptide. Free Radic Res (2003) 37(3):269-279.

Andreasen AH, Brøsen K, Damkier P. A comparative pharmacokinetic study in healthy volunteers of the effect of carbamazepine and oxcarbazepine on cyp3a4. Epilepsia (2007) 48(3):490-496.

Aota N, Hirahara K, Kano Y, Fukuoka T, Yamada A, Shiohara T. Systemic lupus erythematosus presenting with Kikuchi-Fujimoto's disease as a long-term sequela of drug-induced hypersensitivity syndrome. A possible role of Epstein-Barr virus reactivation. Dermatology (2009) 218(3):275-277.

Aota N, Shiohara T. Viral connection between drug rashes and autoimmune diseases: how autoimmune responses are generated after resolution of drug rashes. Autoimmun Rev (2009) 8(6):488-494.

Aouam K, Bel Hadj Ali H, Youssef M, Chaabane A, Amri M, Boughattas NA, Zili JE Carbamazepine-induced DRESS and HHV6 primary infection: the importance of skin tests. Epilepsia (2008) 49(9):1630-1633.

Aouam K, Ben Romdhane F, Loussaief C, Salem R, Toumi A, Belhadjali H, Chaabane A, Boughattas NA, Chakroun M. Hypersensitivity syndrome induced by anticonvulsants: possible cross-reactivity between carbamazepine and lamotrigine. J Clin Pharmacol (2009) 49(12):1488-1491.

Arellano F, Sacristán JA. Allopurinol hypersensitivity syndrome: a review. Ann Pharmacother (1993) 27(3):337-343.

Arévalo-Lorido JC, Carretero-Gómez J, Bureo-Dacal JC, Montero-Leal C, Bureo-Dacal P. Antiepileptic drug hypersensitivity syndrome in a patient treated with valproate. Br J Clin Pharmacol (2003) 55(4):415-416.

Barbaud A. Patch-tests médicamenteux dans l'exploration des toxidermies. Ann Dermatol Venereol (2009a) 136(8-9):635-644.

Barbaud A. Skin testing in delayed reactions to drugs. Immunol Allergy Clin North Am (2009b) 29(3):517-535.

Beeler A, Engler O, Gerber BO, Pichler WJ. Long-lasting reactivity and high frequency of drug-specific T cells after severe systemic drug hypersensitivity reactions. J Allergy Clin Immunol (2006) 117(2):455-462.

Begon E, Roujeau JC. [Drug hypersensitivity syndrome: DRESS (Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms)]. Ann Dermatol Venereol (2004) 131(3):293-297.

Bennett GD, Amore BM, Finnell RH, Wlodarczyk B, Kalhorn TF, Skiles GL, Nelson SD, Slattery JT. Teratogenicity of carbamazepine-10, 11-epoxide and oxcarbazepine in the SWV mouse. J Pharmacol Exp Ther (1996) 279(3):1237-1242.

Bergström MA, Ott H, Carlsson A, Neis M, Zwadlo-Klarwasser G, Jonsson CA, Merk HF, Karlberg AT, Baron JM. A skin-like cytochrome P450 cocktail activates prohaptens to contact allergenic metabolites. J Invest Dermatol (2007) 127(5):1145-1153.

Bernus I, Dickinson RG, Hooper WD, Eadie MJ. Dose-dependent metabolism of carbamazepine in humans. Epilepsy Res (1996a) 24(3):163-172.

Bernus I, Dickinson RG, Hooper WD, Eadie MJ (1996b) The mechanism of the carbamazepine-valproate interaction in humans. Br J Clin Pharmacol 44(1):21-27.

Bernus I, Hooper WD, Dickinson RG, Eadie MJ. Effects of pregnancy on various pathways of human antiepileptic drug metabolism. Clin Neuropharmacol (1997) 20(1):13-21.

Beyer C, Spiteller G. A new carbamazepine metabolite in uraemic filtrate. Xenobiotica (1992) 22(8), 1029-1035.

Blanca M, Posadas S, Torres MJ, Leyva L, Mayorga C, Gonzalez L, Juarez C, Fernández J, Santamaria LF. Expression of the skin-homing receptor in peripheral blood lymphocytes from subjects with nonimmediate cutaneous allergic drug reactions. Allergy (2000) 55(11):998-1004.

Boccara O, Valeyrie-Allanore L, Crickx B, Descamps V. Association of hypogammaglobulinemia with DRESS (Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms). Eur J Dermatol (2006) 16(6):666-668.

Bocquet H, Bagot M, Roujeau JC. Drug-induced pseudolymphoma and drug hypersensitivity syndrome (Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms: DRESS). Semin Cutan Med Surg (1996) 15(4):250-257.

Bosdure E, Cano A, Roquelaure B, Reynaud R, Boyer M, Viard L, Sarles J. Oxcarbazépine et syndrome DRESS : un cas pédiatrique révélé par une hépatite fulminante. Arch Pediatr (2004) 11(9):1073-1077.

Boufidou F, Nikolaou C, Alevizos B, Liappas IA, Christodoulou GN. Cytokine production in bipolar affective disorder patients under lithium treatment. J Affect Disord (2004) 82(2):309-313.

Breton H, Cociglio M, Bressolle F, Peyriere H, Blayac JP and Hillaire-Buys D. Liquid chromatography - electrospray mass spectrometry determination of carbamazepine, oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci (2005) 828:80-90.

Bu HZ, Kang P, Deese AJ, Zhao P, Pool WF. Human in vitro glutathionyl and protein adducts of carbamazepine-10,11-epoxide, a stable and pharmacologically active metabolite of carbamazepine. Drug Metab Dispos (2005) 33(12):1920-1924.

Bu HZ, Zhao P, Dalvie DK, Pool WF. Identification of primary and sequential bioactivation pathways of carbamazepine in human liver microsomes using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom (2007) 21(20):3317-3322.

Burkhart C, von Greyerz S, Depta JP, Naisbitt DJ, Britschgi M, Park KB, Pichler WJ. Influence of reduced glutathione on the proliferative response of sulfamethoxazole-

specific and sulfamethoxazole-metabolite-specific human CD4+ T-cells. Br J Pharmacol (2001) 132(3):623-630.

Castro-Giner F, Künzli N, Jacquemin B, Forsberg B, de Cid R, Sunyer J, Jarvis D, Briggs D, Vienneau D, Norback D, González JR, Guerra S, Janson C, Antó JM, Wjst M, Heinrich J, Estivill X, Kogevinas M. Traffic-related air pollution, oxidative stress genes, and asthma (ECHRS). Environ Health Perspect (2009) 117(12):1919-1924.

Cengiz M, Yüksel A, Seven M. The effects of carbamazepine and valproic acid on the erythrocyte glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and serum lipid peroxidation in epileptic children. Pharmacol Res((2000) 41(4):423-425.

ChaikenBH, Goldberg BI, Segal JP. Dilantin sensitivity; report of a case of hepatitis with jaundice, pyrexia and exfoliative dermatitis. N Engl J Med (1950) 242(23):897-898.

Chen H, Grover S, Yu L, Walker G, Mutlib A. Bioactivation of lamotrigine in vivo in rat and in vitro in human liver microsomes, hepatocytes, and epidermal keratinocytes: characterization of thioether conjugates by liquid chromatography/mass spectrometry and high field nuclear magnetic resonance spectroscopy. Chem Res Toxicol (2010) 23(1):159-170.

Chessman D, Kostenko L, Lethborg T, Purcell AW, Williamson NA, Chen Z, Kjer-Nielsen L, Mifsud NA, Tait BD, Holdsworth R, Almeida CA, Nolan D, Macdonald WA, Archbold JK, Kellerher AD, Marriott D, Mallal S, Bharadwaj M, Rossjohn J, McCluskey J. Human leukocyte antigen class I-restricted activation of CD8+ T cells provides the immunogenetic basis of a systemic drug hypersensitivity. Immunity (2008) 28(6):822-832.

Chiou CC, Yang LC, Hung SI, Chang YC, Kuo TT, Ho HC, Hu S, Hong HS, Chung WH. Clinicopathological features and prognosis of drug rash with eosinophilia and systemic symptoms: a study of 30 cases in Taiwan. J Eur Acad Dermatol Venereol (2008) 22(9):1044-1049.

Chiron S, Minero C, Vione D. Photodegradation processes of the antiepileptic drug carbamazepine, relevant to estuarine waters. Environ Sci Technol (2006) 40(19), 5977-5983.

Chung WH, Hung SI, Chen YT. Human leukocyte antigens and drug hypersensitivity. Curr Opin Allergy Clin Immunol (2007) 7(4):317-323.

Chung WH, Hung SI, Chen YT. Genetic predisposition of life-threatening antiepileptic-induced skin reactions. Expert Opin Drug Saf (2010) 9(1):15-21.

Clarke's Analysis of drugs and poisons, 3rd édition, ed. by AC Offat, MD Osselton, B Widdop, London, United Kingdom : Pharmaceutical Press, 2004, 1935 p.

Cogrel O, Beylot-Barry M, Vergier B, Dubus P, Doutre MS, Merlio JP, Beylot C. Sodium valproate-induced cutaneous pseudolymphoma followed by recurrence with carbamazepine. Br J Dermatol (2001) 144(6):1235-1238.

Conilleau V, Dompmartin A, Verneuil L, Michel M, Leroy D. Hypersensitivity syndrome due to 2 anticonvulsant drugs. Contact Dermatitis (1999) 41(3):141-144.

Cross JV, Deak JC, Rich EA, Qian Y, Lewis M, Parrott LA, Mochida K, Gustafson D, Vande Pol S, Templeton DJ. Quinone reductase inhibitors block SAPK/JNK and NFkappaB pathways and potentiate apoptosis. J Biol Chem (1999) 274(44):31150-31154.

Csetenyi J, Baker KM, Frigerio A, Morselli PL. Iminostilbene-a metabolite of carbamazepine isolated from rat urine. J Pharm Pharmac (Letter to the editor) (1973) 25:340-341.

Davis CD, Pirmohamed M, Kitteringham NR, Allott RL, Smith D, Park BK. Kinetic parameters of lymphocyte microsomal epoxide hydrolase in carbamazepine hypersensitive patients. Assessment by radiometric HPLC. Biochem Pharmacol (1995) 50(9):1361-1366.

de Voogt P, Bleeker EA, van Vlaardingen PL, Fernández A, Slobodník J, Wever H, Kraak MH. Formation and identification of azaarene transformation products from aquatic invertebrate and algal metabolism. J Chromatogr B Biomed Sci Appl (1999) 724(2), 265-274.

Demoly P, Hillaire-Buys D. Classification and epidemiology of hypersensitivity drug reactions. Immunol Allergy Clin North Am (2004) 24(3):345-356.

Descamps V, Bouscarat F, Laglenne S, Aslangul E, Veber B, Descamps D, Saraux JL, Grange MJ, Grossin M, Navratil E, Crickx B, Belaich S. Human herpesvirus 6 infection associated with anticonvulsant hypersensitivity syndrome and reactive haemophagocytic syndrome. Br J Dermatol (1997) 137(4):605-608.

Descamps V, Valance A, Edlinger C, Fillet AM, Grossin M, Lebrun-Vignes B, Belaich S, Crickx B. Association of human herpesvirus 6 infection with drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms. Arch Dermatol (2001) 137(3):301-304.

Descamps V, Collot S, Mahé E, Houhou N, Crickx B, Ranger-Rogez S. Active human herpesvirus 6 infection in a patient with drug rash with eosinophilia and systemic symptoms. J Invest Dermatol (2003) 121(1):215-216.

Eichelbaum M, Tomson T, Tybring G and Bertilsson L. Carbamazepine metabolism in man. Induction and pharmacogenetic aspects. Clin Pharmacokinet (1985) 10:80-90.

Eshki M, Allanore L, Musette P, Milpied B, Grange A, Guillaume JC, Chosidow O, Guillot I, Paradis V, Joly P, Crickx B, Ranger-Rogez S, Descamps V. Twelve-year analysis of severe cases of drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms: a cause of unpredictable multiorgan failure. Arch Dermatol (2009) 145(1):67-72.

Finnell RH, Bennett GD, Slattery JT, Amore BM, Bajpai M, Levy RH. Effect of treatment with phenobarbital and stiripentol on carbamazepine-induced teratogenicity and reactive metabolite formation. Teratology (1995) 52(6):324-332.

Fredj NB, Aouam K, Chaabane A, Toumi A, Rhomdhane FB, Boughattas N, Chakroun M. Hypersensitivity to amoxicillin after drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) to carbamazepine and allopurinol: a possible co-sensitization. Br J Clin Pharmacol (2010) 70(2):273-276.

Fretland AJ, Omiecinski CJ. Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology. Chem Biol Interact (2000) 129:41-59.

Friedmann PS, Strickland I, Pirmohamed M, Park BK. Investigation of mechanisms in toxic epidermal necrolysis induced by carbamazepine. Arch Dermatol (1994) 130(5), 598-604.

Furst SM and Uetrecht JP. Carbamazepine metabolism to a reactive intermediate by the myeloperoxydase system of activated neutrophils. Biochem Pharmacol (1993) 45:1267-1275.

Furst SM, Uetrecht JP. The effect of carbamazepine and its reactive metabolite, 9-acridine carboxaldehyde, on immune cell function in vitro. Int J Immunopharmacol (1995) 17, 445-452.

Furst SM, Sukhai P, McClelland RA, Uetrecht JP. Covalent binding of carbamazepine oxidative metabolites to neutrophils. Drug Metab Dispos (1995) 23(5):590-594.

Gaedigk A, Spielberg SP, Grant DM. Characterization of the microsomal epoxide hydrolase gene in patients with anticonvulsant adverse drug reactions. Pharmacogenetics (1994) 4(3):142-153.

Ganeva M, Gancheva T, Lazarova R, Troeva J, Baldaranov I, Vassilev I, Hristakieva E, and Tzaneva V. Carbamazepine-induced drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) syndrome: report of four cases and brief review. Int J Dermatol (2008) 47(8):853-860.

Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D. Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique (2003) 269-270:91-96.

Gatanaga H, Honda H, Oka S. Pharmacogenetic information derived from analysis of HLA alleles. Pharmacogenomics (2008) 9(2):207-214.

Gau SS, Chao PF, Lin YJ, Chang CJ, Gau CS. The association between carbamazepine and valproate and adverse cutaneous drug reactions in patients with bipolar disorder: a nested matched case-control study. J Clin Psychopharmacol (2008) 28(5):509-517.

Gennis MA, Vemuri R, Burns EA, Hill JV, Miller MA, Spielberg SP. Familial occurrence of hypersensitivity to phenytoin. Am J Med (1991) 91(6):631-634.

Gentile I, Talamo M, Borgia G. Is the drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS) due to human herpesvirus 6 infection or to allergy-mediated viral reactivation? Report of a case and literature review. BMC Infect Dis (2010) 10:49.

Gidal BE, Reiss WG, Liao JS, Pitterle ME. Changes in interleukin-6 concentrations following epilepsy surgery: potential influence on carbamazepine pharmacokinetics. Ann Pharmacother (1996) 30(5):545-546.

Green VJ, Pirmohamed M, Kitteringham NR, Gaedigk A, Grant DM, Boxer M, Burchell B, Park BK. Genetic analysis of microsomal epoxide hydrolase in patients with carbamazepine hypersensitivity. Biochem Pharmacol (1995) 50(9):1353-1359.

Gunaratnam M, Greciano O, Martins C, Reszka AP, Schultes CM, Morjani H, Riou JF, Neidle S. Mechanism of acridine-based telomerase inhibition and telomere shortening. Biochem Pharmacol (2007) 74(5):679-689.

Halevy S, Ghislain PD, Mockenhaupt M, Fagot JP, Bouwes Bavinck JN, Sidoroff A, Naldi L, Dunant A, Viboud C, Roujeau JC; EuroSCAR Study Group. Allopurinol is the most common cause of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Europe and Israel. J Am Acad Dermatol (2008) 58(1):25-32.

Hashimoto K, Yasukawa M, Tohyama M. Human herpesvirus 6 and drug allergy. Curr Opin Allergy Clin Immunol (2003) 3(4):255-260.

He K, Bornheim LM, Falick AM, Maltby D, Yin H, Correia MA. Identification of the heme-modified peptides from cumene hydroperoxide-inactivated cytochrome P450 3A4. Biochemistry (1998) 37(50):17448-17457.

Hirsch LJ, Arif H, Nahm EA, Buchsbaum R, Resor SR Jr, Bazil CW. Cross-sensitivity of skin rashes with antiepileptic drug use. Neurology (2008) 71(19):1527-1534.

Hung SI, Chung WH, Jee SH, Chen WC, Chang YT, Lee WR, Hu SL, Wu MT, Chen GS, Wong TW, Hsiao PF, Chen WH, Shih HY, Fang WH, Wei CY, Lou YH, Huang YL, Lin JJ, Chen YT. Genetic susceptibility to carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions. Pharmacogenet Genomics (2006) 16(4):297-306.

Hung SI, Chung WH, Liu ZS, Chen CH, Hsih MS, Hui RC, Chu CY, Chen YT. Common risk allele in aromatic antiepileptic-drug induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Han Chinese. Pharmacogenomics (2010) 11(3):349-356.

Ichiyama T, Okada K, Lipton JM, Matsubara T, Hayashi T, Furukawa S. Sodium valproate inhibits production of TNF-alpha and IL-6 and activation of NF-kappaB. Brain Res (2000) 857(1-2):246-251.

Itoigawa M, Ito C, Wu TS, Enjo F, Tokuda H, Nishino H, Furukawa H. Cancer chemopreventive activity of acridone alkaloids on Epstein-Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. Cancer Lett (2003) 193(2):133-138.

Jonville-Béra AP, Crickx B, Aaron L, Hartingh I, Autret-Leca E. Strontium ranelate-induced DRESS syndrome: first two case reports. Allergy (2009) 64(4):658-659.

Ju C, Uetrecht JP. Oxidation of a metabolite of indomethacin (Desmethyldeschlorobenzoylindomethacin) to reactive intermediates by activated neutrophils, hypochlorous acid, and the myeloperoxidase system. Drug Metab Dispos (1998) 26(7):676-680.

Ju C, Uetrecht J. Detection of 2-hydroxyiminostilbene in the urine of patients taking carbamazepine and its oxidation to a reactive iminoquinone intermediate. J Pharmacol Exp Ther (1999) 288:51-56.

Kagan VE, Yalowich JC, Borisenko GG, Tyurina YY, Tyurin VA, Thampatty P, Fabisiak JP. Mechanism-based chemopreventive strategies against etoposide-induced acute myeloid leukemia: free radical/antioxidant approach. Mol Pharmacol (1999) 56(3):494-506.

Kalis MM and Huff NA. Oxcarbazepine, an antiepileptic agent. Clin Ther (2001) 23:680-700.

Kaniwa N, Saito Y, Aihara M, Matsunaga K, Tohkin M, Kurose K, Sawada J, Furuya H, Takahashi Y, Muramatsu M, Kinoshita S, Abe M, Ikeda H, Kashiwagi M, Song Y, Ueta M, Sotozono C, Ikezawa Z, Hasegawa R; JSAR research group. HLA-B locus in Japanese patients with anti-epileptics and allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. Pharmacogenomics (2008) 9(11):1617-1622.

Kano Y, Inaoka M, Shiohara T. Association between anticonvulsant hypersensitivity syndrome and human herpesvirus 6 reactivation and hypogammaglobulinemia. Arch Dermatol (2004) 140(2):183-188.

Kano Y, Inaoka M, Sakuma K, Shiohara T. Virus reactivation and intravenous immunoglobulin (IVIG) therapy of drug-induced hypersensitivity syndrome. Toxicology (2005) 209(2):165-167.

Kano Y, Hirahara K, Sakuma K, Shiohara T. Several herpesviruses can reactivate in a severe drug-induced multiorgan reaction in the same sequential order as in graft-versus-host disease. Br J Dermatol (2006) 155(2):301-306.

Kano Y, Hirahara K, Mitsuyama Y, Takahashi R, Shiohara T. Utility of the lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug sensitivity: dependence on its timing and the type of drug eruption. Allergy (2007) 62(12):1439-1444.

Kano Y, Shiohara T. The variable clinical picture of drug-induced hypersensitivity syndrome/drug rash with eosinophilia and systemic symptoms in relation to the eliciting drug. Immunol Allergy Clin North Am (2009) 29(3):481-501.

Kardaun SH, Sidoroff A, Valeyrie-Allanore L, Halevy S, Davidovici BB, Mockenhaupt M, Roujeau JC. Variability in the clinical pattern of cutaneous side-effects of drugs with systemic symptoms: does a DRESS syndrome really exist? Br J Dermatol (2007) 156(3):609-611.

Katiyar SK, Matsui MS, Mukhtar H. Ultraviolet-B exposure of human skin induces cytochromes P450 1A1 and 1B1. J Invest Dermatol (2000) 114(2):328-333.

Kerr BM, Thummel KE, Wurden CJ, Klein SM, Kroetz DL, Gonzalez FJ and Levy RH. Human liver carbamazepine metabolism. Role of CYP3A4 and CYP2C8 in 10,11-epoxide formation. Biochem Pharmacol (1994) 47:1969-1979.

Kettle AJ, Winterbourn CC. Superoxide-dependent hydroxylation by myeloperoxidase. J Biol Chem (1994) 269(25):17146-17151.

Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. Altern Med Rev (2003) 8(3):223-246.

Kim HJ, Barajas B, Chan RC, Nel AE. Glutathione depletion inhibits dendritic cell maturation and delayed-type hypersensitivity: implications for systemic disease and immunosenescence. J Allergy Clin Immunol (2007) 119(5):1225-1233.

Kitteringham NR, Davis C, Howard N, Pirmohamed M, Park BK. Interindividual and interspecies variation in hepatic microsomal epoxide hydrolase activity: studies with cis-stilbene oxide, carbamazepine 10, 11-epoxide and naphthalene. J Pharmacol Exp Ther (1996) 278(3):1018-1027.

Klaassen CD, Reisman SA. Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. Toxicol Appl Pharmacol (2010) 244(1):57-65.

Knowles SR, Shapiro LE, Shear NH. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome: incidence, prevention and management. Drug Saf (1999) 21(6):489-501.

Knowles SR, Shapiro LE, Shear NH. Reactive metabolites and adverse drug reactions: clinical considerations. Clin Rev Allergy Immunol (2003) 24(3):229-238.

Knowles SR, Uetrecht J, Shear NH. Idiosyncratic drug reactions: the reactive metabolite syndromes. Lancet (2000) 356(9241):1587-1591.

Kocak S, Girisgin SA, Gul M, Cander B, Kaya H, Kaya E. Stevens-Johnson syndrome due to concomitant use of lamotrigine and valproic acid. Am J Clin Dermatol (2007) 8(2):107-111.

Kokunai A, Azusawa H, Murota H, Ohhata C, Katayama I, Murata S, Tadokoro S. [Hypersensitivity reactions to multiple drugs during the course of hairy cell leukemia treated with 2-chlorodeoxyadenosine]. Arerugi (2006) 55(6):662-666.

Kraak MHS, Ainscough C, Fernandez A, van Vlaardingen PLA, de Voogt P, Admiraal WA. Short-term and chronic exposure of the zebra mussel [Dreissena polymorpha] to acridine: effects and metabolism. Aquatic Toxicology (1997) 37, 9-20.

Kundu TK, Hille R, Velayutham M, Zweier JL. Characterization of superoxide production from aldehyde oxidase: an important source of oxidants in biological tissues. Arch Biochem Biophys (2007) 460(1):113-121.

Kuntz-Simon G, Obert G. Sodium valproate, an anticonvulsant drug, stimulates human cytomegalovirus replication. J Gen Virol (1995) 76 (Pt 6):1409-1415.

Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. Adv Drug Deliv Rev (2002) 18;54(10):1271-1294.

Lan CC, Wu CS, Tsai PC, Chen GS. Diagnostic role of soluble fas ligand secretion by peripheral blood mononuclear cells from patients with previous drug-induced blistering disease: a pilot study. Acta Derm Venereol (2006) 86(3):215-218.

Leclercq M, Mathieu O, Gomez E, Casellas C, Fenet H, Hillaire-Buys D. Presence and Fate of Carbamazepine, Oxcarbazepine, and Seven of Their Metabolites at Wastewater Treatment Plants. Arch Environ Contam Toxicol (2009) 56(3), 408-415.

Lee AY, Kim MJ, Chey WY, Choi J, Kim BG. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in diphenylhydantoin-induced cutaneous adverse drug reactions. Eur J Clin Pharmacol (2004) 60(3):155-159.

Lee HY, Ariyasinghe JT, Thirumoorthy T. Allopurinol hypersensitivity syndrome: a preventable severe cutaneous adverse reaction? Singapore Med J (2008) 49(5):384-387.

Lee JH, Park HK, Heo J, Kim TO, Kim GH, Kang DH, Song GA, Cho M, Kim DS, Kim HW, Lee CH. Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) syndrome induced by celecoxib and anti-tuberculosis drugs. J Korean Med Sci (2008) 23(3):521-525.

Lee SP, Kim SH, Kim TH, Sohn JW, Shin DH, Park SS, Yoon HJ. A case of mexiletine-induced hypersensitivity syndrome presenting as eosinophilic pneumonia. J Korean Med Sci (2010) 25(1):148-151.

Leeder JS, Gaedigk A, Lu X, Cook VA. Epitope mapping studies with human anti-cytochrome P450 3A antibodies. Mol Pharmacol (1996) 49(2):234-243.

Leeder JS, Lu X, Timsit Y, Gaedigk A. Non-monooxygenase cytochromes P450 as potential human autoantigens in anticonvulsant hypersensitivity reactions. Pharmacogenetics (1998) 8(3):211-225.

Lertratanangkoon K, Horning MG. Metabolism of carbamazepine. Drug Metab Disp (1982) 10:1-10.

Levay G, Bodell WJ. Role of H_2O_2 in the formation of DNA adducts in HL-60 cells treated with benzene metabolites. Biochem Biophys Res Comm (1996) 222:94-99.

Li J, Uetrecht JP. The danger hypothesis applied to idiosyncratic drug reactions. Handb Exp Pharmacol (2010) 196:493-509.

Li LM, Russo M, O'Donoghue MF, Duncan JS, Sander JW. Allergic skin rash with lamotrigine and concomitant valproate therapy: evidence for an increased risk. Arq Neuropsiquiatr (1996) 54(1):47-49.

Lillibridge JH, Amore BM, Slattery JT, Kalhorn TF, Nelson SD, Finnell RH, Bennett GD. Protein-reactive metabolites of carbamazepine in mouse liver microsomes. Drug Metab Dispos (1996) 24(5):509-514.

Linares E, Giorgio S, Mortara RA, Santos CX, Yamada AT, Augusto O. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. Free Radic Biol Med (2001) 30(11):1234-1242.

Locharernkul C, Loplumlert J, Limotai C, Korkij W, Desudchit T, Tongkobpetch S, Kangwanshiratada O, Hirankarn N, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. Carbamazepine and phenytoin induced Stevens-Johnson syndrome is associated with HLA-B*1502 allele in Thai population. Epilepsia (2008) 49(12):2087-2091.

Lochmatter P, Beeler A, Kawabata TT, Gerber BO, Pichler WJ. Drug-specific in vitro release of IL-2, IL-5, IL-13 and IFN-gamma in patients with delayed-type drug hypersensitivity. Allergy (2009a) 64(9):1269-1278.

Lochmatter P, Zawodniak A, Pichler WJ. In vitro tests in drug hypersensitivity diagnosis. Immunol Allergy Clin North Am (2009b) 29(3):537-554.

Lonjou C, Borot N, Sekula P, Ledger N, Thomas L, Halevy S, Naldi L, Bouwes-Bavinck JN, Sidoroff A, de Toma C, Schumacher M, Roujeau JC, Hovnanian A, Mockenhaupt M; RegiSCAR study group. A European study of HLA-B in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis related to five high-risk drugs. Pharmacogenet Genomics (2008) 18(2):99-107.

Lu W, Uetrecht JP. Peroxidase-Mediated Bioactivation of Hydroxylated Metabolites of Carbamazepine and Phenytoin. Drug Metab Dispos (2008) 36(8):1624-1636.

Lu W, Li X, Uetrecht JP. Changes in gene expression induced by carbamazepine and phenytoin: testing the danger hypothesis. J Immunotoxicol (2008) 5(2):107-113.

Lynn RK, Smith RG, Thompson RM, Deinzer ML, Griffin D, Gerber N. Characterization of glucuronide metabolites of carbamazepine in human urine by gas chromatography and mass spectrometry. Drug Metab Dispos (1978) 6(4):494-501.

Madden S, Maggs JL, Park BK. Bioactivation of carbamazepine in the rat in vivo. Evidence for the formation of reactive arene oxide(s). Drug Metab Dispos (1996) 24(4):469-479.

Majeres KD, Suppes T. A cautionary note when using zonisamide in youths: a case report of association with toxic epidermal necrolysis. J Clin Psychiatry (2004) 65(12):1720.

Maggs JL, Pirmohamed M, Kitteringham NR, Park BK. Characterization of the metabolites of carbamazepine in patient urine by liquid chromatography/mass spectrometry. Drug Metab Dispos (1997) 25(3):275-280.

Makis AC, Tzoufi M, Kateri MD, Bourantas KL, Papadopoulou ZL. Valproate-induced eosinophilia in children with epilepsy: role of interleukin-5. J Child Neurol (2005) 20(2):150-152.

Mandrioli R, Albani F, Casamenti G, Sabbioni C and Raggia MA. Simultaneous high-performance liquid chromatography determination of carbamazepine and five of its metabolites in plasma of epileptic patients. J Chromatogr B Biomed Sci Appl (2001) 762:109-116.

Mandrioli R, Ghedini N, Albani F, Kenndler E and Raggi MA. Liquid chromatographic determination of oxcarbazepine and its metabolites in plasma of epileptic patients after solid-phase extraction. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci (2003) 783:253-263.

Mansur AT, Pekcan Yaşar S, Göktay F. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome: clinical and laboratory features. Int J Dermatol (2008) 47(11):1184-1189.

Maoz KB, Brenner S. Drug rash with eosinophilia and systemic symptoms syndrome: sex and the causative agent. Skinmed (2007) 6(6):271-273.

Mardivirin L, Descamps V, Lacroix A, Delebassée S, Ranger-Rogez S. Early effects of drugs responsible for DRESS on HHV-6 replication in vitro. J Clin Virol (2009) 46(3):300-302.

Marmurowska-Michałowska H, Szuster-Ciesielska A, Kandefer-Szerszeń M, Dubas-Slemp H. The influence of carbamazepine on cytokine and superoxide anion production in blood leukocytes of healthy volunteers. Ann Univ Mariae Curie Sklodowska (2004) 59(2):201-206.

Martin S, Weltzien HU. T cell recognition of haptens, a molecular view. Int Arch Allergy Immunol (1994) 104(1):10-16.

Masaki T, Fukunaga A, Tohyama M, Koda Y, Okuda S, Maeda N, Kanda F, Yasukawa M, Hashimoto K, Horikawa T, Ueda M. Human herpes virus 6 encephalitis in allopurinol-induced hypersensitivity syndrome. Acta Derm Venereol (2003) ;83(2):128-131.

Matoth I, Pinto F, Sicsic C, Brenner T. Inhibitory effect of carbamazepine on inflammatory mediators produced by stimulated glial cells. Neurosci Res (2000) 38(2):209-212.

Mauri-Hellweg D, Bettens F, Mauri D, Brander C, Hunziker T, Pichler WJ. Activation of drug-specific CD4+ and CD8+ T cells in individuals allergic to sulfonamides, phenytoin, and carbamazepine. J Immunol (1995) 155(1):462-472.

Mayorga C, Torres MJ, Corzo JL, Sanchez-Sabate E, Alvarez J, Vera A, Posadas S, Jurado A, Blanca M. Improvement of toxic epidermal necrolysis after the early administration of a single high dose of intravenous immunoglobulin. Ann Allergy Asthma Immunol (2003) 91(1):86-91.

McMurtrey KD, Knight TJ. Metabolism of acridine by rat-liver enzymes. Mutat Res (1984) 140(1), 7-11.

Mennicke M, Zawodniak A, Keller M, Wilkens L, Yawalkar N, Stickel F, Keogh A, Inderbitzin D, Candinas D, Pichler WJ. Fulminant liver failure after vancomycin in a sulfasalazine-induced DRESS syndrome: fatal recurrence after liver transplantation. Am J Transplant (2009) 9(9):2197-2202.

Merk HF. Diagnosis of drug hypersensitivity: lymphocyte transformation test and cytokines. Toxicology (2005) 209(2):217-220.

Mira L, Maia L, Barreira L, Manso CF. Evidence for free radical generation due to NADH oxidation by aldehyde oxidase during ethanol metabolism. Arch Biochem Biophys (1995) 318(1):53-58.

Misra UK, Kalita J, Rathore C. Phenytoin and carbamazepine cross reactivity: report of a case and review of literature. Postgrad Med J (2003) 79(938):703-704.

Młodzikowska-Albrecht J, Steinborn B, Zarowski M. Cytokines, epilepsy and epileptic drugs-is there a mutual influence? Pharmacol Rep (2007) 59(2):129-138.

Mockenhaupt M, Viboud C, Dunant A, Naldi L, Halevy S, Bouwes Bavinck JN, Sidoroff A, Schneck J, Roujeau JC, Flahault A. Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: assessment of medication risks with emphasis on recently marketed drugs. The EuroSCAR-study. J Invest Dermatol (2008) 128(1):35-44.

Morris RG, Black AB, Lam E, Westley IS. Clinical study of lamotrigine and valproic acid in patients with epilepsy: using a drug interaction to advantage? Ther Drug Monit (2000) 22(6):656-660.

Munns AJ, De Voss JJ, Hooper WD, Dickinson RG, Gillam EM. Bioactivation of phenytoin by human cytochrome P450: characterization of the mechanism and targets of covalent adduct formation. Chem Res Toxicol (1997) 10(9):1049-1058.

Myllynen P, Pienimaki P, Raunio H and Vahakangas K. Microsomal metabolism of carbamazepine and oxcarbazepine in liver and placenta. Hum Exp Toxicol (1998) 17:668-676.

Naisbitt DJ, Britschgi M, Wong G, Farrell J, Depta JP, Chadwick DW, Pichler WJ, Pirmohamed M, Park BK. Hypersensitivity reactions to carbamazepine: characterization of the specificity, phenotype, and cytokine profile of drug-specific T cell clones. Mol Pharmacol (2003a) 63(3):732-741.

Naisbitt DJ, Farrell J, Wong G, Depta JP, Dodd CC, Hopkins JE, Gibney CA, Chadwick DW, Pichler WJ, Pirmohamed M, Park BK. Characterization of drug-specific T cells in lamotrigine hypersensitivity. J Allergy Clin Immunol (2003b) 111(6):1393-1403.

Nakajima Y, Saito Y, Shiseki K, Fukushima-Uesaka H, Hasegawa R, Ozawa S, Sugai K, Katoh M, Saitoh O, Ohnuma T, Kawai M, Ohtsuki T, Suzuki C, Minami N, Kimura H, Goto Y, Kamatani N, Kaniwa N, Sawada J. Haplotype structures of EPHX1 and their effects on the metabolism of carbamazepine-10,11-epoxide in Japanese epileptic patients. Eur J Clin Pharmacol (2005) 61(1):25-34.

Nathan DL, Belsito DV. Carbamazepine-induced pseudolymphoma with CD-30 positive cells. J Am Acad Dermatol (1998) 38(5 Pt 2):806-809.

Neuman MG, Malkiewicz IM, Shear NH. A novel lymphocyte toxicity assay to assess drug hypersensitivity syndromes. Clin Biochem (2000) 33(7):517-524.

Neuman MG, Shear NH, Malkiewicz IM, Kessas M, Lee AW, Cohen L. Predicting possible zonisamide hypersensitivity syndrome. Exp Dermatol (2008) 17(12):1045-1051.

Noor F, Niklas J, Müller-Vieira U, Heinzle E. An integrated approach to improved toxicity prediction for the safety assessment during preclinical drug development using Hep G2 cells. Toxicol Appl Pharmacol (2009) 237(2):221-231.

O'Brien PJ. Peroxidases. Chem Biol Interact (2000) 129(1-2):113-139.

Obach RS, Huynh P, Allen MC, Beedham C. Human liver aldehyde oxidase: inhibition by 239 drugs. J Clin Pharmacol (2004) 44(1):7-19.

Owen A, Pirmohamed M, Tettey JN, Morgan P, Chadwick D, Park BK. Lymphocyte microsomal epoxide hydrolase in patients on carbamazepine therapy. Br J Clin Pharmacol (2001) 51(4):345-349.

Pacifici R, Paris L, Di Carlo S, Bacosi A, Pichini S, Zuccaro P. Cytokine production in blood mononuclear cells from epileptic patients. Epilepsia (1995) 36(4):384-387.

Panousis C, Kettle AJ, Phillips DR. Oxidative metabolism of mitoxantrone by the human neutrophil enzyme myeloperoxidase. Biochem Pharmacol (1994) 48(12):2223-2230

Park BK, Pirmohamed M, Kitteringham NR. The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. Pharmacol Ther (1995) 68(3):385-424.

Park BK, Pirmohamed M, Kitteringham NR. Role of drug disposition in drug hypersensitivity: a chemical, molecular, and clinical perspective. Chem Res Toxicol (1998) 11(9):969-988.

Pathak DN, Pongracz K, Bodell WJ. Microsomal and peroxidase activation of 4-hydroxy-tamoxifen to form DNA adducts: comparison with DNA adducts formed in Sprague-Dawley rats treated with tamoxifen. Carcinogenesis (1995) 16(1):11-15.

Patsalos PN, Fröscher W, Pisani F, van Rijn CM. The importance of drug interactions in epilepsy therapy. Epilepsia (2002) 43(4):365-385.

Pearce RE, Lu W, Wang Y, Uetrecht JP, Correia MA and Leeder JS. Pathways of Carbamazepine Bioactivation In Vitro III: The Role of Human Cytochrome P450 Enzymes in the Formation of 2,3-Dihydroxycarbamazepine. Drug Metab Dispos (2008) 36:1637-1649.

Pearce RE, Uetrecht JP and Leeder JS. Pathways of carbamazepine bioactivation in vitro: II. The role of human cytochrome P450 enzymes in the formation of 2-hydroxyiminostilbene. Drug Metab Dispos (2005) 33:1819-1826.

Pearce RE, Vakkalagadda GR and Leeder JS. Pathways of carbamazepine bioactivation in vitro I. Characterization of human cytochromes P450 responsible for the formation of 2- and 3-hydroxylated metabolites. Drug Metab Disp (2002) 30:1170-1179.

Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. Proc Natl Acad Sci U S A (1998) 95(6):3071-3076.

Peyrière H, Dereure O, Breton H, Demoly P, Cociglio M, Blayac JP, Hillaire-Buys D; Network of the French Pharmacovigilance Centers. Variability in the clinical pattern of cutaneous side-effects of drugs with systemic symptoms: does a DRESS syndrome really exist? Br J Dermatol (2006) 155(2):422-428.

Phillips EJ, Mallal SA. HLA and drug-induced toxicity. Curr Opin Mol Ther (2009) 11(3):231-242.

Pichler WJ. Pharmacological interaction of drugs with antigen-specific immune receptors: the p-i concept. Curr Opin Allergy Clin Immunol (2002) 2(4): 301–305.

Pichler WJ. Delayed drug hypersensitivity reactions. Ann Intern Med (2003) 139(8):683-693.

Pienimaki P, Fuchs S, Isojärvi J, Vähäkangas K. Improved detection and determination of carbamazepine and oxcarbazepine and their metabolites by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed Appl (1995) 673, 97-105.

Pienimäki P, Lampela E, Hakkola J, Arvela P, Raunio H, Vähäkangas K.. Pharmacokinetics of oxcarbazepine and carbamazepine in human placenta. Epilepsia (1997) 38(3):309-316.

Pirmohamed M, Alfirevic A, Vilar J, Stalford A, Wilkins EG, Sim E, Park BK. Association analysis of drug metabolizing enzyme gene polymorphisms in HIV-positive patients with co-trimoxazole hypersensitivity. Pharmacogenetics (2000) 10(8):705-713.

Pirmohamed M, Allott R, Green VJ, Kitteringham NR, Chadwick D, Park BK Lymphocyte microsomal epoxide hydrolase in patients on carbamazepine therapy. Br J Clin Pharmacol (1994) 37(6):577-581.

Pirmohamed M, Kitteringham NR, Breckenridge AM, Park BK. The effect of enzyme induction on the cytochrome P450-mediated bioactivation of carbamazepine by mouse liver microsomes. Biochem Pharmacol (1992a) 44(12):2307-2314.

Pirmohamed M, Kitteringham NR, Guenthner TM, Breckenridge AM, Park BK. An investigation of the formation of cytotoxic, protein-reactive and stable metabolites from carbamazepine in vitro. Biochem Pharmacol (1992b) 43(8), 1675-1682.

Pirmohamed M, Lin K, Chadwick D, Park BK. TNFalpha promoter region gene polymorphisms in carbamazepine-hypersensitive patients. Neurology (2001) 56(7):890-896.

Pisarchik A, Wortsman J, Slominski A. A novel microarray to evaluate stress-related genes in skin: effect of ultraviolet light radiation. Gene (2004) 341:199-207.

Pluim HJ, van Deuren M, Wetzels JF. The allopurinol hypersensitivity syndrome. Neth J Med (1998) 52(3):107-110.

Pohl LR, Satoh H, Christ DD, Kenna JG. The immunologic and metabolic basis of drug hypersensitivities. Annu Rev Pharmacol Toxicol (1988) 28:367-387.

Posadas SJ, Padial A, Torres MJ, Mayorga C, Leyva L, Sanchez E, Alvarez J, Romano A, Juarez C, Blanca M. Delayed reactions to drugs show levels of perforin, granzyme B, and Fas-L to be related to disease severity. J Allergy Clin Immunol (2002) 109(1):155-161.

Potter JM, Donnelly A. Carbamazepine-10,11-epoxide in therapeutic drug monitoring. Ther Drug Monit (1998) 20(6):652-657.

Ramsay RE, McManus DQ, Guterman A, Briggle TV, Vazquez D, Perchalski R, Yost RA, Wong P. Carbamazepine metabolism in humans: effect of concurrent anticonvulsant therapy. Ther Drug Monit (1990) 12(3):235-241.

Robertson IG, Bland TJ. Inhibition by SKF-525A of the aldehyde oxidase-mediated metabolism of the experimental antitumour agent acridine carboxamide. Biochem Pharmacol (1993) 45(10), 2159-2162.

Romano A, Pettinato R, Andriolo M, Viola M, Guéant-Rodriguez RM, Valluzzi RL, Romano C, Elia M, Ventura MT, Guéant JL. Hypersensitivity to aromatic anticonvulsants: in vivo and in vitro cross-reactivity studies. Curr Pharm Des (2006) 12(26):3373-3381.

Roujeau JC. Clinical heterogeneity of drug hypersensitivity. Toxicology (2005) 209(2):123-129.

Roujeau JC. Immune mechanisms in drug allergy. Allergol Int (2006) 55(1):27-33.

Roujeau JC, Stern RS. Severe adverse cutaneous reactions to drugs. N Engl J Med (1994) 331(19):1272-1285.

Roujeau JC, Kelly JP, Naldi L, Rzany B, Stern RS, Anderson T, Auquier A, Bastuji-Garin S, Correia O, Locati F, et al. Medication use and the risk of Stevens-Johnson syndrome or toxic epidermal necrolysis. N Engl J Med (1995) 333(24):1600-1607.

Rozieres A, Hennino A, Rodet K, Gutowski MC, Gunera-Saad N, Berard F, Cozon G, Bienvenu J, Nicolas JF. Detection and quantification of drug-specific T cells in penicillin allergy. Allergy (2009a) 64(4):534-542.

Rozieres A, Vocanson M, Saïd BB, Nosbaum A, Nicolas JF. Role of T cells in nonimmediate allergic drug reactions. Curr Opin Allergy Clin Immunol (2009b) 9(4):305-310.

Ruscoe JE, Jewell H, Maggs JL, O'Neill PM, Storr RC, Ward SA, Park BK. The effect of chemical substitution on the metabolic activation, metabolic detoxication, and pharmacological activity of amodiaquine in the mouse. J Pharmacol Exp Ther (1995) 273(1):393-404.

Sachs B, Erdmann S, Al-Masaoudi T, Merk HF. In vitro drug allergy detection system incorporating human liver microsomes in chlorazepate-induced skin rash: drug-specific proliferation associated with interleukin-5 secretion. Br J Dermatol (2001) 144(2):316-320.

Sachs B, Erdmann S, Malte Baron J, Neis M, al Masaoudi T, Merk HF. Determination of interleukin-5 secretion from drug-specific activated ex vivo peripheral blood mononuclear cells as a test system for the in vitro detection of drug sensitization. Clin Exp Allergy (2002) 32(5):736-744.

Santiago F, Gonçalo M, Vieira R, Coelho S, Figueiredo A. Epicutaneous patch testing in drug hypersensitivity syndrome (DRESS). Contact Dermatitis (2010) 62(1):47-53.

Schlienger RG, Shear NH. Antiepileptic drug hypersensitivity syndrome. Epilepsia (1998) 39 Suppl 7:S3-7.

Schnyder B, Pichler WJ. Mechanisms of drug-induced allergy. Mayo Clin Proc (2009) 84(3):268-272.

Seino Y, Yamauchi M, Hirai C, Okumura A, Kondo K, Yamamoto M, Okazaki Y. A case of fulminant Type 1 diabetes associated with mexiletine hypersensitivity syndrome. Diabet Med (2004) 21(10):1156-1157.

Seishima M, Yamanaka S, Fujisawa T, Tohyama M, Hashimoto K. Reactivation of human herpesvirus (HHV) family members other than HHV-6 in drug-induced hypersensitivity syndrome. Br J Dermatol (2006) 155(2):344-349.

Seitz CS, Pfeuffer P, Raith P, Bröcker EB, Trautmann A. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome: cross-reactivity with tricyclic antidepressant agents. Ann Allergy Asthma Immunol (2006) 97(5):698-702.

Shapiro LE, Shear NH. Mechanisms of drug reactions: the metabolic track. Semin Cutan Med Surg (1996) 15(4):217-227.

Shaw RN, Arbiser JL, Offermann MK. Valproic acid induces human herpesvirus 8 lytic gene expression in BCBL-1 cells. AIDS (2000) 14(7):899-902.

Shear NH, Spielberg SP. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome. In vitro assessment of risk. J Clin Invest (1988) 82(6):1826-1832.

Shear NH, Spielberg SP, Grant DM, Tang BK, Kalow W. Differences in metabolism of sulfonamides predisposing to idiosyncratic toxicity. Ann Intern Med (1986) 105(2):179-184.

Shiah IS, Yatham LN, Yeh CB, Ravindran AV. Effect of valproate on plasma levels of interleukin-6 in healthy male humans. Int Clin Psychopharmacol (2005) 20(6):295-298.

Shiohara T, Inaoka M, Kano Y. Drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS): a reaction induced by a complex interplay among herpesviruses and antiviral and antidrug immune responses. Allergol Int (2006) 55(1):1-8.

Siddiqui RA, English D, Harvey K, Cui Y, Martin MI, Wentland J, Akard L, Jansen J, Thompson J, Garcia JG. Phorbol ester-induced priming of superoxide generation by phosphatidic acid-stimulated neutrophils and granule-free neutrophil cytoplasts. J Leukoc Biol (1995) 58(2), 189-195.

Silverman DA, Chapron DJ. Lymphopenic effect of carbamazepine in a patient with chronic lymphocytic leukemia. Ann Pharmacother (1995) 29(9), 865-867.

Singh G, Driever PH, Sander JW. Cancer risk in people with epilepsy: the role of antiepileptic drugs. Brain (2005) 128(Pt 1):7-17.

Sontheimer RD, Houpt KR. DIDMOHS: a proposed consensus nomenclature for the drug-induced delayed multiorgan hypersensitivity syndrome. Arch Dermatol (1998) 134(7):874-876.

Spaldin V, Madden S, Pool WF, Woolf TF, Park BK. The effect of enzyme inhibition on the metabolism and activation of tacrine by human liver microsomes. Br J Clin Pharmacol (1994) 38(1):15-22.

Spaldin V, Madden S, Adams DA, Edwards RJ, Davies DS, Park BK. Determination of human hepatic cytochrome P4501A2 activity in vitro use of tacrine as an isoenzyme-specific probe. Drug Metab Dispos (1995) 23(9):929-934.

Spielberg SP, Gordon GB, Blake DA, Mellits ED, Bross DS. Anticonvulsant toxicity in vitro: possible role of arene oxides. J Pharmacol Exp Ther (1981) 217(2):386-389.

Stiborová M, Frei E, Sopko B, Sopková K, Marková V, Lanková M, Kumstýrová T, Wiessler M, Schmeiser HH. Human cytosolic enzymes involved in the metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid: evidence for reductive activation by human NAD(P)H:quinone oxidoreductase. Carcinogenesis (2003) 24(10):1695-1703.

Strolin-Benedetti M. Enzymes FAD-dépendantes impliquées dans l'oxydation métabolique des xénobiotiques. Communication du 19 mai 2010 à l'académie nationale de pharmacie, Paris, France.

Struwe M, Greulich KO, Suter W, Plappert-Helbig U. The photo comet assay--a fast screening assay for the determination of photogenotoxicity in vitro. Mutat Res (2007) 632(1-2):44-57.

Su LD, Duncan LM. Lymphoma- and leukemia-associated cutaneous atypical CD30+ T-cell reactions. J Cutan Pathol (2000) 27(5):249-254.

Suzuki Y, Inagi R, Aono T, Yamanishi K, Shiohara T. Human herpesvirus 6 infection as a risk factor for the development of severe drug-induced hypersensitivity syndrome. Arch Dermatol (1998) 134(9):1108-1112.

Taillia H, Alla P, Fournier B, Bounolleau P, Ouologem M, Ricard D, Sallansonnet-Froment M, de Greslan T, Renard JL. Syndrome d'hypersensibilité aux antiépileptiques. Cas particulier de la lamotrigine. Rev Neurol (Paris) (2009) 165(10):821-827.

Takakusa H, Masumoto H, Yukinaga H, Makino C, Nakayama S, Okazaki O, Sudo K. Covalent binding and tissue distribution/retention assessment of drugs associated with idiosyncratic drug toxicity. Drug Metab Dispos (2008) 36(9):1770-1779.

Tassaneeyakul W, Jantararoungtong T, Chen P, Lin PY, Tiamkao S, Khunarkornsiri U, Chucherd P, Konyoung P, Vannaprasaht S, Choonhakarn C, Pisuttimarn P, Sangviroon A, Tassaneeyakul W. Strong association between HLA-B*5801 and allopurinol-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in a Thai population. Pharmacogenet Genomics (2009) 19(9):704-709.

Tassaneeyakul W, Tiamkao S, Jantararoungtong T, Chen P, Lin SY, Chen WH, Konyoung P, Khunarkornsiri U, Auvichayapat N, Pavakul K, Kulkantrakorn K, Choonhakarn C, Phonhiamhan S, Piyatrakul N, Aungaree T, Pongpakdee S, Yodnopaglaw P. Association between HLA-B*1502 and carbamazepine-induced severe cutaneous adverse drug reactions in a Thai population. Epilepsia (2010) 51(5):926-930.

Tohyama M, Yahata Y, Yasukawa M, Inagi R, Urano Y, Yamanishi K, Hashimoto K. Severe hypersensitivity syndrome due to sulfasalazine associated with reactivation of human herpesvirus 6. Arch Dermatol (1998) 134(9):1113-1117.

Torres MJ, Corzo JL, Leyva L, Mayorga C, Garcia-Martin FJ, Antunez C, Posadas S, Jurado A, Blanca M. Differences in the immunological responses in drug- and virus-induced cutaneous reactions in children. Blood Cells Mol Dis (2003) 30(1):124-131.

Trujillo M, Naviliat M, Alvarez MN, Peluffo G, Radi R. Peroxynitrite biochemistry : formation, reactions and detection : Characterization of nitric oxide and superoxide in biological systems. Analusis (2000) 28(6):518-527.

Uetrecht JP. Myeloperoxidase as a generator of drug free radicals. Biochem Soc Symp (1995) 61:163-170.

Uetrecht JP. New concepts in immunology relevant to idiosyncratic drug reactions: the "danger hypothesis" and innate immune system. Chem Res Toxicol (1999) 12(5):387-395.

Uetrecht J, Sokoluk B.Comparative metabolism and covalent binding of procainamide by human leukocytes. Drug Metab Dispos (1992) 20(1):120-123.

Verrotti A, Basciani F, Trotta D, Greco R, Morgese G, Chiarelli F. Effect of anticonvulsant drugs on interleukins-1, -2 and -6 and monocyte chemoattractant protein-1.Clin Exp Med (2001) 1(3):133-136.

Vispé S, Vandenberghe I, Robin M, Annereau JP, Créancier L, Pique V, Galy JP, Kruczynski A, Barret JM, Bailly C. Novel tetra-acridine derivatives as dual inhibitors of topoisomerase II and the human proteasome. Biochem Pharmacol (2007) 73(12):1863-1872.

Vocanson M, Rozieres A, Hennino A, Poyet G, Gaillard V, Renaudineau S, Achachi A, Benetiere J, Kaiserlian D, Dubois B, Nicolas JF. Inducible costimulator (ICOS) is a

marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of T(H)17/T(H)1 and regulatory T cells. J Allergy Clin Immunol (2010) 126(2):280-289.e7.

Vogna D, Marotta R, Andreozzi R, Napolitano A, d'Ischia M. Kinetic and chemical assessment of the UV/H2O2 treatment of antiepileptic drug carbamazepine. Chemosphere (2004) 54(4), 497-505.

Wad N, Guenat C and Krämer G. Carbamazepine: detection of another metabolites in serum, 9 hydroxymethyl-10-carbamoyl acridan. Ther Drug Monit (1997) 19:314-317.

Wolkenstein P, Tan C, Lecoeur S, Wechsler J, Garcia-Martin N, Charue D, Bagot M, Beaune P. Covalent binding of carbamazepine reactive metabolites to P450 isoforms present in the skin. Chem Biol Interact (1998) 113(1):39-50.

Wolkenstein P, Charue D, Laurent P, Revuz J, Roujeau JC, Bagot M. Metabolic predisposition to cutaneous adverse drug reactions. Role in toxic epidermal necrolysis caused by sulfonamides and anticonvulsants. Arch Dermatol (1995) 131(5):544-551.

Wolkenstein P, Loriot MA, Aractingi S, Cabelguenne A, Beaune P, Chosidow O. Prospective evaluation of detoxification pathways as markers of cutaneous adverse reactions to sulphonamides in AIDS. Pharmacogenetics (2000) 10(9):821-828.

Wu Y, Sanderson JP, Farrell J, Drummond NS, Hanson A, Bowkett E, Berry N, Stachulski AV, Clarke SE, Pichler WJ, Pirmohamed M, Park BK, and Naisbitt DJ. Activation of T cells by carbamazepine and carbamazepine metabolites. J Allergy Clin Immunol (2006) 118:233-241.

Wu Y, Farrell J, Pirmohamed M, Park BK, Naisbitt DJ. Generation and characterization of antigen-specific CD4+, CD8+, and CD4+CD8+ T-cell clones from patients with carbamazepine hypersensitivity. J Allergy Clin Immunol (2007) 119(4):973-981.

Yang CW, Hung SI, Juo CG, Lin YP, Fang WH, Lu IH, Chen ST, Chen YT. HLA-B*1502-bound peptides: implications for the pathogenesis of carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome. J Allergy Clin Immunol (2007) 120(4):870-877.

Yoshikawa Y, Hosomi H, Fukami T, Nakajima M, Yokoi T. Establishment of knockdown of superoxide dismutase 2 and expression of CYP3A4 cell system to evaluate drug-induced cytotoxicity. Toxicol In Vitro (2009) 23(6):1179-1187.

Yun SJ, Lee JB, Kim EJ, Quan G, Kim SJ, Won YH, Lee SC. Drug rash with eosinophilia and systemic symptoms induced by valproate and carbamazepine: formation of circulating auto-antibody against 190-kDa antigen. Acta Derm Venereol (2006) 86(3):241-244.

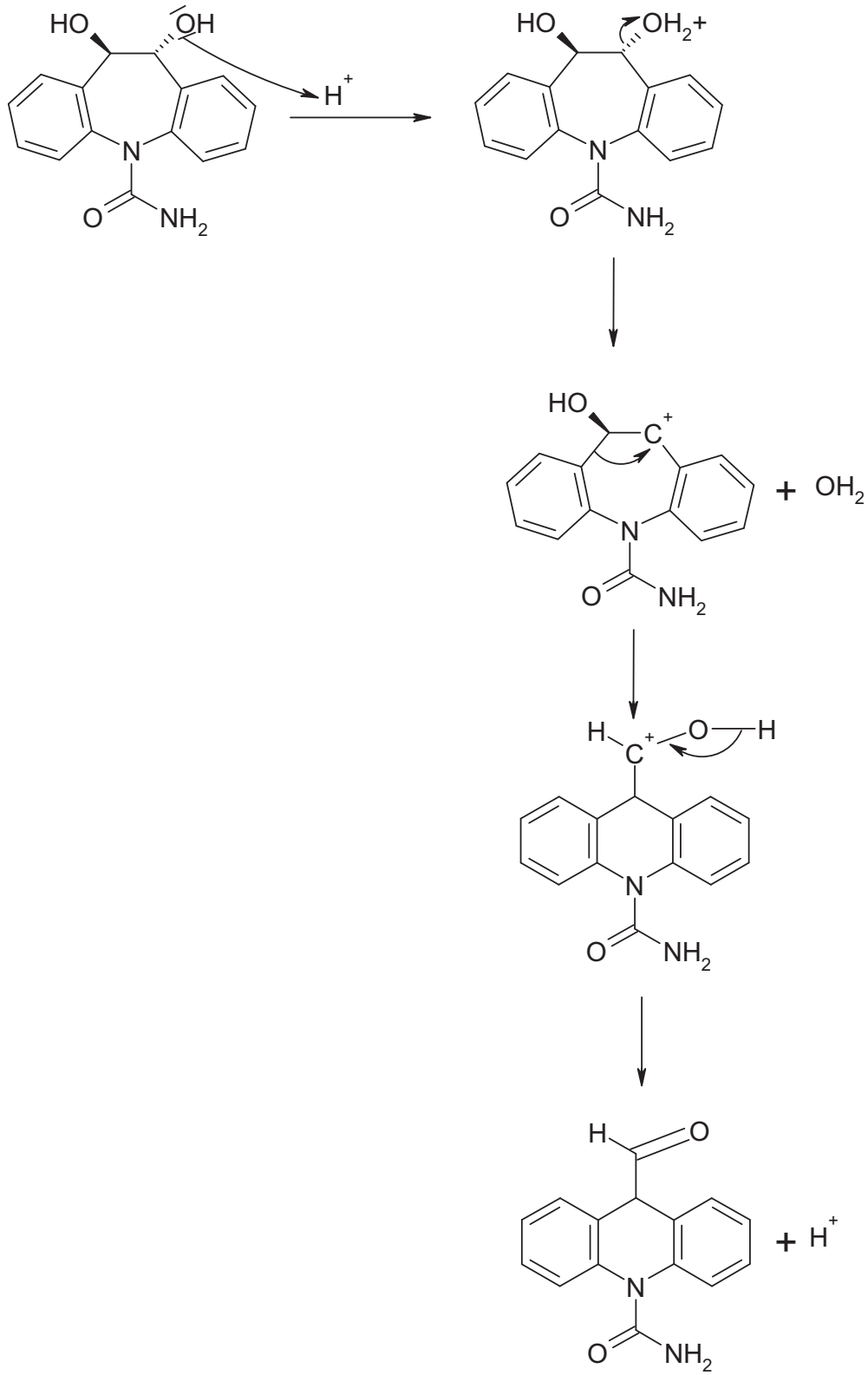
Zawodniak A, Lochmatter P, Beeler A, Pichler WJ. Cross-Reactivity in Drug Hypersensitivity Reactions to Sulfasalazine and Sulfamethoxazole. Int Arch Allergy Immunol (2010a) 153(2):152-156.

Zawodniak A, Lochmatter P, Yerly D, Kawabata T, Lerch M, Yawalkar N, Pichler WJ. In vitro detection of cytotoxic T and NK cells in peripheral blood of patients with various drug-induced skin diseases. Allergy (2010b) 65(3):376-384.

Zbaida S, Kariv R. Simulation of the hepatic metabolism of stilbene and its tricyclic derivatives by Fenton and Ruff reagents: models for cytochrome P-450 activation of chemical carcinogens. Biopharm Drug Dispos (1990) 11(1):39-51.

Zeller A, Schaub N, Steffen I, Battegay E, Hirsch HH, Bircher AJ. Drug hypersensitivity syndrome to carbamazepine and human herpes virus 6 infection: case report and literature review. Infection (2003) 31(4):254-256.

Annexe 1 : Mécanisme du réarrangement pinacolique à partir de la DiOH-CBZ



Annexe 2 : Mail d'acceptation de la publication dans Pharmacological Reports

De : "Pharmacological Reports" <editor@if-pan.krakow.pl>
A : <omt.mathieu@wanadoo.fr>, <hillaire.dominique@gmail.com>

Date : Mercredi, 15 Septembre, 2010 11:29AM
Objet : Pharmacol Rep, paper no. 4678, accepted for publication
Historique : Ce message a été transféré.

Dear Authors,

We kindly inform you that your revised form of the manuscript entitled " Effects of carbamazepine and metabolites on IL-2, IL-5, IL-6, IL-10 and IFN- γ secretion in epileptic patients, influence of comedication " (no. **4678**) was accepted for publication and it will be probably published in **no. 1 (January – February) "Pharmacological Reports", 2011, vol. 63** .
However the paper requires some correction. After proof reading by Editors we will send your manuscript together with our remarks in the text by e-mail (about 2-3 months before publishing).
Best regards,
Beata Kreiner
PHARMACOLOGICAL REPORTS
Institute of Pharmacology
Polish Academy of Sciences
31-343 Krakow, Smetna 12
tel. +48 12 6623237
fax +48 12 6374500
e-mail: editor@if-pan.krakow.pl

Annexe 3 : Méthode de dosage de la CBZ et de ses dérivés par LC/MS publiée par notre équipe en 2005

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT
Journal of Chromatography B, 828 (2005) 80–90
JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B
www.elsevier.com/locate/chromb

Liquid chromatography–electrospray mass spectrometry determination of carbamazepine, oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma

Hélène Breton[a,b], Marylène Cociglio[a,b,c], Françoise Bressolle[d], Hélène Peyriere[b], Jean Pierre Blayac[b], Dominique Hillaire-Buys[a,b,c,*]

[a] INSERM U 454, Arnaud de Villeneuve Hospital, Montpellier, France
[b] Department of Medical Pharmacology and Toxicology, Lapeyronie Hospital, Montpellier, France
[c] Therapeutic Drug Monitoring unit, Lapeyronie Hospital, Montpellier, Department of Medical Pharmacology and Toxicology, 371 Avenue du Doyen Giraud, 34295 Montpellier cedex 5, France
[d] Clinical Pharmacokinetic Laboratory, Faculty of Pharmacy, Montpellier I University, Montpellier, France

Received 22 June 2005; accepted 12 September 2005
Available online 3 October 2005

Abstract

Carbamazepine (CBZ) and oxcarbazepine (OXCBZ) are both antiepileptic drugs, which are prescribed as first-line drugs for the treatment of partial and generalized tonic–clonic epileptic seizures. In this paper, a specific and sensitive liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry method was described for the simultaneous determination of carbamazepine (CBZ), oxcarbazepine (OXCBZ) and eight of their metabolites [CBZ-10,11-epoxide (CBZ-EP), 10,11-dihydro-10,11-*trans*-dihydroxy-carbamazepine (DiOH-CBZ), 10-hydroxy-10,11-dihydroCBZ (10-OH-CBZ), 2-hydroxycarbamazepine (2-OH-CBZ), 3-hydroxycarbamazepine (3-OH-CBZ), iminostilbene (IM), acridone (AO) and acridine (AI)] in human plasma. The work-up procedure involved a simple precipitation with acetone. Separation of the analytes was achieved within 50 min using a Zorbax eclipse XD8 C8 analytical column. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile–formate buffer (2 mM, pH 3). Detection was performed using a quadrupole mass spectrometer fitted with an electrospray ion source. Mass spectrometric data were acquired in single ion recording mode at *m/z* 237 for CBZ, *m/z* 180 for CBZ-EP and AI, *m/z* 236 for OXCBZ, *m/z* 237 for 10-OH-CBZ, *m/z* 253 for 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ and DiOH-CBZ, *m/z* 196 for AO and *m/z* 194 for IM. For all analytes, the drug/internal standard peak height ratios were linked via a quadratic relationship to plasma concentrations. The extraction recovery averaged 90% for CBZ, 80% for OXCBZ and was 80–105% for the metabolites. The lower limit of quantitation was 0.5 mg/l for CBZ, 0.4 mg/l for OXCBZ and ranged from 0.02 to 0.3 mg/l for the metabolites. Precision ranged from 2 to 13% and accuracy was between 86 and 112%. This method was found suitable for the analysis of plasma samples collected during therapeutic drug monitoring of patients treated with CBZ or OXCBZ.
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Liquid chromatography–mass spectrometry; Carbamazepine; Oxcarbazepine; Metabolites; Validation

1. Introduction

Carbamazepine (5H-dibenz/bf/azepine-5-carboxamide) (CBZ) is the most frequently prescribed first-line drug for the treatment of partial and generalized tonic–clonic epileptic seizures [1]. Of the adverse reactions associated with CBZ, 5% can be classified as idiosyncratic or hypersensitivity reactions. These can range from serious skin reactions, such as erythema multiforme [2], to severe haematological disorders, especially agranulocytosis and aplastic anemia [3,4]. Such reactions are unpredictable and are associated with high mortality rates. Although the mechanism of CBZ-induced adverse reactions is not clear, they are thought to result from the formation of reactive metabolites [5].

Carbamazepine is predominantly metabolized in the liver into various metabolites. At least 30 different metabolites have been

Abbreviations: CBZ, carbamazepine; OXCBZ, oxcarbazepine; CBZ-EP, carbamazepine-10,11-epoxide; DiOH-CBZ, 10,11-dihydro-10,11-*trans*-dihydroxy-carbamazepine; 10-OH-CBZ, 10-hydroxy-10,11-dihydro carbamazepine; 2-OH-CBZ, 2-hydroxycarbamazepine; 3-OH-CBZ, 3-hydroxycarbamazepine; IM, iminostilbene; AO, acridone; AI, acridine; QC, quality control

* Corresponding author. Tel.: +33 4 67 33 67 57; fax: +33 4 67 33 67 51.
E-mail address: d-hillaire@chu-montpellier.fr (D. Hillaire-Buys).

1570-0232/$ – see front matter © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jchromb.2005.09.019

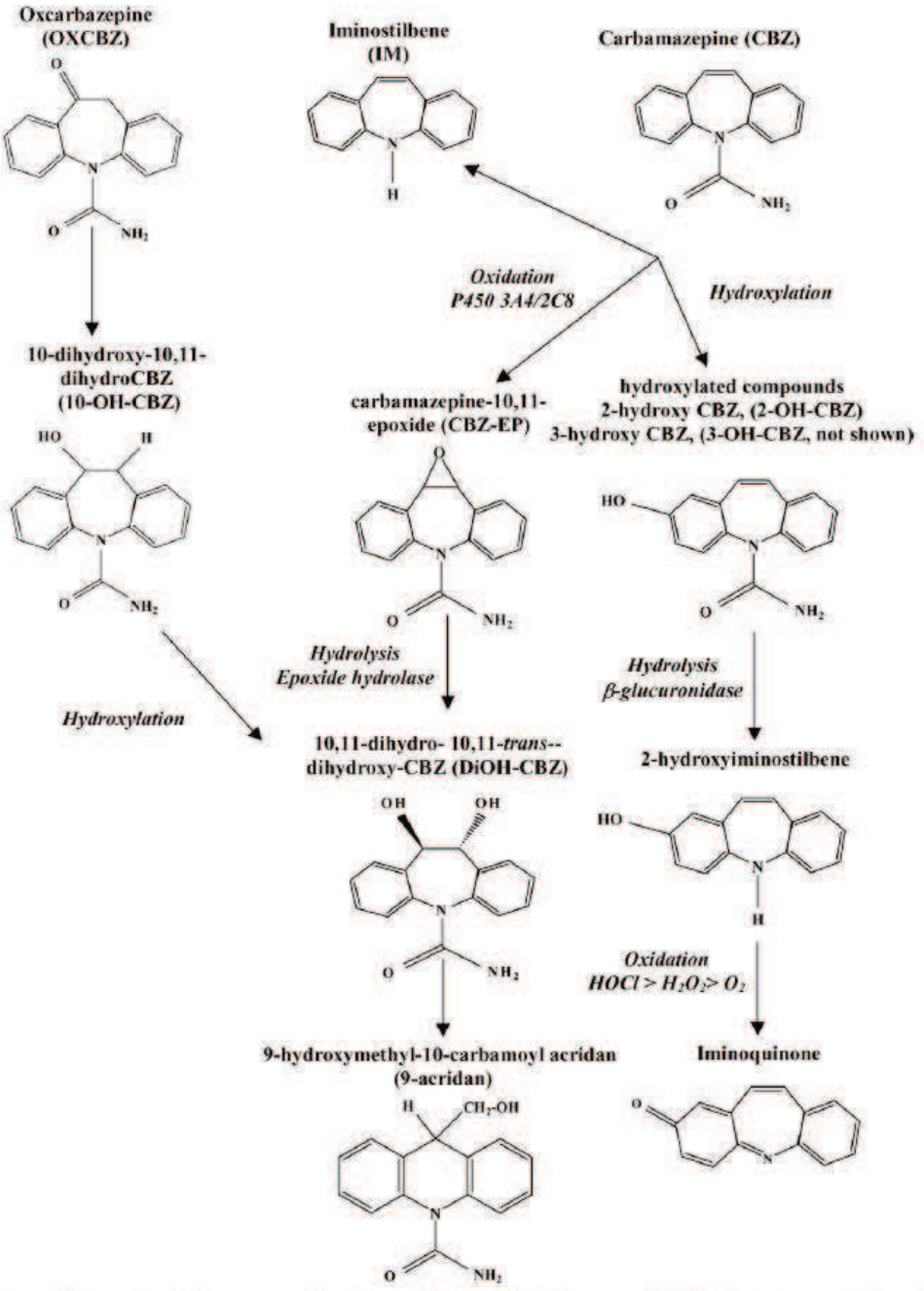


Fig. 1. Hepatic metabolism pathway of carbamazepine and oxcarbazepine. For the hydroxylated compounds, the hydroxylation in position 2 is only presented.

identified [6]. Three principal metabolic pathways have been described [7–13] (Fig. 1). The main route is the formation of the carbamazepine-10,11-epoxide (CBZ-EP), a pharmacologically active compound with anticonvulsant properties. A second route of metabolism concerns the production of hydroxylated compounds. The third minor route of metabolism leads to the formation of iminostilbene (IM). Although the liver is the major site of drug metabolism, the biological half-life of most reactive

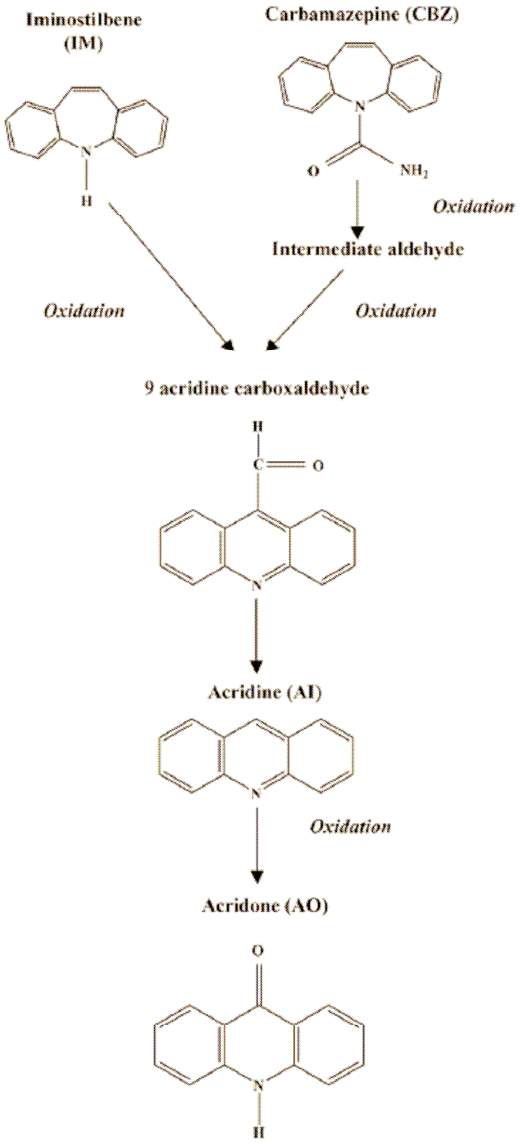


Fig. 2. Carbamazepine and iminostilbene oxidations by activated leucocytes.

metabolites is not sufficient to cause toxicity at distant sites. Leucocytes not only are the major cells involved in the induction of an immune response but also exhibit strong oxidizing properties. Into the leucocytes, CBZ is converted by the myeloperoxidase in a series of metabolites mainly to an intermediate aldehyde, 9-acridine carboxaldehyde, acridine (AI) and acridone (AO) [8] (Fig. 2).

During the last decade, CBZ-EP has been suspected to play a key role in CBZ-induced side-effects, especially severe cutaneous reactions such as Stevens–Johnson syndrome, toxic epidermolysis necrosis or drug rash with eosinophilia and systemic system syndrome. However, CBZ-EP's involvement as the reactive metabolite in idiosyncrasic reactions has been rule out in many studies showing the absence of relationship between this type of side-effects and the presence of CBZ-EP [14]. Furthermore, the initial hypothesis involving epoxyde hydrolase's polymorphism has been excluded [15]. Thus, minor metabolites produced by alternative pathways of metabolism could be considered as potential reactive metabolites. 9-acridine carboxaldehyde, IM and iminoquinone are reactive metabolites [9], whereas 9-hydroxymethyl-10-carbamoyl-acridan (9-acridan), AI and AO are only suspected to be reactive metabolites due to the structural similarity [8].

Oxcarbazepine (OXCBZ), the 10-keto analogue of CBZ, is a more recently marketed antiepileptic drug which has chemical and therapeutic similarities to CBZ. CBZ is frequently substituted by OXCBZ. OXCBZ is mainly metabolized to 10-hydroxy-10,11-dihydroCBZ (10-OH-CBZ) (Fig. 1) probably through a non-inducible aldo-keto-reductase [16]. This therapeutically active metabolite gives the 10,11-dihydro-10,11-*trans*-dihydroxy-carbamazepine (carbamazepine *trans*-diol, DiOH-CBZ) a common metabolite with CBZ. Another potential common metabolite is the hydroxylated compound, 3-hydroxycarbamazepine (3-OH-CBZ), found in plasma of patients treated with OXCBZ, but the enzyme system involved is not identified yet [17–19]. OXCBZ cause undesired side-effects similar to those of CBZ; however, their incidence and severity are reduced [20].

The thermal instability of CBZ and OXCBZ makes high-performance liquid chromatography (HPLC) more attractive to use than gas chromatography [6,21–23], which in addition requires a complicated derivatisation procedure as sample preparation. To date, some HPLC methods with ultra-violet [17–19,24–34] or mass spectrometry [10,11,35,36] detection for determining CBZ and/or OXCBZ in biological fluids (plasma, urine) have been published. Some of them involved both the quantitation of CBZ or OXCBZ and their main metabolites (CBZ-EP, 10-OH-CBZ, DiOH-CBZ [19,24,26–31,33,34]. Other methods allow to quantify either CBZ, CBZ-EP, 10-OH-CBZ, DiOH-CBZ and the 9-acridan [25,32], or the hydroxylated compounds (2-hydroxycarbamazepine (2-OH-CBZ); 3-OH-CBZ) [18]. One method allows to quantify CBZ, OXCBZ, CBZ-EP, 10-OH-CBZ, DiOH-CBZ and the 9-acridan [17]. Four liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) methods have been published; two of them were focused mainly to the determination of the 9-acridan [10,11]. Two methods have recently been described, the first one for the determination of CBZ and CBZ-EP by tandem liquid chromatography–mass spectrometry with electrospray ionisation [35] and the second one for the determination of CBZ and 10-OH-CBZ by atmospheric pressure chemicalionization liquid chromatography/mass spectrometry [36]. All these methods involved tedious sample pretreatment (liquid–liquid or solid-phase extraction) of the biological samples.

To date, no bioanalytical assay has been described for the simultaneous determination of CBZ, OXCBZ and most of their metabolites from both hepatic and leucocyte metabolism path-

ways. The aim of this study was to develop a reliable, specific and sensitive LC–MS method for the simultaneous quantitation of the parent drugs (CBZ and OXCBZ) and eight identified metabolites (CBZ-EP, 10-OH-CBZ, DiOH-CBZ, 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ, IM, AO, AI) in human plasma. This method involved a simple precipitation of the samples with acetone allowing rapid therapeutic drug monitoring of patients treated with CBZ or OXCBZ. This method has an enhanced precision due to the use of an internal standard (2-methyl CBZ). It was validated according to validation procedures, parameters and acceptance criteria based on USP XXIII guidelines and FDA guidance [37–40].

2. Experimental

2.1. Materials and reagents

CBZ, CBZ-EP, 2-methyl CBZ (internal standard), IM, AO and AI were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). OXCBZ, 10-OH-CBZ, DiOH-CBZ, 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ were kindly supplied by Novartis Pharma (Basel, Switzerland). The reagents were of analytical-reagent grade and the acetonitrile was of HPLC grade, all of them were obtained from Merck (Nogent/Marne, France). The formate buffer solution (pH 3) consisted of formic acid salt (126 mg/l) in purified water. Purified water was generated by a Milli-Q reagent water system (Millipore corporation, Bedford, MA).

For the validation of the method, blood samples from healthy volunteers (Etablissement Français du sang, Montpellier, France) were collected in heparinized tubes and plasma was obtained by centrifugation at 1000 × *g* for 10 min. Pooled drug-free plasma samples were aliquoted, frozen at −20 °C, and then used during the study for the preparation of calibration standards and quality control (QC) samples.

Stock solutions (1 mM) of the analytes and of the internal standard (0.2 mM) were prepared by dissolving each compound in acetonitrile. Stock solutions could be stored at 4 °C protected from light for 1 month. For each compound, two separate stock standard solutions were prepared; one which was used for the preparation of calibration curve standards and the second, which was used for the preparation of quality control samples. The working solutions were prepared fresh daily by diluting stock solutions with acetonitrile–water (50:50, v/v).

2.2. Equipment and chromatographic conditions

The LC–MS analysis was performed using a Hewlett Packard (Les Ulis, France) Agilent 1100 mass spectrometer equipped with an electrospray interface and a data acquisition station (08.04 version). The mass spectrometer was coupled to a Hewlett Packard LC system equipped with a quaternary pumping unit and an autosampler with a loading valve fitted with a 100-μl sample loop (Interchim, Montluçon, France) and set at 4 °C. Separation of the analytes was performed on a Zorbax eclipse XD8 C8 column 150 mm × 4.6 mm, i.d., packed with particles of 4 μm-size. The eluent mixture used consisted of acetonitrile (solvent A) and formate buffer (2 mM, pH 3, solvent B) delivered at a flow rate of 0.8 ml/min. The mobile phase used was a linear gradient over 30 min from 15 to 60% (solvent A) followed by a linear gradient over 10 min from 60 to 70% (solvent A). The column was thermostated at 25 °C. The column was then washed for 5 min with the final gradient solution (70% of solvent A), brought back to the initial condition over 1 min and re-equilibrated for 4 min. The total cycle was therefore 50 min. The injection volume was 20 μl.

Table 1
Selected ions for each compound

Drugs	Molecular ions ($M+H^+$), (*m/z*)	Specific fragments (*m/z*)
CBZ	237	194
CBZ-EP	236	180
OXCBZ	253	236
10-OH-CBZ	255	237
DiOH-CBZ	271	253
9-Acridan[a]	255	180
2-OH-CBZ	253	210
3-OH-CBZ	253	210
AI	180	152
AO	196	167
IM	179	194

[a] Selected ions were identified from the literature [10,11].

The mass spectrometer was calibrated in the positive ion mode (ESI+) using a mixture of NaI and CsI. The drying gas temperature and flow were maintained at 350 °C and 10 l/min, respectively and the nebulizer pressure was set at 15 psi. The mass spectra obtained from the ion fragmention of each analyte were acquired between 105 and 170 V. The precise value of each cone voltage selected for each compound is not done since it should be kept in mind that the use of the same fragmenter voltage in different apparatus might result in different abundances of the fragments formed. From the full-scan spectra (Fig. 3), for each compound, two specific ions were selected: the protonated molecular ion ($M+H^+$) and the daughter ion (Table 1). Mass spectrometric data were acquired in simple ion recording mode at *m/z* 237 for CBZ, *m/z* 180 for CBZ-EP and AI, *m/z* 236 for OXCBZ, *m/z* 237 for 10-OH-CBZ, *m/z* 253 for 2-, 3-OH-CBZ and DiOH-CBZ, *m/z* 196 for AO and *m/z* 194 for IM.

2.3. Preparation of calibration standards and QC samples

The calibration set consisted of seven concentrations, prepared by adding 10 μl of the appropriate working solutions into 0.3 ml of drug-free human plasma. Concentration ranges were 0.5–20 mg/l for CBZ, 0.1–5 mg/l for CBZ-EP, 0.4–20 mg/l for OXCBZ and DiOH-CBZ, 0.3–20 mg/l for 10-OH-CBZ, 0.023–1.25 mgl/l for 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ and AI, and 0.024–1.25 mg/l for AO and IM. The volume added was always less than or equal to 4% of total volume of the samples, so that the integrity of the matrix was maintained.

QC samples used in the validation study were prepared in the same way as the calibration standards, by mixing drug-free human plasma with appropriate volumes of working solutions to obtain three different concentrations, one near to the lower limit of quantitation (C1), one near to the center (C2) and one near to

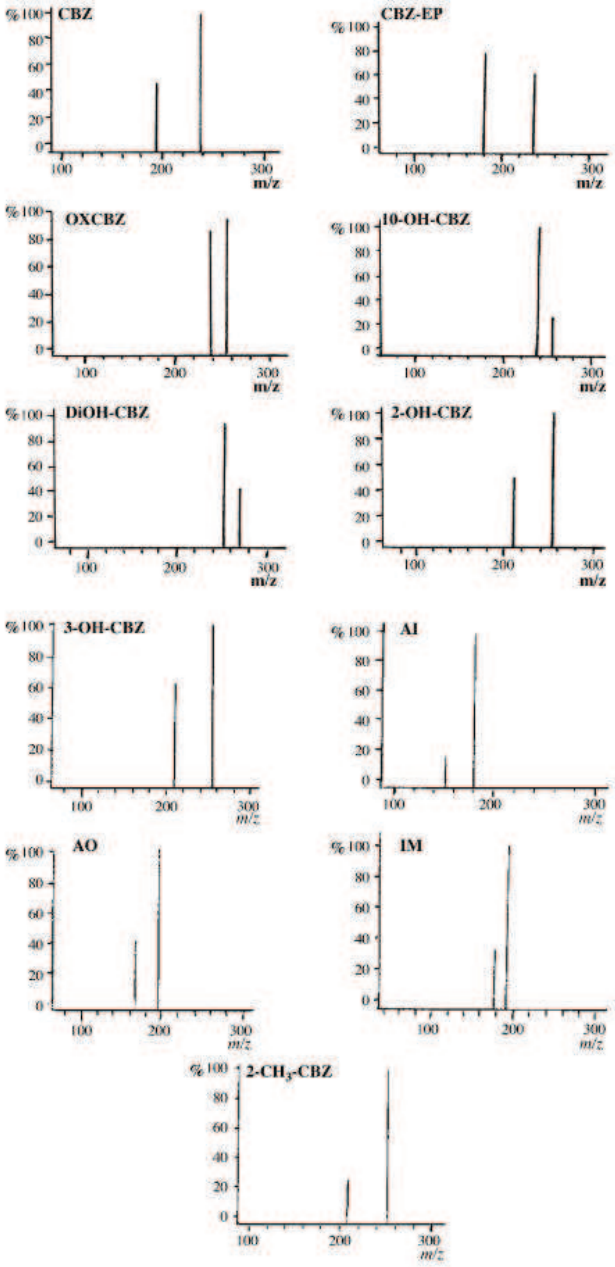


Fig. 3. ESI mass spectra (scan mode) for all compounds.

the upper boundary of the standard curve (C3), (0.7, 5.5, 15 mg/l for CBZ, OXCBZ, 10-OH-CBZ, DiOH-CBZ; 0.16, 1.5, 4 mg/l for CBZ-EP and 0.04, 0.35, 1 mg/l for 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ, AI, AO, IM). Before the sample pretreatment procedure, standards and QC samples previously vortex-mixed were incubated at 25 °C for 15 min, to allow a steady-state with the matrix components. A calibration curve and 3 QC samples were run with every set of eight unknown samples.

2.4. Sample preparation procedure

A 300 μl aliquot of plasma was mixed with 10 μl of internal standard (0.2 mM.); the mixture was vortex-mixed (15 s) then 300 μl of acetone were added and proteins were denatured during 30 s of full speed Vortex mixing. After centrifugation at 1400 × *g* for 10 min, the supernatant was collected and concentrated by evaporation under a stream of nitrogen for 30 min at 37 °C. The dried residue was reconstituted with 40 μl of acetone–water (50:50, v/v), then vortex-mixed to homogenize. A 20 μl volume was injected onto the HPLC column.

2.5. Method validation

2.5.1. Data analysis

From recorded peak heights, the ratio of each analyte to internal standard was calculated. The peak-height ratios were linked to the concentrations of each analyte in plasma according to a quadratic process as: $Y = aX^2 + bX + c$, in which Y is the peak height ratio and X is the concentration of the analyte. The regression curve was not forced through zero. The resulting a, b, c parameters were used to calculate back-calculated concentrations for the calibration curves, which were then statistically evaluated. The normal distribution of the residuals (the difference between nominal and back-calculated concentrations) was verified. Moreover, the mean residual values were computed and compared with zero (Student's *t*-test); the 95% confidence intervals were also determined.

Due to the lack of reference substance available, 9-acridan, a suspected reactive metabolite, was estimated in plasma from the peak height ratio, 9-acridan/DiOH-CBZ, DiOH-CBZ being the direct precursor of 9-acridan. For a specific patient, its concentration was expressed as a percent of the concentration of its direct precursor, as follows:

$$\left[\frac{\text{Peak height of 9-acridan}}{\text{peak height DiOH-CBZ}}\right] \times 100$$

The 9-acridan was identified using the predominant ions at *m/z* 255 and *m/z* 180; the two common ions described in the literature [10,11].

2.5.2. Precision and accuracy

Inter- and intra-day precision and accuracy of the assay were assessed by performing replicate analyses of QC samples (C1, C2, C3) in plasma against a calibration curve. The procedure was repeated on different days ($n = 5$) to determine inter-day repeatability. Intra-day repeatability was determined by treating spiked samples in replicate ($n = 5$) the same day.

The accuracy was evaluated as [mean found concentration/theoretical concentration] × 100; precision was given by the percent relative standard deviation (R.S.D.).

2.5.3. Extraction efficiency

Different solvents (methanol, acetonitrile and acetone) were used to precipitate the proteins from the matrix. Extraction recoveries of the different analytes from plasma were measured three times at each QC sample concentration by calculating the percentage difference between the peak heights of treated QC samples and those of untreated reference standard solutions containing the corresponding concentrations.

2.5.4. Determination of the lower limit of quantitation (LLOQ)

The LLOQ estimated on spiked samples was defined as the lowest concentration which can be determined with a precision ≤20% and an accuracy between 100 ± 20% on a day to day basis. [37–40].

2.5.5. Ion suppression and specificity studies

The absence of ion suppression was demonstrated by the method of Matuszewski et al. [41]. To investigate potential ion suppression effects attributable to the matrix, six different batches of drug-free plasma were treated as described above. The reconstituted extracts (40 μl containing acetone–water, 50:50, v/v) were then enriched with all analytes at three different concentrations (C1, C2, C3). A reference solution containing 40 μl of acetone–water (50:50, v/v) was also enriched with all drugs to the same nominal concentrations. The reconstituted extracts and reference solutions were injected into the LC–MS system. Peak heights obtained from the reconstituted extracts were compared with the corresponding peak heights produced by the reference solutions. The mean height ratios (reconstituted extract in plasma/reference solutions) are presented in Table 2. Thus, no ion-suppression was observed.

The specificity of the method was investigated by analyzing six different batches of drug-free human plasma to determine whether endogenous constituents coeluted with the different analytes. The retention times of endogenous compounds in the matrix were compared with that of the compounds of interest.

Plasma samples from patients receiving other drugs, which might be taken concomitantly with the test drugs, were analyzed for interference. Thus, for drugs that were metabolized in the body, the possible interference with the metabolites was also tested. The following drugs were checked: ethosuximide, lamotrigine, phenobarbital, phenytoïne, and valproïc acid.

Table 2
Results of ion suppression studies

Compounds	Mean height ratios (reconstituted extract in plasma/reference solutions)	R.S.D. (%)
CBZ	0.974	3.41
CBZ-EP	1.04	4.22
OXCBZ	0.96	2.11
10-OH-CBZ	1.05	3.32
DiOH-CBZ	1.04	4.43
2-OH-CBZ	1.03	1.80
3-OH-CBZ	0.937	2.02
AI	1.04	1.90
AO	1.01	1.75
IM	0.977	3.27

2.6. Therapeutic drug monitoring of patient treated with CBZ or OXCBZ

To validate this method, plasma samples from therapeutic drug monitoring of patients chronically treated with CBZ or OXCBZ were analyzed. The recommended daily CBZ, and OXCBZ adult doses were 10–15 and 8–10 mg/kg/day, respectively. This dosage regimen allowed to obtain drug plasma levels at steady-state of 4–12 mg/l for CBZ and 5–20 mg/l for the sum of OXCBZ and 10-OH-CBZ. During therapeutic drug monitoring, blood samples were collected into heparinised tubes at 8:00 h in the morning, just before the first daily drug administration. Immediately after collection blood samples were centrifuged at 1400 × *g* for 10 min; the plasma was transferred into polypropylene tubes and immediately frozen at −20 °C until assay.

3. Results and discussion

3.1. Retention times and specificity

Representative chromatograms are shown in Fig. 4. Under the chromatographic conditions described above, peaks

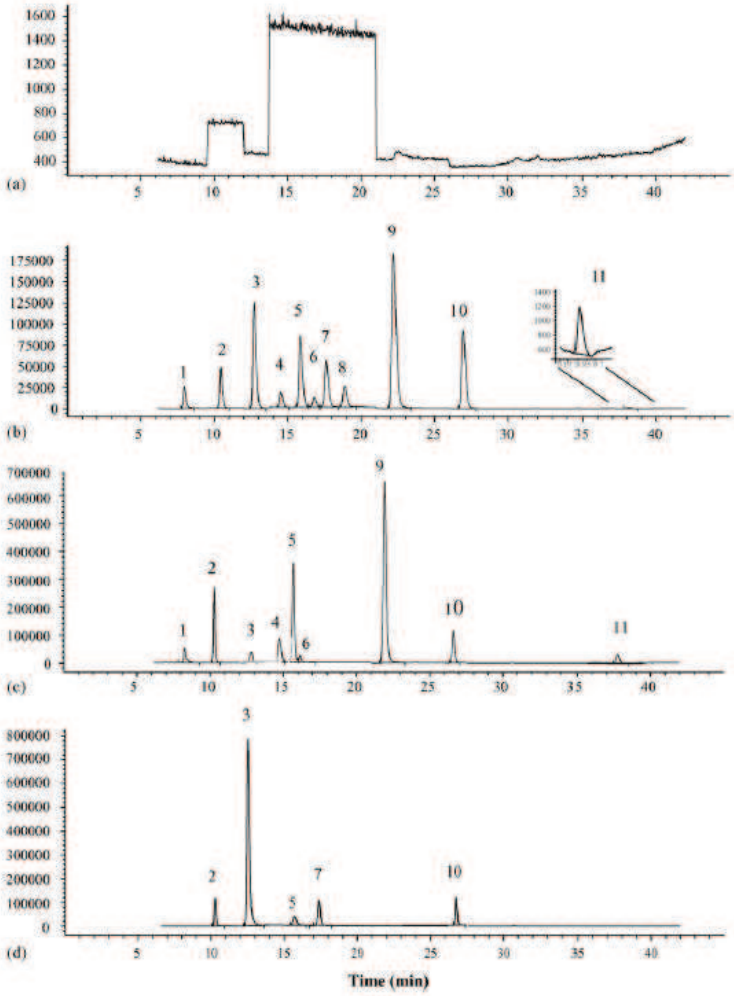


Fig. 4. Typical chromatograms (single-ion recording mode) of drug-free human plasma (a), of drug-free human plasma enriched with AI, 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ, AO, IM at 0.0391 mg/l, DiOH-CBZ, 10-OH-CBZ, OXCBZ, CBZ at 0.625 mg/l and CBZ-EP at 0.156 mg/l (b), of plasma from an authentic epileptic patient treated with CBZ (200 mg twice a day) (concentrations of each compound: 0.034, 5.67, 0.60, 0.037, 3.62, 0.023, 10.9 and 0.031 mg/l for AI, DiOH-CBZ, 10-OH-CBZ, 2-OH-CBZ, CBZ-EP; 3-OH-CBZ, CBZ and IM, respectively) (c) and of plasma from an authentic epileptic patient treated with OXCBZ (600 mg the morning, 300 mg the evening) (concentration of each compound: 1.84, 3.24, 0.023 and 2.98 mg/l for DiOH-CBZ, 10-OH-CBZ, 3-OH-CBZ and OXCBZ, respectively) (d). 1: AI; 2: DiOH-CBZ; 3: 10-OH-CBZ; 4: 2-OH-CBZ; 5: CBZ-EP; 6: 3-OH-CBZ; 7: OXCBZ; 8: AO; 9: CBZ; 10: SI; 11:IM.

were adequately separated. During the 6 months of validation, observed retention times were: AI, 7.7 ± 0.4 min; DiOH-CBZ, 10.3 ± 0.2 min; 10-OH-CBZ, 12.5 ± 0.2 min; 2-OH-CBZ, 14.3 ± 0.25 min; CBZ-EP, 15.7 ± 0.15 min; 3-OH-CBZ, 16.6 ± 0.3 min; OXCBZ, 17.5 ± 0.2 min; AO, 18.3 ± 0.15 min; CBZ, 21.9 ± 0.25 min;; I.S., 26.9 ± 0.2 min; IM, 38.1 ± 0.15 min. Under the chromatographic conditions used, the number of theoretical plates (calculated from the 10-OH-CBZ peak) was approximately 88,500. The column was replaced when the number of theoretical plates decreased below 49,000 (i.e., after 800 analyses).

As shown in Fig. 4a, no peaks due to the matrix interfered at the retention time of the analytes. No interference was found with all tested drugs.

3.2. Drug/response relationship

For all compounds, the quadratic regressions indicated a mean coefficient of determination higher than 0.996. For each compound, mean parameters of the quadratic equation are presented in Table 3. For each point on the calibration curves, the concentrations were back-calculated from the corresponding quadratic equation and mean ± S.D. values were calculated. The results are presented in Table 4. For each analyte, the goodness of fit between back-calculated concentrations and nominal concentrations was statistically evaluated (i) by comparing the regression line of back-calculated versus nominal concentrations to the reference line of slope = 1 and intercept = 0; no significant different was observed; (ii) by studying the frequency distribution histogram of the residuals, which were normally distributed and centred around zero, the number of positive and negative values being approximately equal; and (iii) by comparing the bias to zero; a *t*-test showed that this parameter was not statistically different from zero; moreover, the 95% confidence interval included the zero value.

3.3. Extraction efficiency, precision, accuracy and LLOQ

Most of the published methods involved tedious liquid–liquid [17,25,27,29,32,35,36] or solid-phase [18,19,26,28] extraction of the biological samples. In other published methods, acetonitrile was added to plasma samples to precipitate the plasma proteins [31,33,34]. In our study, protein precipitation was obtained by modification of the dielectric constant by using either methanol, acetonitrile and acetone. However, the highest extraction recoveries were obtained with acetone (data no shown). Extraction recoveries were determined at concentrations of QC samples (0.7, 5.5, 15 mg/l for CBZ, OXCBZ, 10-OH-CBZ, DiOH-CBZ; 0.16, 1.5, 4 mg/l for CBZ-EP and 0.04, 0.35, 1 mg/l for 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ, AI, AO, IM). They were 90 ± 6.7% for CBZ and 80 ± 8.2% for OXCBZ. For the metabolites, the extraction recoveries ranged from 80 to 105%: CBZ-EP (98 ± 5.4%), DiOH-CBZ (80 ± 7.2%), 10-OH-CBZ (105 ± 9.1%), 2-OH-CBZ (89 ± 6.5%), 3-OH-CBZ (92 ± 8.4%), AI (91 ± 4.9%), AO (89 ± 7.4%), IM (80 ± 11.6%).

In regard to previously published methods, the present method involving a simple precipitation of the samples with acetone is neither time-consuming nor expensive, with good extraction recoveries.

Inter- and intra-day precision and accuracy results are presented in Table 5.

Using 0.3 ml of plasma, the LLOQs were 0.5 mg/l for CBZ, 0.1 mg/l for CBZ-EP, 0.4 mg/l for OXCBZ and DiOH-CBZ, 0.3 mg/l for 10-OH-CBZ and 0.023 mg/l for the minor metabolites: 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ, AI, AO and IM (Table 3). Similar results were obtained by Martens and Banditt [27] for CBZ and EP-CBZ and by Pienimäki et al. [17] and Mandrioli et al. [18] for 2-OH-CBZ and 3-OH-CBZ. Higher LLOQ values were reported from published studies involving a simple precipitation with acetonitrile [33,34] or liquid–liquid extraction [32]. However, other workers reached lower LLOQ values (0.7 μg/l to 0.05 mg/l for CBZ [17,18,25,31,35]; 0.012 to 0.055 mg/l for OXCBZ [17-19,28,36]; 5 μg/l to 0.05 mg/l for EP-CBZ [17,18,25,31,35]; 0.012 to 0.025 mg/l for 10-OH-CBZ [17–19,28,36] and 0.01 to 0.025 mg/l for DiOH-CBZ [17,19,25,28]. The first reason to explain a higher LLOQ in our study is the harsh validation procedure employed [37–40]. The second reason is the mode of detection; indeed, most of these methods are based on the spectrophotometric detection around 210 nm and one of them used LC–MS–MS [35] or atmospheric pressure chemical ionization LC–MS [36]. The last reason is the human plasma sample needed (300 μl in this study instead of 500–1000 μl in most of other studies).

Table 3
Results of calibration curves ($n = 8$)[a]

Drugs	Range (mg/l)	*a* (mean)	*b* (mean)	*c* (mean)	r^2	LLOQ (mg/l)
CBZ	0.5–20	−0.0389	2.04 (R.S.D. = 17.6%)	0.973	0.996	0.5
CBZ-EP	0.1–5	−0.317	5.25(R.S.D. = 15.2%)	0.539	0.998	0.1
OXCBZ	0.4–20	−0.0021	0.414(R.S.D. = 18.0%)	0.0737	0.999	0.4
10-OH-CBZ	0.3–20	−0.0401	1.92 (R.S.D. = 16.9%)	0.887	0.999	0.3
DiOH-CBZ	0.4–20	−0.0137	0.732 (R.S.D. = 8.92%)	0.0867	0.999	0.4
2-OH-CBZ	0.023–1.25	−0.842	3.12 (R.S.D. = 10.4%)	0.0753	0.999	0.023
3-OH-CBZ	0.023–1.25	−0.555	2.57 (R.S.D. = 11.7%)	0.0546	0.998	0.023
AI	0.023–1.25	−1.94	9.85 (R.S.D. = 14.6%)	0.162	0.999	0.023
AO	0.024–1.25	−3.06	12.1 (R.S.D. = 15.1%)	0.322	0.999	0.024
IM	0.024–1.25	0.0130	0.257 (R.S.D. = 13.6%)	0.0085	0.999	0.024

n: number of replicates.
[a] $Y = aX^2 + bX + c$.

Table 4
Back-calculated concentrations from calibration curves performed in human plasma

Theoretical concentration (mg/l)	CBZ		OXCBZ		DiOH-CBZ		10-OH-CBZ		CBZ-EP		
	R.S.D. (%)	Recovery (%)	R.S.D. (%)	Recovery (%)	R.S.D. (%)	Recovery (%)	R.S.D. (%)	Recovery (%)	Theoretical concentration (mg/l)	R.S.D. (%)	Recovery (%)
0.5 (CBZ); 0.4 (OXCBZ, DiOH-CBZ); 0.3 (2-OH-CBZ)	7.22	117	18.4	117	17.6	80	16.2	81	0.1	17.2	119
0.625	3.87	103	3.02	102	10.3	89	12.5	89	0.15	12.9	109
1.25	3.14	102	13.2	112	2.43	101	5.72	105	0.31	7.23	108
2.5	5.74	94	9.67	91	1.79	102	3.41	104	0.625	6.51	108
5	8.02	110	4.89	96	7.37	106	7.14	105	1.25	4.24	103
10	5.92	105	2.48	102	3.68	96	4.82	96	2.5	2.55	96
20	2.45	101	1.98	99	2.28	101	1.35	100	5	3.23	100

	R.S.D. (%)					Recovery (%)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
0.023	17.1	16.0	15.2	14.2	16.1	85	118	118	89	84
0.039	11.4	3.89	4.23	8.65	13.3	87	99	98	94	85
0.078	4.68	3.46	5.47	4.11	6.58	107	94	103	107	105
0.15	1.87	9.82	6.05	7.93	4.72	100	109	107	106	98
0.31	1.45	3.45	3.78	3.89	5.85	103	104	103	105	103
0.625	3.92	7.21	2.34	6.02	3.45	98	95	96	96	98
1.25	1.77	2.53	3.41	1.56	2.31	100	101	100	103	100

(1) AI; (2) 2-OH-CBZ; (3) 3-OH-CBZ; (4) AO; and (5) IM. The first concentration level corresponds to the LLOQ defined by a precision ≤20% and an accuracy of 100 ± 20%.

Table 5
Accuracy and precision of the method ($n = 5$)

Drugs	Theoretical concentrations mg/l	Precision (%)		Accuracy (%)	
		Intra-assay	Inter-assay	Intra-assay	Inter-assay
CBZ	0.7	7.60	7.29	94	100
	5.5	4.47	12.5	102	107
	15	5.41	5.23	98	99
CBZ-EP	0.16	7.04	10.2	87	87
	1.5	7.84	13.0	97	105
	4	9.21	7.28	112	103
OXCBZ	0.7	8.72	13.0	95	106
	5.5	7.83	10.4	107	86
	15	10.2	12.0	88	100
10-OH-CBZ	0.7	4.39	13.0	87	99
	5.5	3.39	9.42	93	104
	15	5.06	6.24	102	95
DiOH-CBZ	0.7	5.94	10.6	88	89
	5.5	3.44	5.70	94	109
	15	2.79	7.85	92	90
2-OH-CBZ	0.04	4.58	11.8	104	99
	0.35	3.52	8.94	91	104
	1.0	2.91	2.31	98	95
3-OH-CBZ	0.04	2.90	9.97	90	95
	0.35	2.44	3.46	103	102
	1.0	2.71	2.36	97	95
AI	0.04	4.39	6.93	107	112
	0.35	2.74	10.5	89	103
	1.0	2.21	6.49	93	94
AO	0.04	9.75	11.6	86	90
	0.35	7.63	12.6	93	92
	1.0	8.55	7.65	92	99
IM	0.04	7.25	8.08	88	93
	0.35	3.24	5.54	97	94
	1.0	4.99	3.75	104	108

Table 6
Concentration of the parent drug and its metabolites in plasma from patients treated with CBZ or OXCBZ

Compound	CBZ monotherapy (30 patients)		OXCBZ monotherapy (15 patients)	
	Concentration (mg/l)	n	Concentration (mg/l)	n
CBZ	0.92–16	30	Trace levels (<LLOQ)	15
OXCBZ	–	–	0.4–3.32	13
CBZ-EP	0.12–4.74	30	Trace levels (<LLOQ)	5
10-OH-CBZ	Trace levels (<LLOQ)	20	0.3–10.6	15
DiOH-CBZ	0.4–7.56	30	0.4–2.96	15
2-OH-CBZ	0.023–0.057	9	–	–
3-OH-CBZ	0.023–0.72	25	0.023–0.03	3
AI	0.023–0.067	28	Trace levels (<LLOQ)	3
AO	0.024–0.12	9	Trace levels (<LLOQ)	11
IM	0.024–0.03	3	–	–
9-Acridan[a]	2.5–69%	26	3.9–15%	7

n: number of patients for whom the metabolite was detected.
[a] Results are expressed as a percent of the concentration of its direct precursor: DiOH-CBZ using the formula: [Peak height of 9-acridan/peak height DiOH-CBZ] × 100.

3.4. Therapeutic drug monitoring of patient treated with CBZ or OXCBZ

This LC–MS method was used to analyse plasma samples from epileptic patients treated with CBZ ($n=30$) or OXCBZ ($n=15$). Results are reported in Table 6. Measured concentrations were obtained from blood samples drawn immediately before a new drug administration. Fig. 4c shows the chromatogram of a plasma sample from a patient treated with CBZ (400 mg/day) and Fig. 4d shows a chromatogram of a plasma sample from a patient treated with OXCBZ (1200 mg/day). In the present study, plasma levels ranged from 0.92 to 26 mg/l for CBZ and from 0.04 to 3.32 mg/l for OXCBZ (Table 6).

In patients under CBZ therapy, the main metabolites found in plasma were CBZ-EP, DiOH-CBZ, AI and 9-acridan with a great interindividual variability in plasma concentrations. With regard to minor pathways, 2-OH-CBZ and 3-OH-CBZ were identified in 9 and 25 patients, respectively. In only few patients, AO and IM were present. Surprisingly, 10-OH-CBZ, the main OXCBZ metabolite, was found at very low concentrations in only 20 CBZ treated patients (Table 6).

In patients treated with OXCBZ, in addition to the expected metabolites, 3-OH-CBZ, a typical CBZ hydroxylated metabolite, was identified in plasma (Table 6); AI and AO were only detected at trace levels.

4. Conclusion

A specific and sensitive LC–MS method for the simultaneous determination of carbamazepine (CBZ) and eight metabolites: CBZ-10,11-epoxide (CBZ-EP), 10,11-dihydro-10,11-*trans*-dihydroxy-CBZ (DiOH-CBZ), 10-hydroxy-10,11-dihydro-CBZ (10-OH-CBZ), 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ, iminostilbene (IM), acridone (AO), acridine (AI) in human plasma was described. Moreover, under the chromatographic conditions described, the 9-acridan, a suspected reactive metabolite, was well separated from the other compounds. This method was developed to study the potential relationship between reactive metabolites and the onset of idiosyncrasic reactions to CBZ and/or OXCBZ. The AI, AO and IM compounds have reactive properties and could be considered as potential candidates involved in idiosyncrasic reactions. The relationship between side effects and metabolite exposure will be explored.

Acknowledgments

This study was supported, in part, by the CHU of Montpellier with an internal research program and by the French Fondation Against Epilesia (LFCE). The authors would like to acknowledge Novartis pharma Laboratories for kindly providing part of the reference substances of metabolites and Prof. M Audran, Biophysical laboratory, Faculty of Pharmacy, Montpellier, for its analytical assistance.

References

[1] P. Duche, B. Loiseau, in: R.H. Levy, R.H. Mattson, B.S. Meldrum, J.K. Penry, F.E. Dreyfuss (Eds.), Antiepileptic Drugs, fourth ed., Raven Press, New York, 1995, p. 555.
[2] S. Alballa, M. Fritzler, P. Davis, J. Rheumatol. 14 (1987) 559.
[3] V. Pisciotta, Drugs 15 (1978) 132.
[4] M. Franceschi, G. Ciboddo, G. Truci, A. Borri, N. Fatal, Epilepsia 29 (1988) 582.
[5] B.K. Park, J.W. Coleman, N.R. Kitteringham, Biochem. Pharmacol. 36 (1987) 581.
[6] K. Lertratanangkoon, M.G. Horning, Drug Metab. Dispos. 10 (1982) 1.
[7] J. Csetenyi, K.M. Baker, A. Frigerio, P.L. Morselli, J. Pharm. Pharmacol. 25 (1973) 340.
[8] S. Furst, J. Uetrecht, Biochem. Pharmacol. 45 (1993) 1267.
[9] S. Furst, J. Uetrecht, Int. J. Immunopharmaco. 17 (1995) 445.
[10] S. Eto, N. Tanaka, H. Noda, A. Noda, Biol. Pharm. Bull. 18 (1995) 926.
[11] N. Wad, C. Guenat, G. Krämer, Ther. Drug Monit. 19 (1996) 314.
[12] J.M. Potter, A. Donnelly, Ther. Drug Monit. 20 (1998) 652.
[13] C. Ju, J. Uetrecht, J. Pharmacol. Exp. Ther. 288 (1999) 51.
[14] S. Knowles, J. Uetrecht, N. Shear, Lancet 356 (2000) 1587.
[15] J. Green, M. Pirmohamed, N. Kitteringham, A. Gaedick, D. Grant, M. Boxer, B. Burchell, K. Park, Biochem. Pharmacol. 50 (1995) 1353.
[16] J.G. Larkin, P.J.W. McKee, G. Forrest, G.H. Beastall, B.K. Park, J.I. Lowrie, P. Lloyd, M.J. Brodie, Br. J. Clin. Pharmacol. 31 (1991) 65.
[17] P. Pienimaki, S. Fuchs, J. Isojarvi, K. Vahakangas, J. Chromatogr. B 673 (1995) 97.
[18] R. Mandrioli, F. Albani, G. Casamenti, C. Sabbioni, M.A. Raggia, J. Chromatogr. B 762 (2001) 109.
[19] R. Mandrioli, N. Ghedini, F. Albani, E. Kenndler, M.A. Raggi, J. Chromatogr. B 783 (2003) 253.
[20] M. Villiet, V. Alibert, V. Pinzani, H. Peyrière, H. Breton, D. Hillaire-Buys, J.P. Blayac, Fund. Clin. Pharmacol. 2 (2004) 236 (Abstract).
[21] G.E. Von Unruh, W.D. Paar, Biomed. Environ. Mass Spectrom. 13 (1986) 651.
[22] J. Hallbach, H. Vogel, W.G. Guder, Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 35 (1997) 755.
[23] G. Minkova, D. Getova, Methods Find Exp. Clin. Pharmacol. 23 (2001) 481.
[24] N. Wad, J. Chromatogr. 305 (1984) 127.
[25] R.D. Chelberg, S. Gunawan, D.M. Treiman, Ther. Drug Monit. 10 (1988) 188.
[26] R. Hartley, M. Green, M.D. Lucock, S. Ryan, W.I. Forsythe, Biomed. Chromatogr. 5 (1991) 212.
[27] J. Martens, P. Banditt, J. Chromatogr. 620 (1993) 169.
[28] M.C. Rouan, M. Decherf, V. Le Clanche, J.B. Lecaillon, J. Godbillon, J. Chromatogr. B Biomed. Appl. 658 (1994) 167.
[29] K.M. Matar, P.J. Nicholls, M.I. Al-Hassan, A. Tekle, J. Clin. Pharm. Ther. 20 (1995) 229.
[30] G.L. Lensmeyer, B.E. Gidal, D.A. Wiebe, Ther. Drug Monit. 19 (1997) 292.
[31] M.M. Bhatti, G.D. Hanson, L. Schultz, J. Pharm. Biomed. Anal. 16 (1998) 1233.
[32] K.M. Matar, P.J. Nicholls, A. Tekle, S.A. Bawazir, M.I. Al-Hassan, Ther. Drug Monit. 21 (1999) 559.
[33] H. Levert, P. Odou, H. Robert, Biomed. Chromatogr. 16 (2002) 19.
[34] H. Levert, P. Odou, H. Robert, J. Pharm. Biomed. Anal. 28 (2002) 517.
[35] G.F. Van Rooyen, D. Badenhorst, K.J. Swart, H.K. Hundt, T. Scanes, A.F. Hundt, J. Chromatogr. B 769 (2002) 1.
[36] H.H. Maurer, C. Kratzsch, A.A. Weber, F.T. Peters, T. Kraemer, J. Mass Spectrom. 37 (2002) 687.
[37] United States Pharmacopoeia XXXIII, The United States Pharmacopeia Convention, Rockville, Md, 2003, p. 2439.
[38] V.P. Shah, K.K. Midha, S. Dighe, I.J. McGilveray, J.P. Skelly, A. Yacobi, T. Layloff, C.T. Viswanathan, C.E. Cook, R.D. McDowall, K.A. Pittman, S. Spector, J. Pharm. Sci. 81 (1992) 309.
[39] F. Bressolle, M. Bromet-Petit, M. Audran, J. Chromatogr. B 686 (1996) 3.
[40] US Food and Drug Administration, Guidance for industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001. http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm (accessed May 2004).
[41] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Anal. Chem. 70 (1998) 882.

Annexe 4 : Mail d'acceptation de la publication dans Xenobiotica

De : C.Ioannides@surrey.ac.uk
Envoyé par : onbehalfof+C.Ioannides+surrey.ac.uk@manuscriptcentral.com
A : o-mathieu@chu-montpellier.fr

Date : Lundi, 04 Octobre, 2010 11:11AM
Objet : Xenobiotica - Decision on Manuscript ID TXEN-2010-0089.R1
Historique : Ce message a été transféré.

04-Oct-2010

Dear Mr. Mathieu:

Ref: PRESENCE AND EX VIVO FORMATION OF ACRIDONE IN BLOOD OF PATIENTS ROUTINELY TREATED WITH CARBAMAZEPINE: EXPLORATION OF THE 9-ACRIDINECARBOXALDEHYDE PATHWAY

I am pleased to inform you that the revised version of your paper has been accepted for publication in Xenobiotica, and has now been forwarded to the Publisher for copy editing and typesetting. You will receive proofs for checking, and instructions for transfer of copyright in due course. The publisher also requests that proofs are checked and returned within 48 hours of receipt.

Thank you for your contribution to Xenobiotica and I look forward to receiving further submissions from you.

Sincerely,
Costas Ioannides
Editor in Chief, Xenobiotica
C.Ioannides@surrey.ac.uk

Annexe 5 : Premières pages de l'accord de consortium pour le projet ANR

ORIGINAL **Réf. Ifremer n° 10/3211555**

N° CNRS 050245
Accord de consortium PEPSEA – version finale - 26 juillet 2010

ACCORD DE CONSORTIUM

Programme de recherche : « Contaminants écosystèmes Santé » ANR 2009
Projet de recherche : « Transformation et transfert des PPCPs et de leur métabolites dans les eaux côtières méditerranéennes » (PEPSEA)

ENTRE

LE CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIQUE,
Etablissement public à caractère scientifique et technologique, dont le siège est situé 3 rue Michel-Ange 75794 Paris Cedex 16, SIREN 180 089 013 003 95, APE 7219 Z, représenté par son Président, Monsieur Alain FUCHS, lequel a délégué sa signature pour le présent Accord à Mme Ghislaine GIBELLO, Déléguée Régionale Languedoc-Roussillon,

Ci-après dénommé le « **CNRS** »

Et

L'UNIVERSITE MONTPELLIER 2 SCIENCES ET TECHNIQUES,
Etablissement Public à caractère Culturel et Scientifique et Professionnel, n° SIREN 193 410 883, code APE 8542Z, ayant son siège 2, place Eugène Bataillon, 34095 MONTPELLIER Cedex 5, représentée par sa Présidente, Madame Danièle HERIN ;

Ci-après dénommée l'« **UM2** »

Le CNRS et l'UM2 agissant au nom et pour le compte du **laboratoire de recherche HydroSciences Montpellier, UMR 5569,** dirigé par Monsieur Eric SERVAT,
Ci-après dénommé « **HSM** »,

Et

L'IFREMER,
Etablissement public à caractère industriel et commercial dont le siège est situé au 155, rue Jean Jacques Rousseau – 92130 ISSY LES MOULINEAUX,
N° SIRET 330 715 368 00297, code APE 731Z, représenté par son Président Directeur Général, Monsieur Jean-Yves PERROT ou son délégataire,

Ci-après dénommé l'« **IFREMER** »

Et

LE CENTRE HOSPITALIER REGIONAL UNIVERSITAIRE DE MONTPELLIER
Etablissement public de santé situé 191, avenue du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier Cedex 5, représenté par son Directeur Général, Monsieur Daniel MOINARD,

Ci-après dénommé le « **CHRU** »

Et

L'UNIVERSITE PAUL CEZANNE AIX-MARSEILLE III,
Etablissement Public à caractère Culturel Scientifique et Professionnel, dont le siège social est 3, Avenue Robert Schuman, 13628 Aix-en-Provence cedex 1, N° SIRET 19132364100016, code APE 85 42 Z, représentée par son Président, Monsieur Marc PENA,

Ci-après dénommée l' « **UPCAM**»