



HAL
open science

Modélisation appliquée à la pharmacocinétique de molécules médicamenteuses indiquées en prévention ou en traitement d'atteintes neurologiques chez l'homme

Chadi Abbara

► **To cite this version:**

Chadi Abbara. Modélisation appliquée à la pharmacocinétique de molécules médicamenteuses indiquées en prévention ou en traitement d'atteintes neurologiques chez l'homme. Médicaments. Université d'Angers, 2009. Français. NNT: . tel-00460440

HAL Id: tel-00460440

<https://theses.hal.science/tel-00460440>

Submitted on 1 Mar 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**MODÉLISATION APPLIQUÉE À LA PHARMACINÉTIQUE DE
MOLÉCULES MÉDICAMENTEUSES INDIQUÉES EN PRÉVENTION
OU EN TRAITEMENT D'ATTEINTES NEUROLOGIQUES CHEZ
L'HOMME**

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Pharmacologie Expérimentale et Clinique

ÉCOLE DOCTORALE : Biologie-Santé

Présentée et soutenue publiquement

le : 27 janvier 2009

à : la faculté de médecine- Université d'Angers

par : Mr ABBARA Chadi

Devant le jury :

Dr. Gilbert BENSIMON (rapporteur) Maître de Conférences-Praticien Hospitalier,
Université de Paris VI

Dr. Laurence BONHOMME-FAIVRE (rapporteur) Maître de Conférences-Praticien
Hospitalier, Université de Paris-Sud

Dr. Lucette LACOMBLEZ (examinateur) Maître de Conférences-Praticien Hospitalier,
Université de Paris VI

Pr. Yves MAURAS (président du jury) Professeur-Praticien Attaché, Université d'Angers

Directeur de thèse : Pr. Bertrand DIQUET

Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie

CHU d'Angers

Remerciements

A Monsieur le Professeur Bertrand Diquet pour m'avoir toujours fait confiance et laisser libre d'entreprendre un travail très ardu mais extrêmement riche.

J'ai le sentiment d'avoir beaucoup appris à tes côtés, toujours dans une ambiance agréable. Merci pour ta disponibilité permanente, tes compétences et ton rigueur qui offre un encadrement de grande qualité.

A Madame le Docteur Laurence Bonhomme-Faivre, avec qui j'ai le plaisir de travailler, et qui me fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de cette thèse.

A Monsieur le Docteur Gilbert Bensimon, qui m'a ouvert les yeux sur un monde de recherche qui me semblait impénétrable, et qui me fait l'honneur et le plaisir d'être rapporteur de ce travail.

A Monsieur le Professeur Yves Mauras, qui a eu la gentillesse d'être membre et président de jury de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma plus grande reconnaissance.

A Madame le Docteur Lucette Lacomblez, qui m'a fait la joie d'accepter d'examiner cette thèse. Qu'elle reçoive ici toute l'expression de mes plus vifs remerciements.

Merci infiniment à toute la chaleureuse équipe du laboratoire de pharmacologie-toxicologie au CHU d'Angers. En particulier à Annie, Edwige, Séverine et Isabelle qui m'ont beaucoup apporté tant pour leur disponibilité, leur gentillesse et leurs compétences.

Je tiens aussi à remercier tous le personnel du service de pharmacie à l'hôpital Paul Brousse, pour leurs encouragements et leur soutien moral pour l'aboutissement de cette thèse.

Je ne peux oublier mes parents qui n'ont cessé de m'encourager tout au long de ce long parcours et qui ont hâte que je termine mes étude. Maman, Papa merci pour votre amour et votre confiance.

Merci à toute ma famille ; mon frère, mes oncles, mes tantes, mes cousins et cousines, pour leur confiance et leur soutien moral.

Un grand merci à Olga, Ugo et surtout, Nathalie pour leur patience, leur compréhension et leur énorme soutien moral.

Sommaire

Liste des abréviations.....	6
Résumé.....	8
Abstract.....	9
INTRODUCTION.....	10
ETAT DE L'ART	14
Partie 1.....	15
Les Organophosphorés : Historique et Traitement	15
1. Historique et particularité.....	16
2. Tableau clinique et traitement.....	18
2.1 Traitement initial	20
2.1.1 Décontamination.....	20
2.1.2 Traitement symptomatique	21
2.1.3 Traitement étiologique	22
3. Etudes AIBC	29
3.1 Etude AIBC1	30
3.1.1 Objectifs.....	30
3.1.2 Méthode.....	31
3.2 Etude AIBC2	32
3.2.1 Objectifs.....	32
3.2.2 Méthode.....	33
Partie 2.....	35
Amyotrophie Spinale Infantile.....	35
1. Introduction.....	36
2. thérapie.....	39
2.1 Thérapies médicamenteuses non spécifiques.....	39
2.2 Thérapies médicamenteuses agissant sur les protéines SMN	39
2.3 Facteurs neurotrophes.....	41
3. Riluzole	44
3.1 Caractéristiques du riluzole	44
3.2 Effets indésirables.....	44
3.3 Pharmacocinétique.....	45
3.3.1 Absorption	45
3.3.2 Distribution	46
3.3.3 Métabolisme	46
3.3.4 Excrétion.....	47
3.4 Pharmacologie détaillée.....	47
3.4.1 Effets neuroprotecteurs	47
3.4.2 Autres effets sur le système nerveux central.....	48
3.4.3 Mode d'action.....	49
3.5 Pharmacologie générale.....	50
4. Etude ASIRI.....	51
Partie 3.....	52
Analyse Pharmacocinétique : Art et Science	52
1. Introduction.....	53
2. Approche non compartimentale	54
2.1 Bioéquivalence	54

2.1.1 Etudes de bioéquivalence.....	55
2.1.2 Evaluation de données	55
3. Modélisation en pharmacocinétique.....	58
3.1 Modélisation individuelle	60
3.1.1 Régression non linéaire.....	60
3.1.2 Modèles d'erreur.....	62
3.1.3 Méthodes d'estimation.....	62
3.2 Pharmacocinétique de population.....	63
3.2.1 Méthodes " paramétriques ".....	65
3.2.2 Méthodes " non paramétriques ".....	67
TRAVAUX PERSONNELS	68
Article 1.....	69
High performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method for the simultaneous determination of diazepam, atropine and pralidoxime in human plasma	69
1. Introduction.....	70
2. Discussion	82
2.1 Conditions chromatographiques	82
2.2 Procédure de validation	82
2.3 Application clinique	85
Article 2.....	87
Pharmacokinetic Analysis of Diazepam Liberation From its Prodrug in Healthy Volunteers: Noncompartmental Approach And Compartmental Modeling	87
1. Introduction.....	88
2. Discussion	120
Article 3.....	125
Pharmacokinetic Analysis of Pralidoxime in Healthy Volunteers	125
1. Introduction.....	126
2. Discussion	152
Article 4.....	156
Riluzole Pharmacokinetics in Patients with Spinal Muscular Amyotrophy	156
1. Introduction.....	157
2. Discussion	184
CONCLUSION.....	190
BIBLIOGRAPHIE	194

Liste des abréviations

AIBC :	Auto-injecteur bi-compartmental
ALAT :	Alanine amino transférase
ALS :	<i>Amyotrophic lateral sclerosis</i>
AMM :	Autorisation de mise sur le marché
Anova :	Analyse de variance
ASI :	Amyotrophie spinale infantile
AUC :	<i>Area under the curve</i>
B.I.D. :	<i>Bis in die</i> "deux fois par jour"
Cl/F :	Clairance apparente
C _{max} :	Concentration maximale
C _{min} :	Concentration minimale
CQ :	Contrôle de qualité
DMD :	Diazépam déméthylé
EEG :	Electroencéphalogramme
ELS :	<i>Extended least squares</i>
HPLC :	<i>High performance liquide chromatography</i>
i.m. :	intramusculaire
i.v. :	intraveineux
AIC :	<i>Akaike information criterion</i> " Critère d'Akaike"
CRSSA :	Centre de Recherche du Service de Santé des Armées
CV :	Coefficient de variation
CYP :	Cytochromes
DMT :	Dose maximale thérapeutique
FO :	<i>First order</i>
FOCE :	<i>First order conditional estimation</i>
GI :	Gastro-intestinal
i.p. :	intra péritonéal
IC90% :	Intervalle de confiance à 90%
IRLS :	<i>Iterative reweighted least squares</i>
K _e :	Constante fonctionnelle d'élimination
LC/MS/MS :	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LD :	<i>Limit of detection</i>

LD50:	<i>Lethal dose 50%</i>
LLOQ:	<i>Lower limit of quantification</i>
MFM:	Mesure de la fonction motrice " <i>Motor function measurement</i> "
MS:	<i>Mass spectrometry</i>
NAIP:	<i>Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein</i>
NCA:	<i>Non compartmental approach</i>
NMDA :	N-Méthyle-D-Aspartate
OLS:	<i>Ordinary least squares</i>
OMS :	Organisation mondiale de la santé
PCA :	Pharmacie centrale des armées
Pk pop :	Pharmacocinétique de population
Ppi :	Préparation pour injection
Q.D. :	<i>Quaque die</i> "une fois par jour"
RNL :	Régression non linéaire
s.c. :	sous cutané.
SD :	<i>Standard deviation</i>
SLA :	Sclérose latéral amyotrophique
SMA :	<i>Spinal muscular amyotrophy</i>
SMN :	<i>Survival of motor neuron</i>
SNC:	Système nerveux central
$t_{1/2}$:	Demi-vie apparente d'élimination plasmatique
T_{max} :	Moment de la concentration maximale
TRH :	<i>Thyrotropin Releasing Hormone</i>
UV :	Ultra-violet
V_z :	Volume de distribution
WLS :	<i>Weighted least squares</i>

Résumé

L'aspect expérimental de la pharmacocinétique nécessite le développement de techniques analytiques dans les milieux biologiques pour la quantification des médicaments dans les échantillons prélevés à des temps choisis. L'interprétation des données pharmacocinétiques implique ensuite le développement de modèles et de méthodes statistiques permettant l'évaluation des paramètres pharmacocinétiques caractéristiques des molécules considérées.

Dans la première partie de ce travail, une méthode LC/MS/MS sensible et spécifique, a été développée et validée pour le dosage simultané de pralidoxime, diazépam et atropine dans le plasma. Une étude pharmacocinétique de chacun des trois composés chez le sujet sain recevant par voie intramusculaire l'association avizafone-atropine-pralidoxime, traitement recommandé pour l'intoxication par les agents organophosphorés, a ensuite été conduite.

Les données issues du dosage plasmatique ont été analysées afin de caractériser la cinétique d'hydrolyse de l'avizafone et la pharmacocinétique de la pralidoxime. La modélisation individuelle, sujet par sujet, a permis de déterminer le meilleur modèle pharmacocinétique de la transformation d'avizafone en diazépam après injection intramusculaire d'avizafone seule ou en association avec atropine et pralidoxime.

Une approche de pharmacocinétique de population a enfin été appliquée pour caractériser la pharmacocinétique de la pralidoxime après injection intramusculaire seule ou en association avec atropine et avizafone.

Dans la deuxième partie de cette thèse, l'approche non compartimentale et la modélisation individuelle ont été appliquées à des données obtenues au cours d'une étude de pharmacocinétique évaluant l'administration orale de 50 mg de riluzole chez des enfants atteints d'amyotrophie spinale. Par simulations, il a été possible de montrer que l'administration de riluzole, à la dose de 50 mg deux fois par jour se traduirait par des concentrations résiduelles et maximales comparables à celles obtenues chez l'adulte après une dose de 100 mg deux fois par jour.

La dose de 50 mg une fois par jour a donc été retenue pour l'étude clinique évaluant l'efficacité du riluzole chez les patients atteints d'amyotrophie spinale infantile.

Mots-clés : Pharmacocinétique, Organophosphorés, Amyotrophie spinale infantile, Riluzole.

Abstract

The study of pharmacokinetics involves both experimental and theoretical approaches. The experimental aspect of pharmacokinetics involves the development of biologic sampling techniques and analytical methods for drugs quantification. The theoretical aspect of pharmacokinetics involves the development of pharmacokinetic models and statistical methods for pharmacokinetic parameters estimation and data interpretation.

In the first part of this work, a sensitive and specific LC/MS/MS method was developed and validated for the simultaneous quantification of pralidoxime, atropine and diazepam in plasma samples. This method has been applied to a pharmacokinetic study in healthy subjects, of the three compounds after intramuscular injection of a combination where diazepam was replaced by avizafone, a diazepam prodrug. This treatment is recommended for intoxication by organophosphorous agents.

Data obtained from plasma samples were analyzed to characterize the hydrolysis kinetics of avizafone and the pharmacokinetics of pralidoxime. The individual modelling allowed the determination of the best pharmacokinetic model for avizafone hydrolysis into diazepam after its intramuscular injection alone or in combination with atropine and pralidoxime.

Population pharmacokinetics modelling has then been applied to characterize the pharmacokinetics of pralidoxime after its intramuscular injection alone or in combination with atropine and avizafone.

In the second part of this thesis, the non compartmental approach and the individual modelling method were applied on data obtained from a pharmacokinetic study evaluating the oral administration of 50 mg of riluzole in children patients with spinal muscular atrophy. The pharmacokinetic simulations showed that the administration of 50 mg of riluzole twice daily would result in trough and maximal plasma concentrations comparable to those obtained in adults with 100 mg twice daily. As far as pharmacokinetics is concerned, the study showed that the dose of 50mg once daily would be appropriate in patients with spinal muscular amyotrophy. This dose was therefore chosen for the subsequent clinical trail evaluating the efficacy of riluzole in such patients.

Key words : Pharmacokinetics, Organophosphorous, Spinal muscular atrophy, Riluzole.

INTRODUCTION

Le développement des médicaments est un vaste domaine, impliquant le rapprochement de plusieurs disciplines scientifiques et médicales.

An cours de son développement, la molécule destinée à un usage thérapeutique, passe par différentes phases, de la préclinique à la clinique incluant l'administration chez le patient atteint d'une pathologie correspondant à l'indication envisagée.

L'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (AMM), intervient après la conduite de nombreux essais cliniques, chez le sujet sain et chez le malade, permettant de définir la sécurité et l'efficacité du médicament.

Certains médicaments sont toutefois développés sans que soient menées des études d'efficacité *sensu stricto* dans la population concernée. C'est en particulier le cas des médicaments utilisés en prévention ou en traitement très précoce de certains toxiques, pour lesquels les essais cliniques d'efficacité sont éthiquement et méthodologiquement impossibles à réaliser. Ces médicaments sont en fait évalués chez le sujet sain afin de déterminer la sécurité de leur utilisation " à blanc " en extrapolant à la situation où cette même population serait concernée par une intoxication volontaire ou accidentelle.

Dans un tout autre domaine, la situation du développement des médicaments chez l'enfant est caractérisée par l'insuffisance de leur évaluation, et par l'absence de forme galénique adaptée à l'âge. Cet état de fait permet de comprendre l'origine de très nombreuses prescriptions hors AMM notamment en milieu hospitalier chez le nouveau-né.

En terme de développement clinique des médicaments à visée pédiatrique, les études de sécurité et d'optimisation de la dose à administrer sont un moyen performant permettant d'administrer les médicaments chez l'enfant dans des conditions de sécurité et d'efficacité comparables à ce qui est réalisé chez l'adulte.

Cependant, la réalisation d'essais cliniques chez l'enfant demeure plus complexe que chez l'adulte particulièrement dans le cas des maladies rares.

Au plan méthodologique, les différentes approches utilisées en pharmacocinétique, sont des outils permettant de franchir les obstacles rencontrés lors de développement des médicaments ayant une particularité concernant leur utilisation (antidote), ou concernant la population pédiatrique en particulier chez l'enfant atteint d'une maladie rare.

L'objectif de ce travail est donc d'évaluer l'utilisation de différentes approches en pharmacocinétique, en pharmacologie clinique neurologique, et cela pour deux catégories de médicaments :

1) Les antidotes utilisés en cas d'intoxication par des neurotoxiques : Les données de deux protocoles cliniques ont permis d'évaluer la pharmacocinétique des molécules utilisées en association, en cas d'intoxication par des organophosphorés, dans un auto-injecteur bi-compartimental.

2) Un neuroprotecteur, le riluzole, chez l'enfant atteint d'une maladie rare, l'amyotrophie spinale infantile, afin d'optimiser la dose à administrer en pédiatrie, en regard de la sécurité et des informations disponibles dans une population adulte, sachant qu'aucun enfant n'avait antérieurement été traité par cette molécule dans le cadre d'un essai clinique d'efficacité.

La première partie de cette thèse présente une revue de la littérature des généralités sur les antidotes utilisés en cas d'intoxication par les organophosphorés, sur le riluzole, et sur les approches utilisées en pharmacocinétique.

La deuxième partie porte sur nos travaux personnels. Dans un premier temps, la méthode de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem mise au point et validée pour le dosage de trois molécules utilisée en association comme antidote (pralidoxime, atropine, diazépam), est décrite.

Dans un deuxième temps, sont présentés les résultats de l'analyse pharmacocinétique du diazépam chez le sujet sain après administration intramusculaire d'avizafone seule, la prodrogue du diazépam, de diazépam seul, et d'avizafone en association avec la pralidoxime

et l'atropine, analyse réalisée selon différentes approches : une approche non compartimentale, une approche compartimentale par modélisation des pharmacocinétiques individuelles.

La troisième partie présente les résultats de l'analyse pharmacocinétique de la pralidoxime chez le sujet sain, après son administration intramusculaire seule ou en association avec l'avizafone et l'atropine, également réalisée selon deux approches : non compartimentale, et pharmacocinétique de population.

La dernière partie des travaux présente les résultats de l'analyse pharmacocinétique du riluzole chez l'enfant atteint d'amyotrophie spinale infantile, après administration orale de 50 mg une fois par jour.

ETAT DE L'ART

Partie 1

Les Organophosphorés : Historique et Traitement

1. HISTORIQUE ET PARTICULARITE

Le risque d'utilisation des gaz neurotoxiques est de plus en plus important qu'il s'agisse de conflits armés ou d'initiatives terroristes individuelles, notamment depuis la guerre du golfe Irak-Iran qui s'est déroulée entre 1981-1988 ^[1-3].

Ces agents neurotoxiques sont des dérivés organophosphorés, esters de l'acide phosphonique. Ils inhibent les cholinestérases en se liant à leur site estérasique. Cette liaison devient irréversible au bout de quelques heures (phénomène "d'aging" variable selon l'agent organophosphoré). Il en résulte une accumulation d'acétylcholine au niveau des synapses nerveuses et neuromusculaires. Cette intoxication par l'acétylcholine est responsable d'une crise cholinergique qui associe des effets muscariniques et nicotiniques, touchant le système nerveux autonome, la jonction neuromusculaire, et le système nerveux central.

Les neurotoxiques de guerre ont été développés à partir de la seconde guerre mondiale. Ils sont classés parmi les agents létaux du fait de leur extrême toxicité. Le sarin, qui a été utilisé au Japon lors de l'attentat du métro de Tokyo, peut, à la dose de 0,01 mg/kg, entraîner le décès en 1 minute. Il fait partie des premiers neurotoxiques mis au point, les agents G, caractérisés par leur volatilité plus ou moins importante et qui pénètrent dans l'organisme par les voies respiratoires. C'est également le cas du sabun synthétisé en 1936 et à un degré moindre du soman apparu en 1944. Ce dernier est davantage persistant et peut entraîner la mort en 10 à 15 minutes après absorption cutanée. A partir de 1955 apparaissent les agents V, tel que le VX, caractérisés par leur degré de létalité plus fort, leur faible volatilité, leur persistance, et un mode de pénétration dans l'organisme préférentiellement cutané.

Enfin, le vieillissement de l'enzyme cholinestérase sur laquelle se fixe le toxique est variable selon l'agent utilisé. Il survient en quelques minutes avec le soman, alors qu'il faut 5 heures pour le sarin et plus de 40 heures pour le tabun. Ce vieillissement de l'enzyme rend la liaison avec le

toxique irréversible, et inefficace l'utilisation d'une oxime dont le but thérapeutique est d'interrompre cette liaison ^[2-4].

2. TABLEAU CLINIQUE ET TRAITEMENT

Les organophosphorés sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, qui se lient au site estérasique de l'enzyme et forment avec cette dernière un complexe covalent extrêmement stable. Toutefois, l'enzyme est "ré-activable" par des réactifs nucléophiles comme les oximes, la possibilité de réactivation décroissant cependant avec le temps ^[5].

Sur le plan physiopathologique, l'inhibition de l'acétylcholinestérase entraîne une accumulation de l'acétylcholine au niveau des ganglions du système nerveux autonome, des synapses du système parasympathique, de la plaque motrice et du système nerveux central (SNC); il en résulte un tableau clinique d'hypercholinergie qui associe, au stade aigu ^[2-6] :

- un syndrome muscarinique : bradycardie et hypotension, bronchoconstriction, hypersécrétion bronchique et salivaire, sueurs profuses, larmoiement, myosis, douleurs abdominales, diarrhées et relâchement des sphincters,
- un syndrome nicotinique neuromusculaire : fasciculations musculaires puis paralysie musculaire périphérique et respiratoire,
- des signes centraux : agitation, confusion et très rapidement coma avec convulsions.

D'autres mécanismes encore incomplètement connus sont associés à l'atteinte cholinergique centrale, notamment l'atteinte du système GABAergique et surtout la libération excessive de glutamate. Cet acide aminé excitateur, par l'intermédiaire des ces récepteurs, en particulier les récepteurs canaux de type N-Méthyle-D-Aspartate (NMDA), est une agression du SNC. Cette agression va en particulier entraîner l'apparition des crises épileptiques proches de celle du lobe temporal évoluant vers un état de mal particulièrement intense et prolongé et qui s'accompagne de lésions cérébrales séquellaires ^[7].

Les symptômes mettant en jeu le pronostic vital (apnée, convulsions) peuvent apparaître en quelques minutes après l'inhalation de quantité importante des gaz toxiques ^[1]; en l'absence de

traitement, le décès survient rapidement (en 5 à 30 minutes en cas d'intoxication massive) dans un tableau d'hypoxie multifactorielle où s'associent le bronchospasme, l'hypersécrétion bronchique, la paralysie musculaire et les conséquences ventilatoires du coma et des convulsions ^[2, 4].

Le traitement pharmacologique standard d'urgence qui doit être administré dès l'apparition des premiers symptômes pour une question de survie, est maintenant bien codifié et a été officialisé par les autorités sanitaires françaises et internationales ces trois dernières années ^[2, 8, 9]. Ce traitement associe toujours :

- l'atropine, anticholinergique actif sur les récepteurs muscariniques; agit également au niveau central mais n'a pas d'action sur l'atteinte neuromusculaire car elle ne se fixe pas aux doses classiques sur les récepteurs nicotiniques.

- un anticonvulsivant benzodiazépinique, en général le diazépam. Deux études expérimentales ont montré que le contrôle des convulsions était, dans ces intoxications, un facteur essentiel pour la survie ^[10, 11].

- une oxime qui agit comme régénérateur des cholinestérases inhibées, en libérant l'enzyme de l'organophosphoré. Cette régénération n'est cependant efficace que si l'oxime est employée avant le vieillissement de l'enzyme. Contrairement à l'atropine, les oximes agissent sur les récepteurs nicotiniques mais ne passant pas la barrière hémato-encéphalique, elles sont sans effet sur les signes centraux. L'oxime la plus utilisée est la pralidoxime, le sel variant selon les pays.

L'intoxication par neurotoxique est une urgence vitale qui implique une prise en charge symptomatique et un traitement spécifique immédiats. L'extrême gravité de cette intoxication avait conduit les armées à doter les combattants d'une seringue pour auto traitement. Les attentats terroristes survenus au Japon puis à New York en 2001 ont démontré qu'il existait une menace réelle s'exerçant surtout pour les populations civiles moins préparées et non

protégées.

Le traitement par seringue auto-injectable a été développé dans ce contexte. Elle est d'ores et déjà disponible pour les forces armées. Elle pourrait également être employée dans des circonstances d'attentat, sur ordre médical, par les médecins du SAMU, pour leur permettre de mieux gérer un afflux saturant de victimes. Elle a aussi sa place dans les plans Piratox hospitaliers où elle pourrait être utilisée chez les victimes les plus graves en amont de la chaîne de décontamination, leur permettant de survivre avant la prise en charge médicale spécialisée. Elle présente donc un rapport bénéfice/risque favorable permettant sa mise à disposition éventuelle aux populations civiles et son déploiement potentiel au niveau européen.

Des auto-injecteurs prêts à l'emploi associant les trois médicaments, sont déjà disponibles sur le terrain pour les armées de plusieurs pays: auto-injecteur MULTIPEN à 3 compartiments en France associant atropine, diazépam et méthylsulfate de pralidoxime, COMBOPEN associant atropine, avizafone (prodrogue hydrosoluble du diazépam) et méthanesulfonate de pralidoxime au Royaume Uni et le MARK-1 aux USA à 2 compartiments associant atropine et chlorure de pralidoxime, l'auto-injecteur de diazépam étant présenté séparément ^[1, 12, 13].

2.1 Traitement initial

2.1.1 Décontamination

L'attentat au sarin survenu à Tokyo a mis en évidence le risque de contamination secondaire des sauveteurs puisqu'une quarantaine de personnes (équipes de secours, policiers, employés de métro) ont dû être hospitalisées ^[14, 15].

La décontamination doit donc être la plus précoce possible. Elle vise à éliminer le toxique présent à la surface de la peau ou sur les vêtements et donc à prévenir l'intoxication mais aussi à protéger

le personnel soignant en limitant le transfert possible de contamination. Elle est débutée par un personnel secouriste, protégé, informé et entraîné. Le protocole de décontamination est précis et doit être scrupuleusement respecté. Les deux étapes sont le déshabillage de la victime et le lavage de la surface corporelle. La neutralisation du toxique est obtenue au moyen d'une décontamination humide grâce à une solution aqueuse additionnée d'hypochlorite de sodium (0,5 à 0,8 % de chlore actif) ^[16]. Il en est de même pour les plaies des parties molles et muqueuses (sauf œil). Le rendement de la chaîne de décontamination est d'environ 15 à 20 patients par heure.

2.1.2 Traitement symptomatique

Les victimes graves vont devoir bénéficier rapidement d'une assistance ventilatoire après intubation de la trachée. Une ventilation non invasive est illusoire chez ces patients couverts de sueurs ou présentant des convulsions. Cette intubation est à haut risque chez un patient à l'estomac plein, bradycarde, bronchospastique et hypoxique. Cette intubation est d'autant plus difficile que les sauveteurs doivent impérativement être protégés par une tenue protectrice en butyl. Une étude clinique a montré que le délai pour réaliser cette intubation, réalisée dans des conditions à priori favorables était allongé de façon significative lorsque les médecins étaient habillés dans cette tenue de protection ^[17]. Certaines équipes ont proposé un entraînement régulier pour ce type d'intervention ^[18]. Les difficultés seraient probablement encore plus importantes pour des équipes non entraînées à intervenir de cette façon comme c'est généralement le cas à l'hôpital.

La prise en charge symptomatique impose également un abord veineux particulièrement difficile à réaliser avec des gants en butyl. Cet abord veineux va permettre de traiter les convulsions. De la même façon que pour l'abord trachéal, des équipes ont proposé un abord intra osseux pour la perfusion, plus rapide mais la aussi nécessitant une formation à ce geste ^[19].

2.1.3 Traitement étiologique

Atropine :

L'atropine peut en fait être considérée comme le véritable antidote de l'intoxication par les organophosphorés neurotoxiques. Elle agit par compétition avec l'acétylcholine au niveau de récepteurs muscariniques luttant contre le bronchospasme et l'hypersécrétion bronchique mais ses effets anticonvulsivants ne sont possibles qu'en cas d'administration très précoce ^[20].

Le devenir de l'atropine dans l'organisme après administration i.m. est décrit par un modèle à 2 compartiments avec une absorption de 1^{er} ordre très rapide ^[21].

Après administration i.m. de 0,5, 1, 2, et 4 mg chez le volontaire sain, la concentration plasmatique maximale est atteinte en 6 min en moyenne.

Les concentrations maximales ne sont pas exactement proportionnelles à la dose entre 1 et 2 mg; par contre elles sont proportionnelles entre 2 et 4 mg et justifient la double dose d'antidote pour obtenir un effet pharmacologique 2 fois supérieur ^[21].

L'atropine est ensuite rapidement distribuée dans les tissus; elle passe la barrière hémato-encéphalique. Elle est liée à 44% aux protéines plasmatiques.

Elle est métabolisée dans le foie et est éliminée sous forme inchangée (15-57%) et métabolisée; son principal métabolite excrété dans les urines (la tropine) représente environ 30% de la dose administrée ^[22, 23]. Sa demi-vie terminale d'élimination est de 3,30-4 h après administration de la dose de 0,5 mg et elle est raccourcie en augmentant la dose (2,34 et 1,62 h après administration de 2 et 4 mg) ^[21, 23].

Dans le cas d'intoxication par les organophosphorés, l'administration d'un antagoniste muscarinique au début de cycle (<5 min) pourrait prévenir ou arrêter les convulsions. Cependant, un antagoniste muscarinique serait moins efficace contre les convulsions après leurs débuts.

Différentes études précliniques sont déjà publiées, évaluant la dose d'atropine à administrer dans le cadre du traitement d'une intoxication par les gaz neurotoxiques.

Des études visant à comparer l'administration d'atropine à dose faible (0,1 mg/kg) et à dose élevée (2 mg/kg) en association avec la pralidoxime, et une benzodiazépine ou sans benzodiazépine, ont été publiées par Shih *et al.* [10, 11].

Ces études ont montré que l'administration d'atropine et de pralidoxime sans benzodiazépine n'avait aucun effet sur la prévention des convulsions chez le cobaye après l'intoxication par de forte dose (2 LD50) de différents gaz neurotoxiques.

Les animaux traités par l'atropine et la pralidoxime, présentent des signes d'intoxication aggravés et un indice de mortalité plus élevé que les animaux traités par l'association : atropine, pralidoxime et benzodiazépine anti-convulsivante.

De plus, ces études ont montré que la dose d'atropine (0,1 ou 2 mg/kg) ne modifiait pas significativement la dose d'anticonvulsivant nécessaire pour arrêter les convulsions induites par les substances neurotoxiques.

Pralidoxime :

La seconde partie de traitement étiologique repose sur la réactivation des cholinestérases par différentes molécules, dont les effets ne sont pas identiques sur les différents neurotoxiques organophosphorés.

Il s'agit de la pralidoxime et de l'obidoxime, recommandées par l'OMS, et des enzymes d'Hagedorn (HS-6, HI-6, HGG-12). Ces réactivateurs sont peu efficaces avec les organophosphorés entraînant un vieillissement rapide de la cholinestérase, comme le soman.

La pralidoxime, (méthylsulfate de pralidoxime, Contrathion®), agit à plusieurs niveaux. Elle hydrolyse la liaison enzyme-organophosphoré. De plus, elle est synergique de l'atropine et retarde le vieillissement de l'enzyme, lorsqu'elle est administrée précocement. En revanche, elle est dénuée d'effets centraux. Il n'existe aucun consensus sur les posologies à utiliser, très

variables allant de 2 à 12 g/jour. Les hautes doses de pralidoxime destinées à éviter le recours à la ventilation contrôlée, n'ont pas démontré leur efficacité en cas d'intoxication par les pesticides organophosphorés.

En France, les doses initiales sont de 350 mg par voie intramusculaire à renouveler 30 minutes plus tard, puis toutes les 4-6 heures.

Le devenir de la pralidoxime dans l'organisme après administration i.v. est décrit par un modèle à 2 compartiments ^[24, 25].

La pralidoxime n'est pas liée aux protéines plasmatiques ; elle se distribue largement dans le compartiment extracellulaire. Elle ne passe pas la barrière hémato-encéphalique.

Elle est métabolisée dans le foie et est éliminée dans les urines sous forme inchangée et sous forme de métabolites. Sa demi-vie d'élimination est de 1-3 h ^[24, 26].

Chez l'homme, aucune étude n'a été conduite afin de caractériser la pharmacocinétique de la pralidoxime après administration i.m. Cependant Houzé *et al.* ^[27] ont étudié la pharmacocinétique de la pralidoxime chez le rat. Dans cette étude le méthylsulfate de pralidoxime a été administré par voies i.v. et i.m. à 3 doses (10, 25, et 50 mg/kg équivalent en base), chez le rat naïf. Des rats intoxiqués par la paraoxon (0,215 mg/kg s.c.) ont été traités 30 minutes après par la pralidoxime à 50 mg/kg par voie i.v. ou i.m.

La décroissance plasmatique de la pralidoxime, chez le rat, est biphasique avec une demi-vie d'élimination courte et dépendante de la voie d'administration (environ 30 minutes i.v., et 60 minutes i.m.).

Pour les deux voies d'administration, les surfaces sous la courbe (*Area Under the Curve*, AUC) sont proportionnelles à la dose injectée avec une excellente biodisponibilité intramusculaire.

Chez le rat intoxiqué, il a été observé une prolongation de la demi-vie d'élimination avec une augmentation de la surface sous la courbe après l'administration i.m. ^[27].

Avizafone :

Les antagonistes non compétitifs de la NMDA sont capables d'arrêter les convulsions induites par une intoxication par les organophosphorés, et cela même si le traitement est administré 40 minutes après l'intoxication. Toutefois, ces agents ont des effets secondaires graves, en particulier sur la respiration [28-31]. Une autre façon de réduire le niveau d'activité glutamatergique est de renforcer l'inhibition GABAergique. Il a été démontré que le diazépam, un agoniste GABAergique, peut arrêter les convulsions s'il est injecté 5-10 minutes après leurs survenues. L'administration tardive de diazépam a des effets peu fiables, dans la mesure où les convulsions peuvent se reproduire et seulement une neuroprotection incomplète est obtenue [32].

L'administration d'un traitement associant l'atropine et une oxime, n'empêche pas l'induction des convulsions par les agents neurotoxiques. Des convulsions épileptiformes prolongées provoquées par un agent neurotoxique peuvent provoquer des lésions cérébrales irréversibles [10, 11, 28], ce qui peut entraîner, à long terme, des déficits dans les fonctions cognitives et le comportement. L'administration concomitante d'un médicament anticonvulsivant, tel que le diazépam, est considérée essentielle pour optimiser le traitement composé de carbamate en prétraitement, associé à l'atropine et une oxime dans le cas d'intoxication grave [4,9]. Toutefois, la biodisponibilité du diazépam après une injection i.m. est très variable. De plus, après une injection i.m., l'effet du diazépam est retardé, avec un effet neuroprotecteur moindre après l'exposition à des agents neurotoxiques [28, 33].

Il a été démontré que l'utilisation d'une benzodiazépine tel que le diazépam pourrait réduire la gravité des convulsions induites par le soman et empêcher ou réduire ensuite les conséquences neuropathologiques [33-36]. Le diazépam n'étant pas hydrosoluble, un solvant organique doit être intégré à la formulation du dispositif contenant les trois molécules. Ce problème

d'hydrosolubilité est un facteur limitant l'utilisation du diazépam par voie intramusculaire lorsqu'une obtention rapide des concentrations plasmatiques efficaces est requise. En outre, comme l'affirment Maidment et Upshall ^[37], l'utilisation d'un solvant organique dans les injections de diazépam pourrait ralentir l'absorption de ce médicament au site d'injection. Il était donc nécessaire de développer une prodrogue hydrosoluble, pro-diazépam (avizafone, ou lysyl, peptido-aminobenzophenone diazépam) afin d'obtenir une solution de lyophilisat associant les trois substances nécessaires au traitement de l'intoxication, à reconstituer extemporanément avant l'injection. L'avizafone, *in vivo*, subit une rapide hydrolyse par une aminopeptidase qui donne la lysine et le diazépam ^[37, 38].

La dose d'avizafone (20 mg de chlorhydrate d'avizafone) a été déterminée sur la base de deux études expérimentales réalisées chez le primate, l'une en France par le Centre de Recherche du Service de Santé des Armées (CRSSA) ^[34] et l'autre en Angleterre par Maidment et Upshall ^[37].

- *Etude britannique* ^[37]

24 singes rhésus ont été intoxiqués par 20 DL50 de soman par voie s.c. Les animaux ont été répartis en quatre groupes de traitements (n=6/groupe), ceux-ci recevant par voie i.m., 15 secondes après l'intoxication :

- atropine (1,18 µmol/kg) et méthane sulfonate de pralidoxime (65 µmol/kg)
- atropine, pralidoxime (comme ci-dessus) et avizafone à la dose de 0,7 µmol/kg
- atropine, pralidoxime (comme ci-dessus) et diazépam à la dose de 0,7 µmol/kg
- atropine, pralidoxime (comme ci-dessus) et avizafone à la dose de 1 µmol/kg.

L'efficacité était évaluée par l'évolution des signes cliniques, la mortalité à 24 heures et à 7 jours.

Une amélioration de la ventilation fut observée chez les animaux recevant le diazépam ou l'avizafone avec atropine et pralidoxime par rapport aux animaux traités seulement par atropine et pralidoxime; la mortalité des animaux a été la suivante:

	Mortalité à 24 h	Mortalité à 7 jours
Atropine +pralidoxime	1/6	5/6
Atropine +pralidoxime +avizafone 0,7 μ mol/kg	1/6	3/6
Atropine +pralidoxime + diazépam 0,7 μ mol/kg	0/6	0/6
Atropine +pralidoxime +avizafone 1 μ mol/kg	0/6	0/6

• *Etude française réalisée par le CRSSA* ^[34]

Six singes *Cynomolgus* ont été intoxiqués par 8 DL50 de soman injecté par voie i.m.

Les animaux ont été répartis en 3 groupes de traitements (n=2/groupe), les traitements étant administrés par voie i.m., 1 minute après l'intoxication :

- sulfate d'atropine (0,5 mg/kg = 0,7 μ mol/kg), méthylsulfate de pralidoxime (30 mg/kg = 139 μ mol/kg) et diazépam (0,2 mg/kg = 0,7 μ mol/kg),
- sulfate d'atropine plus méthylsulfate de pralidoxime (comme ci-dessus) et l'avizafone à la dose de 0,7 μ mol/kg (0,35 mg/kg).
- sulfate d'atropine plus méthylsulfate de pralidoxime (comme ci-dessus) et l'avizafone à la dose de 1,05 μ mol/kg (0,53 mg/kg) soit 1,5 fois la dose de diazépam exprimée en molarité.

Les critères d'évaluation étaient l'évolution de l'EEG et des signes cliniques immédiats ainsi que la neuroprotection (comptage neuronal à l'histologie) trois semaines après l'intoxication.

Les résultats furent les suivants :

- Pas de différence concernant l'évolution des signes cliniques entre les animaux recevant le diazépam ou l'avizafone,
- l'EEG des animaux traités par le diazépam restant perturbé pendant environ 90 minutes après l'intoxication,
- l'EEG des animaux traités par l'avizafone à 0,7 $\mu\text{mol/kg}$ restant très perturbé pendant les quatre premières heures suivant l'intoxication,
- l'EEG des animaux traités par l'avizafone à 1,05 $\mu\text{mol/kg}$ se normalisa en 90 minutes, comme celui des animaux recevant le diazépam,
- chez les animaux traités par l'avizafone à 0,7 $\mu\text{mol/kg}$, on nota une perte neuronale dans le cortex fronto-pariétal, qui ne fut jamais retrouvée chez les animaux recevant le diazépam à 0,7 $\mu\text{mol/kg}$ ou l'avizafone à 1 $\mu\text{mol/kg}$.

Ces deux études concordantes, ont montré que, pour obtenir une efficacité neuroprotectrice et un effet sur la survie équivalents entre les associations atropine/pralidoxime/avizafone et atropine/pralidoxime/diazépam, il faut injecter environ 1,5 fois plus d'avizafone que de diazépam.

De plus ces deux études ont montré que la concentration plasmatique maximale de diazépam est obtenue plus rapidement après une injection d'avizafone qu'après une injection de diazépam. Enfin, à dose équimolaire, la "charge plasmatique" en diazépam (définie par la quantité totale de diazépam circulant pendant 3 heures (étude CRSSA) ou 5 heures (étude britannique) ramenée au poids corporel de l'animal) était toujours plus faible (d'environ 20 à 40%) après injection d'avizafone comparativement à une injection de diazépam, expliquant le rapport d'efficacité de 1,5 entre les deux principes actifs.

3. ETUDES AIBC

L'auto-injecteur bi-compartiment (AIBC) est un dispositif développé par la Pharmacie Centrale des Armées (PCA), qui contient dans un compartiment trois principes actifs sous forme lyophilisée et dans un autre compartiment 2,5 ml de solvant (eau ppi).

Les trois principes actifs sont les suivants :

- 20 mg de chlorhydrate d'avizafone (équivalent à 17,03 mg d'avizafone base et à 11,3 mg de diazépam exprimé en dose équimolaire)
- 2 mg de sulfate d'atropine
- 350 mg de méthylsulfate de pralidoxime.

L'AIBC est destinée au traitement d'urgence des intoxications par les neurotoxiques organophosphorés sur le terrain.

En cas de menace avérée d'intoxication (mesure par indicateurs colorés semi-quantitatifs sur le terrain) le combattant reconstituera sur ordre le soluté. Dès l'apparition des premiers symptômes d'intoxication, il s'auto-injectera le contenu d'un AIBC; en cas de persistance des symptômes, une deuxième injection sera renouvelée 15 minutes plus tard.

L'association sera administrée par voie i.m. dans la cuisse ce qui permet une utilisation en contexte d'urgence et en atmosphère chimique; le dispositif a en effet été conçu pour que l'injection puisse être pratiquée à travers les vêtements de protection.

Etant donné l'objectif thérapeutique de l'AIBC (antidote d'une intoxication), il n'a été réalisé ni étude de pharmacodynamie clinique ni étude d'efficacité pour des raisons évidentes d'éthique. Le dossier "études cliniques" de cette application consiste en une étude réalisée chez le sujet sain au cours de laquelle ont été évaluées:

- la sécurité d'emploi de l'AIBC aux doses thérapeutiques recommandées,
- le devenir dans l'organisme de l'avizafone et de la pralidoxime administrées par voie i.m. et leur interaction pharmacocinétique avec les autres constituants de l'association.

Cette étude AIBC a été réalisée en deux étapes successives, dénommées étude AIBC1 et étude AIBC2 :

- étude AIBC1, réalisée pour la partie clinique du 14 septembre 2004 au 4 février 2005, au cours de laquelle le contenu d'un AIBC a été injecté à 20 sujets âgés en moyenne de $29,7 \pm 6,3$ ans (moyenne \pm sd).

- étude AIBC2, réalisée pour la partie clinique, du 22 janvier au 26 mai 2005, au cours de laquelle le contenu de 2 AIBC, dose thérapeutique maximale (DTM), a été injecté à 20 autres sujets âgés en moyenne de $27,2 \pm 6,2$ ans (moyenne \pm sd).

Les sujets inclus dans AIBC1 ne pouvaient pas participer à AIBC2. Un comité désigné à l'avance avait revu les données de sécurité d'emploi d'AIBC1 avant d'autoriser le lancement de l'étude AIBC2.

3.1 Etude AIBC1

3.1.1 Objectifs

Les objectifs pharmacocinétiques d'AIBC1 étaient d'étudier :

- a) la cinétique de transformation de l'avizafone en diazépam et ses métabolites,
- b) l'interaction pharmacocinétique de l'avizafone et de son produit de transformation métabolique, le diazépam, avec l'atropine et la pralidoxime injectés en association dans l'AIBC.

Ces objectifs ont été atteints en comparant :

- a) les profils pharmacocinétiques du diazépam et du DMD, observés après une administration de 20 mg de chlorhydrate d'avizafone (correspondant à 17,03 mg d'avizafone base) et après une administration d'une dose équimolaire de diazépam (11,3 mg)

b) les profils pharmacocinétiques de l'avizafone et du diazépam observés après une administration de 20 mg d'avizafone administrée seule ou avec l'association atropine/pralidoxime.

3.1.2 Méthode

Au cours de l'étude AIBC1, les sujets ont reçu selon un schéma ouvert, randomisé et croisé, une administration i.m. unique de:

- 20 mg de chlorhydrate d'avizafone (2,5 ml)
- 11,3 mg de diazépam (2,25 ml)
- le contenu d'un AIBC soit : 20 mg de chlorhydrate d'avizafone, 2 mg de sulfate d'atropine, 350 mg de méthylsulfate de pralidoxime (2,75 ml)

Compte-tenu de la demi-vie longue du DMD (30 à 150 h) ^[39] les administrations de chaque principe actif étaient espacées d'au moins trois semaines.

Afin de s'assurer que le traitement était correctement administré et de mesurer la quantité exacte de produit injecté, le dispositif AIBC était pesé avant puis après administration du traitement; en effet le dispositif étant opaque, il n'est pas possible de savoir si le contenu a été injecté par sa seule inspection visuelle.

Les prélèvements étaient effectués 5, 15, 30, 45 min puis 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120 et 168 h après administration des traitements.

En raison de l'instabilité de l'avizafone, les prélèvements sanguins étaient conservés dans la glace et immédiatement divisés en deux aliquots:

- dans l'un prévu pour le dosage de l'avizafone, de l'acétonitrile était immédiatement ajouté pour bloquer la dégradation enzymatique de la substance. Après mélange au vortex puis centrifugation à 0°C pendant 10 minutes, le surnageant était recueilli dans un tube conservé à -80°C,

- l'autre aliquot était traité de façon classique : centrifugation (à 0°C) et mise en congélation à -80°C du plasma surnageant.

Les échantillons étaient conservés à -80°C jusqu'à envoi pour la réalisation des dosages analytiques.

Ainsi les concentrations d'avizafone ont été déterminées dans le sang et celles du diazépam et du DMD dans le plasma.

Les paramètres pharmacocinétiques: aire sous la courbe (AUC), C_{max} , T_{max} , $t_{1/2}$ ont été calculés à partir des concentrations sanguines ou plasmatiques par le logiciel WinNonlin®.

Les AUC et les C_{max} ont été comparés 2 à 2 après transformation logarithmique par le test de Schuirmann. Les biodisponibilités (i.e. AUC) et les C_{max} ont été considérées comme équivalentes lorsque les intervalles de confiance à 90% (IC 90%) des ratios des AUC_{0-t} et des C_{max} étaient compris dans l'intervalle réglementaire 0,80-1,25. Les T_{max} ont été comparés par un test non paramétrique de Friedmann.

D'autre part, les urines étaient également recueillies pendant les intervalles de temps suivants : temps 0, puis 0-12 h et 12-24 h après administration.

Dans les urines, les concentrations de l'avizafone, du diazépam et de ses 3 métabolites (DMD, temazépam, oxazépam) ont été déterminées.

De plus, les profils des chromatogrammes après administration d'avizafone, de diazépam et d'AIBC ont été comparés afin de s'assurer que les produits de dégradation étaient qualitativement similaires et qu'aucun nouveau produit de dégradation n'apparaissait après l'administration d'avizafone.

3.2 Etude AIBC2

3.2.1 Objectifs

Les objectifs pharmacocinétiques d'AIBC2 étaient d'étudier:

a) la cinétique de la pralidoxime après administration i.m., peu de données étant disponibles dans la littérature,

b) l'interaction pharmacocinétique de la pralidoxime avec l'atropine et l'avizafone, injectés en association.

Ces objectifs ont été atteints en étudiant et comparant les profils pharmacocinétiques de la pralidoxime observés après une administration unique de pralidoxime administrée seule ou avec l'AIBC.

3.2.2 Méthode

Au cours de l'étude AIBC2, les sujets ont reçu selon un schéma ouvert, randomisé et croisé, une administration i.m. unique de:

- 700 mg de méthylsulfate de pralidoxime (soit 385 mg de pralidoxime base)

- le contenu de 2 AIBC soit: 40 mg de chlorhydrate d'avizafone, 4 mg de sulfate d'atropine, 700 mg de méthylsulfate de pralidoxime.

En raison du volume des injections (2*2,5 ml pour la pralidoxime et 2*2,75 ml pour l'AIBC), les deux traitements ont été administrés sous forme de deux injections pratiquées simultanément par deux personnes différentes, des côtés droit et gauche (fesse pour la pralidoxime et cuisse pour l'AIBC pour reproduire les conditions d'utilisation thérapeutique).

Bien que la demi-vie d'élimination plasmatique de la pralidoxime soit seulement de 1-3 h, l'intervalle entre les deux périodes a été de deux semaines. En effet un des autres objectifs était d'étudier la sécurité d'emploi de l'administration de deux AIBC. En raison de la longue demi-vie du DMD, un intervalle trop court aurait pu biaiser l'évaluation de la tolérance de la pralidoxime chez les sujets qui recevaient deux AIBC en première période.

Lors de cette étude, le schéma d'administration a été deux injections pratiquées simultanément alors que le schéma d'administration thérapeutique recommandé est en fait l'injection d'un

2^{ème} AIBC 15 min après le 1^{er}, si les symptômes persistent. Les raisons de cette divergence sont les suivantes:

- a) l'injection simultanée du contenu de deux AIBC, permettait de sensibiliser l'évaluation de la sécurité d'emploi de la dose maximale thérapeutique (DMT),
- b) l'injection de deux AIBC à 15 min d'intervalle, perturbait l'évaluation du profil pharmacocinétique de la pralidoxime administrée par voie i.m., un des objectifs de l'étude.

Par ailleurs, ce schéma d'administration n'a pas biaisé l'interprétation de l'autre objectif pharmacocinétique de l'étude: étudier l'interaction de la pralidoxime avec les 2 autres constituants de l'étude ; en effet ceci s'est fait en comparant les AUC de pralidoxime observées chez des sujets qui ont reçu deux administrations de pralidoxime (pralidoxime seule ou pralidoxime en association avec atropine/avizafone) effectuées selon le même schéma.

Les prélèvements sanguins étaient effectués 5, 15, 30, 45 min puis 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8 et 12 h après administration des traitements.

Les méthodes statistiques utilisées pour calculer et comparer les paramètres pharmacocinétiques de la pralidoxime administrée seule ou avec l'AIBC ont été similaires à celles utilisées pour les benzodiazépines.

Partie 2

Amyotrophie Spinale Infantile

1. INTRODUCTION

Les amyotrophies spinales infantiles (ASI) sont identifiées depuis plus d'un siècle. Maladies génétiques touchant l'appareil locomoteur, elles sont caractérisées par une dégénérescence des motoneurons de la corne antérieure de la moelle épinière et du bulbe rachidien, responsable de paralysies évolutives. Elles se caractérisent par une faiblesse et une fonte précoces des muscles du bassin, des épaules, du tronc et des membres. Dans les formes les plus graves, le diaphragme est touché, imposant une assistance ventilatoire. Leur prévalence est estimée à une naissance sur 6000 à 10000 ^[40].

Trois différents types d'ASI sont distingués, selon l'âge de début des symptômes et leur évolutivité ^[41].

L'ASI de type I (*severe SMA*), ou maladie de Werdnig-Hoffman, apparaît très précocement avant 6 mois et comprend deux formes : type I vrai apparaissant à la fin de la vie fœtale ou au cours des 2 premiers mois de vie avant que l'enfant ne tienne sa tête. Type I bis (ou *Borderline severe/intermediate severity SMA*) débutant entre 3 et 6 mois où l'enfant peut, ou a pu, tenir sa tête sans avoir jamais acquis la tenue assise.

L'ASI de type II débute avant l'âge de la marche, l'enfant se tient ou a tenu assis seul.

L'ASI de type III, ou maladie de Kugelberg-Welander, débutant après l'acquisition de la marche, peut survenir à n'importe quel âge dans l'enfance, à l'adolescence ou même à l'âge adulte.

Plus le début de la maladie est précoce plus l'atteinte est sévère. Dans l'ASI de type I vrai, l'enfant décèdera précocement avant l'âge de 2 ans dans un tableau soit de tétraplégie progressive avec insuffisance respiratoire et trouble de la déglutition soit de mort subite du fait de l'atteinte bulbaire. Dans les formes I bis et II, l'aggravation est là aussi progressive aboutissant à une tétraplégie, d'autant plus sévère que le début a été précoce, entraînant à

l'âge adulte une dépendance totale. Le pronostic vital est en jeu du fait de l'insuffisance respiratoire paralytique aggravée par l'hypoplasie pulmonaire et les déformations orthopédiques, surtout en l'absence de prise en charge. Pour les types III, l'aggravation est variable, soit très régulière, soit par poussées entraînant en général la perte de la marche et parfois une insuffisance respiratoire sévère.

Les études anatomo-pathologiques des patients atteints d'amyotrophie spinale ont montré l'existence d'une raréfaction des motoneurones de la corne antérieure de la moelle épinière, correspondant à une perte des unités fonctionnelles appelées encore unités motrices.

Au niveau musculaire, il existe une atrophie des fibres musculaires comparable à celle observée dans les dénervations par section de nerf.

La mort prématurée de motoneurones, par un phénomène d'apoptose, est probablement à l'origine de la perte des unités motrices. Toutefois, compte tenu des échanges trophiques permanents entre muscle et neurone, le rôle du muscle est également important. De même, les expériences récentes font émettre l'hypothèse d'une anomalie du transport axonal à l'origine d'une dégénérescence du motoneurone. A l'heure actuelle, il n'existe aucun marqueur biologique sérique corrélé à l'évolution de la maladie et le mécanisme à l'origine de la dégénérescence élective des motoneurones dans les ASI reste obscur.

L'anomalie génétique responsable de l'ASI a été localisée sur le chromosome 5q13 en 1990 par J. Melki puis identifiée en 1995 par ce même groupe ^[42]. Il s'agit d'une délétion homozygote dans 95% des cas (mutation pour les 5% restants) de la copie télomérique du gène SMN ^[43]. Ce gène majeur code pour la protéine de survie du motoneurone (*Survival of Motor Neuron*, SMN). Ainsi chez les patients atteints d'ASI, la concentration intracellulaire de la protéine dans les motoneurones est fortement réduite et corrélée à la sévérité de la maladie ^[44]. Cette protéine intervient dans les mécanismes de l'épissage des ARN messagers,

de la transcription et du métabolisme des ARN ribosomiaux ; mais la raison pour laquelle sa déficience entraîne une maladie spécifique des motoneurones n'est pas élucidée ^[45-47].

D'autres gènes situés dans la région 5q13 sont impliqués dans l'expression de la maladie et pourraient expliquer l'hétérogénéité clinique des ASI. Il s'agit entre autres des gènes SMN2, (la copie centromérique du gène SMN) qui codent pour une protéine SMN tronquée ^[48] et du gène NAIP (*Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein*), dont une délétion a été retrouvée chez 80% des cas de type I et chez très peu d'individus de type II et III ^[49]. L'existence d'autres gènes mineurs pouvant moduler l'expression de la maladie, situés à distance de la région 5q13 est suspectée.

2. THERAPIE

Il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement médicamenteux spécifique des ASI probablement parce que les mécanismes à l'origine de la dégénérescence des motoneurones, et de l'atteinte musculaire ne sont pas encore connus. Il semble, dans l'état actuel des connaissances, que l'on soit encore bien loin de la thérapie génique. En revanche, quelques essais médicamenteux ont été menés plus ou moins récemment.

2.1 Thérapies médicamenteuses non spécifiques

Les traitements proposés ici ont pour cible le muscle ou l'appareil neuromusculaire dans sa globalité. Ainsi des études réalisées entre 1970 et 1980, sur divers produits, stéroïde anabolisant, hexahydrocoenzyme et guanidine hydrochloride ^[50-52], se sont avérées peu concluantes. Puis deux essais plus récents ont porté sur la carnitine ^[53] et le salbutamol ^[54]. Si certains effets ont été notés, impression de mieux être, réduction de la fréquence des infections pulmonaires pour le premier, prise de poids, augmentation de la force musculaire subjective sans une réelle amélioration aux tests objectifs de testing pour le deuxième, il n'existe pas jusqu'alors de résultat probant de l'efficacité réelle de ces produits.

2.2 Thérapies médicamenteuses agissant sur les protéines SMN

Thérapies agissant soit par augmentation de la protéine SMN, soit par stimulation de la production de la protéine SMN tronquée par le gène SMN2.

Dans ce cadre, un premier travail a montré que l'acide valproïque augmente la transcription du gène SMN2 dans les lignées cellulaires d'amyotrophie spinale ^[55].

Dans une étude publiée en 2006, une équipe américaine a réalisé une étude pilote avec du valproate de sodium chez 7 patients adultes atteints d'ASI de type III. Le traitement a duré entre 1 et 15 mois. Le valproate a été donné dans un premier temps à la dose journalière de 250 mg puis, si aucun effet secondaire n'était noté, à la dose de 500 mg. Un des participants (le n°3) a dû stopper son traitement au bout d'un mois. Six mois après le début du traitement, la force musculaire avait augmenté chez tous les participants excepté le patient n°3. Une amélioration fonctionnelle a également été rapportée par les participants ^[56].

Parallèlement ont été conduites des recherches sur le phénylbutyrate. Après avoir montré que ce produit pouvait augmenter l'expression du gène SMN2 *in vitro*, Mercuri a réalisé une étude pilote récente dans le but d'évaluer les effets cliniques de ce produit, sa tolérance comme son efficacité ^[57]. Dix enfants atteints d'ASI de type II génétiquement confirmé (dont cinq seulement âgés de plus de 5 ans), suivis pendant neuf semaines, ont reçu une semaine sur deux (soit cinq semaines de traitement au total) 500 mg/kg de phénylbutyrate. Certains résultats positifs, en particulier une augmentation de la fonction motrice (évaluée par l'échelle de motricité d'Hammersmith), ont été enregistrés sans que soient apparus d'effets adverses majeurs. Toutefois ces résultats doivent être interprétés avec prudence compte tenu de la courte durée du traitement, du petit nombre de sujets et de l'absence de véritable groupe contrôle (étude non aveugle et sans placebo). La rapidité d'apparition des premiers signes d'amélioration, trois semaines seulement après le début de l'étude (soit après deux semaines de traitement) est peu compatible avec les résultats obtenus habituellement dans les thérapies médicamenteuses des affections neurodégénératives. Il aurait été souhaitable de mettre en évidence parallèlement une augmentation du taux de protéine SMN. Dans une étude publiée en janvier 2007, un consortium italien a présenté les résultats d'un essai randomisé, en double aveugle contre placebo testant la tolérance et l'efficacité du phénylbutyrate dans l'ASI. L'étude a impliqué 10 centres italiens et 107 enfants atteints

d'ASI (âgés de 30 mois à 13 ans). Le traitement (placebo ou phénylbutyrate) était donné à la dose de 500 mg/kg/jour, pendant 13 semaines suivant un régime discontinu (7 jours avec puis 7 jours sans). Au total, 90 patients (45 dans chaque groupe) ont suivi et terminé l'essai conformément aux règles établies pour ce protocole. La fonction motrice, l'état fonctionnel des muscles et la capacité vitale ont été mesurés à 5 et 13 semaines.

Les résultats ont montré que le phénylbutyrate était bien toléré. Seulement deux patients ont dû quitter l'essai à cause d'effets secondaires trop importants. Une amélioration fonctionnelle légère a été observée dans les deux groupes sans différence statistique significative. Les auteurs en concluent que, dans ces conditions de traitement, le phénylbutyrate n'est pas efficace dans l'ASI mais souhaiteraient néanmoins faire des essais complémentaires avec cette molécule sur des tranches d'âge mieux ciblées ^[58].

2.3 Facteurs neurotrophes

Il s'agit là de s'intéresser aux substances susceptibles d'agir directement sur la survie des motoneurones, des axones et de la jonction nerf / muscle.

A cet égard l'effet de l'hormone TRH (*Thyrotropin Releasing Hormone*) susceptible d'agir sur les neurones moteurs de la corne antérieure de la moelle épinière (peut-être par une action neurotrophique) a été évalué dans un essai en double aveugle. Pendant 29 jours, six enfants atteints d'ASI II ou III ont été traités par voie intraveineuse (0,1 mg/kg) et trois recevaient du placebo ^[59]. Après 29 jours de traitement, la force musculaire, mesurée par dynamométrie, ainsi que la vitesse de conduction du nerf péronier, étaient significativement plus élevées. Ces résultats encourageants portent toutefois sur un temps très court et devraient être confirmés sur un nombre de patients plus important.

Mais surtout parmi les traitements susceptibles de freiner l'évolution de l'ASI, en agissant sur les neurones, il paraît intéressant de tester l'efficacité de molécules antiglutamates compte

tenu de la neurotoxicité du glutamate à concentration très élevée. Les corps cellulaires des motoneurones spinaux et bulbaires sont de plus très exposés à ce neurotransmetteur.

Deux médicaments peuvent être envisagés dans ce cadre, la gabapentine et le riluzole.

Pour la gabapentine, une étude américaine chez 84 adultes atteints d'ASI de forme II et III n'a pas montré après 12 mois de traitement, d'effet bénéfique sur la force musculaire (mesurée par des tests myométriques), la capacité vitale ou d'autres tests fonctionnels ^[60].

De même une étude de Merlini portant sur 120 patients, 61 traités par la gabapentine, 59 non-traités, a obtenu des résultats contradictoires : amélioration significative du score de force musculaire du membre supérieur mais amélioration beaucoup moins nette pour le membre inférieur, aucun effet sur la capacité vitale et sur les tests fonctionnels ^[61].

En ce qui concerne le riluzole, il a déjà été reconnu comme efficace pour une pathologie également liée à la dégénérescence des motoneurones, la sclérose latérale amyotrophique (SLA), diminuant la progression de la maladie. Son action neuroprotectrice semble bien, pour une part, être liée à une diminution de la libération de glutamate et, par conséquent, de la transmission glutamatergique ^[62-64].

Par ailleurs, les effets du riluzole chez l'animal ont été évalués dans un modèle animal de l'amyotrophie spinale ^[65]. Des souris mutantes, portant une délétion de l'exon 7 du gène SMN, induisent une dégénérescence axonale suivie d'une détérioration de la fonction motrice, semblable à celle observée chez l'homme avec un temps moyen de survie de 33 jours ^[66, 67].

Le riluzole, administré après le début des signes moteurs (à partir de l'âge de 21 jours, 8 mg/kg/jour par voie orale), conduit à un allongement significatif de la survie et à une protection de la jonction neuromusculaire sans toutefois entraîner une diminution de la perte des axones. Ces résultats démontrent que l'évolution de l'amyotrophie spinale de la souris peut être ralentie après le début de la maladie et suggèrent que le riluzole peut être considéré comme une molécule candidate à des essais thérapeutiques chez l'homme.

Enfin parallèlement ont été publiés, par Russmann et Iannaccone ^[68], les résultats d'un essai préliminaire de phase 1 mené en double aveugle *versus* placebo, testant la tolérance et l'efficacité du riluzole à la dose de 107 mg/m² chez dix enfants atteints d'ASI de type I, âgés de 4 à 15 mois ; 2 enfants recevant du riluzole contre 1 du placebo, ceci pendant 9 mois (traitement prescrit à nouveau au bout de 12 mois à la demande des parents dans quelques cas) . Cette étude permet de conclure à l'absence de toxicité du riluzole dans l'ASI chez le très jeune enfant; aucun effet indésirable, ni aucune modification des paramètres biologiques n'ont été observés chez les dix enfants. En revanche, il n'est pas possible d'en déduire l'efficacité de la molécule. Certes les trois patients du groupe placebo sont morts à l'âge de 6 à 13 mois ; quatre des sept enfants traités sont aussi décédés mais plus tardivement (de 5 à 25 mois) et trois sont encore vivants, l'un jusqu'à 64 mois. Malheureusement les deux groupes d'enfants, traités et placebo, diffèrent très nettement selon l'âge de début de maladie, (critère sans doute non pris en compte lors du tirage au sort : début à la naissance ou à 1 mois pour les trois enfants placebo, début nettement plus tardif entre 3 et 5 mois pour six des enfants traités). Ceci rend difficile toute comparaison, la gravité de la maladie étant en général très liée à l'âge lors du début des symptômes.

3. RILUZOLE

3.1 Caractéristiques du riluzole

Le riluzole fait partie de la classe chimique des benzothiazoles. Son mécanisme d'action principal serait une réduction de la transmission glutamatergique. L'action neuroprotectrice est probablement liée à une réduction de la libération de glutamate ^[69].

Utilisé jusqu'alors essentiellement chez l'adulte atteint de SLA, le riluzole est administré par voie orale en comprimé de 50 mg, à la dose quotidienne de 100 mg en deux prises distantes de 12 heures ^[64].

3.2 Effets indésirables

Les effets indésirables les plus fréquemment observés au cours du traitement ont été : asthénie, nausées et élévation des transaminases hépatiques. L'asthénie et les nausées ayant été rapportées comme dose dépendantes, peuvent être contrôlées en diminuant provisoirement la dose, tout en administrant le riluzole au cours des repas ^[70].

Lors des essais cliniques contrôlés dans la SLA, une élévation des transaminases (ALAT) au delà de 3 fois la limite supérieure de la normale a été signalée chez environ 11% des patients traités par riluzole (contre 4,2% des patients sous placebo); une augmentation plus importante, 5 fois la limite supérieure de la normale, chez 3,8% des sujets traités contre 1,7% dans le groupe placebo ^[62]. L'augmentation survient le plus souvent lors des 3 premiers mois d'initiation du traitement ; elle est habituellement inférieure à 5 fois la limite supérieure de la normale et transitoire malgré la poursuite du traitement. Chez les patients dont l'augmentation a été supérieure à 5 fois la limite supérieure de la normale, les taux d'ALAT sont, après l'arrêt

du traitement, redevenus normaux en 2 à 4 mois. Ces élévations ont rarement été associées à un ictère.

D'autres effets secondaires ont été signalés : céphalées, douleurs abdominales, autres douleurs, vomissements, tachycardie, étourdissements, somnolence, paresthésies péri-buccales. Très rarement, des réactions anaphylactiques, des œdèmes angioneurotiques et des pancréatites ont été rapportées. Enfin, parmi les 5000 patients environ ayant reçu du riluzole, il y a eu trois cas de neutropénie sévère, tous survenus dans les deux premiers mois de traitement ^[71].

3.3 Pharmacocinétique

3.3.1 Absorption

La pharmacocinétique du riluzole est linéaire pour la fourchette des doses allant de 25 à 100 mg et administrées toutes les 12 heures ^[72].

Le riluzole est absorbé rapidement après administration par voie orale, la concentration plasmatique maximale étant atteinte dans les 60 à 90 minutes qui suivent. Le riluzole pris par voie orale est bien absorbé (environ 90%), et sa biodisponibilité absolue s'établit en moyenne à 60 % environ (CV de 30%) probablement du fait d'un métabolisme présystémique ^[72]. La prise du riluzole avec un repas riche en graisses entraîne une diminution de l'absorption se traduisant par une diminution approximative de 20% de l'aire sous la courbe des concentrations en fonction du temps (AUC) et de 45% du pic plasmatique (C_{max}).

L'administration de doses multiples entraîne une accumulation plasmatique du riluzole d'environ 2 fois et l'état d'équilibre est atteint en moins de 5 jours.

Le riluzole se distribue largement dans tout l'organisme et traverse la barrière hématoencéphalique ^[73].

3.3.2 Distribution

Le volume de distribution du riluzole est environ de 3,4 L/kg ^[72].

Dans la fourchette de concentrations mesurées en clinique, le riluzole se lie aux protéines plasmatiques dans une proportion de 97%, principalement à l'albumine sérique et aux lipoprotéines ^[73].

3.3.3 Métabolisme

Le riluzole est fortement métabolisé en 6 principaux métabolites et en plusieurs autres de moindre importance quantitative qui n'ont pas tous été identifiés. Certains métabolites semblent avoir une activité pharmacologique *in vitro*. Le riluzole est métabolisé principalement dans le foie par hydroxylation dépendante du système du cytochrome P450 et par glucuroconjugaison ^[74].

La clairance du riluzole est très variable entre les patients, probablement à cause de la variabilité de l'activité de la principale isoenzyme du cytochrome P450 responsable de la N-hydroxylation, l'isoenzyme 1A2 ^[74, 75].

Dans le cadre d'études *in vitro* réalisées sur des microsomes hépatiques, on a constaté que l'hydroxylation du groupe amine primaire qui conduit à la formation de N-hydroxyriluzole, constitue la principale voie métabolique chez l'homme, le singe, le chien et le lapin. Chez l'homme, l'isoenzyme 1A2 du cytochrome P450 est la principale enzyme responsable de la N-hydroxylation. Sur la base de ces études *in vitro* il est peu probable que les isoenzymes 2D6, 2C19, 3A4 et 2E1 contribuent de façon significative au métabolisme du riluzole chez l'humain. Si la glucuroconjugaison directe du riluzole (à laquelle participe l'isoforme UGT-HP4 de la glucurotransférase) est très lente dans les microsomes hépatiques de l'humain, la conjugaison du N-hydroxyriluzole au groupe hydroxylamine s'effectue rapidement et donne

lieu à la formation de O-glucuroconjugués (dans une proportion de plus de 90%) et de N-glucuroconjugués ^[74].

3.3.4 Excrétion

Après administration d'une dose unique de 150 mg de riluzole radiomarqué au carbone 14 à 6 sujets sains, 90% et 5% respectivement de la dose radiomarquée ont été éliminés dans les urines et les fèces sur une période de 7 jours. Les glucuroconjugués représentaient plus de 85% des métabolites récupérés dans les urines. Seulement 2% de la dose de riluzole administrée ont été retrouvés dans les urines sous forme inchangée ^[70].

En prise chronique, le riluzole a une demi-vie d'élimination moyenne d'environ 12 h (CV de 35%) ^[72].

3.4 Pharmacologie détaillée

3.4.1 Effets neuroprotecteurs

Le riluzole exerce un effet protecteur sur les neurones centraux, et expérimentalement il a été démontré qu'il protégeait les cultures de motoneurones de rat des effets excitotoxiques de l'acide glutamique (0,1 M) et qu'il empêchait la mort par anoxie des neurones cérébelleux de rat mis en culture (concentration efficace médiane d'environ 30 M). Il protège également les cultures de neurones corticaux de rat des effets excitotoxiques du facteur toxique présent dans le liquide céphalo-rachidien des personnes atteintes de la SLA (0,5 M).

In vitro, le riluzole empêche la nécrose des coupes de tissu hippocampique incubées en présence de N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et de vératridine (protection de 60 et de 90%, respectivement à la concentration de 100 M) ^[70, 76].

L'emploi du riluzole *in vivo* (8 mg/kg par voie i.p. ou 4 mg/kg par voie i.v.) entraîne une réduction du volume des lésions nécrotiques ischémiques consécutives à la cautérisation de l'artère cérébrale moyenne chez le rat et à l'occlusion bilatérale des artères carotides chez la

gerbille (administration de 4 mg/kg par voie i.p.). Chez la gerbille, le recours aux techniques électroencéphalographiques a permis de mettre en évidence une récupération fonctionnelle. Le riluzole (8 mg/kg par voie i.v.) inhibe la libération d'acide glutamique déclenchée par l'ischémie cérébrale. Enfin, l'emploi par voie orale de riluzole sur un modèle d'excitotoxicité directe (4 et 8 mg/kg) occasionnerait une diminution de la taille des lésions suite à l'injection dans le corps strié d'un acide aminé excitateur, l'acide quinolinique ^[69, 70, 77].

Chez la souris de souche *Mnd*, qui présente une atrophie évolutive des motoneurons de cause inconnue dont les symptômes s'apparentent à ceux de la SLA, l'emploi du riluzole a entraîné une modification partielle de l'évolution de cette atrophie. L'administration par gavage de 8 mg/kg de riluzole, 5 jours/semaine pendant 15 semaines, a occasionné une amélioration notable de la mobilité pendant la phase terminale de la neuropathie dégénérative. À l'autopsie des animaux sacrifiés, les motoneurons de l'étage lombaire semblaient épargnés, contrairement aux motoneurons des autres étages médullaires ^[69, 70, 78].

3.4.2 Autres effets sur le système nerveux central

Administré par voies i.p. et orale, le riluzole s'est révélé être anticonvulsivant dans une large gamme de modèles de convulsions. En effet, il a empêché l'apparition des convulsions déclenchées par des acides aminés excitateurs ou par le test d'électrochoc maximal.

L'effet anticonvulsivant du riluzole s'installe rapidement et dure longtemps (plus de 6 heures) tant chez la souris que chez le rat ^[69].

Le riluzole est également un puissant anticonvulsivant chez l'animal génétiquement sujet aux convulsions. Chez la souris de souche DBA/2, qu'un stimulus auditif peut faire entrer en convulsions, l'administration de riluzole par voie i.p. a empêché l'apparition de convulsions cloniques et toniques déclenchées par le son d'une cloche (dose efficace médiane de 2,5 et de 1,2 mg/kg, respectivement). Chez le babouin atteint d'épilepsie déclenchée par stimulation

lumineuse, le riluzole a également inhibé la myoclonie provoquée par stimulation stroboscopique (4 et 8 mg/kg administrés par voie i.v.) [70, 79].

3.4.3 Mode d'action

Le riluzole pourrait agir par blocage de la transmission glutamatergique, comme ses propriétés anticonvulsivantes incitent à le penser. Administré à raison de 0,6 mg/kg par voie i.p., il inhibe les décharges des motoneurons provoquées par des acides aminés excitateurs, sans affecter les réactions d'excitation à l'acétylcholine ou à la sérotonine dans d'autres parties du cerveau. Le riluzole s'est avéré capable d'inhiber la libération de neurotransmetteurs provoquée par les acides aminés excitateurs sur plusieurs modèles *in vivo* et *in vitro*, de même que la mobilisation du calcium déclenchée par l'ajout d'acide glutamique aux cultures primaires de neurones cérébraux de rongeurs.

L'étude électrophysiologique de récepteurs isolés des acides aminés excitateurs exprimés dans l'ovocyte de *Xenopus* a permis de vérifier que le riluzole inhibait les courants induits par le NMDA et l'acide kaïnique, suggérant ainsi qu'il interagit directement, mais de façon non compétitive, avec les récepteurs des acides aminés excitateurs.

Le riluzole peut bloquer la libération de l'acide glutamique *in vivo* et *in vitro*, qu'il s'agisse de libération basale ou après activation neuronale.

Le riluzole peut empêcher la dépolarisation du neurone par blocage des canaux sodiques potentiel-dépendants, car il stabilise l'inactivation de ces canaux ioniques dans le nerf sciatique de grenouille, la couche granulaire du cortex cérébelleux de rat et les récepteurs recombinés exprimés dans l'ovocyte de *Xenopus*.

Il semble donc que l'action du riluzole repose sur plusieurs mécanismes, notamment le blocage direct non-compétitif des récepteurs des acides aminés excitateurs, l'inhibition de la libération de l'acide glutamique, l'inactivation des canaux sodiques potentiel-dépendants et la stimulation des voies de transduction dépendantes de la protéine G. On ignore si ces actions

sont réellement indépendantes les unes des autres et, le cas échéant, à laquelle il faudrait attribuer les diverses propriétés neuroprotectrices et les effets du riluzole sur le comportement [69, 70].

3.5 Pharmacologie générale

Administré à des doses atteignant 10 mg/kg par voie orale et 3 mg/kg par voie i.v., le riluzole semble généralement bien toléré, la sédation constituant le principal effet indésirable. Sur des modèles expérimentaux, le riluzole n'a aucune propriété neuroleptique, antidépressive, anxiolytique ou psychostimulante.

In vitro, le riluzole modifie le potentiel d'action cardiaque, mais cet effet cardiovasculaire n'est pas retrouvé *in vivo*, par voie i.v. à des doses atteignant 3 mg/kg. Chez le chien ayant reçu une dose cumulée de 8 mg/kg par voie i.v. les effets du riluzole sur la fonction respiratoire se sont limités à des augmentations faibles et passagères de la résistance pulmonaire et à une diminution de la compliance pulmonaire. L'administration orale d'une dose élevée (25 mg/kg) à des souris a entraîné une diminution du volume urinaire et de l'excrétion du potassium, et la dose de 30 mg/kg chez le rat entraîne un ralentissement du transit intestinal. Chez le rat, la prise orale de 20 mg/kg de riluzole s'est traduite 24 heures plus tard par un allongement très important du temps de Quick, lié à une baisse du taux de prothrombine [69, 70].

4. ETUDE ASIRI

Il s'agit d'un essai d'efficacité en deux groupes parallèles, comparant un groupe "Riluzole" avec un groupe "Placebo".

L'essai est randomisé, avec stratification par centre et sur le type d'amyotrophie spinale (type II ou type III) et contrôlé par un double aveugle.

L'évolution de la motricité à 2 ans par le score MFM (Mesure de la Fonction Motrice) ^[80] est le critère principal : c'est pour un sujet donné la différence entre son score MFM à 24 mois et son score MFM à J0.

Cet essai a été précédé d'une phase pharmacocinétique de 5 jours réalisée chez 14 patients visant à affiner la connaissance du profil cinétique du riluzole chez le patient ASI.

L'étude de pharmacocinétique clinique visée à déterminer les paramètres pharmacocinétiques du riluzole à l'état d'équilibre.

Il s'agissait d'une étude en ouvert, non randomisée, à dose répétée et mono centrique.

Quatorze patients atteints d'ASI ont reçu une dose journalière de 50 mg de riluzole 50mg soit une gélule par jour, pendant 5 jours.

Critères de sélection: Patients des deux sexes, âgés de 6 à 20 ans, atteints d'amyotrophie spinale de type II ou III (critères cliniques); diagnostic confirmé par une analyse génétique: délétion homozygote de l'exon 7 du gène SMN (ou mutation).

Les prélèvements ont été effectués le 5^{ème} jour avant la prise journalière et 1hr, 5hr, 9hr et 14hr après administration du traitement. Les paramètres pharmacocinétiques : aire sous la courbe (AUC), C_{max} , T_{max} , $t_{1/2}$ ont été calculés à partir des concentrations plasmatiques par le logiciel WinNonlin[®].

Partie 3

Analyse Pharmacocinétique : Art et Science

1. INTRODUCTION

La pharmacocinétique a pour but d'étudier le devenir d'un médicament dans l'organisme. Elle est à la confluence de plusieurs disciplines pharmaceutiques et mathématiques.

La détermination des paramètres pharmacocinétiques d'un médicament apporte les informations qui permettent de choisir les voies d'administration et d'adapter les posologies pour son utilisation future.

Les deux approches les plus utilisées pour caractériser la pharmacocinétique d'un médicament sont : l'analyse non compartimentale (*non compartmental approach*, NCA) et l'analyse par régression non linéaire, dite compartimentale. Les avantages de la méthode compartimentale sont les inconvénients de la NCA et *vice versa*.

2. APPROCHE NON COMPARTIMENTALE

Cette méthode ne requière pas de faire l'hypothèse d'un modèle mathématique spécifique du médicament. L'élimination est assimilée à un processus qui part du compartiment d'échantillonnage.

Le principe de base repose sur la méthode des trapèzes, permettant l'estimation de la surface sous la courbe des concentrations en fonction du temps (AUC).

L'AUC peut être estimée en utilisant la méthode des trapèzes linéaire, ou log-linéaire. Dans les deux cas, la surface totale est calculée en faisant la somme des surfaces intermédiaires de chaque trapèze.

L'estimation de la constante fractionnelle d'élimination (K_e) se fait par régression log-linéaire sur les points terminaux. Cette constante permet ensuite d'estimer la surface sous la courbe au-delà du dernier point mesuré (en pratique un triangle) en l'extrapolant à l'infini $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_{last} / K_e$.

A partir de ces paramètres initiaux, sont calculés : la clairance (Cl), le volume de distribution (V_z), et la demi-vie d'élimination.

2.1 Bioéquivalence

Les différences observées en terme de réponse clinique ou d'effets secondaires pour une même dose d'un médicament sont parfois liées à un comportement pharmacocinétique variable entre les individus ou à des différences de biodisponibilité de la molécule selon la forme pharmaceutique.

Si l'on admet l'hypothèse d'une relation directe entre la concentration ou l'exposition (AUC) et l'effet d'un médicament, deux formes pharmaceutiques bioéquivalentes, ayant donc la même biodisponibilité systémique, devraient entraîner la même réponse thérapeutique.

Deux produits sont dits bioéquivalents, lorsque la biodisponibilité, mesurée *in vivo*, du produit test (généralement un générique), ne diffère pas significativement, en terme d'absorption et d'exposition totale, du produit princeps, et cela après l'administration de la même dose molaire du principe actif sous les mêmes conditions expérimentales, après une dose unique ou répétée.

2.1.1 Etudes de bioéquivalence

Ces études sont réalisées afin de comparer la biodisponibilité d'un médicament générique à celle du produit princeps. Les outils statistiques doivent être suffisamment sensibles pour détecter des différences au niveau de l'absorption, et de l'exposition totale, différences qui ne seraient pas imputables à la variabilité intra-individuelle.

2.1.2 Evaluation de données

Méthodologie analytique :

La méthode analytique utilisée pour quantifier la molécule étudiée, doit être validée en terme de : justesse, précision, spécificité et sensibilité.

L'utilisation de méthodes analytiques différentes durant une étude de bioéquivalence n'est pas valide, du fait de l'introduction d'une source non quantifiable de différences entre les valeurs de concentrations mesurées. Les données analytiques doivent être présentées sous deux formats : tableaux et graphiques.

Evaluation pharmacocinétique :

Concernant les études à dose unique, les paramètres pharmacocinétiques suivants sont estimés pour chaque sujet : AUC du temps 0 jusqu'à la dernière concentration quantifiable, puis extrapolée à l'infini, la C_{max} , le T_{max} , la constante fractionnelle d'élimination et la demi- vie d'élimination.

Pour les études à doses multiples, les paramètres pharmacocinétiques estimés et évalués pour chaque sujet sont : AUC à l'état d'équilibre, C_{max} , T_{max} , C_{min} et pourcentage de fluctuation $[100 * (C_{max} - C_{min}) / C_{min}]$.

Une analyse statistique appropriée doit être réalisée pour chaque paramètre pharmacocinétique estimé.

Evaluation statistique :

La bioéquivalence est généralement évaluée en comparant les moyennes géométriques de chaque valeur reflétant la bioéquivalence, comme l'AUC et la C_{max} . Cette approche appelée bioéquivalence moyenne, comprend le calcul de l'intervalle de confiance à 90% pour les ratios des moyennes géométriques de chaque valeur métrique de la bioéquivalence, et cela pour les deux produits : test et référence. Pour que les deux produits soient bioéquivalents, l'intervalle de confiance des ratios doit être compris entre 0,8-1,25.

Généralement, les études cliniques pour obtenir ces données sont conduites en *cross-over*.

Une autre approche est validée par la FDA. Cette approche, appelée bioéquivalence individuelle, nécessite un plan d'études croisées multiples, permettant l'estimation de la variabilité intra-individuelle pour les deux produits, ainsi que l'interaction sujet-formulation.

Les tests paramétriques ne sont applicables qu'à des données suivant une distribution normale. Or la distribution de plusieurs paramètres biologiques semble déplacée vers la droite comparativement à une courbe gaussienne ^[81].

De plus, la distribution exacte des ces paramètres est difficile à établir, du fait du petit nombre de sujets inclus dans les études de bioéquivalence, dépassant rarement quelques dizaines. Par conséquent une transformation logarithmique, qui " normalise " la distribution, est effectuée avant toute évaluation statistique.

- *Analyse de variance (ANOVA) :*

Le test d'ANOVA permet de comparer la variabilité entre les sujets, les groupes de traitements, les périodes, les formulations et autres variables dépendant du design de l'étude.

- *Le test de Schuirmann (Two one sided t test):*

Appelé aussi " approche de l'intervalle de confiance ". L'objectif de ce test est de déterminer si la différence entre les moyennes de paramètres est supérieure à 20%

Ce test, actuellement rendu obligatoire par la FDA ^[82], permet de calculer l'intervalle de confiance à 90% des ratios des moyennes des deux produits. Cet intervalle de confiance doit être compris dans la zone $\pm 20\%$ pour les mesures d'absorption et d'exposition totale au principe actif, ce qui revient à considérer que 20% de différence sur AUC ou C_{\max} , n'aura pas de conséquence cliniquement significative.

Après transformation logarithmique des données, l'intervalle de confiance à 90% est fixé entre 0,8-1,25.

3. MODELISATION EN PHARMACOCINETIQUE

La modélisation pharmacocinétique consiste à mettre au point des modèles mathématiques permettant de décrire l'évolution des concentrations d'un médicament dans les fluides biologiques en fonction du temps, de quantifier les principales étapes du devenir du médicament dans l'organisme, et de prévoir les concentrations qui seront observées si la dose administrée varie.

Une des difficultés majeures de la modélisation pharmacocinétique réside dans le choix du modèle mathématique. La qualité principale attendue reste la description optimale des courbes de concentrations observées en fonction du temps, mais un modèle doit également être le plus simple possible et conserver une certaine analogie avec les phénomènes physiologiques.

Classiquement, la modélisation pharmacocinétique repose sur une approche compartimentale. Celle-ci considère l'organisme comme " divisé " en plusieurs compartiments, chacun de ces compartiments représentant un espace virtuel susceptible de correspondre à une structure ou un ensemble de structures anatomiques ou tissulaires, dans lequel le médicament se distribuerait de manière homogène. Le volume de chacun de ces compartiments est appelé volume de distribution. Le modèle mathématique permet de décrire les transferts du médicament entre ces différents compartiments à l'aide d'équations différentielles ou de systèmes d'équations différentielles. Ces équations font intervenir des micro-constantes. Les variables dépendantes d'intérêt sont les quantités de médicament présentes à l'instant t dans chaque compartiment. Lorsque le nombre de compartiments considéré est réduit (classiquement 3, voire 2 compartiments), la résolution analytique des équations différentielles demeure facilement accessible. Le modèle comporte alors plusieurs paramètres, qui sont des fonctions des micro-constantes de transfert inter-compartimentales, et qui

peuvent avoir une signification physiologique, comme la vitesse d'absorption ou la clairance du médicament, par exemple.

Cette approche compartimentale distingue en son sein deux concepts différents : les modèles déterministes et les modèles stochastiques. L'approche déterministe repose sur l'hypothèse que les molécules médicamenteuses sont réparties de façon homogène au sein d'un compartiment. L'approche stochastique rejette cette hypothèse de répartition homogène des molécules dans un compartiment.

La description des modèles compartimentaux les plus couramment utilisés en pharmacocinétique pourra être consultée au sein de quelques ouvrages spécifiques^[83, 84]. A la suite d'une administration par voie orale, l'absorption gastro-intestinale du médicament constitue un phénomène très complexe, influencé notamment par des processus de dissolution, le volume de remplissage gastrique, la vitesse de vidange gastrique ou la possibilité d'une pluralité des sites d'absorption. Il est cependant possible de modéliser mathématiquement ce passage du médicament au niveau de la circulation systémique. Classiquement, deux modèles d'absorption sont plus particulièrement utilisés :

- Le modèle décrit par un processus d'ordre 0 (non linéaire), qui considère une vitesse de transfert constante au cours du temps entre le compartiment en amont (dépôt), c'est-à-dire ici la lumière digestive, et le compartiment central.
- Le modèle d'ordre 1 (linéaire), considérant que le médicament franchit la barrière intestinale selon un processus du premier ordre (avec une constante fractionnelle de vitesse, c'est-à-dire une vitesse de passage proportionnelle à la quantité de médicament présente dans le compartiment en amont).

Il est très courant d'introduire un paramètre supplémentaire appelé " temps de latence " ou " *lag-time* " permettant de prendre en compte le temps s'écoulant entre la prise médicamenteuse et le début de l'absorption.

3.1 Modélisation individuelle

Dans ce type d'analyse, les paramètres pharmacocinétiques sont obtenus, dans un premier temps, en analysant les données de façon indépendante, individu par individu. Cette technique requiert un nombre d'observations important pour chaque sujet (données riches) afin de définir au mieux les profils pharmacocinétiques.

Cette première étape a pour but d'établir les paramètres optimaux de chaque individu. Elle peut être réalisée grâce à la méthode du maximum de vraisemblance, à une simple méthode des moindres carrés, ou par régression non-linéaire (RNL).

Dans une deuxième étape, est alors constituée une population de référence en estimant, pour la totalité des paramètres individuels décrivant la distribution de la population, la moyenne (caractéristique de la tendance centrale dans la population) et la matrice de variance-covariance représentant la dispersion autour de la moyenne.

3.1.1 Régression non linéaire

Le moyen de distinguer les modèles linéaires est de déterminer la dérivée première de la fonction par rapport à un paramètre, en fixant les autres paramètres du modèle.

Si aucune des dérivés ne contient les paramètres de modèle, celui-ci est dit linéaire. Sinon le modèle est dit non linéaire.

En pharmacocinétique, les données expérimentales sont exploitées pour déterminer les paramètres de modèle.

L'objectif est de déterminer une valeur de β , donnant des différences entre les concentrations observées et celles prédites les plus faibles possibles.

Les trois critères utilisés généralement sont : les moindres carrés ordinaires (*ordinary least squares*, OLS), les moindres carrés pondérés (*weighted least squares*, WLS) et les moindres

carrés étendus (*extended least squares*, ELS), méthode connue sous le nom de maximum de vraisemblance (*maximum likelihood*).

Ces critères sont obtenus en minimisant les quantités suivantes, appelées fonction objective (*objective function*, OF) ; e.g, O_{OLS} , O_{WLS} , O_{ELS} :

$$O_{OLS} = \sum_{i=1}^n (C_i - \hat{C}_i)^2$$

$$O_{WLS} = \sum_{i=1}^n W_i (C_i - \hat{C}_i)^2$$

$$O_{ELS} = \sum_{i=1}^n [W_i (C_i - \hat{C}_i)^2 + \ln(\text{var}(\hat{C}_i))]$$

Où \hat{C}_i est la valeur de C_i prédite par le modèle, et W_i est le facteur de pondération.

Le modèle de variance utilisé généralement est :

$$\text{var}(C) = \sigma^2 f(X, \beta)^\lambda$$

Quand $\lambda=0$, les variances de C_i sont identiques et constantes, et dans ce cas les critères OLS, WLS, ELS sont équivalents.

Si le modèle de variance est une fonction dépendant d'une variable indépendant X, mais ne dépend d'aucun paramètre à estimer, le WLS devient le critère à utiliser.

Par contre, si le modèle de variance dépend d'un ou de plusieurs paramètres β , l'utilisation d'une variation de WLS sera plus appropriée. Pour ce faire, la procédure consiste à donner une valeur de départ à W et de faire un WLS. Les paramètres résultants sont ensuite utilisés pour mettre à jour W_i , et un second WLS est réalisé. Ce processus est répété jusqu'à ce que les valeurs convergent. Ce WLS modifié est appelé technique des moindres carrés itératifs repondérés (*iterative reweighted least square*, IRLS) [83].

Dans le cadre des modèles généralement utilisés en pharmacocinétique pour analyser des données riches, diverses études de simulation ont montré que le critère ELS n'était pas

supérieur à IRLS. Par ailleurs ELS pourrait conduire à des estimations de paramètres biaisées ou avec une variabilité plus grande ^[85].

3.1.2 Modèles d'erreur

Erreur absolue constante :

Si la variance est supposée être constante pour toutes les observations, les facteurs de pondération sont fixés à une valeur constante, généralement 1.

Erreur de Poisson :

Ce modèle est utilisé quand la variance est proportionnelle à la moyenne des valeurs prédites.

Erreur proportionnelle (erreur relative) :

L'erreur est dite proportionnelle quand le coefficient de variation est constant tout au long de la gamme des concentrations observées.

3.1.3 Méthodes d'estimation

Méthode de recherche randomisée :

Cette méthode nécessite de connaître la gamme de valeurs plausibles des paramètres. Cette procédure peut être très lente, et ne permet pas de mesurer la précision des estimations de paramètres.

Méthode " d'épluchage, de pelage " (peeling) :

Il s'agit d'une méthode dont l'application est limitée aux modèles exprimés en somme d'exponentielles. Elle ne converge pas quand les constantes sont approximativement égales. De plus, elle est considérée comme peu efficace compte tenu de l'utilisation partielle des données pour estimer chaque paramètre. Néanmoins, cet " épluchage " de la courbe cinétique est souvent programmé dans les logiciels, pour estimer les valeurs initiales des paramètres.

Méthodes de linéarisation :

Ce sont les techniques les plus utilisées dans les logiciels statistiques pour estimer les paramètres d'un modèle.

Méthodes de Simplex :

C'est un des algorithmes de minimisation parmi les plus robustes, mais il est généralement très lent à converger.

3.2 Pharmacocinétique de population

La pharmacocinétique de population (PKpop) a pour but, chez un groupe d'individus, de définir les paramètres pharmacocinétiques moyens et leur dispersion (variance), et d'étudier l'influence des covariables sur ces paramètres pharmacocinétiques. En d'autres termes, une étude de pharmacocinétique de population cherche à estimer la variabilité inter-individuelle, voire intra-individuelle, des paramètres pharmacocinétiques et à quantifier les relations qui existent entre l'état physiopathologique d'un individu et ses propres paramètres ^[86]. Elle permet alors de mieux maîtriser la thérapie au plan individuel.

Selon Sheiner et Beal, trois types de facteurs sont à l'origine de cette variabilité ^[87] :

Des facteurs physiopathologiques ou explicatifs. Ce sont, notamment, des facteurs démographiques (sexe, âge, race, poids...), des facteurs génétiques (phénotype d'une voie métabolique), des facteurs fonctionnels (maladie concomitante, insuffisance rénale ou hépatique...), des facteurs biologiques ou chronobiologiques. Ces différents facteurs sont appelés covariables et sont à l'origine d'une variation des paramètres pharmacocinétiques entre individus ou, parfois même, chez un individu au cours du traitement.

D'autres facteurs sont dits " aléatoires ". Ils représentent la part inexpliquée et/ou imprévisible de la variabilité inter-individuelle.

Enfin, d'autres facteurs sont à l'origine de la variabilité dite " résiduelle ". Cette dernière comprend en particulier les erreurs de mesure (variabilité due aux méthodes analytiques, à l'imprécision des temps de prélèvements...) et la variabilité intra-individuelle.

D'autre part, l'approche PKpop ne considère jamais un patient comme isolé mais comme un membre d'une sous-population particulière. Ceci revient à dire que les paramètres pharmacocinétiques d'un individu ne sont connus qu'avec incertitude, cette incertitude reflétant la variabilité inter-individuelle estimée de la sous-population en question ^[88].

Plus globalement, lorsqu'un patient reçoit un traitement, l'incertitude sur la valeur de ses paramètres pharmacocinétiques correspond au niveau de variabilité apprécié dans la population générale des patients redevables du traitement, mais celui-ci pourra être situé dans une sous-population particulière, au vu par exemple, de son âge ou de son poids.

Ces méthodes raisonnent sur l'ensemble des données obtenues chez tous les patients. De ce fait, il n'est plus nécessaire que chaque patient ait subi la totalité des prélèvements sanguins. En fait, on peut répartir ces prélèvements chez plusieurs patients, chaque patient pouvant même n'avoir qu'un seul prélèvement. Une fois connue la distribution statistique des paramètres pharmacocinétiques dans la population, les cinétiques individuelles peuvent être estimées par la méthode bayésienne. Cette approche est donc bien adaptée à la pharmacocinétique clinique.

En pharmacocinétique de population, on distingue les méthodes " paramétriques ", qui présupposent une distribution normale (ou Log-normale) des paramètres pharmacocinétiques dans la population, et les méthodes " non paramétriques ", qui ne dépendent pas de cette hypothèse.

3.2.1 Méthodes " paramétriques "

Elles sont basées sur la décomposition de chaque paramètre pharmacocinétique en une somme de deux termes : un terme appelé " effet fixe ", constant dans la population donnée, et un terme appelé " effet aléatoire ", variable d'un patient à l'autre. On parle alors de modèles à effets mixtes. Par exemple, la clairance d'un patient quelconque (i) s'écrira sous la forme :

$$Cl_i = Cl + (\eta^{Cl})_i$$

où Cl désigne l'effet fixe et $(\eta^{Cl})_i$ l'effet aléatoire pour le patient i.

Il est possible d'écrire une fonction de vraisemblance tenant compte de l'ensemble des concentrations mesurées chez tous les patients. La maximisation de cette fonction permet d'estimer les effets fixes des différents paramètres pharmacocinétiques, ainsi que la matrice de variances-covariances des effets aléatoires.

Les logiciels de pharmacocinétique, comme NONMEM (*NONlinear Mixed Effect Model*) et WinNonMix proposent trois méthodes paramétriques basées sur le maximum de vraisemblance : les méthodes FO, FOCE et Laplacienne. Au cours de nos travaux, nous avons utilisé les méthodes FO et FOCE qui seront décrites ici brièvement.

La méthode FO (*First order method* : méthode du premier ordre) a été la première méthode de population développée^[89, 90]. Elle permet d'obtenir les deux premiers moments μ et C de la distribution des paramètres dans la population ainsi que la variabilité résiduelle. Si l'on considère $y_{i,j}$ la $j^{\text{ième}}$ observation recueillie chez un individu i, et $y_i(\xi)$ le vecteur d'observations de cet individu i, on a :

$$y_i(\xi) = f_i(\xi, \theta_i) + \varepsilon_i$$

Où ε_i et $f_i(\xi, \theta_{=i})$ représentent le vecteur d'erreurs aléatoires de l'individu i et le vecteur estimé par le modèle pour un individu i ayant pour paramètres individuels θ_i . θ_i peut également s'écrire :

$$\theta_i = \mu + \eta_i$$

Où μ est l'espérance mathématique de la loi de distribution des paramètres (on dit que μ est l'effet fixe ou *fixed effect*) et où η_i représente les fluctuations aléatoires pour un individu i de paramètres θ_i (on dit que θ_i est l'effet aléatoire ou *random effect*). L'effet aléatoire est considéré comme ayant une espérance nulle et une matrice de variance-covariance C . Une estimation des paramètres μ et C est obtenue en minimisant le critère des moindres carrés étendus et en "linéarisant" le modèle autour de $\eta_i = 0$ (c'est à dire autour de μ). On obtient une fonction objective qui est minimisée par un algorithme d'optimisation de type gradient [90].

La méthode FOCE (*First Order Conditional Estimation*) semble aujourd'hui consensuelle pour toute analyse de population. Ses performances et sa supériorité par rapport à la méthode FO ont été largement discutées lors du 13^e congrès du PAGE (*Population Approach Group in Europe, Thirteenth meeting*, 17-18 juin, Uppsala, Suède 2004). Davidian et col. ont rapporté que la linéarisation du modèle autour de la moyenne des paramètres pouvait être à l'origine d'un biais important sur l'estimation de μ et C , surtout lorsque la variabilité inter-individuelle dans la population est importante [91]. La méthode FOCE propose une linéarisation du premier ordre autour des "estimées courantes" des effets aléatoires η_i et non pas autour de $\eta_i = 0$. Beal et Sheiner considèrent cette méthode comme supérieure à la méthode FO, et proposent son utilisation lorsque la variabilité interindividuelle est grande et que le nombre de données par individu est important [87].

3.2.2 Méthodes " non paramétriques "

Elles utilisent un principe introduit par Mallet *et al.* ^[88], puis modifié par Schumitzky ^[92] pour permettre sa programmation sur micro-ordinateur. Ce principe consiste à se donner une distribution de paramètres pharmacocinétiques sous la forme d'une densité de probabilité, puis à calculer la probabilité conditionnelle des résultats expérimentaux (c'est-à-dire la vraisemblance) par rapport à cette distribution. Cette dernière est alors automatiquement ajustée par un algorithme spécifique, fonctionnant de manière itérative, afin de maximaliser cette vraisemblance.

L'utilisateur doit avoir estimé au préalable le domaine de variation de chaque paramètre pharmacocinétique afin de fixer les bornes de la grille sur laquelle sera évaluée la densité de probabilité. En pratique, une estimation grossière suffit, la grille pouvant être affinée par essais et erreurs en fonction des résultats du programme.

Ces méthodes ne dépendent d'aucune supposition concernant la forme de la distribution des paramètres pharmacocinétiques dans la population. Elles sont donc particulièrement bien adaptées à l'étude de distributions non gaussiennes, ou de mélanges de populations. Il reste toutefois à poser des hypothèses sur la forme du modèle pharmacocinétique (nombre de compartiments...) et du modèle d'erreur résiduelle, ce qui peut influencer grandement les résultats.

TRAVAUX PERSONNELS

Article 1

**High performance liquid chromatography coupled with
electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method for
the simultaneous determination of diazepam, atropine and
pralidoxime in human plasma**

Journal of Chromatography B, October 2008

Volume 15, Issue 874, Pages: 42-50.

1. INTRODUCTION

Les agents neurotoxiques organophosphorés " OP " (sarin, soman, tabun) sont des produits chimiques extrêmement toxiques qui ont été mis au point par le chimiste allemand, Gerhard Scharder, avant et pendant la Seconde Guerre mondiale. Ils possèdent des effets neurotoxiques potentiels entraînant des conséquences sur le plan militaire et civil, comme en témoignent les conflits armés ou les attaques terroristes.

L'exposition à ces inhibiteurs de la cholinestérase provoque une intense stimulation cholinergique postsynaptique. Les signes de toxicité comprennent : hypersécrétion, détresse respiratoire, tremblements, convulsions, puis coma et décès. Ces effets toxiques sont liés à l'hyperactivité du système cholinergique en inhibant la cholinestérase ce qui augmente l'acétylcholine au niveau des sites centraux et périphériques.

Les benzodiazépines sont efficaces contre les symptômes induit par les OP, avec une forte synergie lorsqu'elles sont associées à des anticholinergiques et des désactivateurs de la cholinestérase ^[93]. Plusieurs benzodiazépines ont été testées et le diazépam a été retenu grâce à son activité accrue ^[94]. Ainsi, le diazépam est recommandé comme un traitement standard de convulsions provoquées par des agents neurotoxiques, ainsi que les réactivateurs de la cholinestérase (pralidoxime, HI-6) et un antagoniste muscarinique telle que l'atropine ^[95, 96]. Ce traitement associant trois médicaments est conditionné sous forme liquide dans des auto-injecteurs qui doivent être administrés par voie intramusculaire. Cependant, contrairement aux réactivateurs de la cholinestérase (les oximes) et de l'atropine, le diazépam n'est pas hydrosoluble. Cette propriété chimique limite son activité pharmacologique après une injection intramusculaire (i.m.) et exige donc l'incorporation d'un solvant organique dans la triple formulation injectable.

Par conséquent, une prodrogue du diazépam soluble dans l'eau, l'avizafone, a été développée en tant que composant d'un mélange médicamenteux aqueux avec de l'atropine et la

pralidoxime. L'avizafone est efficace pour stopper les convulsions induites par le soman ^[34]. Un auto-injecteur contenant un mélange de chlorhydrate d'avizafone, de sulfate d'atropine, et de méthylesulfate de pralidoxime, est actuellement utilisé. La formulation est une poudre lyophilisée destinée à être diluée dans l'eau avant administration par injection i.m.

Dans la littérature, plusieurs méthodes de quantification des benzodiazépines ont été rapportées. Des méthodes analytiques, telles que la chromatographie sur couche mince (CCM)^[97], la chromatographie liquide à haute performance avec un switch de colonnes ^[98-100], et de dosage immunologique ^[101], ainsi que différentes méthodes de LC/MS/MS ^[102, 103], et CE/MS/MS ^[104, 105] sensibles et sélectives, sont actuellement utilisées pour la quantification du diazépam et des 1-4 benzodiazépines.

Plusieurs méthodes de chromatographie liquide ont déjà été signalées pour la quantification de la pralidoxime dans le plasma. Ces méthodes impliquent la détection UV ^[24, 25] et la détection électrochimique ^[106].

D'autre part, le dosage de l'atropine dans la matrice biologique peut se faire par différentes techniques, y compris HPLC avec détecteur UV ^[107] ou spectrométrie de masse en tandem ^[108, 109], et chromatographie en phase gazeuse avec spectrométrie de masse ^[110]. De plus, l'atropine a été évaluée en équivalents en dl-hyoscyamine par une méthode radioimmuno ^[111] et dosage des radio-récepteurs ^[112]. Néanmoins, aucune méthode n'a pas encore été publiée décrivant la quantification simultanée de la pralidoxime, du diazépam et de l'atropine dans une matrice biologique.

Dans cet article, nous décrivons le développement et la validation d'une méthode rapide, sensible et spécifique pour la quantification de trois molécules utilisées dans le traitement de l'intoxication par les OP dans le plasma humain, par HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem avec ionisation par electrospray.

Cette méthode a été associée à un prétraitement simple d'échantillons, et la validation de la méthode a été réalisée selon les récentes lignes directrices internationales pour la validation bioanalytique.



High-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method for the simultaneous determination of diazepam, atropine and pralidoxime in human plasma

Chadi Abbara^{a,b,*}, Isabelle Bardot^c, Annie Cailleux^{a,b}, Guy Lallement^d, Anne Le Bouil^{a,b}, Alain Turcant^{a,b}, Pascal Clair^c, Bertrand Diquet^{a,b}

^a Université d'Angers, UFR médecine, Angers cedex F-49045, France

^b CHU d'Angers, Service Pharmacologie-Toxicologie, Angers cedex 09 F-49933, France

^c Pharmacie centrale des Armées, BP 04, 45908 Orléans, France

^d Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, Unité de Neuropharmacologie, BP 87, 38702 La Tronche, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 November 2007

Accepted 31 August 2008

Available online 10 September 2008

Keywords:

Avizafone

Diazepam

Atropine

Pralidoxime

Liquid chromatography/tandem mass

spectrometry

Pharmacokinetics

Organophosphate agents

ABSTRACT

A high-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) procedure for the simultaneous determination of diazepam from avizafone, atropine and pralidoxime in human plasma is described. Sample pretreatment consisted of protein precipitation from 100 μ l of plasma using acetonitrile containing the internal standard (diazepam D5). Chromatographic separation was performed on a X-Terra[®] MS C₈ column (100 mm \times 2.1 mm, i.d. 3.5 μ m), with a quick step-wise gradient using a formate buffer (pH 3, 2 mM) and acetonitrile at a flow rate of 0.2 ml/min. The triple quadrupole mass spectrometer was operated in positive ion mode and multiple reaction monitoring was used for drug quantification. The method was validated over the concentration ranges of 1–500 ng/ml for diazepam, 0.25–50 ng/ml for atropine and 5–1000 ng/ml for pralidoxime. The coefficients of variation were always <15% for both intra-day and inter-day precision for each analyte. Mean accuracies were also within \pm 15%. This method has been successfully applied to a pharmacokinetic study of the three compounds after intramuscular injection of an avizafone–atropine–pralidoxime combination, in healthy subjects.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Organophosphate "OP" nerve agents (sarin, soman and tabun) are extremely toxic chemicals that were developed by the German chemist, Gerhard Scharder, before and during World War II. They pose potential neurotoxic effects to both military and civilian population, as evidenced by armed conflicts or terrorist attacks.

Exposure to organophosphorous cholinesterase inhibitors causes a progression of toxic signs and symptoms, including hypersecretion, fasciculation, tremors, convulsions, coma and respiratory distress, which can lead to death. These toxic effects are due to

hyperactivity of the cholinergic system because cholinesterase is inhibited and acetylcholine increases at central and peripheral sites.

Benzodiazepines are effective against OP-induced symptoms, with strong synergistic effects when combined with cholinesterase deactivators and anticholinergic drugs [1]. Different benzodiazepines have been tested and enhanced activity of diazepam was observed [2]. Thus, diazepam has been recommended for standard treatment therapy of convulsions caused by nerve agents, along with cholinesterase reactivators (pralidoxime, HI-6) and a muscarinic antagonist such as atropine [3,4].

Three-drug regimens are currently packaged in a single auto-injector which must be used intramuscularly. However, compared to cholinesterase reactivators and atropine, diazepam is not water soluble. This chemical property limits the pharmacological potency of diazepam for intramuscular (i.m.) injection and requires incorporation of an organic solvent in the triple injectable formulation.

* Corresponding author at: CHU d'Angers, Service Pharmacologie-Toxicologie, 4, Rue Larrey, Angers cedex 09 F-49933, France. Tel.: +33 241353642; fax: +33 241354877.

E-mail address: chadi.abbara@gmail.com (C. Abbara).

Table 1
Retention times and monitored transitions of the analytes and the internal standard

	Retention time (min)	Precursor (<i>m/z</i>)	Product (<i>m/z</i>)
Pralidoxime	1.8–2.1	137	119
Atropine	6–6.2	290	124
Diazepam	7–7.5	285	193
Diazepam D5	7–7.5	290	198

Therefore, a water-soluble prodrug of diazepam, avizafone, was developed as a component of an aqueous drug mixture with atropine and a cholinesterase reactivator. Avizafone is effective in arresting soman-induced seizures [5].

The three-drug regimen is currently packaged in a single auto-injector device containing a combination of avizafone hydrochloride, atropine sulfate and pralidoxime methyl sulfate. The formulation is a lyophilized powder to be diluted with water for injection before i.m. administration.

Several methods have been reported in the literature for the quantification of benzodiazepines. Several analytical methods, such as thin-layer chromatography (TLC) [6], column-switch high-performance liquid chromatography [7–9] and immunoassay [10], as well as different sensitive and selective LC/MS/MS [11,12], and CE/MS/MS [13,14] are currently used for the quantification of diazepam and 1–4 benzodiazepines.

In fact, several LC methods have already been reported for the quantification of pralidoxime in plasma. These assays involved UV detection [15,16] and electrochemical detection [17].

Additionally, quantification of atropine in the biological matrix has been accomplished by different techniques including HPLC with UV detector [18] or tandem mass spectrometry [19,20] and gas chromatography with mass spectrometry [21]. In addition, atropine was quantified as dl-hyoscyamine equivalents with a radioimmuno assay [22] and a radio receptor assay [23]. Nevertheless, no method is yet published describing the simultaneous quantification of pralidoxime, atropine and diazepam in a biological matrix.

In this paper, we describe the development and validation of a rapid, sensitive and specific method for the quantification of three molecules used in the treatment of OP intoxication in human plasma, using HPLC coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry.

This method was combined with a simple sample pretreatment, and the validation of the method was performed based on the most recent international guidelines for bioanalytical validation.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Drug standards pralidoxime, atropine and diazepam were purchased from Sigma–Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). The

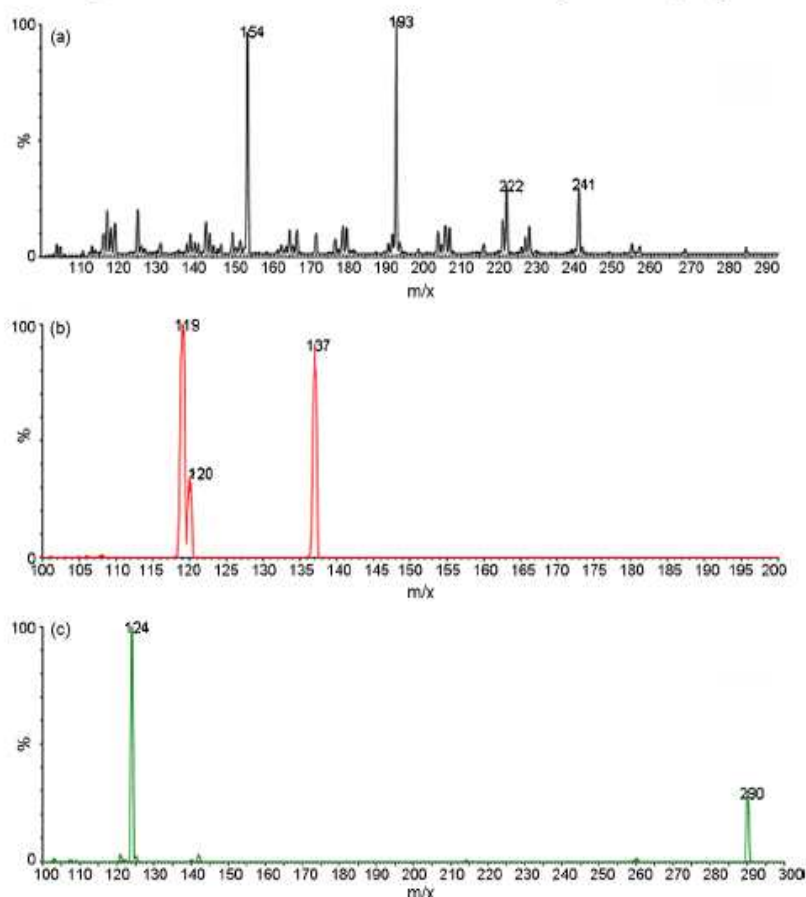


Fig. 1. Full scan mass spectra of pralidoxime (a), diazepam (b) and atropine (c).

Table 2
Interday and intraday precision (CV%) and accuracy (deviation%) for the three analytes in spiked human plasma samples

Analyte	Inter-day reproducibility (n = 6)				Intra-day reproducibility (n = 6)		
	Nominal concentration (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)	Accuracy%	CV%	Measured concentration (ng/ml)	Accuracy%	CV%
Pralidoxime	15	15.9	5.89	6.67	16	6.67	6.74
	300	330	9.9	4.25	311	3.77	6.33
	800	785	-1.83	6.64	799	-0.17	5.88
Atropine	0.75	0.78	3.65	7.48	0.77	3.00	3.24
	15	15.6	3.72	5.92	16	6.67	6.94
	40	39.5	-1.19	6.07	44.8	7.33	7.33
Diazepam	3	3.12	3.65	7.48	3.08	2.78	12.5
	150	156	3.72	5.92	165	10.2	2.11
	400	395	-1.19	6.07	384	-4.01	4.82

Table 3
Lower limit of quantification (CV%) and accuracy (deviation%) for the three analytes in spiked human plasma samples

Analyte	Lower limit of quantification (n = 6)			
	Nominal concentration	Measured concentration	Accuracy%	CV%
Pralidoxime	5	5.68	13.5	3.49
Atropine	0.25	0.238	-4.80	18.9
Diazepam	1	1.12	11.6	3.66

internal standard (I.S.) pentadeuterated diazepam was obtained from Promochem (Molsheim, France), HPLC grade acetonitrile and methanol, and analytical grade formic acid and ammonium formate were purchased from Merck (Fontenay sous Bois, France). Milli-Q water was used throughout the analysis. Drug-free human plasma was obtained from the hospital blood bank (Angers Hospital, France).

2.2. Preparation of drug standards (stock solutions, working solutions and plasma standards)

Stock solutions of each analyte were prepared in methanol at a concentration of 1 mg/ml.

During analysis, two stock solutions were used for each analyte: one to spike the plasma calibration standards, the other to prepare the quality control "QC" samples.

Stock solutions were diluted further in methanol:water (50:50, v/v) to obtain two working solutions. The first solution contained pralidoxime and atropine at 20 and 1 µg/ml, respectively. The second solution contained diazepam at 10 µg/ml.

These working solutions were then diluted in human drug-free plasma in order to obtain calibration curve standards and QC samples.

The stock solution of the I.S. (diazepam D5) was prepared in methanol at a concentration of 1 mg/ml. This solution was diluted to a concentration of 100 ng/ml in acetonitrile. The final solution

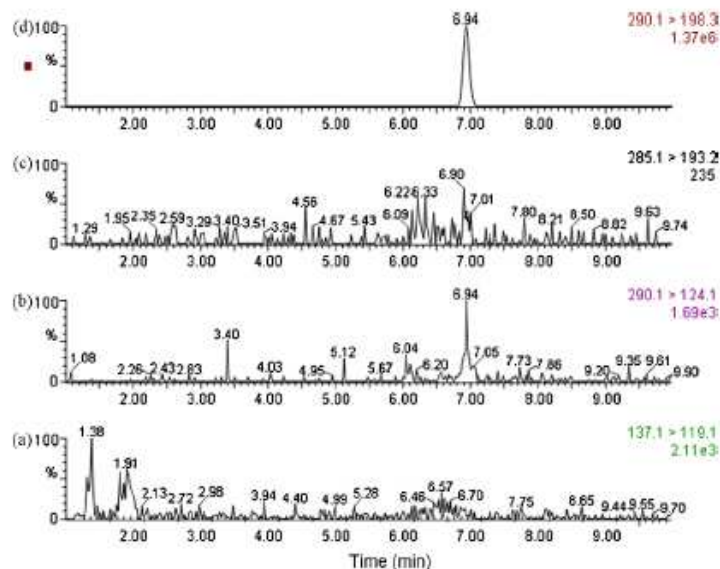


Fig. 2. MRM chromatograms (a–d) of a processed zero point sample: pralidoxime transition (a), atropine transition (b), diazepam transition (c) and diazepam D5 transition (d).

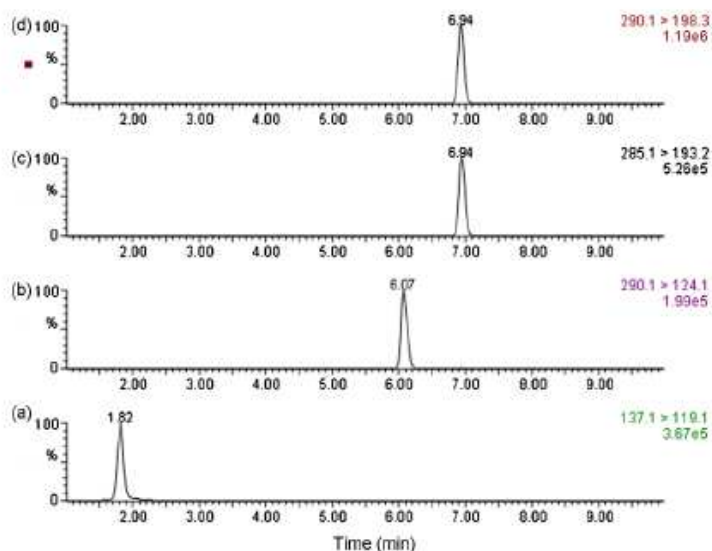


Fig. 3. MRM chromatograms (a–d) of a processed quality control sample at high concentration level: pralidoxime transition (a, 790 ng/ml), atropine transition (b, 38 ng/ml), diazepam transition (c, 391 ng/ml) and diazepam D5 transition (d).

was used as a protein precipitation reagent. All stock solutions were stored at -20°C .

Calibration standards (at seven concentrations) and QC samples (at low, medium and high levels) containing the three studied molecules were prepared in plasma by diluting various volumes of working solutions in human drug-free plasma. The following concentration ranges were validated: 5–1000 ng/ml for pralidoxime, 0.25–50 ng/ml for atropine and 1–500 ng/ml for diazepam.

2.3. Sample preparation

To 100 μl of plasma (QC, calibration standard and subject), 150 μl of protein precipitation reagent (including I.S.) was added. After vortex mixing for 30 s, the samples were ultra centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. The supernatant was then transferred into autosampler vials, and 10 μl aliquot was then analyzed by the chromatographic system.

2.4. Chromatographic and mass spectrometric conditions

The LC separation was performed using a Waters Alliance[®] 2695 separation module system. Chromatography was carried out at 40°C in a reversed phase system using a X-Terra[®] MS C_8 column (100 mm \times 2.1 mm, i.d. 3.5 μm) protected with X-Terra[®] MS C_8 (10 mm \times 2.1 mm, i.d. 3.5 μm) precolumn (Waters, Saint Quentin en Yvelines, France).

A quick stepwise gradient was used to elute the compounds from the column. At time zero, a mixture of 99% of ammonium formate buffer (pH 3, 2 mM) and 1% of acetonitrile was flushed through the column. From 2 to 3 min, the percentage of acetonitrile was increased to 2% linearly. Then, from 3 to 3.1 min, acetonitrile percentage was augmented to 95%. This solution of 95% acetonitrile was held till 7.5 min. From 7.5 to 8 min, the solution was changed to 1% of acetonitrile. From 8 to 11 min the HPLC column was re-equilibrated before the next injection. The flow rate was maintained at 0.2 ml/min. The column outlet was connected to the electrospray sample inlet.

The separated compounds were detected with a Waters Micro-mass Quattro Premier[®] triple quadrupole mass spectrometer with an electrospray source operating in positive ionization mode. The ionization source conditions were as follows: capillary voltage of 3.0 kV, source temperature of 120°C and desolvation temperature of 80°C . The cone and desolvation gas flows were 60 l/h and 651 l/h, respectively, and were obtained from a nitrogen generator (Peak Scientific). Argon was used as the collision gas and regulated at 0.25 ml/min. The multiplier was set to 650 V.

Mass spectrometer conditions (cone and collision energy) were optimized by direct infusion of the compound into the source (solutions at 0.5 mg/ml in water:methanol (50:50, v/v)). Multiple reaction monitoring (MRM) was used for data collection and the precursor/product ion transitions were listed in Table 1. ESI mass spectra of pralidoxime, atropine and diazepam are shown in Fig. 1. Data were processed by MassLynx[®] NT software.

2.5. Validation procedure

Validation of the analytical method was based on the Food and Drug Administration (FDA) guidelines for bioanalytical method validation published on-line [24].

2.5.1. Linearity

Calibration standards were prepared and analyzed in triplicate in three independent runs. Calibration curves (area ratio with I.S. vs. nominal analyte concentration) were fitted by least square linear regression without weighting and using $1/X$ and $1/X^2$ (X =concentration) as weighting factors. In order to establish the best weighting factor the goodness of the fit graphs were examined. To assess linearity, deviation of the mean calculated concentration over three runs should be within $\pm 15\%$ of nominal concentration with a coefficient of variation (CV) $< 15\%$. At the lower limit of quantification (LLOQ) level, a deviation of $\pm 20\%$ and a CV up to 20% was permitted.

Table 4
Stability study results

Analyte	Nominal concentration	Three freeze/thaw cycles		–20 °C		25 °C		Extracted at 25 °C	
		Recovery%	CV%	Recovery%	CV%	Recovery%	CV%	Recovery%	CV%
Pralidoxime	15	104.67	14.00	101.33	13.40	102.67	9.61	110.33	3.84
	300	100.33	5.30	96.13	4.26	91.07	4.55	102.25	10.49
	800	96.90	9.20	96.63	4.60	99.80	5.30	91.41	5.51
Atropine	0.75	95.56	12.00	96.24	10.20	104.32	9.75	105.20	6.80
	15	104.23	9.00	97.50	6.80	98.64	4.21	104.52	7.52
	40	106.32	8.00	101.20	5.80	102.30	7.80	96.30	5.23
Diazepam	3	107.87	8.93	105.56	7.29	105.67	10.15	110.00	4.29
	150	105.00	9.59	97.73	5.50	103.53	3.77	101.33	5.12
	400	106.50	6.31	104.70	4.30	105.88	6.02	97.2	2.98

2.5.2. Accuracy and precision

The QC samples already prepared were used for precision and accuracy determination, the three QC levels were chosen to cover the calibration curve range.

Precision was calculated as the CV% with a single run (Intra-assay) and between different runs (Inter-assay). Accuracy was determined as the percentage of deviation between measured and nominal concentration.

2.5.3. Limit of detection (LOD) and lower limit of quantification (LLOQ)

The limit of detection was set to the lowest concentration where the signal of the compound was threefold higher than background noise.

The LLOQ was experimentally chosen as the minimal concentration in plasma samples that could be confidently determined. FDA guidelines recommend that the deviation between measured and nominal concentration at LLOQ should not deviate more than $\pm 20\%$ with a precision $< 20\%$.

2.5.4. Specificity

Specificity refers to the ability of analytical method to differentiate and quantify the analyte in the presence of other components. Specificity was examined by applying the pretreatment procedure to drug-free human plasma samples ($n = 5$) as previously described by Shah et al. [25].

2.5.5. Stability

The stability of analytes was investigated at various concentrations during all steps of analysis.

Therefore, freshly prepared QC samples at three concentration levels were stored for 24 h at room temperature, 3 months at -20°C and underwent three freeze/thaw cycles.

The stability of extracted samples was assessed by reanalyzing a calibration curve and duplicate QC samples at each level after storage for approximately 20 h at room temperature.

2.5.6. Assessment of matrix effects

To assess any possible suppression or enhancement of ionization due to sample matrix, three types of experiments were performed.

In the first experiment, blank plasma samples of subjects at time 0 (before administration of any drug), used as negative samples were analyzed.

The second experiment included the evaluation of the matrix effect as described by Matuszewski et al. [26]. For this test two sets of samples are necessary. Set A consists of standard solutions. For set B blank samples are supplemented with the same amount of standards as used for set A.

Absolute matrix effects were calculated with the formula: $\text{ME\%} = \text{B/A} \times 100$.

Relative matrix effect was based on direct comparison of the MS/MS responses of extracts originating from different batches

(sources) of biological fluid (set B) with analytes spiked into. The variability of the responses, expressed as CVs(%), can be considered as a measure of the relative matrix effect for a given analyte.

The final procedure was based on the post-column infusion of an analyte in a chromatographic run of an extract or a blank matrix [27]. The signal was compared to the signal obtained with the post-column infusion of the same model analyte in a chromatographic run with eluent only.

2.6. Clinical application

Twenty healthy adult male volunteers between the ages of 18 and 45 years (29.7 ± 6.3 years, mean \pm SD) were selected for the clinical study. All subjects provided written informed consent and the Ethics Committee has approved the clinical protocol. All volunteers were assessed as healthy based on medical history, clinical examination, blood pressure, ECG and laboratory investigation (hematology, blood biochemistry and urine). No subject had a history or showed evidence of hepatic, renal, gastrointestinal, or hematological deviations, or any acute/chronic disease or drug allergy.

The study was conducted in an open, randomized, single-dose, three-way, cross-over design with a 3 weeks washout period between the treatments. Each subject received the following treatments by i.m. injection: 20 mg of avizafone chlorhydrate, 11.3 mg of diazepam and 20 mg of avizafone chlorhydrate combined with 2 mg of atropine sulfate and 350 mg of pralidoxime methyl sulfate using the bi-compartmental auto-injector under development (AIBC).

Blood samples were collected before i.m. administration, and 0.0833, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 and 168 h after treatment administration. The blood samples were centrifuged and plasma was separated and stored at -80°C until drug assay.

3. Results and discussion

3.1. Chromatographic conditions

The method permitted the separation and the simultaneous quantification of molecules used in the treatment of intoxication by organophosphorous compounds. These molecules vary greatly with respect to their hydrophilic nature. Hence, application of the stepwise gradient method was necessary in order to obtain an acceptable run time with accurate and precise quantification.

Upon injection, a small percentage of acetonitrile was applied in order to elute pralidoxime with enhanced resolution. Once the elution of pralidoxime and atropine was completed, the percentage of acetonitrile was increased to 95% to elute diazepam. Use of a dramatic gradient permitted simultaneous quantification of the three compounds in the treatment. It was necessary to increase the

Table 5
Matrix effect study ($n = 6$) results

Analyte	Nominal concentration (ng/ml)	Recovery%	CV%
Pralidoxime	15	37.4	2.69
	300	39.2	1.33
	800	45.2	1.17
Atropine	0.75	40.5	1.94
	15	37.7	0.63
	40	38.7	1.35
Diazepam	3	31.2	2.71
	150	31.1	3.16
	400	30.6	5.89

acetonitrile percentage quickly because of the differences in the hydrophilic nature of the molecule (atropine and pralidoxime are highly hydrophilic while diazepam is highly lipophilic).

Varying pretreatment procedures, including a liquid–liquid or a solid phase extraction were not applicable due to the variability in molecules nature. Also, the pretreatment procedure permitting the extraction of three molecules would be labor intensive and time consuming. To expedite the sample processing, a protein precipitation using acetonitrile was applied. This sample pretreatment procedure allowed the quantification of pralidoxime atropine and diazepam with a LLOQ that favorably compared to methods already published [9,17].

3.2. Validation procedure

The assay was linear over the validated concentration ranges of 1–500 ng/ml for diazepam, 5–1000 ng/ml for pralidoxime and 0.25–50 ng/ml for atropine, with determination coefficients $R^2 \geq 0.99$. The best calibration curves fitting was obtained using a weighting factor of $1/(\text{concentration})^2$ for all analytes. Deviations from the nominal concentration ranged from –5 to 15% for all analytes at all concentrations. The overall precision of the back-calculated standard concentrations was <14.3% for all analytes and at all concentration levels.

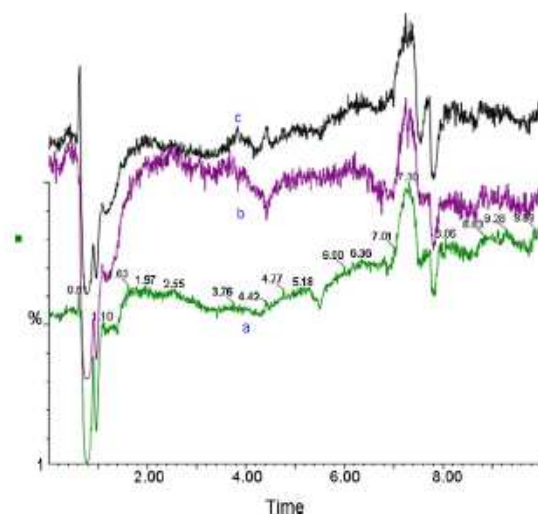


Fig. 4. MRM chromatograms for pralidoxime (a), atropine (b) and diazepam (c) during post-column infusion and subsequent injection of blank human plasma extracted according to the assay. Retention times for pralidoxime, for atropine and diazepam are, respectively, 1.8, 6.0 and 6.9 min.

Intra- and inter-assay validation results are presented in Table 2.

The intra-assay precision as measured by the CV% of mean of six analyses of three QC sample concentrations in one run. It was <12% for all tested concentrations for all compounds.

The mean inter-assay precision did not exceed 9.6% for all analytes.

Intra-assay accuracies were within $\pm 13.5\%$ for the limit of quantification and within $\pm 11.1\%$ for the other concentrations.

Samples above the upper limit of quantification could be re-analyzed and quantified with acceptable accuracy after dilution with drug-free human plasma.

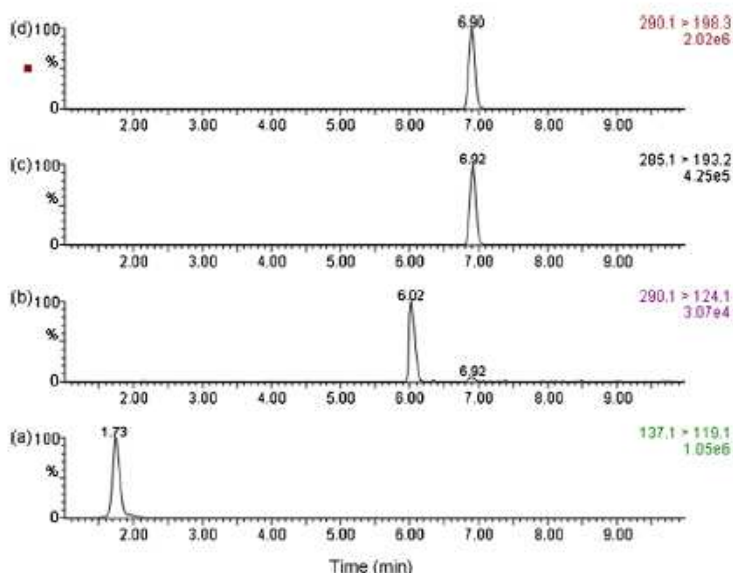


Fig. 5. MRM chromatograms (a–d) of a processed subject sample 30 min after the intramuscular administration of the three analytes: pralidoxime transition (a, 1998 ng/ml), atropine transition (b, 3.8 ng/ml), diazepam transition (c, 207 ng/ml) and diazepam D5 transition (d).

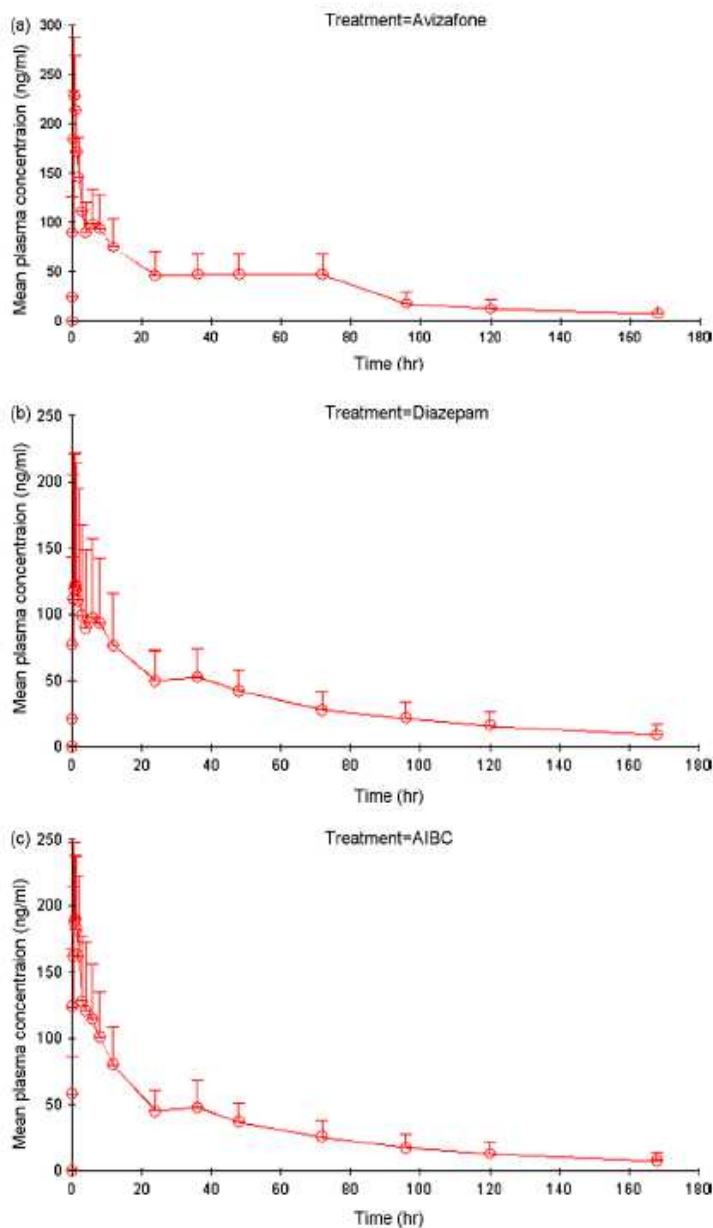


Fig. 6. Diazepam mean pharmacokinetic profile after the intramuscular administration of avizafone alone (a), diazepam alone (b) and avizafone with atropine and pralidoxime using the bi-compartmental auto-injector "AIBC" (c).

The LOD was set to 0.1 ng/ml for diazepam, 1 ng/ml for pralidoxime and 0.075 ng/ml for atropine.

The LLOQ was validated at 1 ng/ml for diazepam, 5 ng/ml for pralidoxime and 0.25 ng/ml for atropine in human plasma.

For LLOQ, the CV ($n=6$) of the quantified concentrations ranged from 3.49 to 18.9%. The accuracies for LLOQs were within $\pm 13.5\%$ for all analytes (Table 3).

3.2.1. Selectivity and specificity

Drug-free human plasma ($n=5$) was analyzed using the chromatographic conditions used to quantify the studied molecules.

Fig. 2 shows the extracted single ion chromatograms of drug-free human plasma spiked with internal standard. Fig. 3 shows the extracted single ion chromatograms of high-level quality control sample. No significant endogenous interfering peaks were noticed at the retention time of the studied analytes.

3.2.2. Stability

The results of stability study are presented in Table 4. The stability of extracted samples was tested by reinjecting a calibration standards and duplicate QC samples at each concentration after storage for approximately 20 h stored at room temperature. Stan-

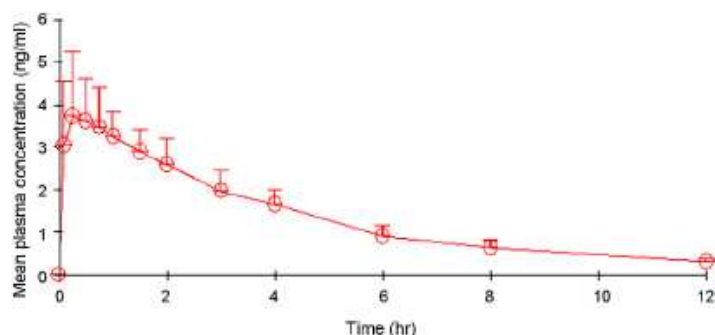


Fig. 7. Atropine mean pharmacokinetic profile after the intramuscular administration of atropine with avizafone and pralidoxime using the bi-compartmental auto-injector "AIBC".

dards and QC samples deviation remained within $\pm 13.4\%$ for all analytes.

The stability of plasma samples exposed to three cycles of freezing and thawing prior to analysis was assessed by analyzing triplicate QC samples at each concentration level after three freeze/thaw cycles. The mean plasma concentrations for QC samples remained within $\pm 7.87\%$ of nominal levels and that for all molecules at the three levels indicated acceptable stability for samples thawed up to three times before analysis.

The stability of plasma samples exposed to thaw at room temperature storage conditions was tested by analyzing triplicate QC samples at each concentration level after storage at room temperature during 24 h. Mean plasma concentrations for these QC samples were within $\pm 9.93\%$ of nominal levels, indicating acceptable stability of analytes in samples thawed 24 h prior to analysis.

The stability of frozen samples was tested by analyzing QC samples in triplicate at each concentration after storage for approximately 3 months at -20°C . Mean plasma concentrations for QC samples remained within $\pm 5.56\%$ of nominal levels, indicating acceptable stability for samples stored at least 3 months at -20°C .

3.2.3. Assessment of matrix effects

Plasma samples were obtained before treatments administration. These samples were used as negative controls to compare the baseline chromatograms with those obtained after drug administration.

The matrix effect evaluation procedure showed a low influence on the qualitative and quantitative determinations, and this was

further confirmed by the post-column infusion test. As far as an absolute matrix effect is concerned, the percentages of recovery were $<100\%$ indicating an ionization suppression. Meanwhile, the assessment of the relative matrix effect showed that the precision of the determination of set B at three concentration levels varied very slightly from 0.63 to 5.89%, for all analytes (Table 5). These data showed that the relative matrix effect for the three analytes was nearly absent.

Post-column infusion ($10 \mu\text{l}/\text{min}$) of the three analytes into the mobile phase while injecting extracted blank matrix is a very useful tool to determine the location of interference peaks that cause ion suppression. No critical area around the retention times of the three analytes was detected (Fig. 4).

3.3. Clinical application

For pharmacokinetic purpose, over 1200 plasma samples from 20 subjects have been assayed using the bioanalytical method described above. Fig. 5 shows the extracted single ion chromatograms of a subject's plasma, spiked with internal standard, 30 min after i.m. administration of the three compounds. Fig. 6 shows the mean pharmacokinetic profile of diazepam after i.m. administration of avizafone alone, diazepam alone and avizafone with atropine and pralidoxime using the bi-compartmental auto-injector "AIBC".

Fig. 7 shows the mean pharmacokinetic profile of atropine after i.m. administration of atropine with avizafone and pralidoxime using the bi-compartmental auto-injector "AIBC".

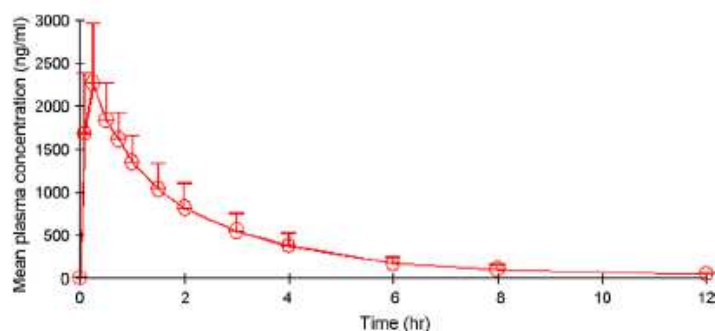


Fig. 8. Pralidoxime mean pharmacokinetic profile after the intramuscular administration of atropine with avizafone and pralidoxime using the bi-compartmental auto-injector "AIBC".

Fig. 8 shows the mean pharmacokinetic profile of pralidoxime after i.m. administration of pralidoxime with atropine and avizafone using the bi-compartmental auto-injector "AIBC".

References

- [1] J. Bajgar, *Adv. Clin. Chem.* 38 (2004) 151.
- [2] J.H. McDonough, J. McMonagle, T. Copeland, D. Zoefel, T.M. Shih, *Arch. Toxicol.* 73 (1999) 473.
- [3] F. Worek, R. Widmann, O. Knopff, L. Szinicz, *Arch. Toxicol.* 72 (1998) 237.
- [4] B.R. Capacio, T.M. Shih, *Epilepsia* 32 (1991) 604.
- [5] G. Lallement, F. Renault, D. Baubichon, M. Peoc'h, M.F. Burckhart, M. Galonnier, D. Clarencon, N. Jourdil, *Arch. Toxicol.* 74 (2000) 480.
- [6] R.K. Sarin, G.P. Sharma, K.M. Varshney, S.N. Rasool, *J. Chromatogr. A* 822 (1998) 332.
- [7] A. El Mahjoub, C. Staub, *J. Chromatogr. B* 742 (2000) 381.
- [8] M.D. Robertson, O.H. Drummer, *J. Chromatogr. B* 667 (1995) 179.
- [9] V.F. Samanidou, A.P. Pechlivanidou, I.N. Papadoyannais, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 679.
- [10] C.E. Jones, F.H. Wians, L.A. Martinez, G.J. Merritt, *Clin. Chem.* 35 (1989) 1394.
- [11] M. Kleinschmitz, M. Herderich, P. Schreier, *J. Chromatogr. B* 676 (1996) 61.
- [12] M. Laloup, M. Fernandez, M. Wood, V. Maes, G. De Boeck, Y. Vanbeckvoort, N. Samyn, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1545.
- [13] S. McClean, E.J. O'Kane, J. Hillis, W.F. Smyth, *J. Chromatogr. A* 838 (1999) 273.
- [14] S. McClean, E.J. O'Kane, W.F. Smyth, *Electrophoresis* 21 (2000) 1381.
- [15] J.L. Willems, J.P. Langenberg, A.G. Verstraete, M. De Loose, B. Vanhaesebroeck, G. Goethals, F.M. Belpaire, W.A. Buylaert, D. Vogelaers, F. Colardyn, *Arch. Toxicol.* 66 (1992) 260.
- [16] J.J. Medicis, C.M. Stork, M.A. Howland, R.S. Hoffman, L.R. Goldfrank, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 34 (1996) 289.
- [17] P. Houze, S.W. Borron, F. Scherminski, B. Bousquet, B. Gourmel, F. Baud, *J. Chromatogr. B* 814 (2005) 149.
- [18] O. Rbeida, B. Christiaens, P. Hubert, D. Lubda, K.S. Boos, J. Crommen, P. Chiap, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2005) 947.
- [19] P.A. Boermans, H.S. Go, A.M. Wessels, D.R. Uges, *Ther. Drug Monit.* 28 (2006) 295.
- [20] J. Bayer, F.T. Peters, T. Kraemer, H.H. Maurer, *J. Mass. Spectrom.* 42 (2007) 621.
- [21] M. Eckert, P.H. Hinderling, *Agents Actions* 11 (1981) 520.
- [22] K. Pihlajamaki, J. Kanto, L. Aaltonen, E. Iisalo, P. Jaakkola, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 24 (1986) 236.
- [23] E. Kentala, T. Kaila, *J. Kanto, Pharmacol. Toxicol.* 65 (1989) 110.
- [24] Guidance for industry, Bioanalytical method validation, www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf, 2001.
- [25] 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, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 16 (1991) 249.
- [26] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019.
- [27] R. Bonfiglio, R.C. King, T.V. Olah, K. Merkle, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1175.

2. DISCUSSION

2.1 Conditions chromatographiques

La méthode a permis la séparation et la quantification simultanée de molécules utilisées dans le traitement de l'intoxication par les composés organophosphorés. Ces molécules étant très variables quant à leur nature hydrophile, l'application de la méthode de gradient était nécessaire afin d'obtenir un temps d'analyse acceptable avec une quantification précise et exacte.

Lors de l'injection, la phase mobile contient un faible pourcentage d'acétonitrile afin d'éluer la pralidoxime avec une bonne résolution. Une fois l'élution de la pralidoxime et de l'atropine est achevée, le pourcentage d'acétonitrile est porté à 95% pour éluer le diazépam. L'augmentation brutale du gradient a permis la quantification simultanée de ces trois composés du traitement. Il a été nécessaire d'augmenter le pourcentage d'acétonitrile rapidement en raison des différences dans la nature hydrophile des molécules (l'atropine et la pralidoxime sont très hydrophiles, tandis que le diazépam est hautement lipophile).

Différentes procédures de prétraitement, y compris une extraction liquide-liquide ou en phase solide ne sont pas applicables en raison de la variabilité de la nature hydrophile des molécules. En outre, la procédure de prétraitement permettant l'extraction des trois molécules serait longue et laborieuse. Pour accélérer le traitement des échantillons, une précipitation de protéines en utilisant l'acétonitrile a été appliquée. Cette procédure de prétraitement a permis la quantification de l'atropine, la pralidoxime et le diazépam avec une limite de quantification (LLOQ) favorable par rapport aux méthodes déjà publiées ^[100, 106].

2.2 Procédure de validation

La méthode était linéaire sur les gammes de concentration validées : 1-500 ng/ml pour le diazépam, 5-1000 ng/ml pour la pralidoxime, et 0.25-50 ng/ml pour l'atropine, avec des

coefficients de détermination $R^2 \geq 0.99$. Le meilleur ajustement des courbes d'étalonnage a été obtenu en utilisant un facteur de pondération de $1/(\text{concentration})^2$ pour tous les composés analysés. Les écarts par rapport à la valeur nominale de la concentration variaient de 5 à 15% pour tous les composés et à toutes les concentrations. La précision globale de calcul de concentrations prédites pour la gamme était inférieure à 14,3% pour tous les composés et à tous les niveaux de concentration.

Les résultats de la validation intra et inter-essai sont présentés dans le tableau 2. La précision intra-essai mesurée par le CV% de la moyenne de six analyses de trois échantillons de contrôle qualité (CQ) en une seule analyse était <12% pour toutes les concentrations testées et pour tous les composés.

La précision moyenne inter-essai ne dépassait pas 9,6% pour tous les composés. Les exactitudes intra-essai ont été à $\pm 13,5\%$ pour la limite de quantification et de $\pm 11,1\%$ pour les autres concentrations.

Les échantillons ayant des concentrations supérieures à la limite supérieure de quantification sont ré-analysés après dilution dans du plasma.

La limite de détection a été fixée à 0,1 ng/ml pour le diazépam, 1 ng/ml pour la pralidoxime et 0,075 ng/ml pour l'atropine.

La LLOQ a été validée à 1 ng/ml pour le diazépam, 5 ng/ml pour la pralidoxime et 0,25 ng/ml pour l'atropine dans le plasma humain.

Pour la LLOQ, le CV (n=6) de la quantification variait de 3,49 à 18,9%. L'exactitude de la LLOQs était entre $\pm 13,5\%$ pour tous les composés (tableau 3).

Sélectivité et spécificité:

Des échantillons de plasma humain vierge (n = 5) ont été analysés en utilisant les conditions chromatographiques appliquées pour quantifier les molécules étudiées. La figure 2 montre les chromatogrammes d'un blanc surchargé avec l'étalon interne. La figure 3 montre les

chromatogrammes d'un échantillon de contrôle qualité au niveau haut. Aucun pic d'interférence endogène n'a été remarqué aux temps de rétention des composés étudiés.

Stabilité:

Les résultats de l'étude de stabilité sont présentés dans le tableau 4. La stabilité des extraits des échantillons a été testée par la réinjection des échantillons standard d'une gamme d'étalonnage, ainsi que des échantillons de CQ en double à chaque niveau, après stockage d'environ 20 heures à température ambiante. L'écart des standards et des échantillons de CQ est resté à $\pm 13,4\%$ pour tous les composés.

La stabilité des échantillons plasmatiques exposés aux 3 cycles de congélation et décongélation avant d'être analysés a été évaluée en analysant les échantillons de CQ en triple à chaque niveau de concentration. Les moyennes des concentrations plasmatiques d'échantillons de CQ sont restées à $\pm 7,87\%$ de la concentration nominale indiquant une stabilité acceptable pour toutes les molécules aux trois niveaux dans les échantillons ayant été congelés et décongelés jusqu'à trois fois avant l'analyse.

La stabilité des échantillons plasmatiques conservés à température ambiante a été testée en analysant les échantillons de CQ en triple à chaque niveau de concentration après un stockage à température ambiante pendant 24 heures. Les moyennes des concentrations plasmatiques d'échantillons de CQ ont été à $\pm 9,93\%$ de la concentration nominale indiquant une stabilité acceptable des molécules dans des échantillons décongelés 24 heures avant d'être analysés.

La stabilité des échantillons congelés a été testée en analysant les échantillons de CQ en triple à chaque niveau de concentration, après un stockage de près de 3 mois à -20°C . Les moyennes des concentrations plasmatiques d'échantillons de CQ sont restées à moins de $\pm 5,56\%$ de la concentration nominale, indiquant une stabilité acceptable pour les échantillons conservés au moins 3 mois à -20°C .

Évaluation de l'effet matrice:

Des échantillons plasmatiques ont été prélevés avant administration des traitements. Ces échantillons ont été utilisés comme témoins négatifs afin de comparer les chromatogrammes de référence à ceux obtenus après administration des médicaments. La procédure d'évaluation de l'effet matrice a montré une faible influence sur la composition qualitative et quantitative, et ce point a également été confirmé par le test de perfusion post-colonne. En ce qui concerne l'effet absolu de la matrice, les pourcentages de récupération étaient inférieurs à 100% indiquant une suppression de l'ionisation. Toutefois, l'évaluation de l'effet relatif de la matrice a montré que la précision de la détermination de la série B à trois niveaux de concentration variait très légèrement de 0,63-5,89%, pour toutes les molécules (tableau 5). Ces données ont révélé que l'effet relatif de la matrice pour les trois molécules était presque absent.

La perfusion post-colonne (à 10 µl/min) des trois molécules dans la phase mobile et lors l'injection de l'extrait de blanc de matrice, est un outil très utile pour déterminer l'emplacement des pics d'interférence provoquant une suppression d'ions. Aucun pic critique aux même temps de rétention des trois molécules n'a été détecté (figure 4).

2.3 Application clinique

Afin d'étudier les pharmacocinétiques, plus de 1200 échantillons plasmatiques de 20 sujets ont été testés en utilisant la méthode bioanalytique décrite ci-dessus. La figure 5 montre les chromatogrammes d'un échantillon plasmatique d'un sujet, surchargé avec l'étalon interne, 30 min après l'administration i.m. de trois composés. La figure 6 montre le profil pharmacocinétique moyen du diazépam après l'administration i.m. de l'avizafone seule, le diazépam seul et l'avizafone avec l'atropine et la pralidoxime à l'aide de l'auto-injecteur bi-compartimental " AIBC ".

La figure 7 montre le profil pharmacocinétique moyen de l'atropine après l'administration i.m. d'atropine avec l'avizafone et la pralidoxime en utilisant l'auto-injecteur bi-compartmental " AIBC ".

La figure 8 montre le profil pharmacocinétique moyen de la pralidoxime après l'administration i.m. de la pralidoxime avec l'atropine et l'avizafone à l'aide de l'auto-injecteur bi-compartmental " AIBC ".

Article 2

Pharmacokinetic Analysis of Diazepam Liberation

From its Prodrug in Healthy Volunteers:

Noncompartmental Approach And Compartmental

Modeling

Article soumis à British Journal of Pharmacology

1. INTRODUCTION

Les agents organophosphorés, qui sont largement utilisés dans le monde comme des insecticides agricoles, ont une toxicité importante, ce qui pose un grave problème de santé publique mondiale, avec plus de 3 millions d'empoisonnement et 200000 décès par an. Ils sont hautement neurotoxiques avec un potentiel d'utilisation comme armes de destruction massive. Ils agissent par inhibition irréversible de l'acétylcholinestérase, enzyme qui hydrolyse l'acétylcholine. Une accumulation rapide de ce neurotransmetteur dans la fente synaptique, au niveau des récepteurs muscariniques et nicotiques, provoque une intense stimulation cholinergique post synaptique. Les signes de toxicité comprennent : hypersécrétion, détresse respiratoire, tremblements, convulsions, puis coma et décès ^[113, 114]. L'augmentation de l'activité cholinergique dans le cerveau induirait la phase initiale de convulsions, alors que les convulsions durables sont probablement liées à l'augmentation de l'activité glutamatergique conduisant à des lésions excitotoxiques situés en majorité dans le cortex piriforme, le cortex entorhinal, l'hippocampe et l'amygdale ^[28, 32, 115, 116].

L'administration de l'antagoniste muscarinique, l'atropine, au début du cycle (<5 min) pourrait prévenir l'apparition des convulsions, mais ne peut pas les arrêter lorsqu'elles ont débuté^[29, 116]. L'utilisation des antagonistes glutamatergique a été partiellement couronnée de succès. Les antagonistes non compétitifs de la N-méthyl-D-aspartate sont en mesure de mettre fin aux convulsions, même si le traitement est retardé de 40 minutes. Toutefois, ces agents ont de graves effets secondaires sur la respiration ^[30, 31, 117, 118]. L'activité glutamatergique pourrait aussi être réduite par le renforcement de l'inhibition de la fonction GABAergique. Il a été démontré que l'agoniste GABAergique, le diazépam, peut arrêter les convulsions s'il est injecté 5 à 10 minutes après leurs débuts. Une administration retardée du diazépam pourrait avoir des effets peu fiables, dans la mesure où les convulsions peuvent se reproduire et une neuroprotection est incomplètement assurée^[116].

La réactivation de l'acétylcholinestérase inhibée est un élément important du traitement post-exposition. Les oximes bis-pyridinium peuvent réactiver l'enzyme phosphorylée si elles sont administrées avant le passage de l'état de réactivable à l'état nonréactivable, processus dénommé "vieillessement". Les oximes telles que la pralidoxime et l'obidoxime ont été largement utilisées pour contrôler ce type d'intoxication^[114].

Dans certains pays, les forces militaires ont basé leur traitement contre l'intoxication par des organophosphorés sur l'association de pralidoxime, atropine et diazépam. Ce traitement associant trois médicaments est conditionné sous forme liquide dans des auto-injecteurs qui doivent être administrés par voie intramusculaire. Un auto-injecteur contenant 2 mg d'atropine, 7,5 mg de diazépam, et 350 mg pralidoxime, est utilisé par le combattant, dès que les premiers signes d'intoxication apparaissent (tremblements, salivation, etc.). Un deuxième auto-injecteur doit être injecté 10-15 minutes plus tard, si les signes d'intoxication persistent.

Il est connu que l'usage d'une benzodiazépine, le diazépam par exemple, réduit la sévérité des convulsions induites par le soman et prévient ou tout au moins diminue sévérité de l'atteinte neurologique^[33, 35, 36, 119, 120]. Le diazépam n'étant pas soluble dans des milieux aqueux, un solvant organique doit être incorporé dans la formulation galénique de la triple solution d'injection. Ce manque de hydrosolubilité limite l'usage du diazépam par injection intramusculaire à des doses pharmacologiquement efficaces et nécessaires d'atteindre rapidement des taux sanguins efficaces. En outre, comme rapporté par Maidment et Upshall^[37], le solvant d'injection utilisé pour le diazépam est susceptible de ralentir l'absorption de cette molécule du site d'injection. Il paraît donc intéressant de développer l'utilisation d'une pro-drogue hydrosoluble, le pro-diazépam (avizafone, ou lysyl, peptido-aminobenzophenone diazépam), afin de l'associer en soluté aqueux au sulfate d'atropine et à la pralidoxime pour le traitement des intoxications par les agents neurotoxiques. *In vivo* le pro-diazépam subit une hydrolyse rapide par une aminopeptidase libérant de la lysine et du diazépam^[37, 38].

Pour ces raisons, l'avizafone est bien adaptée à une injection intramusculaire directe via le dispositif auto-injecteur, sans la nécessité d'un compartiment séparé au sein du dispositif. L'objectif de la présente étude était donc d'évaluer la cinétique de l'hydrolyse de l'avizafone en diazépam *in vivo* chez des sujets sains, et de déterminer l'effet éventuel de l'atropine et/ou de la pralidoxime sur la biotransformation biologique de l'avizafone.

Pharmacokinetic Analysis of Diazepam Liberation From its Prodrug in Healthy Volunteers: Noncompartmental Approach and Compartmental Modelling

C. Abbara^{1,2,*}, J.M. Rousseau³, A. Turcant^{1,2}, G. Lallement⁴, E. Comets⁵, I. Bardot⁶, P. Clair⁶ and B. Diquet^{1,2}

(1) Université d'Angers, UFR médecine, Angers cedex, F-49045, France.

(2) CHU d'Angers, Service Pharmacologie-Toxicologie, Angers cedex 09, F-49933, France.

(3) Service de Réanimation, Hia Bégin, 94163 Saint Mandé cedex, France

(4) Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, Unité de Neuropharmacologie, BP 87, 38702 La Tronche, France

(5) INSERM U738, Université Paris 7 Denis Diderot, UFR de Médecine, Paris, France

(6) Pharmacie centrale des Armées, BP 04, 45998 Orléans, France

*Corresponding author: Tel: +33241353642; fax: +33241354877

Email address: chadi.abbara@gmail.com

Summary:

Background and purpose:

To document the pharmacokinetic analysis of diazepam liberation from its hydro soluble prodrug, avizafone, in healthy volunteers.

Experimental approach:

The study was conducted in an open, randomized, single-dose, three-way, cross-over design with a 3 weeks washout period between the treatments. Each subject received the following treatments by i.m. injection: 20 mg of avizafone chlorhydrate, 11.3 mg of diazepam, and 20 mg of avizafone chlorhydrate combined with 2 mg of atropine sulfate and 350 mg of pralidoxime methyl sulfate using the bi-compartmental auto-injector (AIBC).

Diazepam concentrations were quantified using a validated LC/MS-MS method in 20 healthy volunteers included in this study.

Two approaches were used to analyze these data: (i) a non compartmental approach using a log-linear trapezoidal method, (ii) a compartmental modelling approach using a method implanted in the software WinNonLin[®].

Results:

In order to estimate the relative bioavailability of diazepam, two pharmacokinetic parameters, AUC and C_{max} , estimated by the non compartmental approach, were compared using the confidence interval approach.

Regarding compartmental modelling approach, two-compartment open models were tested. According to Akaike criterion, the best model describing the kinetic of diazepam liberation from its prodrug was a two-compartment with a zero-order absorption model. When atropine and pralidoxime were injected with avizafone, the best model describing diazepam liberation kinetic becomes a two-compartment with a first-order absorption model.

Conclusion:

The two approaches showed that diazepam has a faster inlet to the general circulation and at higher maximal concentrations after the injection of avizafone than after the injection of diazepam itself.

Keywords: *Avizafone, Diazepam, Pharmacokinetics, Bioavailability, Neurotoxic agents.*

Introduction:

Organophosphates extensively used around the world as agricultural insecticides, have an important toxicity which is a serious global public health problem, with more than 3 million poisonings and numerous deaths reported per year. They are highly neurotoxic agents and such as have a potential use as mass destruction weapons. They act by irreversible inhibition of acetyl cholinesterase, the enzyme that hydrolyzes acetylcholine. A rapid accumulation of this neurotransmitter within the synaptic cleft, at muscarinic and nicotinic receptors, causes intense postsynaptic cholinergic stimulation. The toxic signs include hypersecretion, respiratory distress, tremor, seizures/convulsions, coma and death (Hardman *et al.*, 2001; Wetherell *et al.*, 2007). The increased cholinergic activity in the brain most likely induces the initial phase of seizures, whereas sustained seizures are probably linked to increased glutamatergic activity leading to excitotoxic lesions predominantly in piriform cortex, entorhinal cortex, amygdala and hippocampus (Carpentier *et al.*, 1991; Lallement *et al.*, 1992; McDonough *et al.*, 1995; McDonough *et al.*, 1997).

Administration of the muscarinic antagonist, atropine, early in the cycle (<5 min) can prevent or stop convulsions, but cannot stop them once they are established (McDonough *et al.*, 1997; Taysse *et al.*, 2006). Use of glutamatergic antagonists has been partly successful. Non competitive N-methyl-D-aspartate antagonists are able to terminate seizures even if treatment is delayed for 40 min. However, such agents have severe side effects on respiration (Carpentier *et al.*, 1994; McDonough *et al.*, 1993; Shih, 1990; Shih *et al.*, 1991). Glutamatergic activity may also be reduced by enhancing the inhibitory GABAergic function. It has been shown that the GABAergic agonist, diazepam, can stop seizures if injected after 5 to 10 min after their occurrence. Diazepam later administration has unreliable effects,

inasmuch as seizures can recur and only an incomplete neuroprotection is achieved (McDonough *et al.*, 1997).

Reactivation of inhibited acetylcholinesterase is considered to be an important element in post-exposure treatment. Bis-pyridinium oximes can reactivate the phosphorylated enzyme if they are administered prior to the change from reactivatable to unreactivable state, a process referred to as “aging”. The oximes, pralidoxime and obidoxime, have been widely used in this type of intoxication (Wetherell *et al.*, 2007).

In some countries, therapy against organophosphonate intoxication is based on the combination of pralidoxime, atropine and diazepam. This three-drug regimen is packaged in a liquid form in separate auto-injectors which must be administered intramuscularly. An auto-injector device includes 2 mg atropine, 7.5 mg diazepam, and 350 mg pralidoxime, to be used by the subject as soon as first signs of intoxication appear (tremors, salivation, chewing, etc.). A second auto-injector must be injected 10-15 minutes later if the signs of poisoning are still present.

It is known that the use of a benzodiazepine such as diazepam reduces the severity of soman induced convulsions and prevents or reduces subsequent neuropathology (Eddleston *et al.*, 2008; Hayward *et al.*, 1990; Lallement *et al.*, 2004; Lallement *et al.*, 2000; Lipp *et al.*, 1980). Since diazepam is not water soluble, an organic solvent has to be incorporated into the formulation of the triple injection solution. This lack of water solubility limits the use of diazepam for i.m. injection when pharmacological effective blood levels are required to be reached rapidly. Moreover, as argued by Maidment and Upshall, (Maidment *et al.*, 1990) the injection solvent used for diazepam likely slows the absorption of this drug from the injection site. It was thus, interesting to develop the use of the water soluble prodrug, pro-diazepam (avizafone, or lysyl, peptido-aminobenzophenone diazepam) in order to add it to an aqueous drug mixture with atropine sulphate and pralidoxime for the therapy of nerve agent poisoning.

Pro-diazepam, *in vivo*, undergoes a rapid hydrolysis by an aminopeptidase to give lysine and diazepam (Breton *et al.*, 2006; Maidment *et al.*, 1990).

For these reasons, avizafone is well suited for i.m. injection using the auto-injector device without the requirement for a special compartment in the auto-injector.

The objective of the present study was to assess the pharmacokinetic parameters of the hydrolysis of avizafone into diazepam in human healthy volunteers and to determine the effect of atropine and pralidoxime on avizafone biotransformation.

Methods:

I. Study Design:

The study was conducted in an open, randomized, single-dose, three-way, cross-over design with a 3 weeks washout period between the treatments. Each subject received the following treatments by i.m. injection: 20 mg of avizafone chlorhydrate, 11.3 mg of diazepam, and 20 mg of avizafone chlorhydrate combined with 2 mg of atropine sulphate and 350 mg of pralidoxime methyl sulphate using the bi-compartmental auto-injector (AIBC).

Blood samples were collected before i.m. administration, and 0.0833, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 and 168 hours after treatment administration. Blood samples were centrifuged and plasma was separated and stored at -80°C until drug assay.

In order to determine diazepam concentrations, protein precipitation was carried out using 150 μL of acetonitrile containing diazepam D5 as internal standard. Samples were then vortex-mixed, then centrifuged. Supernatant was transferred to micro vials and 10 μL was injected into the chromatographic system. The analysis was achieved by reverse phase high performance liquid chromatography using a C-8 X-Terra column maintained at 40°C . The mobile phase was nebulized using an electrospray source and the ionized compounds were detected using a triple quadrupole mass spectrometer (Abbara *et al.*, 2008).

Calibration curves were linear over the range 1 to 500 ng/mL, with regression coefficient $R^2 \geq 0.99$. Based on quality control samples, the overall relative standard deviation was less than 12%. The overall relative error was less than 10%. The lower limit of quantification was 1 ng/mL.

II. Data Analysis:

1. Non compartmental Approach:

The non compartmental model independent analysis was performed using WinNonLin[®] Pro v.4.1 (Pharsight Corporation, USA). For each subject, data corresponding to three treatments were analyzed separately. Data were used to estimate individual maximal concentration (C_{max}) and time necessary to reach maximal concentration (t_{max}). In addition, for each treatment the elimination rate constant (K_e), and the area under the concentration-time curve (AUC) were estimated. K_e was estimated as the slope of the log-linear terminal portion of the plasma concentration vs. time curve, determined using unweighted linear least-squares regression analysis. The best number of concentrations was chosen as that giving the highest coefficient of determination, as recommended. Area under concentration-time curve was computed from 0 to 168 h using the log-linear trapezoidal method and extrapolated to infinity using the equation $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_{last} / K_e$, where C_{last} is the last quantified concentration above the lower limit of quantification.

Additionally, from these estimated parameters, several pharmacokinetic parameters were derived. Terminal elimination half-life after each treatment was calculated as $T^{1/2} = \ln 2 / K_e$. Systemic apparent clearance and terminal phase apparent volume of distribution were calculated after each treatment using the equations: $Cl/F = \text{Dose} / AUC$, and $V_d = Cl / K_e$.

Two parameters: AUC and C_{max} were then compared using the two one-sided t tests approach which is also referred to as the confidence interval approach.

The 90% confidence limits are estimated for the sample means. The interval estimate is based on a Student's distribution of data. In this test, a 90% confidence interval about the ratio pharmacokinetic parameter means of the two drug products must be within $\pm 20\%$ for measurement of the rate (C_{\max}) and extent of drug bioavailability.

This approach was performed on the log-transformed AUC and C_{\max} values. The t_{\max} were then compared using a non parametric test (Wilcoxon Test).

2. Compartmental Modelling Approach:

2.1. Studied Pharmacokinetic Models:

In order to describe the absorption after the i.m. injection, two absorption kinetic models were compared. First, the two-compartment model with first-order absorption and elimination rates described by the equation:

$$C_p = \frac{FDK_a}{V_c} \left(\frac{K_{21} - a}{(K_a - a)(a - b)} e^{-at} + \frac{K_{21} - b}{(K_a - b)(a - b)} e^{-bt} + \frac{K_{21} - K_a}{(K_a - b)(K_a - a)} e^{-k_a t} \right)$$

Where K_a is the absorption rate constant, D is the dose administered by i.m. injection, a and b are constants that depend solely on K_{12} , K_{21} (transfer constants between compartments 1 and 2) and K_e (elimination constant), and V_c is the volume of distribution in the central compartment.

The second model was a two-compartment model with zero-order absorption rate and first-order elimination rate and was described by the equation:

For $t \leq T$

$$C_p = \frac{FD}{TV_c K_e} \left(1 - \frac{K_e - b}{a - b} e^{-at} - \frac{a - K_e}{a - b} e^{-bt} \right)$$

and for $t > T$

$$C_p = \frac{FD}{TV_c K_e} \left(\frac{K_e - b}{a - b} (1 - e^{-aT}) e^{-a(t-T)} - \frac{K_e - a}{a - b} (1 - e^{-bT}) e^{-b(t-T)} \right)$$

Where T represents the duration of absorption, D the dose administered by i.m. injection, a and b are constants that depend solely on K_{12} , K_{21} (transfer constants between compartments 1 and 2) and K_e (elimination constant), and V_c is the volume of distribution in the central compartment.

2.2. Estimation Method:

WinNonLin[®] software was used to fit the data of each subject and after each treatment using two combinations of models: a two-compartment open model with either zero-order or first-order absorption. The initial estimates of the pharmacokinetic parameters were computed by WinNonLin[®] using curve stripping.

The pharmacokinetic parameters were V_c , K_e , K_{12} , K_{21} , and an absorption parameter: K_a in the case of first-order absorption. In the case of zero-order absorption, T was fixed and determined as time necessary to reach the maximal concentration and that for each subject and each treatment individually.

From these parameters, several derived pharmacokinetic parameters were computed: area under the curve AUC, time needed to reach maximal concentration t_{max} , and maximal concentration C_{max} .

For each concentration, a proportional error was assumed arising from a zero mean Gaussian distribution, with a heteroscedastic variance. Errors on two different concentrations were assumed to be uncorrelated. The error included: error of the analytical method, and error inherent to the pharmacokinetic model.

Gauss-Newton method with Levenberg modification was used to provide the “least square” estimates. Data were weighted using a constant coefficient of variation error model based on

model predicted plasma concentration $1/\hat{y}^2$. As using observed data as weights is problematic since they are measured with error, predicted values are used instead. In this manner, any measurement error or random variability in the data is controlled.

2.3. Comparison of Models:

The Akaike Information Criterion (AIC) was used to identify the best combination of models, since the first-order and the zero-order absorption models are not nested. This criterion can be viewed as the sum of a measure of the goodness of fit, and of a penalty function proportional to the number of estimated parameters in the model. For each combination of models, the criterion for all subjects was computed. The combination of models with the smallest AIC is the most adequate according to a parcimony principle.

Results:

I. Non compartmental approach:

Twenty healthy adult male volunteers aged between 18 and 45 years (29.7 ± 6.3 years, mean \pm S.D) were included in the clinical study. All subjects have given written informed consent and the Ethics Committee has approved the clinical protocol. All volunteers were assessed as healthy based on medical history, clinical examination, blood pressure, ECG and laboratory investigation. There was no individual with either a history or evidence of hepatic, renal, gastrointestinal, and hematological deviations, or any acute/chronic disease or drug allergy.

Plasma diazepam concentrations were quantified after i.m. administration of three treatments: avizafone alone, diazepam alone and avizafone with atropine and pralidoxime using the bi-compartmental auto-injector device (AIBC) with a 3 weeks wash out period. Diazepam plasma concentrations, obtained after the three treatments administration, are plotted in

Figure 1.

Table 1 shows the main and derived pharmacokinetic parameters of diazepam obtained after a non compartmental analysis of the data for the three treatments.

The results regarding diazepam relative bioavailability after the three treatments are summarized in **Table 2**. C_{max} of diazepam liberated from avizafone is significantly different from that obtained after the administration of an equimolar dose of diazepam, while AUC is still in the range 0.8-1.25. Diazepam concentrations reach their maximal value earlier when it was injected as a prodrug ($p<0.001$).

The co-administration of atropine and pralidoxime with avizafone seemed to decrease diazepam C_{max} and its AUC. The application of Schuirmann test showed that these two parameters 90% confidence interval was still in the range 0.80-1.25. Diazepam concentrations reach their maximal value earlier when avizafone is injected alone ($p=0.008$).

II. Compartmental modelling approach:

On a log-scale, data appeared to exhibit a biexponential decline (**Figure 1**) and that describes the sum of two first-order processes: distribution and elimination. Hence, two-compartment open models were studied in order to describe the pharmacokinetics of diazepam after the three treatments administration.

For each combination of models, individual fittings of data after the administration of the three treatments were obtained. **Figure 2** shows the pharmacokinetic curve fitted by the model for a typical subject. In this figure, the comparison between observed and predicted concentrations confirmed the biexponential elimination suggested by the data.

After the administration of avizafone alone, diazepam peak concentrations were better predicted by zero-order absorption model than by first-order absorption model.

However, when avizafone was administered with atropine and pralidoxime, diazepam peak concentrations were better predicted by a first-order absorption model. This model described with a good fitting diazepam peak concentrations after an i.m. administration of diazepam.

These graphical results were confirmed by the AIC for all subjects which are summarized in **Table 3**, and that for both absorption orders after the three treatments. Thus, the pharmacokinetics of diazepam liberation from its prodrug could be described by a two-compartment open model with zero-order absorption and these pharmacokinetics are better described by a two-compartment open model with first-order absorption when the prodrug is administered with atropine and pralidoxime.

For the chosen models, no trend is noticed in the graphics of standardized residuals *versus* predicted concentrations or *versus* time as it is shown in **Figure 3** for the typical subject. The pharmacokinetic parameters estimated with the iterative reweighted least-squares method are summarized in **Table 4**.

The standard errors of individual estimates were also obtained, except for the time of absorption T in the model with zero-order absorption, which was fixed and determined as the t_{\max} estimated using the non compartmental approach.

From the estimated pharmacokinetic parameters, AUC and C_{\max} were derived for the three treatments, while t_{\max} was derived only for treatments: diazepam and avizafone in combination with atropine and pralidoxime (**Table 4**). The results obtained after this analysis appear to be in agreement with those obtained after the non compartmental analysis. They confirmed the faster inlet of diazepam to the general circulation and its higher maximal concentration after avizafone injection as compared after diazepam injection.

Discussion:

This study was the first one in human aiming to determine the pharmacokinetic parameters of the hydrolysis of avizafone, an inactive moiety, into diazepam, the active molecule.

Therefore, both a non compartmental approach and a compartmental modelling analysis were achieved. Since the three treatments were administered within a 3 weeks interval, interoccasion variability in the pharmacokinetic parameters has been taken into account, with the assumption that plasma clearance remains constant (Rowland, 1980).

In a non compartmental approach, kinetics after administration of different treatments are always analyzed separately and individual pharmacokinetic parameters are estimated for each period of treatment. In a compartmental modelling approach, interoccasion variability can be modelled using a random effect model. In the compartmental modelling part of this study, in order to take into account the interoccasion variability without modelling it, the three kinetics after each treatment administration were modelled separately.

As mentioned above, the non compartmental analysis followed by the confidence interval approach (January 2001), showed that diazepam inlet in plasma is achieved earlier and at higher concentrations after avizafone i.m. administration, than after the i.m. administration of an equimolar dose of diazepam, while, diazepam total exposure, measured by AUC, appears to be equivalent when diazepam is injected directly or as a prodrug.

In 8 subjects, after diazepam i.m. injection, t_{max} is considerably greater than the median of the group of twenty subjects. Furthermore, this augmentation of t_{max} was accompanied by a 3 fold decrease in C_{max} . In these subjects, the AUCs were comparable to the mean of the subjects group, and that after the three treatments. These differences could be explained by the use of

an organic injection solvent with diazepam. This solvent slows diazepam absorption which results in a large variability in plasma concentrations and distribution of diazepam (Maidment *et al.*, 1990). Hence, the coefficients of variation for diazepam pharmacokinetic parameters were greater after diazepam injection than after the avizafone injection.

Lallement *et al.* related the low efficacy of avizafone to stop seizures to the relatively reduced total diazepam exposure after the prodrug administration (Lallement *et al.*, 2000). In their study, when injected in combination with atropine and pralidoxime, the relative bioavailability of diazepam liberated from avizafone was found to be 62-66% as compared to diazepam i.m. injection. The pharmacokinetic data obtained from two monkeys, showed that diazepam plasma levels were achieved faster and declined more rapidly after avizafone injection than after diazepam injection. These results were in agreement with previous data obtained in guinea pigs or rhesus monkeys and were explained by either (a) an incomplete conversion of avizafone to diazepam or (b) an excretion of avizafone itself before conversion to diazepam (Breton *et al.*, 2006; Lallement *et al.*, 2000; Maidment *et al.*, 1990). These data demonstrated that, in combination with atropine and pralidoxime, the prodrug have to be injected at higher dose than diazepam (1 μmol avizafone *vs.* 0.7 μmol) to obtain similar neuroprotection since it had been demonstrated that neuroprotection was correlated to the diazepam total exposure (Carpentier *et al.*, 1994). Nevertheless, no clinical data were published in agreement with results obtained in these preclinical studies. Hence, it was chosen in our study, to compare the pharmacokinetics of diazepam after the injection of avizafone alone and diazepam alone at the same molar dose. The present results are not in agreement with the preclinical studies results. Indeed, clinical data showed that after avizafone injection, the relative bioavailability of diazepam appears to be equivalent to that one obtained after the injection of the same dose, on a molar basis, of diazepam alone, without modification of diazepam elimination half-life. Hence, this analysis demonstrated that the selected avizafone

dose was able to reach pharmacologically active diazepam plasma concentrations. However, to know whether such a clinical observation will still be valid after injection of avizafone or diazepam in combination with atropine and pralidoxime remains to be determined.

The compartmental modelling analysis was achieved using a non-linear least squares method. The basic problem in this method is finding the values of θ , the model parameter, which minimizes the residual sum of squares which is essentially a problem in optimization. As the objective functions used in pharmacokinetic modelling are of quadratic nature, they have a convex or curved structure that can be exploited to find an estimate of θ . Specific algorithms have been developed to take advantage of the nature of the objective function surface. These algorithms are designed to be as robust as possible and to converge if convergence can be achieved (Bonate, 2006).

In this study, Gauss-Newton algorithm modified by Levenberg and Hartley has been used for models parameters estimation. Although Gauss-Newton method does require the estimated variance-covariance matrix of parameters, Levenberg modifications suppress the magnitude of change in parameters values from iteration to iteration to a reasonable amount.

A constant coefficient of variation error model was chosen, and the iteratively reweighted least squares method has been used. In this method, the first estimation of the parameter is achieved by a regression, and this estimation is weighted and then reestimated by the weighted least squares method (Bonate, 2006).

The error is a combination of assay error and error inherent to pharmacokinetic model. Quality control samples used during diazepam quantification in subjects samples, showed that a constant coefficient of variation error model was appropriate for assay error. It was assumed that such a model could also well describe error due to the pharmacokinetic model. Actually, it is reasonable to assume that this kind of error is more important during the absorption and the distribution phases rather at the end of the kinetic. Otherwise, there was no reason to

assume that the variance parameters could be different among the subjects. The Akaike criterion was used to select the combination of models that included the best absorption model, in addition to the plots of predicted and observed concentration *versus* time. Ludden *et al.* showed that this criterion was reliable in the evaluation of pharmacokinetic equations (Ludden *et al.*, 1994).

The compartmental analysis showed that the pharmacokinetics of diazepam administered intramuscularly followed a two-compartment model with first-order absorption. This analysis confirmed the large inter-individual variability in diazepam pharmacokinetic parameters, which was already noticed after the non compartmental analysis, mainly during the absorption period.

When diazepam was injected intramuscularly as a prodrug, diazepam absorption process seemed to be fast and achieved by zero-order rate process, while its distribution and elimination seemed to be comparable to those noticed after its i.m. injection as a free drug. These results could explain those obtained after the relative bioavailability analysis concerning the two pharmacokinetic parameters C_{\max} and t_{\max} estimated by the non compartmental analysis.

When avizafone is administered with atropine and pralidoxime using the device under development (AIBC), a two-compartment model with first-order absorption was identified to be the best model fitting the pharmacokinetics of diazepam liberated from avizafone.

When diazepam is injected as a prodrug with atropine and pralidoxime a delay in its absorption was noticed. This delay is accompanied with a shift of the best mathematical model fitting this process from zero-order to first-order rate one. This delayed absorption likely reflects either (a) delaying the avizafone conversion partially or totally or (b) modification in diazepam absorption profile without altering the avizafone hydrolysis.

None of the two compounds, atropine or pralidoxime, exhibits pharmacological properties suggesting an inhibition of an aminopeptidase which could explain the modification of avizafone hydrolysis. Nevertheless, atropine when is administered at clinical doses which induces anticholinergic effects, counteracts the peripheral effects, i.e. vasodilatation, leading to modification of blood flow rate at the site of injection (1). Hence, this pharmacological property could explain the delay in the absorption process for the co-administered molecules. In summary, the non compartmental analysis followed by the confidence interval approach enabled to determine the differences between pharmacokinetic parameters regarding the bioavailability (AUC, and C_{max}), while the compartmental approach allowed to characterize the best absorption model and provided several pharmacokinetic parameters that could not be obtained with a model independent analysis which enables the understanding of some processes concerning the biotransformation of avizafone into diazepam.

Conflict of Interest:

The study had been sponsored by the Service de Santé des Armées, France.

JM Rouseau, G Lallement, I Bardot and P Clair are employees of the Service de Santé des Armées, France.

References:

(January 2001). Statistical approaches to establishing bioequivalence. : Food and Drug Administration, Guidance for Industry

Abbara C, Bardot I, Cailleux A, Lallement G, Le Bouil A, Turcant A, *et al.* (2008). High-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method for the simultaneous determination of diazepam, atropine and pralidoxime in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*

Bonate P (2006). *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation.* edn. Springer.

Breton D, Buret D, Mendes-Oustric AC, Chaimbault P, Lafosse M, Clair P (2006). LC-UV and LC-MS evaluation of stress degradation behaviour of avizafone. *J Pharm Biomed Anal* **41**(4): 1274-1279.

Carpentier P, Foquin-Tarricone A, Bodjarian N, Rondouin G, Lerner-Natoli M, Kamenka JM, *et al.* (1994). Anticonvulsant and antilethal effects of the phencyclidine derivative TCP in soman poisoning. *Neurotoxicology* **15**(4): 837-851.

Carpentier P, Lambrinidis M, Blanchet G (1991). Early dendritic changes in hippocampal pyramidal neurones (field CA1) of rats subjected to acute soman intoxication: a light microscopic study. *Brain Res* **541**(2): 293-299.

Eddleston M, Buckley NA, Eyer P, Dawson AH (2008). Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet* **371**(9612): 597-607.

Hardman JG, Limbird LE (eds) (2001). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill.

Hayward IJ, Wall HG, Jaax NK, Wade JV, Marlow DD, Nold JB (1990). Decreased brain pathology in organophosphate-exposed rhesus monkeys following benzodiazepine therapy. *J Neurol Sci* **98**(1): 99-106.

Lallement G, Carpentier P, Collet A, Baubichon D, Pernot-Marino I, Blanchet G (1992). Extracellular acetylcholine changes in rat limbic structures during soman-induced seizures. *Neurotoxicology* **13**(3): 557-567.

Lallement G, Masqueliez C, Baubichon D, Cassegrain N, Renaudeau P, Clair P (2004). Protection against soman-induced lethality of antidote combination atropine -pralidoxime-prodiazepam packaged as a freeze-dried form. *J Med Chem Def* **2**: 1-11.

Lallement G, Renault F, Baubichon D, Peoc'h M, Burckhart MF, Galonnier M, *et al.* (2000). Compared efficacy of diazepam or avizafone to prevent soman-induced electroencephalographic disturbances and neuropathology in primates: relationship to plasmatic benzodiazepine pharmacokinetics. *Arch Toxicol* **74**(8): 480-486.

Lipp J, Dola T (1980). comparison of the efficacy of HS-6 versus HI-6 when combined with atropine, pyridostigmine and clonazepam for soman poisoning in the monkey. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **246**(1): 138-148.

Ludden TM, Beal SL, Sheiner LB (1994). Comparison of the Akaike Information Criterion, the Schwarz criterion and the F test as guides to model selection. *J Pharmacokinet Biopharm* **22**(5): 431-445.

Maidment MP, Upshall DG (1990). Pharmacokinetic of the conversion of a peptido-aminobenzophenone prodrug of diazepam in guinea pigs and rhesus monkeys. *J Biopharm Sci* **1**: 19-32.

McDonough JH, Jr., Dochterman LW, Smith CD, Shih TM (1995). Protection against nerve agent-induced neuropathology, but not cardiac pathology, is associated with the anticonvulsant action of drug treatment. *Neurotoxicology* **16**(1): 123-132.

McDonough JH, Jr., Shih TM (1997). Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev* **21**(5): 559-579.

McDonough JH, Jr., Shih TM (1993). Pharmacological modulation of soman-induced seizures. *Neurosci Biobehav Rev* **17**(2): 203-215.

Rowland M (1980). *Towards better safety of drugs and pharmaceutical products*. . edn. Elsevier North-Holland: Amsterdam.

Shih TM (1990). Anticonvulsant effects of diazepam and MK-801 in soman poisoning. *Epilepsy Res* **7**(2): 105-116.

Shih TM, Koviak TA, Capacio BR (1991). Anticonvulsants for poisoning by the organophosphorus compound soman: pharmacological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* **15**(3): 349-362.

Taysse L, Daulon S, Delamanche S, Bellier B, Breton P (2006). Protection against soman-induced neuropathology and respiratory failure: a comparison of the efficacy of diazepam and avizafone in guinea pig. *Toxicology* **225**(1): 25-35.

Wetherell J, Price M, Mumford H, Armstrong S, Scott L (2007). Development of next generation medical countermeasures to nerve agent poisoning. *Toxicology* **233**(1-3): 120-127.

Tables:

Table 1. Estimated and derived pharmacokinetic parameters of diazepam obtained with the non compartmental approach

	Avizafone		Diazepam		AIBC	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
AUC _{0-t} (hr.ng/mL)	5851	2086	5485	1856	5265	1802
t _{max} (hr) ^a	0.75	0.5-1 ^b	1.5	0.5-96 ^b	1	0.5-2
C _{max} (ng/mL)	231	60	148	91	203	54
K _e (hr ⁻¹)	0.0199	0.0129	0.0174	0.0088	0.0179	0.0093
t _{1/2} (hr)	50.1	35.8	54.4	38.0	55.5	50.8
Vd (mL)	148560	114949	182790	162680	180947	178724
Cl/F (mL/hr)	2104	571	2266	714	2341	645

AUC, area under the curve; T_{max} time to reach maximal concentration; C_{max} maximal concentration; K_e elimination constant; T^{1/2} elimination half-life; Vd, volume of distribution; Cl/F apparent clearance. ^a Median. ^b Range.

Table 2. Relative diazepam bioavailability after the administration of the three treatments

Parameters	Geometric Means		Ratio ^b	<i>p</i>	90% CI
	Avizafone	Diazepam			
C _{max} (ng/mL)	223	118	0.526	-	0.424-0.651
AUC _{0-t} (hr.ng/mL)	5584	5224	0.937	-	0.885-0.992
t _{max} (hr) ^a	0.75	1.5	-	<0.001	-

Parameters	Geometric Means		Ratio ^c	<i>p</i>	90% CI
	Avizafone	AIBC			
C _{max} (ng/mL)	223	197	1.136	-	1.043-1.238
AUC _{0-t} (hr.ng/mL)	5584	5025	1.111	-	1.075-1.148
t _{max} ^a (hr)	0.75	1	-	0.008	-

C_{max} maximal concentration; AUC, area under the curve; t_{max} time to reach maximal concentration; AIBC, auto injector bi-compartmental ^a Median. ^b Diazepam/Avizafone. ^c Avizafone/AIBC

Table 3. AIC for all subjects and for the two absorption studied models

	Avizafone	Diazepam	AIBC
First-order absorption	368.8	-28.4	-111.3
Zero-order absorption	243.6	17.9	149.3

AIC, Akaike information criterion; AIBC, auto-injector bi-compartmental.

Table 4. Estimated and derived Pharmacokinetic parameters of diazepam obtained with the compartmental modeling approach

	Avizafone		Diazepam		AIBC	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
V_c (mL)	41600	11867	60194	46866	51646	15675
K_a (hr^{-1})	-	-	2.53	1.68	3.69	1.63
K_e (hr^{-1})	0.047	0.021	0.043	0.019	0.042	0.015
K_{12} (hr^{-1})	0.712	0.62	0.25	0.26	0.226	0.23
K_{21} (hr^{-1})	0.38	0.19	0.2	0.13	0.14	0.09
AUC (hr.ng/mL)	6900	2885	6355	2639	5975	2278
t_{max} (hr)	-	-	2.53	3.67	0.91	0.26
C_{max} (ng/mL)	235	49	172	72	187	51

V_c , volume of distribution of central compartment; K_a absorption constant; K_e , elimination constant; K_{12} , K_{21} transfer constants between compartments 1 and 2; AUC, area under the curve; t_{max} , time to reach maximal concentration; C_{max} maximal concentration.

Figures:

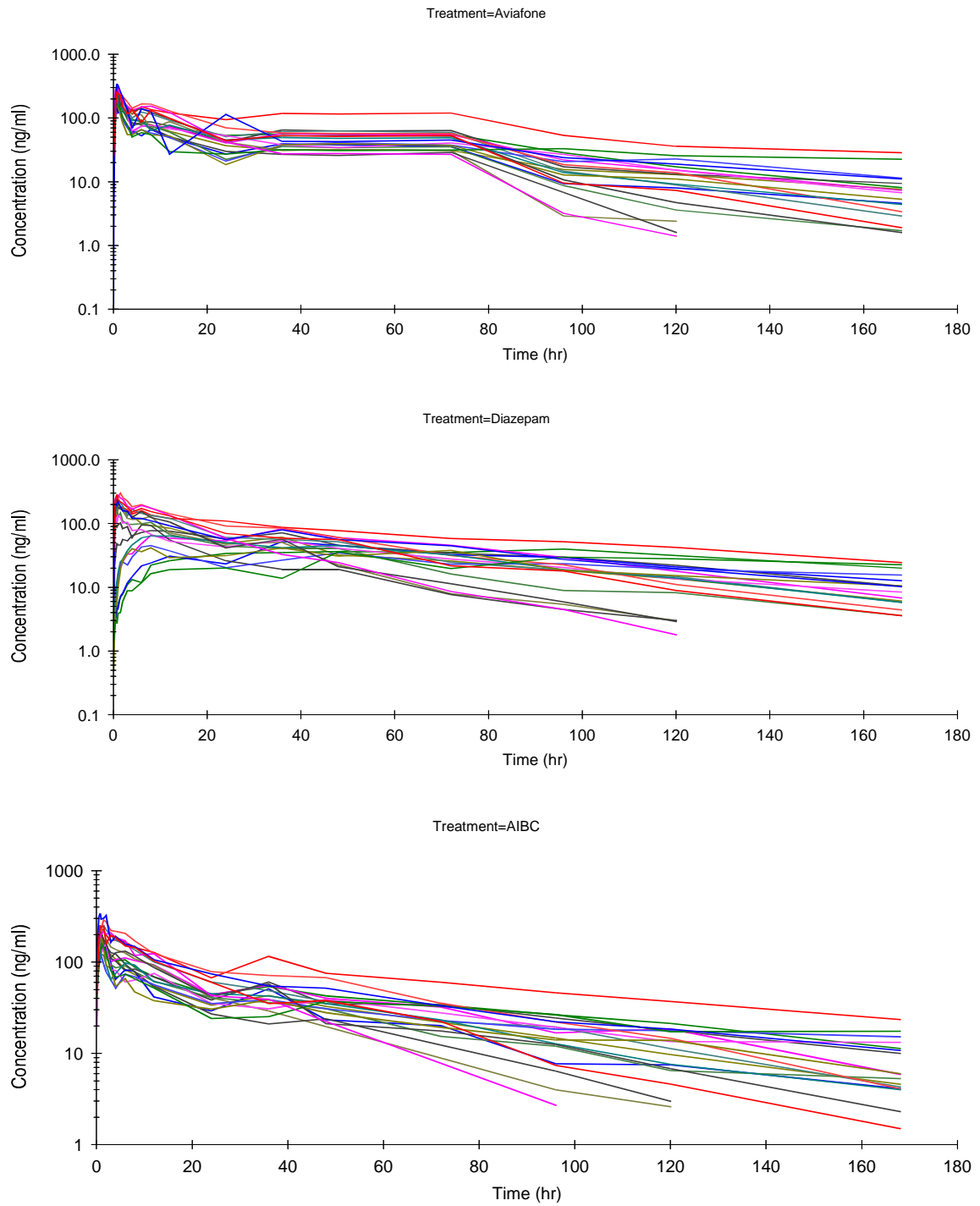


Figure 1

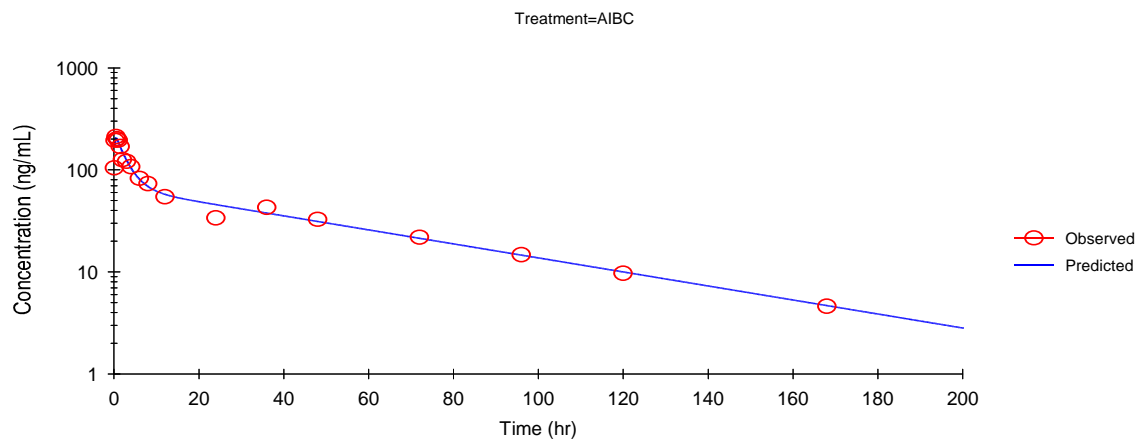
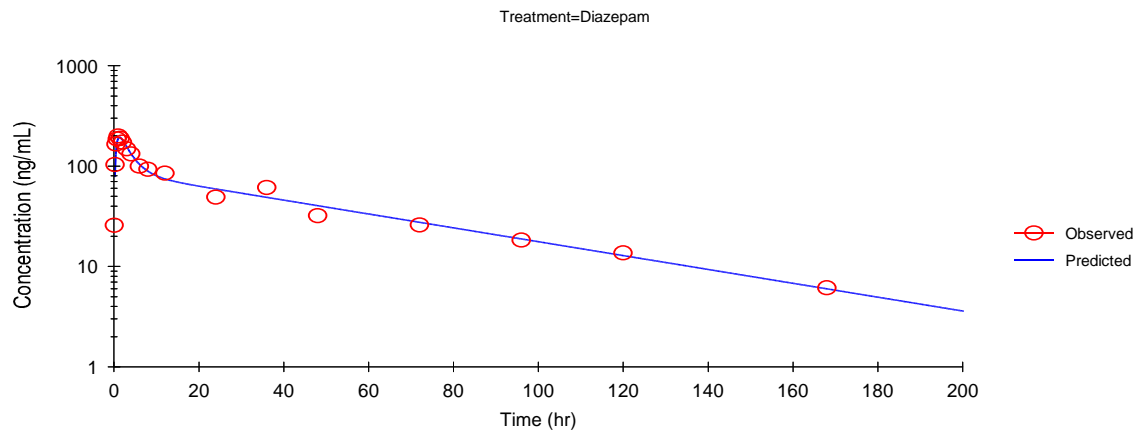
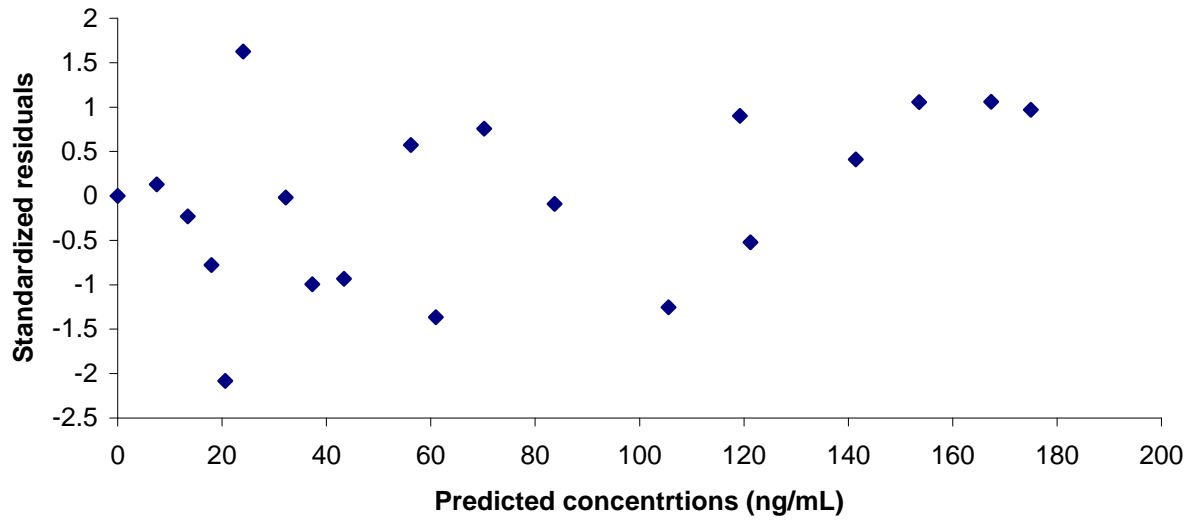
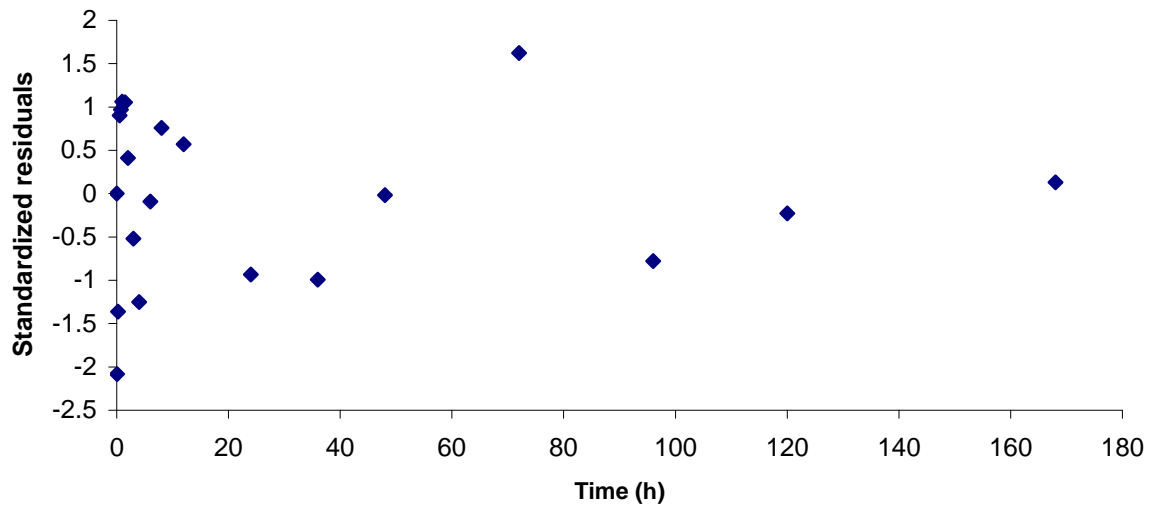


Figure 2

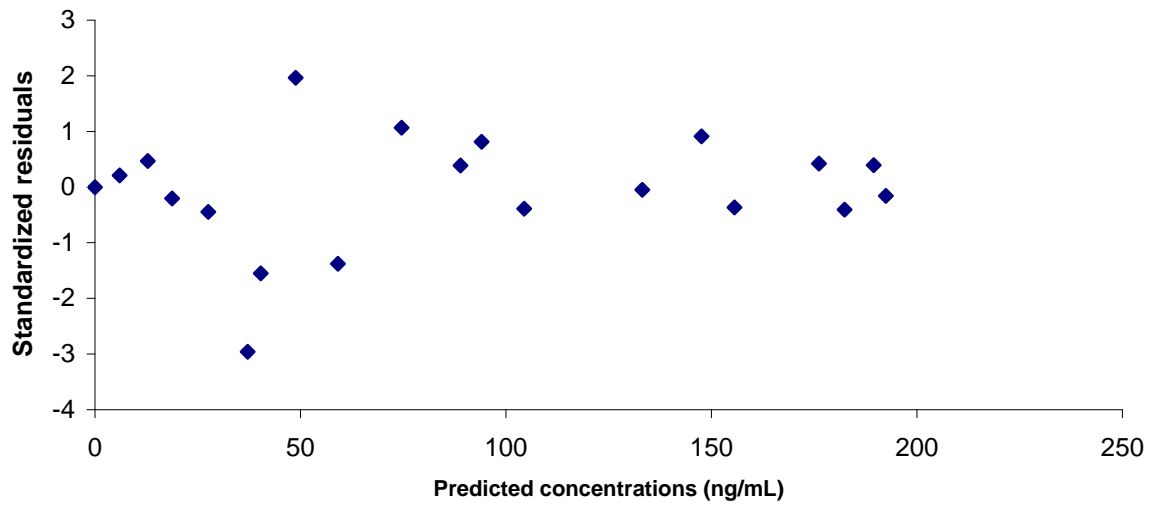
Avizafone



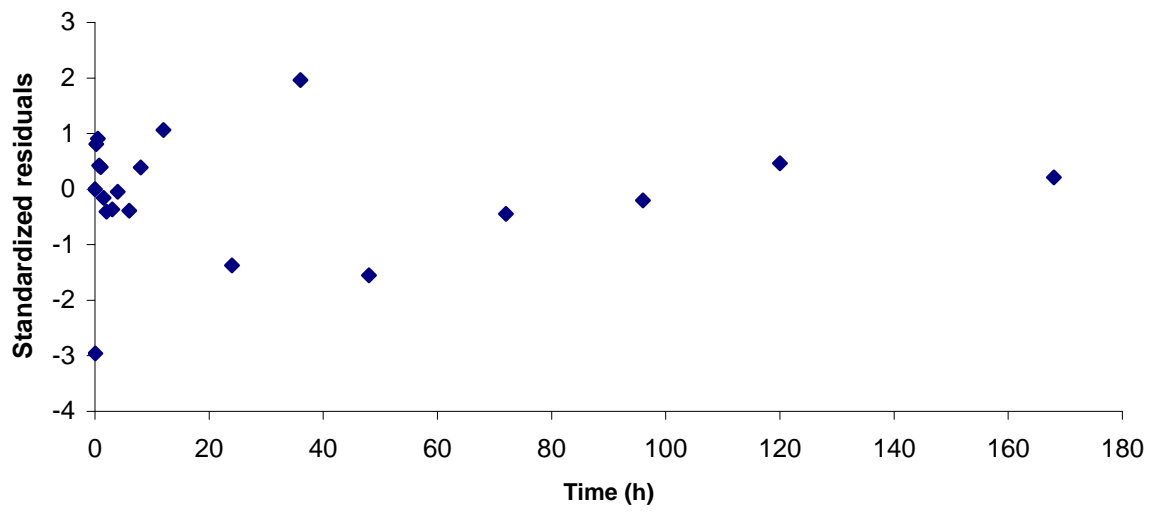
Avizafone



Diazepam



Diazepam



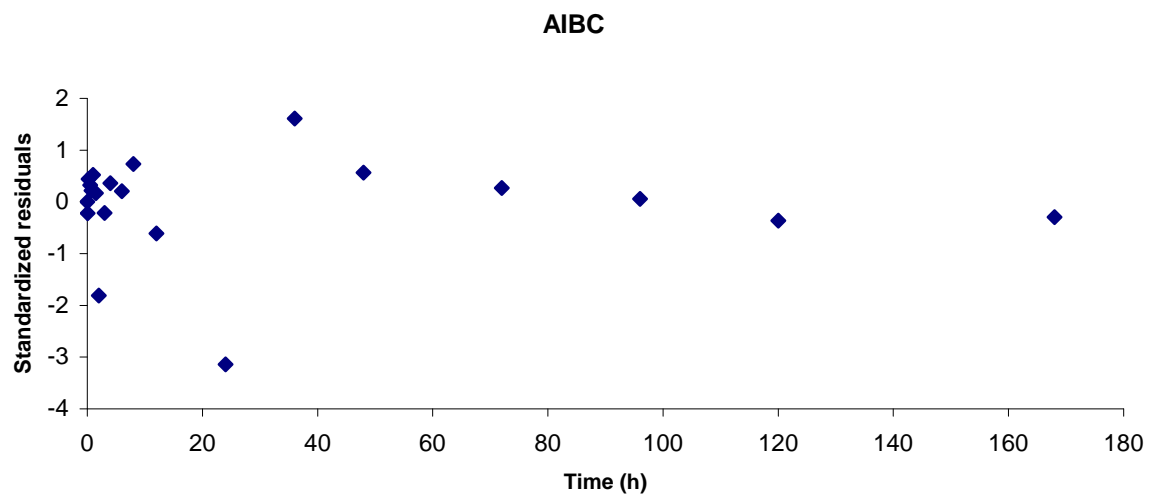
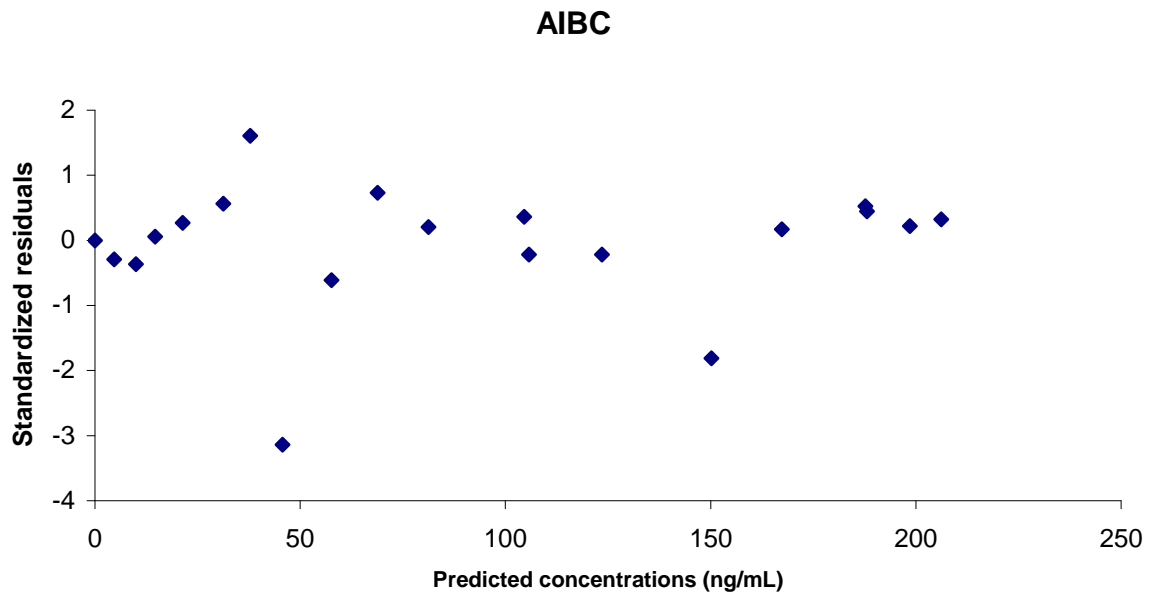


Figure 3

Legends of figures:

Fig 1. Semilogarithmic plot of plasma diazepam concentration-time for the 20 subjects, after an intramuscular injection of : avizafone, diazepam, and AIBC.

Fig 2. Semilogarithmic plot of time course of plasma diazepam concentrations in subject 20, after an intramuscular injection of avizafone, diazepam or AIBC (avizafone with atropine and pralidoxime). Solid lines represent the pharmacokinetic curve predicted by the two compartmental model with a zero order absorption (for avizafone), or a first order absorption (for diazepam and AIBC).

Fig 3. Standardized residuals of subject 20 as a function of concentrations predicted by the two compartmental model with a zero order absorption (avizafone) and a first order absorption (diazepam or AIBC), and as function of time.

2. DISCUSSION

Cette étude visant à déterminer les paramètres pharmacocinétiques de l'hydrolyse de l'avizafone, molécule inactive, en diazépam, molécule active, est la première réalisée chez l'homme.

Deux approches ont été réalisées : une non compartimentale et une modélisation compartimentale. Les traitements ayant été administrés à un intervalle de deux semaines, la variabilité " inter-occasion " des paramètres pharmacocinétiques a été prise en compte, en faisant l'hypothèse que la clairance plasmatique restait constante ^[121].

Dans l'approche non compartimentale, les cinétiques après l'administration des différents traitements sont toujours analysées séparément et les paramètres pharmacocinétiques sont estimés pour chaque période de traitement. Dans l'approche de modélisation compartimentale, la variabilité " inter-occasion " peut être modélisée selon un modèle à effet mixte. Concernant la partie de modélisation compartimentale de cette étude, et afin de tenir compte de la variabilité inter-occasion sans la modeler, les cinétiques de trois traitements après chaque administration ont été modélisées séparément. Comme mentionné ci-dessus, l'analyse non compartimentale suivie par l'approche de l'intervalle de confiance ^[82], a montré que le diazépam dans le plasma apparaissait plus vite et à des concentrations plus élevées après l'administration intramusculaire de l'avizafone, qu'après l'administration intramusculaire d'une dose équimolaire du diazépam, tandis que l'exposition totale du diazépam, évaluée par l'AUC, reste équivalente que le diazépam soit injecté directement, ou comme prodrogue.

Chez 8 sujets, après injection intramusculaire du diazépam, le T_{max} est considérablement plus élevé que la médiane du groupe de vingt sujets. En outre, cette augmentation du T_{max} s'est accompagnée d'une diminution de la C_{max} d'un facteur 3. Chez ces sujets, les AUC étaient comparables à la moyenne du groupe des sujets, et cela pour les trois traitements. Ces

différences pourraient s'expliquer par l'influence du solvant organique nécessaire à l'injection du diazépam seul. Ce solvant ralentirait l'absorption du diazépam, ce qui se traduirait par une grande variabilité des concentrations plasmatiques et de la distribution de diazépam comme en témoignent les coefficients de variation des paramètres pharmacocinétiques du diazépam plus élevés après injection de diazépam qu'après injection d'avizafone [37].

Lallement *et al.* attribuent la faible efficacité de l'avizafone pour traiter les convulsions, à la réduction de l'exposition totale du diazépam après administration de la prodrogue [34]. Dans leur étude, la biodisponibilité du diazépam libéré à partir de l'avizafone est de 62-66% de celle obtenue après injection intramusculaire du diazépam. Les données pharmacocinétiques obtenues dans l'étude menée chez le singe (n=2), ont montré que les concentrations plasmatiques de diazépam ont été atteintes plus rapidement et ont diminuées plus vite après injection d'avizafone qu'après injection de diazépam. Ces résultats sont en accord avec les données obtenues chez le cobaye ou le singe rhésus et ont été expliqués par (a) une conversion incomplète de l'avizafone en diazépam ou (b) une excrétion de l'avizafone avant même la conversion en diazépam [34, 37, 38]. Ces données expérimentales suggèrent que la prodrogue doit être injectée à une dose molaire plus élevée que le diazépam (1 μmol avizafone *versus* 0,7 μmol) pour obtenir une neuroprotection comparable puisqu'il a été démontré que la neuroprotection était corrélée à l'exposition totale en diazépam [117]. Aucune donnée clinique humaine n'a toutefois été publiée confirmant les résultats obtenus dans des études chez l'animal. Pour cette raison il a été choisi, dans notre étude, de comparer la pharmacocinétique du diazépam après injection de diazépam ou d'avizafone à la même dose molaire. Les résultats ne sont pas en accord avec les résultats des études précliniques. En effet, les résultats de l'essai clinique chez le sujet sain ont montré qu'après injection d'avizafone, la biodisponibilité du diazépam est équivalente à celle obtenue après injection de la même dose molaire du diazépam, et cela sans modification de la demi-vie apparente

d'élimination du diazépam. La présente analyse a donc démontré que la dose d'avizafone choisie était en mesure de produire des concentrations plasmatiques pharmacologiquement actives de diazépam.

L'analyse par modélisation compartimentale a été réalisée par la méthode des moindres carrés non-linéaire. Le principe fondamental dans cette méthode est de trouver les valeurs de θ , le paramètre du modèle, ce qui minimise la somme résiduelle de carrés qui est essentiellement un problème dans l'optimisation. Comme les fonctions objectives utilisées dans la modélisation pharmacocinétique sont de nature quadratique, elles ont une forme concave ou convexe ce qui peut être exploité pour trouver une estimation de θ . Des algorithmes spécifiques ont été développés pour tirer profit de la nature de la surface de la fonction objective. Ces algorithmes sont conçus pour être le plus robuste que possible et pour converger rapidement lorsque la convergence peut être atteinte ^[122].

Dans cette étude, l'algorithme de Gauss-Newton modifié par Levenberg et Hartley a été utilisé pour estimer les paramètres des modèles. La méthode Gauss-Newton correspond à l'estimation de la matrice de variance-covariance des paramètres, et la modification de Levenberg réduit l'amplitude du changement des valeurs de paramètres à chaque itération à un niveau acceptable.

Un modèle d'erreur à coefficient de variation constant a été choisi, et la méthode des moindres carrés avec pondération itérative a été utilisée. Dans cette méthode, la première estimation du paramètre est réalisée par régression, et cette estimation est ensuite réestimé par la méthode des moindres carrés pondérés ^[122]. L'erreur est la combinaison d'erreur de dosage et d'erreur liée au manque de spécificité du modèle pharmacocinétique. Les échantillons de contrôle qualité cités pour le dosage du diazépam dans des échantillons des sujets, ont montré qu'un modèle d'erreur à coefficient de variation constant était approprié pour l'erreur de dosage. L'hypothèse a été faite que ce modèle pourrait aussi décrire l'erreur liée au modèle

pharmacocinétique. En fait, on peut supposer que ce type d'erreur est plus important au cours des phases d'absorption et de distribution que lors de la phase terminale de la cinétique. Par ailleurs, aucun argument ne permet de supposer que la variance des paramètres puisse être différente entre les sujets.

Le critère d'Akaike a été utilisé pour retenir la combinaison de modèles qui intégrait le meilleur modèle d'absorption. De plus, les graphes de concentrations observées et prédites en fonction du temps, ainsi que les coefficients de variation d'estimation des paramètres, ont également été examinés et leur évaluation a permis de choisir le meilleur modèle d'ajustement [123].

L'analyse compartimentale a montré que la pharmacocinétique du diazépam administré par voie intramusculaire suit un modèle à deux compartiments avec une absorption d'ordre 1. Cette analyse a confirmé la grande variabilité inter-individuelle des paramètres pharmacocinétiques du diazépam, ce qui a déjà été remarqué lors de l'analyse non compartimentale, particulièrement au cours de la phase d'absorption.

Lorsque le diazépam est injecté par voie intramusculaire sous forme de prodrogue, le processus d'absorption du diazépam semble être rapide et d'ordre-zéro, tandis que sa distribution et son élimination semblent être comparables à celles remarquées après son injection intramusculaire comme base. Ces résultats pourraient expliquer ceux obtenus concernant les deux paramètres pharmacocinétiques la C_{max} et le T_{max} estimés par l'analyse non compartimentale. Quand l'avizafone est administré avec de l'atropine et de la pralidoxime en utilisant l'auto-injecteur (AIBC), un modèle à deux compartiments avec absorption d'ordre 1 était identifié comme étant le plus approprié pour décrire la pharmacocinétique de production du diazépam à partir de l'avizafone.

Lorsque le diazépam est injecté comme la prodrogue avec de l'atropine et de la pralidoxime, un retard à l'absorption apparaît. Ce retard se traduit par un changement du modèle

mathématique le plus adapté, qui passe de processus d'ordre zéro à un processus d'ordre 1. Ce retard d'absorption reflète probablement soit (a) le retard de la conversion de l'avizafone, totale ou partielle, soit (b) la modification de l'absorption du diazépam sans modification l'hydrolyse de l'avizafone.

Aucun des deux composés, atropine ou pralidoxime, n'est connu pour avoir des propriétés pharmacologiques susceptible d'inhiber une aminopeptidase qui pourrait expliquer la modification de l'hydrolyse de l'avizafone. Cependant, en clinique lorsque l'atropine est administrée à des induisant des effets anticholinergiques généraux, il y a modification des effets périphériques, dont vasodilatation. Il en résulte une modification du débit sanguin à différents niveaux dont potentiellement au site d'injection ^[113]. Cette action pharmacologique pourrait ainsi expliquer le retard dans le processus d'absorption des molécules co-administrées.

En résumé, l'analyse non compartimentale suivie de l'approche de l'intervalle de confiance a permis de déterminer les différences en terme de biodisponibilité (AUC, et C_{max}), tandis que l'approche compartimentale a permis de caractériser le meilleur modèle d'absorption et a fourni plusieurs paramètres pharmacocinétiques qui n'ont pas pu être obtenus par une analyse modèle-indépendante ce qui permet la compréhension des processus qui gouvernent la biotransformation de l'avizafone en diazépam.

Article 3

Pharmacokinetic Analysis of Pralidoxime in Healthy Volunteers

Article soumis à Clinical Pharmacokinetics

1. INTRODUCTION

Les agents anticholinestérasiques sont des molécules qui inhibent l'acétylcholinestérase. Ils provoquent l'accumulation de l'acétylcholine aux niveaux des récepteurs cholinergiques et produisent des effets équivalents à une stimulation excessive des récepteurs cholinergiques dans l'ensemble du système nerveux central et périphérique. Compte tenu de la distribution généralisée des neurones cholinergiques, il n'est pas surprenant que les agents anticholinestérasiques irréversibles, en tant que groupe, aient été utilisés comme agents toxiques, en tant qu'insecticides ou comme armes de guerre chimique "gaz neurotoxiques". Par ailleurs, plusieurs composés de la classe réversibles sont largement utilisés comme agents thérapeutiques, approuvés ou en essai clinique dans le traitement de la maladie d'Alzheimer [113].

Avant la Seconde Guerre mondiale, seuls les agents anticholinestérasiques réversibles étaient connus, parmi lesquels la physostigmine était le chef de file. Pendant la Seconde Guerre mondiale, une classe relativement nouvelle de produits chimiques hautement toxiques, les organophosphorés, a alors été développée, principalement par Schardner, d'abord comme insecticides agricoles puis comme des agents de guerre chimique. L'extrême toxicité de ces composés a été expliquée par leur fixation irréversible sur les récepteurs de l'acétylcholine, ce qui aboutissait à bloquer son activité à long terme.

L'accumulation rapide de ce neurotransmetteur dans la fente synaptique, au niveau des récepteurs muscariniques et nicotiniens, provoque une stimulation cholinergique postsynaptique intense. Les signes toxiques comprennent : hypersécrétion, détresse respiratoire, tremblements, convulsions, puis coma et mort [113, 114]. L'augmentation de l'activité cholinergique dans le cerveau induirait la phase initiale de convulsions, alors que les convulsions durables seraient liées à l'augmentation de l'activité glutamatergique conduisant à

des lésions excitotoxiques situées en majorité dans le cortex piriforme, le cortex entorhinal, l'hippocampe et l'amygdale [28, 32, 116, 124].

L'administration d'un antagoniste muscarinique, comme l'atropine, au début du cycle (à moins de 5 min) pourrait prévenir l'apparition des convulsions, mais ne peut pas les arrêter lorsqu'elles ont débuté [29, 116]. L'utilisation des antagonistes glutamatergiques a été partiellement couronnée de succès. Les antagonistes non compétitifs de la N-méthyl-D-aspartate sont en mesure de mettre fin aux convulsions, même si le traitement est retardé de 40 minutes. Toutefois, ces agents ont de graves effets secondaires sur la respiration [30, 31, 117, 118]. L'activité glutamatergique pourrait aussi être réduite par le renforcement de l'inhibition de la fonction GABAergique. Il a été démontré que l'agoniste GABAergique, le diazépam, pouvait arrêter les convulsions s'il est injecté 5 à 10 minutes après leurs débuts. Une administration retardée du diazépam pourrait avoir des effets peu fiables, dans la mesure où les convulsions peuvent se reproduire, et la neuroprotection est incomplètement assurée [116].

La réactivation de l'acétylcholinestérase inhibée est un élément important du traitement post-exposition. Les oximes bis-pyridinium peuvent réactiver l'enzyme phosphorylée si elles sont administrées avant le passage de l'état de réactivable à l'état non-réactivable, processus dénommé "vieillesse". Si le traitement par les oximes est retardé, le phosphate lié à la cholinestérase inhibée perd un groupe alkyl et devient alors résistant à l'effet des oximes. Les oximes telles que la pralidoxime et l'obidoxime ont été largement utilisées dans ce type d'intoxication [114]. La pralidoxime, est l'une des oximes communément utilisée comme agent réactivateur de l'acétylcholinestérase. Son effet est le résultat d'une réaction nucléophile moléculaire avec les organophosphorés, le décrochant du site de l'acétylcholinestérase et restaurant ainsi la capacité de l'acétylcholinestérase à hydrolyser l'acétylcholine.

Dans certains pays, les forces militaires ont basé leur traitement contre l'intoxication par des organophosphorés sur l'association de pralidoxime, atropine et diazépam. Ce traitement

associant trois médicaments est conditionné sous forme liquide dans des auto-injecteurs qui doivent être administrés par voie intramusculaire. Un auto-injecteur contenant 2 mg d'atropine, 7,5 mg de diazépam, et 350 mg pralidoxime, est utilisé par le combattant, dès que les premiers signes d'intoxication apparaissent (tremblements, salivation, etc.). Un deuxième auto-injecteur doit être injecté 10-15 minutes plus tard, si les signes d'intoxication persistent.

À l'heure actuelle, les résultats connus publiés sont en faveur de l'administration du traitement au plus tôt après intoxication ^[119, 125], de ce fait, l'association de trois médicaments est actuellement formulée dans un seul auto-injecteur contenant un mélange de chlorhydrate d'avizafone "prodrogue de diazépam", de sulfate d'atropine et de méthylesulfate de pralidoxime. La formulation est une poudre lyophilisée à solubiliser dans l'eau pour injection avant l'administration i.m.

Peu d'essais cliniques évaluant l'efficacité des traitements et la dose nécessaire dans la prise en charge de l'intoxication par les pesticides organophosphorés ont été publiés ^[126, 127]. Bien plus, aucune étude n'a été publiée concernant l'évaluation de la pharmacocinétique de la pralidoxime après son administration i.m.

L'objectif de la présente étude était donc d'évaluer les paramètres pharmacocinétiques de pralidoxime chez les sujets sains après administration intramusculaire de méthylesulfate de la pralidoxime, seule ou en association avec l'atropine et l'avizafone en utilisant un auto-injecteur bi-compartmental.

Pharmacokinetic Analysis of Pralidoxime in Healthy Volunteers

C. Abbara^{1,2,*}, J.M. Rousseau³, A. Turcant^{1,2}, G. Lallement⁴, B. Lelièvre^{1,2}, S. Ferec^{1,2}, I. Bardot⁵, P. Clair⁵ and B. Diquet^{1,2}

(1) Université d'Angers, UFR médecine, Angers cedex, F-49045, France.

(2) CHU d'Angers, Service Pharmacologie-Toxicologie, Angers cedex 09, F-49933, France.

(3) Service de Réanimation, Hia Bégin, 94163 Saint Mandé cedex, France

(4) Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, Unité de Neuropharmacologie, BP 87, 38702 La Tronche, France

(5) Pharmacie centrale des Armées, BP 04, 45998 Orléans, France

*Corresponding author: Tel: +33241353642; fax: +33241354877Email address:

chadi.abbara@gmail.com

Summary:

This paper presents the analysis of the pharmacokinetics of pralidoxime, in 20 human healthy volunteers, from pralidoxime concentrations quantified after the i.m. administration of two treatments: pralidoxime, and pralidoxime in combination with avizafone and atropine using an auto-injector device under development. Two approaches were used to analyze these data: (i) a non compartmental approach using a log-linear trapezoidal method, (ii) a compartmental modeling approach using a method implanted in the software WinNonMix[®]. In order to estimate the relative bioavailability of diazepam, two pharmacokinetic parameters, AUC and C_{max} , estimated by the non compartmental approach, were compared using the confidence interval approach.

Regarding compartmental modeling approach, two-compartment open models were tested. According to Akaike criterion and to goodness of fit graphs, the best model describing the pharmacokinetics of pralidoxime was a two-compartment with a zero-order absorption model. When avizafone and atropine were injected with pralidoxime, the best model describing pralidoxime pharmacokinetics becomes a two-compartment with a first-order absorption model. The two approaches showed that the administration of avizafone and atropine with pralidoxime affects its i.m. absorption profile, resulting in a faster inlet to the general circulation and at higher maximal concentrations as compared to the administration of pralidoxime alone.

Keywords: *Pralidoxime, Pharmacokinetics, Bioavailability, Neurotoxic agents.*

Introduction:

Drugs that inhibit acetylcholinesterase are anticholinesterase agents. They cause acetylcholine to accumulate at cholinergic receptors sites and they are potentially capable of producing effects equivalent to excessive stimulation of cholinergic receptors throughout the central and the peripheral nervous systems. In view of the widespread distribution of cholinergic neurons, it is not surprising that the anticholinesterase agents as a group have received extensive application as toxic agents, in the form of agricultural insecticide and potential chemical warfare “nerve gases”. Nevertheless, several members of this class of compounds are widely used as therapeutic agents; others have been approved or are in clinical trial for the treatment of Alzheimer’s disease^[1].

Prior to World War II, only the reversible anticholinesterase agents were generally known, of which physostigmine is the outstanding example. Shortly before and during World War II, a comparatively new class of highly toxic chemical, the organophosphates, was developed chiefly by Scharder, first as agricultural insecticide and later as potential chemical warfare agents. The extreme toxicity of these compounds was found to be due to their irreversible inactivation of acetylcholinesterase, which resulted in long-term inhibitory activity.

The rapid accumulation of this neurotransmitter within the synaptic cleft, at muscarinic and nicotinic receptors, causes intense postsynaptic cholinergic stimulation. The toxic signs include hypersecretion, respiratory distress, tremor, seizures/convulsions, coma and death^[1, 2]. The increased cholinergic activity in the brain most likely induces the initial phase of seizures, whereas sustained seizures are probably linked to increased glutamatergic activity leading to excitotoxic lesions predominantly in piriform cortex, entorhinal cortex, amygdala and hippocampus^[3-6].

Administration of the muscarinic antagonist, atropine, early in the cycle (<5 min) can prevent or stop convulsions, but cannot stop them once they are established^[4, 7]. Use of glutamatergic

antagonists has been partly successful. Non competitive N-methyl-D-aspartate antagonists are able to terminate seizures even if treatment is delayed for 40 min. However, such agents have severe side effects on respiration ^[8-11]. Glutamatergic activity may also be reduced by enhancing the inhibitory GABAergic function. It has been shown that the GABAergic agonist, diazepam, can stop seizures if injected after 5 to 10 min after their occurrence. Diazepam later administration has unreliable effects, inasmuch as seizures can recur and only an incomplete neuroprotection is achieved ^[4].

Reactivation of inhibited acetylcholinesterase is considered to be an important element in post-exposure treatment. Bis-pyridinium oximes can reactivate the phosphorylated enzyme if they are administered prior to the change from reactivatable to unreactivable state, a process referred to as “aging”. If treatment with oximes is delayed, the phosphate bound to the inhibited cholinesterase loses an alkyl group and becomes resistant to oxime therapy ^[12]. The oximes pralidoxime and obidoxime have been widely used in this type of intoxication ^[2]. Pralidoxime is one of commonly oximes used as acetylcholinesterase reactivating agent. Its effect results from a molecular nucleophilic reaction with the organophosphate, removing it from the acetylcholinesterase site, thereby restoring acetylcholinesterase’s capacity to breakdown acetylcholine.

In some countries, military forces have based their therapy against organophosphonate intoxication on the combination of pralidoxime, atropine and diazepam. This three-drug regimen is packaged in a liquid form in separate auto-injectors which must be administered intramuscularly. An auto-injector includes 2 mg atropine, 7.5 mg diazepam, and 350 mg pralidoxime, must be used by the soldier as soon as first signs of intoxication appear (tremors, salivation, chewing, etc.). A second auto-injector must be injected 10-15 minutes later if the signs of poisoning are still present.

At present, the balance of published evidence favours the early use of the treatment ^[13, 14], hence, the three drug regimen is currently packaged in a single auto-injector device containing a combination of avizafone hydrochloride “diazepam prodrug”, atropine sulfate and pralidoxime methyl sulfate. The formulation is a lyophilized powder to be diluted with water for injection before i.m. administration.

Few clinical trials evaluating efficacy and dose needed in the treatment of organophosphorous pesticide poisoning are already published ^[12, 15]. Nevertheless, no study has been yet published concerning the evaluation of pralidoxime pharmacokinetics after its i.m. administration.,

The objective of the present study was to assess the pharmacokinetic parameters of pralidoxime in human healthy volunteers after i.m. administration of pralidoxime methylsulfate, alone or in combination with avizafone and atropine using a bi-compartmental auto-injector.

Methods:

I. Study Design:

The study was conducted in an open, randomized, single-dose, two-way, cross-over design with a 2 weeks washout period between the treatments. Each subject received the following treatments by i.m. injection: 700 mg of pralidoxime methyl sulfate and 40 mg of avizafone chlorhydrate combined with 4 mg of atropine sulfate and 700 mg of pralidoxime methyl sulfate using the bi-compartmental auto-injector (AIBC).

Blood samples were collected before i.m. administration, and 0.0833, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 and 24 hours after treatment administration. Blood samples were centrifuged and plasma was separated and stored at -80°C until drug assay.

In order to determine pralidoxime concentrations, protein precipitation was carried out using 150 μL of acetonitrile containing diazepam D5 as internal standard. Samples were then vortex-mixed, then centrifuged. Supernatant was transferred to micro vials and 10 μL was injected into the chromatographic system. The analysis was achieved by reverse phase high performance liquid chromatography using a C-8 X-Terra column maintained at 40°C . The mobile phase was nebulized using an electrospray source and the ionized compounds were detected using a triple quadrupole mass spectrometer^[16].

Calibration curves were linear over the range 5 to 2500 ng/ml, with regression coefficient $R^2 \geq 0.99$. Based on quality control samples, the overall relative standard deviation was less than 12%. The overall relative error was less than 10%. The lower limit of quantification was 5 ng/ml.

II. Data Analysis:

1. Non compartmental Approach:

The non compartmental model independent analysis was performed using WinNonLin[®] Pro v.4.1 (Pharsight Corporation, USA). For each subject, data corresponding to three treatments were analyzed separately. Data were used to estimate individual maximal concentration (C_{max}) and time necessary to reach maximal concentration (t_{max}). In addition, for each treatment the elimination rate constant (K_e), and the area under the concentration-time curve (AUC) were estimated. K_e was estimated as the slope of the log-linear terminal portion of the plasma concentration *versus* time curve, determined using unweighted linear least-squares regression analysis. The best number of concentrations was chosen as that giving the highest coefficient of determination, as recommended. Area under concentration-time curve was computed from 0 to 24 hr using the log-linear trapezoidal method and extrapolated to infinity using the equation $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_{last} / K_e$, where C_{last} is the last quantified concentration above the lower limit of quantification.

Additionally, from these estimated parameters, several pharmacokinetic parameters were derived. Terminal elimination half-life after each treatment was calculated as $t_{1/2} = \ln 2 / K_e$. Systemic apparent clearance and terminal phase apparent volume of distribution were calculated after each treatment using the equations: $Cl/F = \text{Dose} / AUC$, and $V_d = Cl / K_e$.

Two parameters: AUC and C_{max} were then compared using the two one-sided t tests approach which is also referred to as the confidence interval approach.

The 90% confidence limits are estimated for the sample means. The interval estimate is based on a Student's distribution of data. In this test, a 90% confidence interval about the ratio pharmacokinetic parameter means of the two drug products must be within $\pm 20\%$ for measurement of the rate (C_{max}) and extent of drug bioavailability.

This approach was performed on the log-transformed AUC and C_{\max} values. The t_{\max} were then compared using a non parametric test (Wilcoxon Test).

2. Compartmental Modeling Approach:

2.1. Studied Pharmacokinetic Models:

In order to describe the absorption after the i.m. injection, two absorption kinetic models were compared. First, the two-compartment model with first-order absorption and elimination rates described by the equation:

$$Cp = \frac{FDK_a}{V_c} \left(\frac{K_{21} - a}{(K_a - a)(a - b)} e^{-at} + \frac{K_{21} - b}{(K_a - b)(a - b)} e^{-bt} + \frac{K_{21} - K_a}{(K_a - b)(K_a - a)} e^{-K_a t} \right)$$

Where K_a is the absorption rate constant, D is the dose administrated by i.m. injection, a and b are constants that depend solely on K_{12} , K_{21} (transfer constants between compartments 1 and 2) and K_e (elimination constant), and V_c is the volume of distribution in the central compartment.

The second model was a two-compartment model with zero-order absorption rate and first-order elimination rate and was described by the equation:

For $t \leq T$

$$Cp = \frac{FD}{TV_c K_e} \left(1 - \frac{K_e - b}{a - b} e^{-at} - \frac{a - K_e}{a - b} e^{-bt} \right)$$

and for $t > T$

$$Cp = \frac{FD}{TV_c K_e} \left(\frac{K_e - b}{a - b} (1 - e^{-aT}) e^{-a(t-T)} - \frac{K_e - a}{a - b} (1 - e^{-bT}) e^{-b(t-T)} \right)$$

Where T represents the duration of absorption, D the dose administered by i.m. injection, a and b are constants that depend solely on K_{12} , K_{21} (transfer constants between compartments 1 and 2) and K_e (elimination constant), and V_c is the volume of distribution in the central compartment.

2.2. Estimation Method:

Population pharmacokinetic analysis was performed using WinNonMix[®] software implanting the first-order conditional estimation method. WinNonMix computed the minimum value of the objective function (MVOF), a statistic that is proportional to minus twice log likelihood of the data.

Inter individual variability in the parameters assigned a log-normal distribution across the population. Therefore, the distribution of the pharmacokinetic parameters was defined by: $P_i = P_{tot} * \exp(\eta_i)$, where P_i is the individual model parameter and P_{tot} is the population value with η_i being the normally distributed inter individual variability with mean zero and variance ω^2 .

A number of statistical models were tested for the residual error (additive, proportional, and combined additive and proportional), which was modelled using a combined error model $C_{obs,ij} = C_{pred,ij} * (1 + \epsilon_{ij})$ where $C_{obs,ij}$ and $C_{pred,ij}$ are the observed and predicted concentrations, respectively for i th individual and denote the residual random error with mean zero and variance σ^2 . The residual error describes the intra individual variability and contains inexplicable error which arises from, for example, measuring experimental errors and model mis-specification.

The pharmacokinetic parameters were V_c , K_e , K_{12} , K_{21} , and an absorption parameter: K_a in the case of first-order absorption. In the case of zero-order absorption, T was fixed and determined as time necessary to reach the maximal concentration and that for each subject and each treatment individually.

From these parameters, several derived pharmacokinetic parameters were computed: area under the curve AUC, time needed to reach maximal concentration t_{\max} , and maximal concentration C_{\max} .

2.3. Comparison of Models:

The Akaike Information Criterion (AIC) was used to identify the best combination of models, since the first-order and the zero-order absorption models are not nested. This criterion can be viewed as the sum of a measure of the goodness of fit, and of a penalty function proportional to the number of estimated parameters in the model.

The goodness of fit was assessed graphically by evaluation of the agreement between the observed and the predicted pralidoxime concentrations, reductions in the range of weighted residuals, and uniformity of the distribution of weighted residuals about zero across the range of both the predicted concentrations and the time since last dose. In addition, increases in the precision of the parameter estimates and reduction in both inter individual variability and residual variability were also used to discriminate between competing models.

Results:

I. Non compartmental approach:

Twenty healthy adult male volunteers aged between 18 and 45 years (29.7 ± 6.3 years, mean \pm S.D) were included in the clinical study. All subjects have been given written informed consent and the Ethics Committee has approved the clinical protocol. All volunteers were assessed as healthy based on medical history, clinical examination, blood pressure, ECG and laboratory investigation. There was no individual with either a history or evidence of hepatic, renal, gastrointestinal, and hematological deviations, or any acute/chronic disease or drug allergy.

Plasma pralidoxime concentrations were quantified in 20 healthy volunteers after i.m. administration of two treatments: pralidoxime alone and pralidoxime with atropine and avizafone using the bi-compartmental auto-injector device (AIBC) with 2-weeks wash out period.

Table 1 shows the main and derived pharmacokinetic parameters of pralidoxime obtained after a non compartmental analysis of the data for both treatments.

The results regarding pralidoxime relative bioavailability after the three treatments are summarized in **Table 2**.

The co-administration of atropine and avizafone with pralidoxime seemed to increase pralidoxime C_{\max} and its AUC. The application of Schuirmann test showed that although AUC 90% confidence interval was still in the range 0.80-1.25, C_{\max} 90% was out this range. Pralidoxime concentrations reach their maximal value earlier when pralidoxime is administered in combination with avizafone and atropine ($p=0.045$).

II. Compartmental modeling approach:

On a log-scale, data appeared to exhibit a biexponential decline and that describes the sum of two first-order processes: distribution and elimination. Hence, two-compartment open models were studied in order to describe the pharmacokinetics of pralidoxime after treatments administration.

A two-compartment model with zero-order absorption and first-order elimination was chosen to predict pralidoxime concentrations when it was administrated alone.

Meanwhile, two-compartment model with first-order absorption and elimination described with a good fitting pralidoxime concentrations after its i.m. administration with atropine and avizafone.

Figure 1 shows the population predicted concentrations for all individuals compared with the observation data.

Inter individual variability was described by an exponential error model, whereas residual variability was described by a combined exponential and additive error model.

For the chosen models, no trend is noticed in the graphics of standardized residuals *versus* predicted concentrations or *versus* time as it is shown in **Figure 2**. The pharmacokinetic parameters estimated with the iterative reweighted least-squares method are summarized in **Table 3**.

The standard errors of individual estimates were also obtained, except for the time of absorption T in the model with zero-order absorption, which was fixed and determined as the t_{\max} estimated using the non compartmental approach.

From the estimated pharmacokinetic parameters, AUC and C_{\max} were derived for both treatments, while t_{\max} was derived only for treatment: pralidoxime in combination with atropine and avizafone (**Table 4**).

Discussion:

This study was the first one in human aiming to determine the pharmacokinetic parameters of pralidoxime after its i.m. administration.

Therefore, both a non compartmental approach and a compartmental modelling analysis were achieved. Since treatments were administered within a 2 weeks interval, interoccasion variability in the pharmacokinetic parameters has been taken into account, with the assumption that plasma clearance remains constant ^[17].

In a non compartmental approach, kinetics after administration of both treatments are always analyzed separately and individual pharmacokinetic parameters are estimated for each period of treatment. In a compartmental modelling approach, interoccasion variability has been modelled using a random effect model.

As mentioned above, the non compartmental analysis followed by the confidence interval approach ^[18], showed that pralidoxime inlet in plasma is achieved earlier exhibiting higher concentrations when it was administered in combination with avizafone and atropine as compared to its administration alone. Meanwhile, the total exposure of pralidoxime, assessed by AUC, appears to be equivalent when pralidoxime is injected either alone or combined with avizafone and atropine. The co-administration of avizafone and atropine with pralidoxime appears to have no effect on pralidoxime elimination half-life, which is comparable to what has been already published after i.v. infusion in both organophosphorous poisoned patients and healthy volunteers ^[19].

The compartmental modelling analysis was achieved using a non-linear least squares method. The basic problem in this method is finding the values of θ , the model parameter, which minimizes the residual sum of squares which is essentially a problem in optimization. As the objective functions used in pharmacokinetic modelling are of quadratic nature, they have a convex or curved structure that can be exploited to find an estimate of θ . Specific algorithms

have been developed to take advantage of the nature of the objective function surface. These algorithms are designed to be as robust as possible and to converge if convergence can be achieved ^[20].

In this study, Gauss-Newton algorithm modified by Levenberg and Hartley has been used for models parameters estimation. Although Gauss-Newton method does require the estimated variance-covariance matrix of parameters, Levenberg modifications suppress the magnitude of change in parameters values from iteration to iteration to a reasonable amount.

A constant coefficient of variation error model was chosen, and the iteratively reweighted least squares method has been used. In this method, the first estimation of the parameter is achieved by a regression, and this estimation is weighted and then reestimated by the weighted least squares method ^[20].

For each concentration, an additive error was assumed arising from a zero mean Gaussian distribution, and the standard deviation of the residual error was best described by a combined additive and proportional structure. Errors on two different concentrations were assumed to be uncorrelated. The error included: analytical assay error, and model misspecification error. Quality control samples used during pralidoxime quantification in subjects samples, showed that a constant coefficient of variation error model was appropriate for assay error. It was assumed that such a model could also well describe error due to the pharmacokinetic model. Actually, it is reasonable to assume that this kind of error is more important during the absorption and the distribution phases rather at the end of the kinetic. Otherwise, there was no reason to assume that the variance parameters could be different among the subjects. The Akaike criterion was used to select the combination of models that included the best absorption model. In addition, plots of predicted and observed concentration *versus* time, parameters estimation coefficient of variation, were also examined and their evaluation was considered to choose the best fit model.

The population pharmacokinetic analysis showed that the pharmacokinetics of pralidoxime administered intramuscularly followed a two-compartment model with zero-order absorption. This model was chosen though the AIC of the model with first-order absorption was lower (3645 *versus* 3607 for first-order and zero-order absorption, respectively). As a matter of fact, the estimation coefficient of variation several estimated and derived parameters were high when data were fitted using the first-order absorption, while, with the zero-order absorption, they were always lower than 25%. In addition, the combined model with first-order absorption seemed to underestimate the maximal concentration.

When pralidoxime is administered with atropine and pralidoxime using the auto-injector device (AIBC), a two-compartment model with first-order absorption was identified to be the best model fitting the pharmacokinetics of pralidoxime. For these data, AIC, coefficients of variation of derived and estimated parameters, and plots of goodness of fit indicated that the model with first-order absorption was the best to fit and to estimate the pharmacokinetic parameters.

When pralidoxime is injected with avizafone and atropine, earlier absorption, accompanied by higher maximal concentration, had occurred. This phenomenon is accompanied with a shift of the best mathematical model fitting this process from zero-order to first-order rate one. Zero-order absorption usually occurs when the drug is absorbed by a saturable process or a zero-order controlled release delivery system is used. This could suggest the implication an active transport phenomena, or a temporary stockage of the drug at the site of administration with a constant diffusion into the general circulation.

Hence, the accelerated absorption of pralidoxime, when combined with avizafone and atropine, likely reflects a consequence of a modification of absorption process due to a blood flow modification at the site of injection ^[1].

Avizafone is not known to exhibit pharmacological properties suggesting any modification of blood flow or other absorption mechanisms. Nevertheless, atropine when is administered at clinical doses which induces anticholinergic effects, counteracts the peripheral effects, i.e. vasodilatation, leading to modification of blood flow rate at the site of injection ^[1]. Hence, this pharmacological property could explain the modification in the absorption process for the co-administered molecules.

In summary, the non compartmental analysis followed by the confidence interval approach enabled to determine the differences between pharmacokinetic parameters regarding the bioavailability (AUC, and C_{max}), while the compartmental approach allowed to characterize the best absorption model and provided several pharmacokinetic parameters that could not be obtained with a model independent analysis which enables the understanding of some processes concerning pharmacokinetics of pralidoxime.

References:

1. Hardman JG, Limbird LE, editors. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Ninth Edition ed: McGraw-Hill, 2001.
2. Wetherell J, Price M, Mumford H, et al. Development of next generation medical countermeasures to nerve agent poisoning. *Toxicology* 2007 Apr 20;233 (1-3): 120-7.
3. Lallement G, Carpentier P, Collet A, et al. Extracellular acetylcholine changes in rat limbic structures during soman-induced seizures. *Neurotoxicology* 1992 Fall;13 (3): 557-67.
4. McDonough JH, Jr., Shih TM. Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev* 1997 Sep;21 (5): 559-79.
5. Carpentier P, Lallement G, Bodjarian N, et al. Effects of paraldehyde on the convulsions induced by administration of soman in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 1992;6 (7): 309-18.
6. McDonough JH, Jr., Dochterman LW, Smith CD, et al. Protection against nerve agent-induced neuropathology, but not cardiac pathology, is associated with the anticonvulsant action of drug treatment. *Neurotoxicology* 1995 Spring;16 (1): 123-32.
7. Taysse L, Daulon S, Delamanche S, et al. Protection against soman-induced neuropathology and respiratory failure: a comparison of the efficacy of diazepam and avizafone in guinea pig. *Toxicology* 2006 Aug 1;225 (1): 25-35.
8. Shih TM. Anticonvulsant effects of diazepam and MK-801 in soman poisoning. *Epilepsy Res* 1990 Nov;7 (2): 105-16.
9. Shih TM, Koviak TA, Capacio BR. Anticonvulsants for poisoning by the organophosphorus compound soman: pharmacological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 1991 Fall;15 (3): 349-62.
10. McDonough JH, Jr., Shih TM. Pharmacological modulation of soman-induced seizures. *Neurosci Biobehav Rev* 1993 Summer;17 (2): 203-15.

11. Carpentier P, Foquin-Tarricone A, Bodjarian N, et al. Anticonvulsant and antilethal effects of the phencyclidine derivative TCP in soman poisoning. *Neurotoxicology* 1994 Winter;15 (4): 837-51.
12. Pawar KS, Bhoite RR, Pillay CP, et al. Continuous pralidoxime infusion versus repeated bolus injection to treat organophosphorus pesticide poisoning: a randomised controlled trial. *Lancet* 2006 Dec 16;368 (9553): 2136-41.
13. Eddleston M, Buckley NA, Eyer P, et al. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet* 2008 Feb 16;371 (9612): 597-607.
14. Eddleston M. The pathophysiology of organophosphorus pesticide self-poisoning is not so simple. *Neth J Med* 2008 Apr;66 (4): 146-8.
15. Hmouda H, Ben Salem C, Bouraoui K. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet* 2008 Jun 28;371 (9631): 2169-70; author reply 70-1.
16. Abbara C, Bardot I, Cailleux A, et al. High-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method for the simultaneous determination of diazepam, atropine and pralidoxime in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008 Sep 10.
17. Rowland M. Towards better safety of drugs and pharmaceutical products. . Amsterdam: Elsevier North-Holland, 1980.
18. Statistical approaches to establishing bioequivalence. . Food and Drug Administration, Guidance for Industry January 2001.
19. Willems JL, Langenberg JP, Verstraete AG, et al. Plasma concentrations of pralidoxime methylsulphate in organophosphorus poisoned patients. *Arch Toxicol* 1992;66 (4): 260-6.
20. Bonate P. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation: Springer, 2006.

Tables:

Table 1: Estimated pharmacokinetic parameters of pralidoxime obtained with the non compartmental approach

	Pralidoxime		AIBC	
	Mean	SD	Mean	SD
AUC _{0-t} (hr.ng/ml)	10044	2488	10187	2704
t _{max} (hr) [#]	0.63	0.52	0.33	0.21
C _{max} (ng/ml)	3988	1572	4635	1408
K _e (hr ⁻¹)	0.235	0.033	0.215	0.028
t _{1/2} (hr)	2.94	0.41	3.22	0.42

medians: Pralidoxime 0.50 hr; AIBC 0.25 hr

Table 2: Relative pralidoxime bioavailability after the administration of treatments: pralidoxime and AIBC.

Parameters	Geometric Means		Ratio***	<i>p</i>	90% CI
	Pralidoxime	AIBC			
C _{max} (ng/ml)	3725	4386	0.849	-	0.685-1.053
AUC _{0-t} (hr.ng/ml)	9764	9819	0.994	-	0.924-1.07
t _{max} * (hr)	0.50	0.25	-	<0.01**	-

* median ; ** Wilcoxon test ; *** Pralidoxime/AIBC

Table 3: Population pharmacokinetic parameter details of pralidoxime obtained with the best fitting model for treatments; pralidoxime and AIBC.

	Pralidoxime		AIBC	
	Estimate	Standard error	Estimate	Standard error
V1(L)	197.2	10.84	311.7	30.25
K01 (hr ⁻¹)	-	-	0.685	0.036
K10 (hr ⁻¹)	0.685	0.036	0.45	0.023
K12 (hr ⁻¹)	0.527	0.071	0.079	0.071
K21 (hr ⁻¹)	0.357	0.024	0.357	0.024
Population variability*				
V1	39.70%		31.10%	
K01	-		70.70%	
K10	22.90%		16.6%	
K12	144%		2.28%	
K21	89.70%		7.48%	
Residual error	1.30%		18.70%	

* Expressed as coefficient of variation

Table 4: Main derived Pharmacokinetic parameters and estimation CV% of pralidoxime obtained with the compartmental modeling approach.

	Pralidoxime		AIBC	
	Mean	SD	Mean	SD
AUC (hr.ng/ml)	10164	2159	10291	2629
AUC estimation CV%	4.78%	0.146%	9.84%	2.06%
t _{max} (hr)	-	-	0.31	0.15
t _{max} estimation CV%	-	-	14.4%	0.94%
C _{max} (ng/ml)	3987	1031	4333	723
C _{max} estimation CV%	5.96%	0.93%	9.86%	2.43%

Figures:

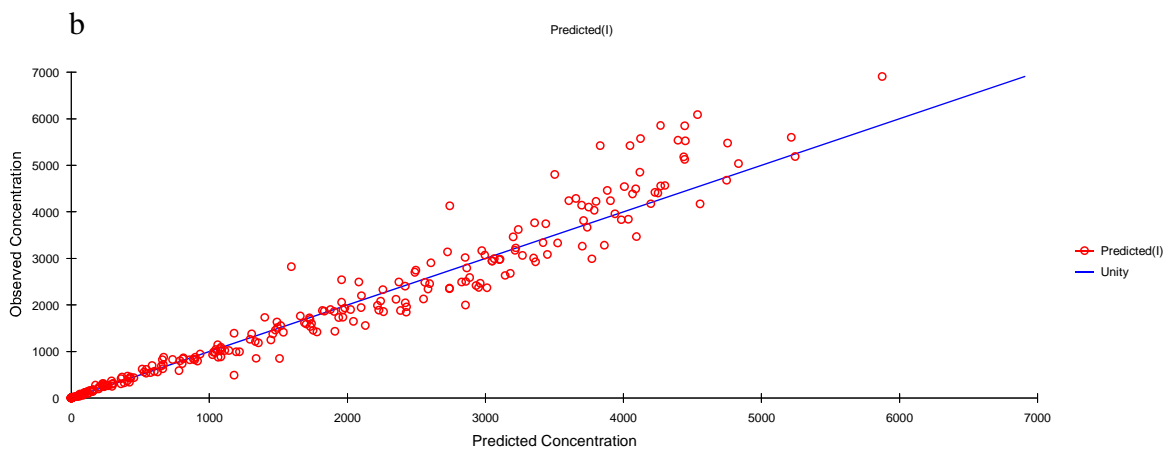
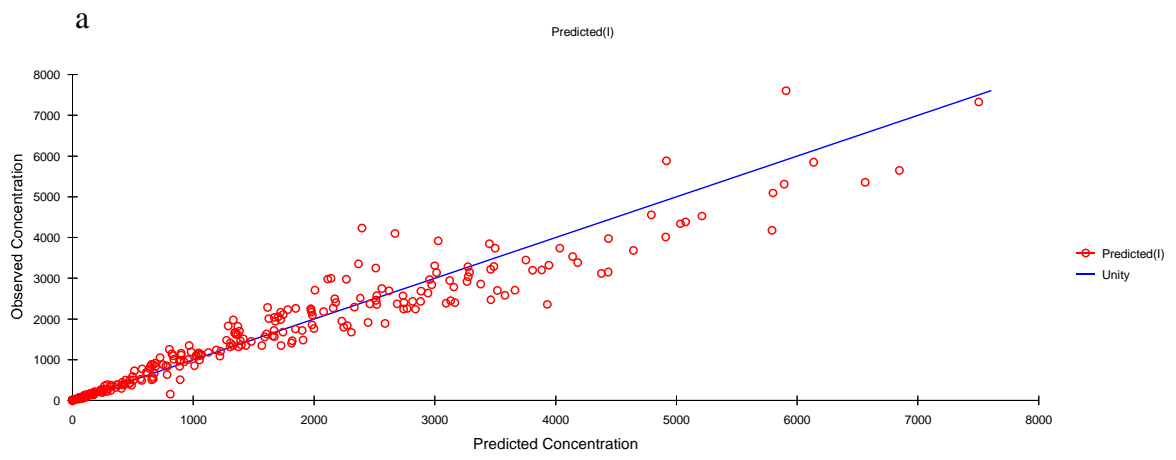


Figure 1

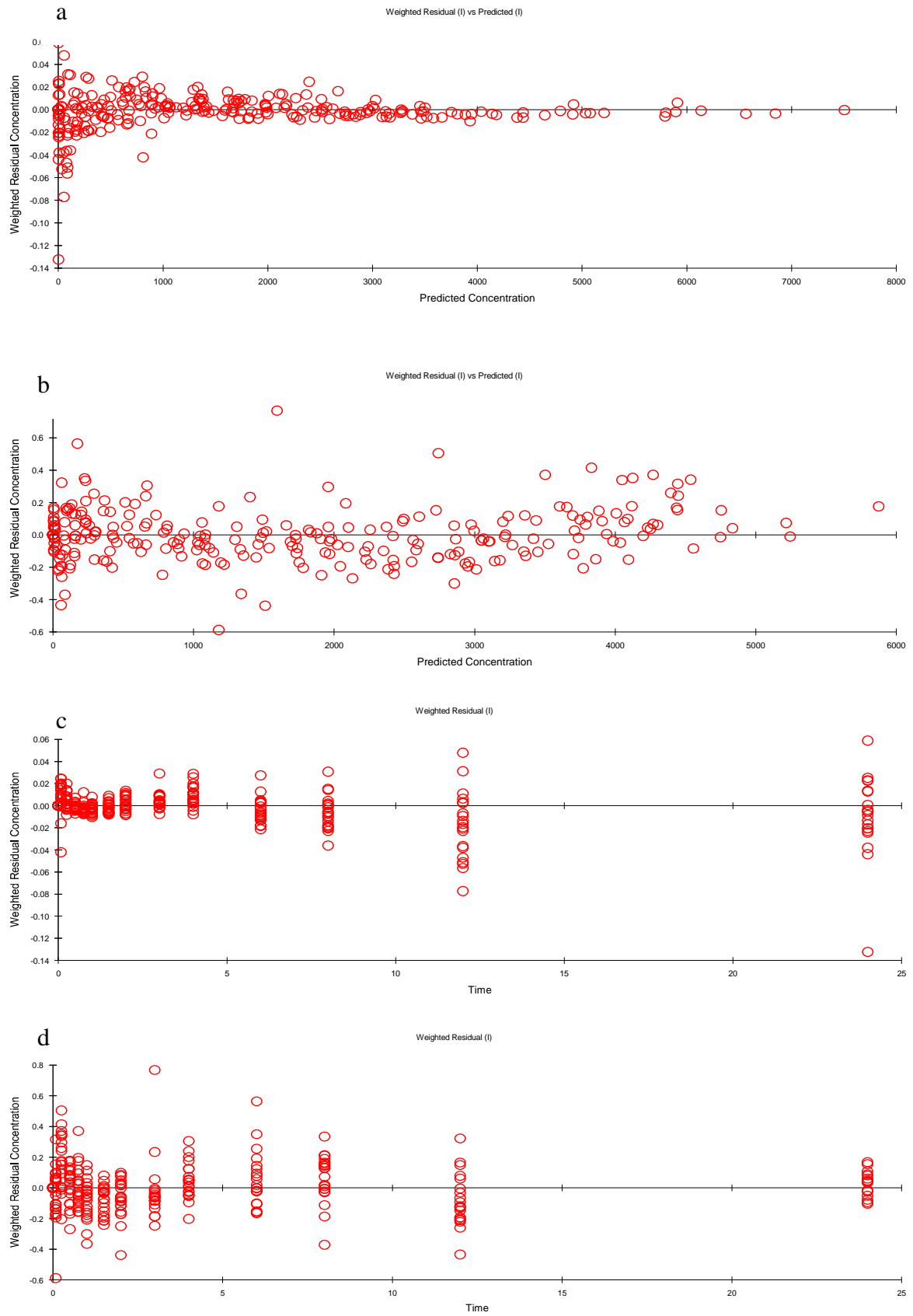


Figure 2

Legends:

Figure 1 : Scatterplot of observed *versus* predicted plasma pralidoxime concentrations indicated a closer distribution around the line of unity for pralidoxime alone (a) and AIBC (b).

Figure 2 : Assesment of predictive performance of final population models for both treatements: pralidoxime and AIBC. Plots of residual *versus* predicted concentrations for pralidoxime (a) and AIBC (b), and residual *versus* time for pralidoxime (c) and AIBC (d).

2. DISCUSSION

Cette étude visant à déterminer les paramètres pharmacocinétiques de la pralidoxime après administration i.m. est la première réalisée chez l'homme.

Deux approches ont été réalisées : une non compartimentale et une modélisation compartimentale. Les traitements ayant été administrés à un intervalle de deux semaines, la variabilité " inter-occasion " des paramètres pharmacocinétiques a été prise en compte, en faisant l'hypothèse que la clairance plasmatique restait constante ^[121].

Dans l'approche non compartimentale, les cinétiques après administration des deux traitements sont toujours analysées séparément et les paramètres pharmacocinétiques sont estimés pour chaque période de traitement. Dans l'approche de modélisation compartimentale, la variabilité inter-occasion était modélisée selon un modèle à effet mixte. Comme mentionné ci-dessus, l'analyse non compartimentale suivie par l'approche de l'intervalle de confiance ^[82], a montré que la pralidoxime dans le plasma apparaissait plus vite et à des concentrations plus élevées après administration intramusculaire de l'association pralidoxime, atropine et avizafone, que lorsqu'elle était administrée seule. Cependant, l'exposition totale de la pralidoxime, évaluée par l'AUC, reste équivalente que la pralidoxime soit injectée seule, ou en association avec l'atropine et l'avizafone.

La co-administration de l'atropine et de l'avizafone avec la pralidoxime semble n'avoir aucun effet sur la demi-vie d'élimination de la pralidoxime, qui est comparable à celle qui a déjà été publiée après une perfusion i.v. chez les patients intoxiqués par les organophosphorés ou chez le sujet sain ^[24].

L'analyse par modélisation compartimentale a été réalisée par la méthode des moindres carrés non-linéaire. Le principe fondamental dans cette méthode est de trouver les valeurs de θ , le paramètre du modèle, ce qui minimise la somme résiduelle de carrés qui est essentiellement un problème dans l'optimisation. Comme les fonctions objectives utilisées dans la

modélisation pharmacocinétique sont de nature quadratique, elles ont une forme concave ou convexe ce qui peut être exploité pour trouver une estimation de θ . Des algorithmes spécifiques ont été développés pour tirer profit de la nature de la surface de la fonction objective. Ces algorithmes sont conçus pour être le plus robuste que possible et pour converger rapidement lorsque la convergence peut être atteinte ^[122].

Dans cette étude, l'algorithme de Gauss-Newton modifié par Levenberg et Hartley a été utilisé pour estimer les paramètres des modèles. La méthode Gauss-Newton correspond à l'estimation de la matrice de variance-covariance des paramètres, et la modification de Levenberg réduit l'amplitude du changement des valeurs de paramètres à chaque itération à un niveau acceptable.

Un modèle d'erreur à coefficient de variation constant a été choisi, et la méthode des moindres carrés avec pondération itérative a été utilisée. Dans cette méthode, la première estimation du paramètre est réalisée par régression, et cette estimation est ensuite ré-estimé par la méthode des moindres carrés pondérés ^[122]. L'erreur est la combinaison d'erreur de dosage et d'erreur liée au manque de spécificité du modèle pharmacocinétique. Les échantillons de contrôle qualité cités pour le dosage de la pralidoxime dans des échantillons des sujets, a montré qu'un modèle d'erreur à coefficient de variation constant était approprié pour l'erreur de dosage. L'hypothèse a été faite que ce modèle pourrait aussi décrire l'erreur liée au modèle pharmacocinétique. En fait, on peut supposer que ce type d'erreur est plus important au cours des phases d'absorption et de distribution que lors de la phase terminale de la cinétique. Par ailleurs, aucun argument ne permet de supposer que la variance des paramètres puisse être différente entre les sujets.

Le critère d'Akaike a été utilisé pour retenir la combinaison de modèles qui intégrait le meilleur modèle d'absorption. De plus, les graphes de concentrations observées et prédites en fonction du temps, ainsi que les coefficients de variation d'estimation des paramètres, ont

également été examinés et leur évaluation a permis de choisir le meilleur modèle d'ajustement.

Dans l'approche de la pharmacocinétique de population, la pharmacocinétique de la pralidoxime administrée par voie intramusculaire suit un modèle à deux compartiments avec une absorption d'ordre zéro. Ce modèle a été retenu, bien que l'AIC du modèle avec une absorption d'ordre 1 soit inférieur (3645 *versus* 3607 pour l'absorption d'ordre 1 et d'ordre zéro, respectivement). En fait, les variances de plusieurs paramètres estimés et dérivés étaient élevées lorsque les données ont été modélisées par une absorption d'ordre 1, tandis que, avec une absorption d'ordre zéro, elles étaient toujours inférieures à 25%. De plus, le modèle intégrant une absorption d'ordre 1 sous-estimait les concentrations maximales.

Après administration de pralidoxime avec l'atropine et l'avizafone à l'aide du système d'auto-injecteur (AIBC), un modèle à deux compartiments avec absorption d'ordre 1 a été identifié comme étant le plus approprié pour décrire la pharmacocinétique de la pralidoxime. Concernant ces données, l'AIC, les variances des paramètres estimés et dérivés, et les graphes de qualité de l'ajustement, montrent que le modèle avec absorption d'ordre 1 est le plus adapté pour ajuster et estimer les paramètres pharmacocinétiques.

Injectée en association avec l'avizafone et l'atropine, la pralidoxime est absorbée plus vite, et atteint des concentrations maximales plus élevées. Ce phénomène s'accompagne d'un changement du meilleur modèle mathématique du processus, passant d'une absorption d'ordre zéro à une absorption d'ordre 1. Une absorption d'ordre zéro se voit en général quand un système de libération contrôlée est utilisé. Cela pourrait également suggérer l'existence de phénomènes de transport actif, ou de stockage temporaire de la molécule au site d'injection suivie d'une diffusion constante dans la circulation générale.

De ce fait, l'accélération de l'absorption de la pralidoxime, lorsqu'elle est associée avec l'atropine et l'avizafone, reflète probablement une modification du processus d'absorption résultant de la modification du flux sanguin au niveau du site d'injection ^[113].

L'avizafone n'est pas connue pour avoir des propriétés pharmacologiques suggérant une modification du flux sanguin ou des mécanismes d'absorption. Cependant, en clinique lorsque l'atropine est administrée à des doses induisant des effets anticholinergiques généraux, il y a modification des effets périphériques, dont vasodilatation. Il en résulte une modification du débit sanguin à différents niveaux dont potentiellement au site d'injection ^[113]. Cette action pharmacologique pourrait ainsi expliquer le retard dans le processus d'absorption des molécules co-administrées.

En résumé, l'analyse non compartimentale suivie de l'approche de l'intervalle de confiance a permis de déterminer les différences en terme de biodisponibilité (AUC, et C_{max}), tandis que l'approche compartimentale a permis de caractériser le meilleur modèle d'absorption et a fourni plusieurs paramètres pharmacocinétiques qui n'ont pas pu être obtenus par une analyse modèle-indépendante, ce qui permet la compréhension des processus qui gouvernent la pharmacocinétique de la pralidoxime.

Article 4

Riluzole Pharmacokinetics in Patients with Spinal Muscular Amyotrophy

Projet de Publication

1. INTRODUCTION

L'amyotrophie spinale infantile (ASI) est une maladie récessive génétique, caractérisée par une faiblesse et une fonte musculaire progressive provoquée par une dégénérescence des motoneurons de la corne antérieure. Cette maladie neuromusculaire de l'enfance a une prévalence estimée à une naissance sur 6000 à 10.000 ^[40].

La classification actuelle des formes d'ASI, dont l'altération a été cartographiée sur le chromosome 5q13, est basée sur des critères cliniques ^[41]. L'ASI sévère (maladie de Werding Hoffman, ASI aiguë et ASI de type I) est caractérisée par son apparition précoce avant l'âge de 6 mois, l'impossibilité de s'asseoir sans support et une espérance de vie de 2 ans ou moins. L'ASI de type II (ASI chronique) est habituellement décelable entre 6 et 18 mois, mais pourrait débuter plus tôt. Les patients parviennent à se tenir assis seuls et peuvent vivre jusqu'à l'adolescence ou davantage. L'ASI de type III (ASI juvénile ou maladie de Kugelberg WELANDER) devient symptomatique après l'âge de 18 mois, et tous les patients sont capables de marcher seuls. Les patients atteints de l'ASI III peuvent vivre jusqu'à l'âge de 60 ans.

Les enfants atteints d'ASI avec pronostic grave ont des difficultés de succion, de déglutition et de respiration abdominale au cours des premiers mois de vie. Dubowitz et Thomas et Ignatinus *et al.*, ont montré que 80% des patients dont la maladie a débuté avant l'âge de deux mois meurent dans les 7 mois qui suivent, et 80% des patients dont la maladie a débuté entre 2 et 6 mois meurent à l'âge de 20 mois ^[128, 129].

Les hypothèses sur la pathogenèse de l'ASI sont les suivantes: défaut d'inhibition de l'apoptose, cytotoxicité du glutamate, et absence de facteurs neuroprotecteurs au niveau nerveux ou musculaire ^[130].

Il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement médicamenteux d'ASI. En revanche quelques essais cliniques ont été menés plus ou moins récemment. Certains de ces essais évaluent

l'efficacité des médicaments agissant sur la protéine SMN tronquée par le gène SMN2, comme l'acide valproïque et le phenylbutyrate ^[58, 61]. D'autres études s'intéressent aux substances susceptibles d'agir sur la survie des motoneurones.

Les inhibiteurs du glutamate sont actuellement recommandés pour le traitement de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et permettent d'en ralentir la progression ^[62, 64].

Le riluzole est un médicament neuroprotecteur qui agirait en bloquant la neurotransmission via les acides aminés excitateurs et permet ainsi d'atténuer l'excitotoxicité ^[69]. Le riluzole fut le premier médicament reconnu comme efficace pour traiter la SLA. Il est administré par voie orale sous forme de comprimé dosé à 50 mg deux fois par jour. Le riluzole est rapidement et bien absorbé au niveau gastro-intestinal. La relation entre la dose administrée et les concentrations plasmatiques est linéaire et la biodisponibilité absolue est d'environ 60%, avec toutefois une importante variabilité inter-individuelle, vraisemblablement liée aux différences de l'effet de premier passage ^[72].

L'état d'équilibre des concentrations plasmatiques est atteint après environ 5 jours, et les concentrations plasmatiques maximales sont d'environ 300 ng/ml. Le riluzole est métabolisé par les enzymes oxydatives de phase I du système des cytochromes P450 (CYP), principalement le CYP 1A2, suivie par une glucuroconjugaison puis est éliminé dans les urines ^[74].

Haddad *et al.* ont montré que l'évolution de l'amyotrophie spinale de la souris peut être ralentie après le début de la maladie et suggèrent que le riluzole peut être considéré comme une molécule candidate des essais thérapeutiques chez l'homme ^[65].

A ce jour, une seule étude clinique de phase 1 évaluant l'administration orale du riluzole chez les nourrissons a été publiée ^[68]. Cette étude suggère que le riluzole est sans danger chez les nourrissons avec ASI et pourrait avoir un effet d'atténuation de la progression de la maladie.

Cependant, il s'agissait d'une étude portant sur un petit nombre de sujets à la puissance insuffisante pour pouvoir montrer une différence entre les deux groupes (traitement et placebo).

Par ailleurs, aucune donnée pharmacocinétique concernant l'administration orale du riluzole chez l'enfant n'a été publiée.

L'objectif de l'étude présentée est de déterminer les principaux paramètres pharmacocinétiques du riluzole à l'état d'équilibre après son administration par voie orale à la dose de 50 mg par jour chez le patient atteint d'ASI.

Riluzole Pharmacokinetics in Patients with Spinal Muscular Amyotrophy.

Abstract:

Spinal muscular atrophy (SMA) is a neuromuscular disorder of childhood occurring in 1 in 6000 to 10000 births. Riluzole is an anti-excitotoxic agent recommended for treatment of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). The objective of the present study is to assess the pharmacokinetics of riluzole in patients with SMA.

Fourteen patients (age between 9-17 years) were enrolled in an open-label, single cohort, repeat-dose, pharmacokinetic study. All participants were assigned to receive riluzole orally (50 mg once a day) for 5 days. Riluzole plasma concentrations were determined by a validated LC-MS/MS method from samples obtained at day 5. Non compartmental approach and compartmental modeling analysis were thereafter performed.

The analyses showed that the dose of 50 mg once daily was sufficient to achieve a total daily exposure similar to those achieved in adult healthy volunteers or ALS patients at the recommended dose of 50 mg twice a day. The pharmacokinetic simulations showed that the administration of 50 mg twice daily would result in higher trough and maximal concentrations comparable to those obtained in ALS patients with 100 mg twice daily.

In conclusion, the study showed that the dose of 50 mg once a day is appropriate in patients with SMA. This dose was chosen for the clinical trial evaluating the efficiency of riluzole in patients with SMA.

INTRODUCTION:

Spinal Muscular Atrophy (SMA) is an autosomal recessive disorder, clinically characterized by a slowly progressive muscle weakness related to the degeneration of anterior horn cells. This rare familial neuromuscular disorder of childhood occurs in 1 in 6000 to 10000 births ^[1] and the genetic mutation has been mapped to chromosome 5q13.

Current sub-classification of SMA, is based on clinical criteria ^[2]. Severe SMA (Werdnig-Hoffman disease, acute SMA and SMA type-I) is characterized by onset before 6 months of age, failure to achieve sitting without support and a life expectancy of 2 years or less. Spinal muscular atrophy type-II (chronic SMA) usually becomes symptomatic between 6 and 18 months of age, but may start earlier. Those patients ultimately attain independent sitting with help and may live into adolescence or longer. Spinal muscular atrophy type-III (juvenile SMA or Kugelberg-Welander disease) becomes symptomatic after the age of 18 months, and all patients walk independently at some time. Patients with SMA type-III may survive into the sixth decade of life.

SMA children with the severe prognosis have difficulties with sucking, swallowing, and abdominal breathing in the first few months of life. Thomas and Dubowitz and Ignatius *et al.*, have shown that 80% of patients with onset before two months of age die within 7 months. 80% of patients with onset between 2 and 6 months die by age 20 months ^[3, 4].

Hypotheses regarding the pathogenesis of SMA include defective inhibition of apoptosis, glutamate excitotoxicity, or lack of neurotrophic factors in nerve or muscle ^[5].

Clinical trials were or are currently conducted to evaluate the effect of disease modifying therapy in SMA. Few studies were or are conducted to evaluate the effect of drugs that mainly act by increasing SMN2-derived RNA and proteins levels, such as valproic acid and phenylbutyrate.

Other clinical trials evaluate the safety and efficacy of other drugs acting as neuroprotectors, such as riluzole which is a glutamate inhibitor. It had been shown that riluzole slow the progression of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) ^[6, 7] and is currently recommended for treatment of that disease.

Riluzole is a neuroprotective drug that is thought to act by blocking excitatory amino acid mediated neurotransmission and thus attenuating excitotoxicity ^[8]. Riluzole was the first drug to have been shown to be of benefit in the treatment of ALS. The recommended dosage is 50 mg oral tablet twice daily.

In adult healthy volunteers, the drug is well and rapidly absorbed from the gastrointestinal tract. The relationship between administered dose and plasma concentrations is linear and the absolute bioavailability is ~60%, although there is considerable inter-individual variability, presumably due to differences in the extent of the first-pass effect ^[9]. Steady-state plasma concentrations are achieved after ~5 days, and peak plasma concentrations are ~300 ng/ml. Riluzole is metabolized by phase I oxidative enzymes, principally CYP 1A2, followed by glucuroconjugation and it is eliminated in the urine ^[10].

Haddad *et al.* showed that riluzole can modify disease progression in SMA when administered after the onset of neuromuscular defects and may warrant further investigation in a therapeutic trial in SMA ^[11].

Up today, only one phase-1 clinical trial evaluating the safety of riluzole administration in children with SMA has been reported ^[12]. This study suggests that riluzole is safe in children with SMA and may have a mitigating effect on the natural course of the disease.

However, this was a limited study with insufficient power to show a difference between with placebo.

Since no pharmacokinetic data concerning the oral administration of riluzole in children is yet available, we undertook a study to determine the steady-state main pharmacokinetic parameters of riluzole at 50 mg daily in children with SMA.

SUBJECTS AND METHODS:

The study was conducted in one clinical center (Raymond Poincaré Hospital, Garche, France). This study was nested in a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial assessing riluzole efficacy. Fourteen patients participated in this preliminary repeat-dose, open label, single cohort, pharmacokinetic study.

Patients at inclusion had to be at least 6 years old and younger than 20 years at the time of the enrollment and needed to fulfill international classification criteria for SMA type-II or -III with a mobility score ≤ 12 on motor function measurement (MFM) scale^[13].

Eligibility was determined on the basis of medical history, physical examination, electrocardiogram, and standard laboratory tests including hematology and blood chemistry.

Patients were excluded if they met any of the following criteria: treatment with riluzole, treatment with any hepatotoxic drug, renal, cardiac and hepatic insufficiency.

All subjects received a daily dose of 50 mg of riluzole administered as 50 mg capsule for 5 days. On day 5, blood samples (approximately 2 ml) were drawn into lithium heparin tubes before and at t-1hr, t-5hr, t-9hr, t-14hr and t-24hr after the last administration of daily riluzole dose. Samples were centrifuged and plasma decanted and frozen at -20°C until further analysis.

Assay method:

Riluzole was quantified in plasma samples, after protein precipitation, using a validated liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS/MS) method. At the moment of assay, 100 μ l of plasma was exactly measured. Protein precipitation was carried out using 150 μ l of

acetonitrile containing diazepam-D5 as the internal standard (I.S.). The samples were vortex mixed, then centrifuged. The supernatant was transferred to micro vials and 5 μ l were analyzed by the chromatographic system. The analysis was achieved by reversed phase high performance liquid chromatography using a C-8 ACQUITY column maintained at 40°C. The mobile phase was nebulized using an electrospray source. The mass spectrometry (Quattro premier) was programmed to transmit the protonated molecules $[M+H]^+$ at m/z 235.2 for riluzole and m/z 290.2 for I.S. via the first quadripole filter (Q1), with collision fragmentation in Q2 while monitoring, in Q3, the product ions at m/z 216.2 (riluzole) and m/z 198.2 (I.S.). Micromass software[®] (Waters, USA) was used to acquire chromatographic data, integrate the peaks, and calculate plasma concentrations.

Calibration curves were obtained by fitting the peaks area ratio (riluzole/I.S.) to standard concentrations using the weighted (1/concentration) linear least squares regression. The calibration curve was linear over the concentration range 2-500 ng/ml with determination coefficient <0.99. When a plasma sample concentration was above 500 ng/ml, the sample was diluted with human blank plasma and re-assayed.

Based on quality control samples, the overall relative standard deviation (an index of precision) was less than 11.6%. The overall relative error (an index of accuracy) was within \pm 13.9%. The lower limit of quantification (LLOQ) was validated at 2 ng/ml.

Pharmacokinetic Analysis:

Non compartmental model:

The non compartmental model independent analysis was performed using WinNonLin[®] Pro v.4.1 (Pharsight Corporation, USA), to estimate riluzole main pharmacokinetic parameters at the steady state. Data were used to estimate individual maximal concentration (C_{max}) and time necessary to reach maximal concentration (t_{max}). In addition, for each treatment the

elimination rate constant (K_e), and the area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours of blood sampling (AUC_{0-24}) were estimated. K_e was estimated as the slope of the log-linear terminal portion of the plasma concentration vs. time curve, determined using unweighted linear least-squares regression analysis. The best number of concentrations was chosen as that giving the highest coefficient of determination, as recommended. Area under concentration-time curve was computed from 0 to 24 hr using the log-linear trapezoidal method. Additionally, from these estimated parameters, several pharmacokinetic parameters were derived. Terminal elimination half-life was calculated as $t_{1/2} = \ln 2 / K_e$.

Compartmental Modelling Approach:

Studied Pharmacokinetic Models

In order to describe the absorption after oral administration of riluzole, two absorption kinetic models were compared. First, the one-compartment model with first-order absorption and elimination rates described by the equation:

$$C_p = \frac{K_a D}{TV_c K_e} (1 - e^{-K_e t})$$

Where K_a is the absorption rate constant, D is the dose administered orally, K_e is the elimination constant, and V_c is the volume of distribution in the central compartment.

The second model was a one-compartment model with zero-order absorption rate and first order elimination rate and was described by the equation:

For $t \leq T$

$$C_p = \frac{FD}{TV_c K_e} (1 - e^{-K_e t})$$

and for $t > T$

$$C_p = \frac{FD}{TV_c K_e} \left((1 - e^{-K_e T}) * e^{-K_e (t-T)} \right)$$

Where T represents the duration of absorption, D is the dose administered orally, K_e is the elimination constant, and V_c is the volume of distribution in the central compartment.

Estimation Method:

WinNonLin[®] software was used to fit the data of each subject using two combinations of models: a one-compartment open model with either zero-order or first-order absorption. The initial estimates of the pharmacokinetic parameters were computed by WinNonLin[®] using curve stripping.

The pharmacokinetic parameters were V_c , K_e , and an absorption parameter: K_a in the case of first-order absorption. In the case of zero-order absorption, T was fixed and determined as time necessary to reach the maximal concentration and that for each subject individually.

From these parameters, several derived pharmacokinetic parameters were computed: area under the curve $AUC_{0 \rightarrow t}$, time needed to reach maximal concentration t_{max} , and maximal concentration C_{max} .

For each concentration, an additive error was assumed arising from a zero mean Gaussian distribution, with a heteroscedastic variance. Errors on two different concentrations were assumed to be uncorrelated. The error included: error of the analytical method, and error due to the pharmacokinetic model misspecification.

Gauss-Newton method with Levenberg modification was used to provide the “least square” estimates. Data were weighted using a constant coefficient of variation error model based on model predicted plasma concentration $1/\hat{y}^2$. As using observed data as weights is problematic since they are measured with error, predicted values are used instead. In this manner, any measurement error or random variability in the data is controlled.

Comparison of Models:

The Akaike Information Criterion (AIC) was used to identify the best combination of models, since the first order and the zero order absorption models are not nested. This criterion can be viewed as the sum of a measure of the goodness of fit, and of a penalty function proportional to the number of estimated parameters in the model. For each combination of models, the criterion for all subjects was computed. The combination of models with the smallest AIC is the most adequate according to a parcimony principle.

Pharmacokinetic simulation:

The individual parameter estimates from the final chosen model were used to compare two dosing regimens: 50mg Q.D. and 50 mg B.I.D. with dosing interval $\tau=12$ hours.

Results:

14 patients (5 male, 9 female) were enrolled in the study. Demographic characteristics of the study population are summarized in **Table I**. One subject was excluded from the analysis due to difficulties in blood sampling.

Figure 1 shows the mean plasma concentration *versus* time profile of riluzole at the steady state. The individual and mean pharmacokinetic parameters in infants are summarized in **Table II**. The individual pharmacokinetic data showed inter-individual variability in pharmacokinetic parameters with CV% varied from 45.5% to 71%;

The mean plasma levels of riluzole increased until 1 hour, thereafter, plasma levels of riluzole declined and the mean apparent terminal half-life ($t_{1/2}$) was 9.75 hr.

A delay in the time to reach the maximal concentration is observed in the group of patients with SMA II as compared to patients with SMA III (median t_{max} ; 3 hr *versus* 1 hr)., with no significant effect on the total exposure and the maximal concentration.

One-compartment open models were studied in order to describe riluzole pharmacokinetics.

For each combination of models, individual fittings of data were obtained. **Figure 2** shows the pharmacokinetic curve fitted by the model for a typical subject.

After oral administration, riluzole concentrations were better predicted by zero-order absorption model than by first-order absorption model.

These graphical results were confirmed by the AIC for all subjects (4.29 *versus* -18.2) for first-order and zero-order absorption, respectively.

For the chosen models, no trend is noticed in the graphics of standardized residuals *versus* predicted concentrations or *versus* time. The pharmacokinetic parameters estimated with the iterative reweighted least-squares method are summarized in **Table III**.

The standard errors of individual estimates were also obtained, except for the time of absorption T , which was fixed and determined as the t_{\max} estimated using the non compartmental approach.

Discussion:

This study aimed to establish the pharmacokinetic profile of riluzole after repeated oral administration in SMA patients.

The pharmacokinetics of riluzole was determined after steady-state concentration had been reached. Two types of pharmacokinetic analysis were carried out to determine the dose to be administered in this population, with regards to the total systemic exposure, absorption and elimination of riluzole.

Non compartmental analysis:

This analysis showed that riluzole reaches rapidly its maximal concentration after oral administration of 50 mg capsules (median $t_{max} = 1$ hr). Four SMA II patients had a delay in riluzole absorption (experimental $t_{max} = 5$ hr). Three of them had a C_{max} 2-fold lower than the mean C_{max} , while the fourth had a C_{max} 2-fold higher than the mean C_{max} . Anyhow, riluzole total exposure in this subject was 3-fold higher than the mean total exposure, which could explain the higher C_{max} , despite the delayed absorption.

One subject, with SMA III, had a 4-fold lower total exposure than mean total exposure, accompanied by a 4-fold decrease in the C_{max} as compared to group mean.

This variability could be due, in part, to fluctuations in CYP 1A2 activity, the predominant isoenzyme in phase I riluzole metabolism^[10, 14].

Although, the t_{max} in the SMA II group still not significantly different from the group SMA III, which is probably due to subjects number in SMA III group, the absorption of riluzole seemed to be delayed in the group SMA II. This delay has no significant effect on the other pharmacokinetic parameters ($AUC_{0 \rightarrow t}$, C_{max} and half-life of elimination).

The mean C_{max} of the whole studied group, as compared to other clinical studies conducted in healthy adults^[15-17], appears to be higher, with a high variability, even if a delay is observed

to obtain the C_{\max} in SMA patients. Anyhow, this delay could be probably due to sampling schedule followed in this study.

$AUC_{0 \rightarrow t}$ appears to be 2 fold higher than $AUC_{0 \rightarrow t}$ obtained in other clinical studies conducted at steady state in healthy volunteers and patients with ALS, in which the mean total exposure ranged between 654 and 1470 ng.hr/ml [9, 15-17].

These results suggest that riluzole total daily exposure after the administration of 50 mg Q.D. in children, is comparable to that one obtained after the administration of 50 mg B.I.D. in adults “healthy volunteers and ALS patients”.

Compartmental analysis:

The best model fitting the individual data was evaluated as follows: sum of AIC for all subjects, coefficient of variation of parameters estimation.

The zero-order absorption model had the smaller sum of AIC as compared to the first order absorption. In addition, the estimation CV% were acceptable “between 5.87%-45.8%”.

The model underestimated C_{\max} as compared to C_{\max} estimated by NCA which could be due to the choice of the structural model. Riluzole exhibits bi exponential decline as it has been already reported [9, 14].

Bruno *et al.* chose one compartment model with first order absorption and elimination, as riluzole best population model, although the two compartment model substantially improved the fit, as both models provided very similar clearance estimates [14].

In our study, although the examination of data on semi-log scale could suggest a bi exponential decline, the number of points per subject prevents the fitting using a two compartment model.

However, the chosen model provided good estimates of pharmacokinetic parameters.

The final chosen model parameters were used to simulate individual plasma concentration-time profiles following the oral administration of 50 mg of riluzole B.I.D. **Figure 3**, showed

two simulated pharmacokinetic profiles following the oral administration of 50 mg of riluzole Q.D. and B.I.D. in a typical subject. This simulation demonstrates that the administration of 50 mg of riluzole B.I.D. would result in a higher accumulation of the drug, with higher maximal and trough concentrations, comparable with those obtained in ALS patients with 100 mg B.I.D.

However, the benefit/risk balance appears to be in favor to a 50 mg Q.D. regimen, taking into account the pharmacokinetic comparison with results obtained from clinical trials conducted in adults [7, 16].

Different hypotheses could be proposed to explain these findings:

To investigate the effect of demographic variables, a multilevel linear regression was applied to test the correlation between the main pharmacokinetic parameters ($AUC_{0 \rightarrow t}$, C_{max} , half-life of elimination) and the demographic variables (Age, body weight, corporal surface).

The results obtained from this analysis showed that there is no correlation between the studied demographic co-variables and the main pharmacokinetic parameters (Fischer test, $p > 0.05$).

In consequence, riluzole $AUC_{0 \rightarrow t}$, C_{max} and half-life were not affected by the patient's age, weight, or corporal surface.

On the other hand, a clinical trial evaluating riluzole efficacy in children with obsessive compulsive disorder has been published recently [18]. In this study, riluzole was administered to children from 8 to 17 years old, at dose increased by 10 mg every few days, and the maximal daily dose was set at 120 mg. All the children included in this study (n=6) reached the dose of 50 mg of riluzole B.I.D. The authors reported that riluzole was well tolerated although some adverse events such as; drowsiness, transient elevations of liver enzymes, were noticed.

Although no pharmacokinetic evaluation was realized during this study, the observations of its tolerability and dosing results added to our pharmacokinetic findings suggest that

modifications in pharmacokinetics of riluzole in patient with SMA are due to the physiopathology more than other demographic variables “age, weight and sex”.

Concerning the metabolism, reduced riluzole elimination in children could explain the increased total exposure and maximal concentration. This increase is usually accompanied by a prolongation of the terminal half-life. In this study, the elimination half-life is comparable with those obtained in clinical trials conducted in healthy volunteers and ALS patients ^[9]. In addition, during our study, all treatments influencing riluzole metabolism by CYP1A2 were avoided, which minimize the probability of drug-drug interactions.

Concerning the protein binding effect, plasma protein leads to higher drug plasma concentration at steady state with a reduced volume of distribution.

For all low extraction ratio drugs, regardless of route of administration, and for all drugs administered orally and eliminated primarily by the liver, total exposure is independent of protein binding and no dosing adjustment will need to be made. Only high extraction ratio drugs given intravenously and oral drugs eliminated by nonhepatic high extraction ratio routes will exhibit changes in unbound drug exposure when protein binding changes ^[19].

Riluzole is highly bound to albumin (97%), and it is eliminated principally in the urine. Change in albumin concentrations could lead to a change in riluzole plasma concentrations.

Nevertheless, it has never been reported that a change in albumin concentration in SMA patients was observed. In addition, in this study, albumin was not determined at the day of pharmacokinetic study realization.

Drug absorption might be affected by any disease that causes changes in: (1) intestinal blood flow, (2) GI motility, (3) changes in stomach emptying time, (4) gastric pH that affect drug solubility, (5) intestinal pH that affects the extent of ionization, (6) the permeability of the gut wall, (8) digestive enzyme secretion or (9) alteration of normal GI flora.

One or more, of these physiological changes could be observed in patients with SMA, which could lead to modification in riluzole absorption profile in addition to high variability.

Although the compartmental analysis showed that the zero-order absorption appears to be a best model to fit our data, in both SMA II and SMA III groups, this type of absorption couldn't be confirmed physiologically by data obtained from this study due to small number of points in the absorption phase.

However, zero-order absorption usually occurs when the drug is absorbed by a saturable process or a controlled release delivery system is used. This could suggest the implication an active transport phenomena.

The findings of the compartmental analysis, added to those obtained from the non compartmental approach, suggest that the probable reason leading to enhanced exposure and absorption of riluzole in children with SMA, is related to the absorption step more than other levels of its kinetics, and probably the severity of the pathology could be related to modification in absorption profiles in these patients. Nevertheless, these observations need to be confirmed by a further clinical and biological investigation.

In conclusion, this study showed that the administration of 50 mg of riluzole once a day in patients with SMA leads to total riluzole daily exposure comparable to those obtained after the administration of 50 mg twice a day in healthy volunteers or ALS patients. This dose was therefore chosen for the subsequent clinical trial assessing the efficacy of riluzole in SMA patients.

References:

1. Mostacciuolo ML, Danieli GA, Trevisan C, et al. Epidemiology of spinal muscular atrophies in a sample of the Italian population. *Neuroepidemiology* 1992;11 (1): 34-8.
2. Munsat TL, Skerry L, Korf B, et al. Phenotypic heterogeneity of spinal muscular atrophy mapping to chromosome 5q11.2-13.3 (SMA 5q). *Neurology* 1990 Dec;40 (12): 1831-6.
3. Thomas NH, Dubowitz V. The natural history of type I (severe) spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 1994 Sep-Nov;4 (5-6): 497-502.
4. Ignatius J. The natural history of severe spinal muscular atrophy--further evidence for clinical subtypes. *Neuromuscul Disord* 1994 Sep-Nov;4 (5-6): 527-8.
5. Greensmith L, Vrbova G. Possible strategies for treatment of SMA patients: a neurobiologist's view. *Neuromuscul Disord* 1995 Sep;5 (5): 359-69.
6. Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med* 1994 Mar 3;330 (9): 585-91.
7. Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, et al. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet* 1996 May 25;347 (9013): 1425-31.
8. Doble A. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology* 1996 Dec;47 (6 Suppl 4): S233-41.
9. Le Liboux A, Lefebvre P, Le Roux Y, et al. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of riluzole in white subjects. *J Clin Pharmacol* 1997 Sep;37 (9): 820-7.
10. Sanderink GJ, Bournique B, Stevens J, et al. Involvement of human CYP1A isoenzymes in the metabolism and drug interactions of riluzole in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1997 Sep;282 (3): 1465-72.

11. Haddad H, Cifuentes-Diaz C, Miroglio A, et al. Riluzole attenuates spinal muscular atrophy disease progression in a mouse model. *Muscle Nerve* 2003 Oct;28 (4): 432-7.
12. Russman BS, Iannaccone ST, Samaha FJ. A phase 1 trial of riluzole in spinal muscular atrophy. *Arch Neurol* 2003 Nov;60 (11): 1601-3.
13. Berard C, Payan C, Fermanian J, et al. [A motor function measurement scale for neuromuscular diseases - description and validation study]. *Rev Neurol (Paris)* 2006 Apr;162 (4): 485-93.
14. Bruno R, Vivier N, Montay G, et al. Population pharmacokinetics of riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Pharmacol Ther* 1997 Nov;62 (5): 518-26.
15. Le Liboux A, Cachia JP, Kirkesseli S, et al. A comparison of the pharmacokinetics and tolerability of riluzole after repeat dose administration in healthy elderly and young volunteers. *J Clin Pharmacol* 1999 May;39 (5): 480-6.
16. Groeneveld GJ, Van Kan HJ, Kalmijn S, et al. Riluzole serum concentrations in patients with ALS: associations with side effects and symptoms. *Neurology* 2003 Oct 28;61 (8): 1141-3.
17. Groeneveld GJ, van Kan HJ, Lie AHL, et al. An association study of riluzole serum concentration and survival and disease progression in patients with ALS. *Clin Pharmacol Ther* 2008 May;83 (5): 718-22.
18. Grant P, Lougee L, Hirschtritt M, et al. An open-label trial of riluzole, a glutamate antagonist, in children with treatment-resistant obsessive-compulsive disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2007 Dec;17 (6): 761-7.
19. Benet LZ, Hoener BA. Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2002 Mar;71 (3): 115-21.

Tables:

Table I: subject demographics

	SMA II subjects	SMA III subjects
Number	8	6
Gender		
Male	3	2
Female	5	4
Age (years)		
Mean \pm SD	12.8 \pm 2.85	13.5 \pm 2.34
Range	9-17	11-17
Weight (kg)		
Mean \pm SD	28 \pm 13	30 \pm 7.3
Range	17-58	19-39
Corporal surface(m ²)		
Mean \pm SD	0.99 \pm 0.27	1.04 \pm 0.17
Range	0.74-1.6	0.78-1.26

Table II : Estimated and derived pharmacokinetic parameters of riluzole obtained with the non compartmental approach

Subjects	AUC _{0-∞} (ng.hr/ml)	C _{max} (ng/ml)	t _{max} (hr)	Half Life (hr)
SMA II				
2001	1764	145	5	13.4
2002	1441	145	5	7.04
2003	2568	404	1	22.6
2004	1643	444	1	9.2
2005	7312	831	5	7.9
2006	1624	206	1	9.7
2007	2256	173	5	10.5
2008	2085	542	1	3.5
Mean ± SD	2492 ± 1992	313 ± 241	3 ^a (1-5)	11.1 ± 5.1
CV%	79.9	77		45.7
CI	[827-4156]	[112-514]		[6.86-15.3]
SMA III				
3001	2078	396	1	11.9
3002	1764	539	1	8.6
3003	2420	618	1	8.6
3004	547	62	1	6.0
3005	1842	314	1	8.6
Mean ± SD	1730 ± 709	385 ± 216	1	8.8 ± 2.1
CV%	41	56		24
CI	[850-2611]	[116-655]		[6.2-11.4]
All subjects				
Mean ± SD	2258 ± 1601	371 ± 225	1 (1-5)	9.9 ± 4.6
CV%	71	61		46

Table III: Estimated and pharmacokinetic parameters of riluzole obtained with the compartmental modelling analysis

Subjects	Vd (ml)	Estimation CV%	K_{10} (hr ⁻¹)	Estimation CV%
SMA II				
2001	396298	20.1	0.067	14.7
2002	396159	42.7	0.075	29.7
2003	186254	33.8	0.089	21.3
2004	194255	45.0	0.122	22.5
2005	70882	40.9	0.091	25.4
2006	326259	16.1	0.089	10.1
2007	349578	22.2	0.062	16.9
2008	409043	12.0	0.089	7.5
SMA III				
3001	191888	32.0	0.110	17.4
3002	165102	45.8	0.140	20.6
3003	134425	38.9	0.133	18.3
3004	826723	10.7	0.109	5.9
3005	237130	26.0	0.103	14.8

Figures :

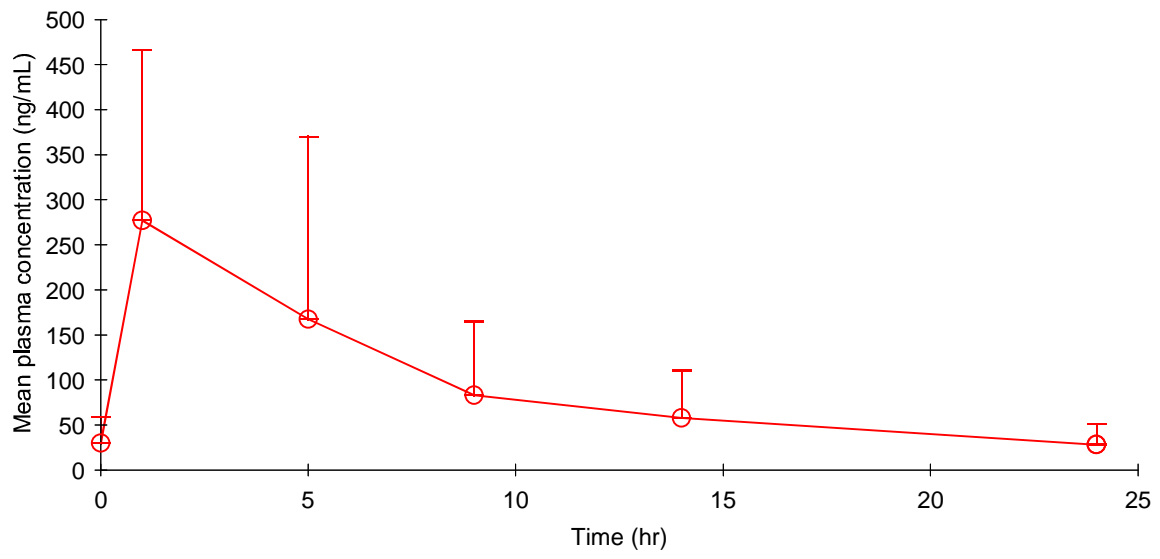


Figure 1.

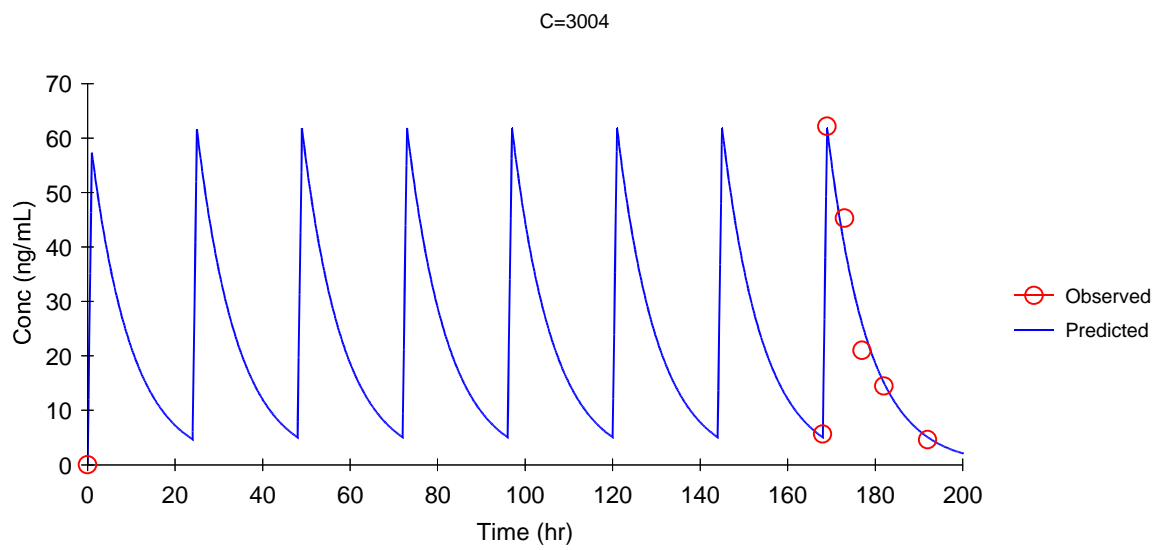


Figure 2.

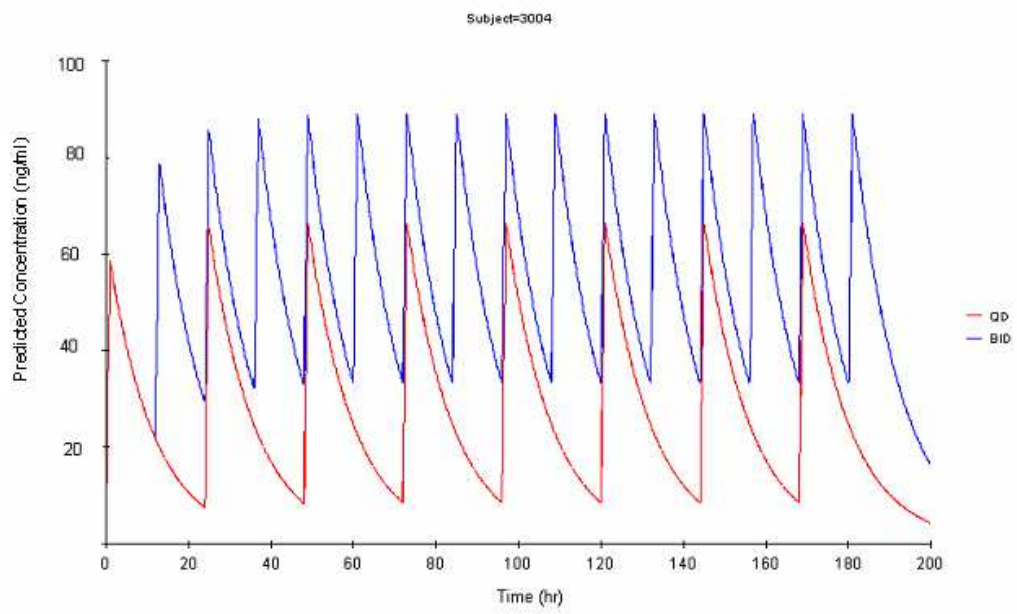


Figure 3.

Legends:

Figure 1 : Mean pharmacokinetic profile of riluzole at steady state.

Figure 2 : Plot of time course of riluzole plasma concentrations in a typical subject after oral administration of 50 mg Q.D. Solid lines represent the pharmacokinetic curve predicted by the one compartment model with a zero-order absorption.

Figure 3 : simulated pharmacokinetic profiles following the oral administration of 50 mg of riluzole Q.D. and B.I.D. in a typical subject.

2. DISCUSSION

La pharmacocinétique du riluzole a été déterminée après que l'état d'équilibre ait été atteint. Deux types d'analyses pharmacocinétiques ont été effectuées afin de déterminer la dose administrable dans cette population, et cela en évaluant l'exposition systémique totale, l'absorption et l'élimination du riluzole.

L'analyse non compartimentale révèle que le riluzole atteint rapidement sa concentration maximale après administration orale de 50 mg (médiane $t_{\max} = 1$ h). Un retard de l'absorption du riluzole a été observé chez quatre patients classés ASI type II (t_{\max} expérimental = 5 h). Trois d'entre eux avaient une C_{\max} 2 fois inférieure à la C_{\max} moyenne, tandis que le quatrième avait une C_{\max} 2 fois plus élevée que la C_{\max} moyenne. De plus, l'exposition totale au riluzole de ce sujet était 3 fois plus élevée que l'exposition totale moyenne, ce qui est cohérent avec l'augmentation de la C_{\max} , en dépit du retard d'absorption.

Un sujet, classé ASI de type III, avait une exposition totale 4 fois plus faible que la moyenne de l'exposition totale du groupe, accompagnée d'une diminution de 4 fois de la C_{\max} par rapport à la moyenne du groupe.

Cette variabilité pourrait être due, en partie, aux fluctuations de l'activité CYP 1A2, l'isoenzyme principale de la phase I du métabolisme du riluzole ^[74, 131].

Bien que le t_{\max} dans le groupe ASI II ne soit pas significativement différent de celui du groupe ASI III, l'absorption du riluzole semble être retardée dans le groupe ASI II, ceci est probablement dû au nombre des sujets dans le groupe ASI III. Ce retard n'a pas d'effet significatif sur les autres paramètres pharmacocinétiques ($AUC_{0 \rightarrow t}$, C_{\max} et demi-vie d'élimination).

La C_{\max} moyenne de l'ensemble du groupe étudié, comparée aux données issues de la littérature dans d'autres études cliniques menées chez les sujets sains adultes ^[72, 132-134], est plus élevée, avec une grande variabilité ; de plus chez les patients ASI un retard à l'absorption

est observé. Ce délai est peut être artefactuel, lié aux temps de prélèvements fixés dans le protocole de cette étude.

En ce qui concerne l'exposition, l' $AUC_{0 \rightarrow t}$ est 2 fois plus élevée que les $AUC_{0 \rightarrow t}$ obtenues dans les études cliniques menées à l'état d'équilibre chez les sujets sains ou chez les patients atteints de SLA, dans lesquelles l'exposition totale moyenne variait entre 654 et 1470 ng.hr/ml [72, 132-134].

Ces résultats suggèrent que l'exposition totale quotidienne après administration de 50 mg Q.D. chez les enfants ASI, est comparable à celle obtenue après administration de 50 mg B.I.D. chez les adultes qu'il s'agisse de sujets sains ou patients SLA.

Lors de l'analyse compartimentale, le meilleur modèle d'ajustement des données individuelles a été évalué en prenant en compte les critères suivants: somme des AIC pour tous les sujets, et coefficient de variation de l'estimation des paramètres.

Le modèle avec absorption d'ordre zéro montrait une somme d'AIC inférieure à celle du modèle avec absorption d'ordre 1. De plus, les CV% d'estimation étaient entre 5,87% et 45,8% ; valeurs reconnues comme acceptables.

Le modèle a sous-estimé les C_{max} par rapport aux C_{max} obtenues par l'analyse non compartimentale. Cela pourrait être dû au choix du modèle structurel ; il a été en effet proposé que le riluzole pourrait avoir un profil de décroissance bi-exponentielle [72, 131].

Bruno *et al.* ont choisi un modèle mono-compartimental avec absorption et élimination d'ordre 1, comme étant le meilleur modèle de population du riluzole, bien que le modèle à deux compartiments améliorerait sensiblement l'ajustement, mais les deux modèles donnant des estimations de la clairance très similaires, le plus simple a été retenu [131].

Dans notre étude, bien que l'évaluation des données sur une échelle semi-logarithmique suggère une décroissance bi-exponentielle, le nombre de points par cinétique empêche l'ajustement des données par un modèle à deux compartiments.

Néanmoins, le modèle choisi a donné de bonnes estimations des paramètres pharmacocinétiques.

Les paramètres du modèle final ont été utilisés pour simuler le profil pharmacocinétique individuel chez chaque sujet après administration orale de 50 mg de riluzole B.I.D. La figure 4, montre deux profils pharmacocinétiques simulés à la suite de l'administration orale de 50 mg de riluzole Q.D. et B.I.D. chez un sujet typique. Cette simulation montre que l'administration de 50 mg de riluzole B.I.D. se traduirait par une accumulation plus grande du médicament, avec des concentrations maximales et résiduelles plus élevées et comparables à celles observées chez le patient SLA après administration de 100 mg B.I.D.

De ce fait, la balance bénéfice/risque semble être en faveur d'une dose limitée à 50 mg Q.D., en se fondant sur la comparaison pharmacocinétique avec les résultats obtenus dans les essais cliniques chez l'adulte ^[64, 133], alors qu'il était initialement envisagé d'atteindre progressivement la dose de 50 mg B.I.D. chez l'enfant ASI.

Différentes hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ces résultats:

En ce qui concerne l'effet de variables démographiques, une régression linéaire multiple a été appliquée pour tester la corrélation entre les principaux paramètres pharmacocinétiques ($AUC_{0 \rightarrow t}$, C_{max} , demi-vie d'élimination) et les variables démographiques (âge, poids, surface corporelle).

Les résultats obtenus par cette étude ne montrent pas de corrélation entre les variables démographiques et les principaux paramètres pharmacocinétiques (test de Fischer, $P > 0.05$).

En conséquence, l' $AUC_{0 \rightarrow t}$, la C_{max} et la demi-vie du riluzole ne sont pas influencées par l'âge du patient, son poids, ou sa surface corporelle.

D'autre part, un essai clinique évaluant l'efficacité du riluzole chez les enfants atteints de trouble obsessionnel compulsif a été publié récemment ^[135]. Dans cette étude, le riluzole a été

administré chez des enfants de 8 à 17 ans, avec une augmentation par palier de 10 mg sur plusieurs jours, la dose quotidienne maximale était fixée à 120 mg.

Tous les enfants inclus dans cette étude (n = 6) ont atteint la dose de 50 mg de riluzole B.I.D. Selon les auteurs le riluzole a été bien toléré, avec quelques effets indésirables, tels que somnolence et élévations transitoires des enzymes hépatiques. Bien qu'aucune évaluation pharmacocinétique n'ait été réalisée au cours de cette étude, les résultats de tolérance et de posologies atteintes, ajoutés à nos résultats pharmacocinétiques, confirment l'hypothèse que les modifications de la pharmacocinétique du riluzole chez les patients atteints d'ASI sont plus liées à la physiopathologie, qu'à d'autres variables démographiques comme l'âge, le poids ou le sexe.

En ce qui concerne le métabolisme, la réduction de l'élimination du riluzole chez les enfants pourrait expliquer l'augmentation de l'exposition totale et des concentrations maximales. Cette augmentation est généralement accompagnée d'un allongement de la demi-vie terminale. Dans cette étude, la demi-vie d'élimination est comparable à celles obtenues dans les essais cliniques menés chez les sujets sains et les patients SLA ^[72]. De plus, au cours de notre étude, tous les traitements susceptibles d'avoir un impact sur le métabolisme du riluzole au niveau du CYP1A2, ont été évités, ce qui minimise la probabilité d'interactions médicamenteuses.

Concernant l'effet de liaisons aux protéines ; en première approche, l'augmentation des concentrations des protéines plasmatiques pourrait conduire à une augmentation de la concentration plasmatique du médicament à l'état d'équilibre en relation avec une diminution du volume de distribution.

Pour les médicaments ayant un coefficient d'extraction faible, quelle que soit la voie d'administration, et pour tous les médicaments administrés par voie orale et majoritairement éliminés par voie hépatique, l'exposition totale est indépendante de la liaison aux protéines et aucun ajustement de la dose ne devrait être fait. Seul le cas des médicaments ayant un

coefficient d'extraction élevé et administrés par voie intraveineuse ainsi que celui des médicaments administrés par voie orale et éliminés par voies extra hépatiques pourraient conduire à des changements de l'exposition totale du médicament libre, lorsque des modifications de liaison aux protéines surviennent ^[136].

Le riluzole est fortement lié à l'albumine (97%), et il est éliminé principalement dans les urines. Le changement des concentrations d'albumine pourrait ainsi conduire à un changement dans les concentrations plasmatiques de riluzole. Néanmoins, il n'a jamais été observé que les concentrations d'albumine chez les patients atteints d'ASI soient différentes de celles observées chez le sujet sain. Malheureusement, dans notre étude, les concentrations d'albumine n'ont pas été déterminées systématiquement.

L'absorption de médicaments pourrait être affectée par les maladies provoquant des modifications dans: (1) la circulation sanguine intestinale, (2) la motilité gastro-intestinale, (3) le délai de vidange gastrique (4), le pH gastrique pour les médicaments pour lesquels la solubilité est affectée (5), le pH intestinal par son effet sur l'intensité de l'ionisation (6), la perméabilité de l'intestin grêle, (8) la sécrétion d'enzymes digestifs ou (9) la modification de la flore normale GI.

Un ou plusieurs de ces changements physiologiques pourraient être observés chez les patients ASI, ce qui pourrait provoquer des modifications du profil d'absorption du riluzole ainsi qu'une grande variabilité.

Bien que l'analyse compartimentale ait montré que l'absorption d'ordre zéro semble être le meilleur modèle d'ajustement des données, dans les deux groupes ASI II et III, ce type d'absorption ne peut être confirmé par les données physiologiques recueillies dans cette étude en raison du faible nombre de points situés dans la phase d'absorption. En outre, l'absorption d'ordre zéro se produit généralement lorsque le médicament est absorbé selon un processus

saturable ou lorsque un système de libération contrôlée est utilisé. Ceci suggère la mise en jeu des phénomènes de transport actif.

Les résultats obtenus par modélisation, ajoutés à ceux obtenus dans l'analyse non compartimentale, plaident en faveur de l'hypothèse suivante : la raison la plus probable conduisant à une exposition et une absorption plus fortes du riluzole chez les enfants ASI, est liée à l'étape d'absorption et non aux autres étapes de la cinétique ; il est probable que la gravité de la pathologie puisse expliquer la modification des profils d'absorption chez ces patients. Cependant, ces conclusions nécessitent d'être confirmées par des investigations cliniques et biologiques supplémentaires.

En conclusion, cette étude a montré qu'une dose de riluzole de 50 mg une fois par jour, permet d'atteindre des expositions totales journalières comparables à celles observées chez l'adulte " sujet sain et patient SLA " recevant une dose de 50 mg deux fois par jour.

Cette dose a donc été retenue pour l'étude clinique évaluant l'efficacité du riluzole chez les patients ASI.

CONCLUSION

Ce travail de thèse illustre l'intérêt d'appliquer l'approche pharmacocinétique sous toutes ses formes au développement des médicaments, et cela dans des situations pour lesquelles l'objectif thérapeutique ne permet de réaliser ni étude de pharmacodynamie clinique, ni étude d'efficacité, ni essai clinique au sens comparatif sur des grandes populations. Le modèle est également particulièrement utile, lorsque l'objectif thérapeutique concerne une population fragile particulière comme en pédiatrie.

Les études sur l'auto-injecteur de molécules associées (études AIBC) avaient pour objectif d'évaluer la sécurité d'utilisation des antidotes en cas d'intoxication par des organophosphorés. Elles ont permis de documenter la pharmacocinétique de libération de diazépam à partir de l'avizafone, ainsi que la pharmacocinétique de la pralidoxime et cela après administration du traitement antidote via l'auto-injecteur bi-compartimental par voie intramusculaire dans des conditions simulant chez le sujet sain les conditions d'utilisation ultérieures. La nécessité de disposer d'une forme galénique stable et rapidement administrable a conduit à opter pour la lyophilisation, cette forme galénique permettant d'inclure les trois substances actives ensemble sans être en solution car l'atropine présente une grande instabilité en milieu aqueux.

L'intoxication par neurotoxique est une urgence vitale qui implique une prise en charge symptomatique et un traitement spécifique immédiats. L'extrême gravité de cette intoxication a conduit les armées à doter les combattants d'une seringue pour auto-traitement. Par ailleurs, il existe une menace réelle s'exerçant surtout pour les populations civiles, par définition moins préparées et le plus souvent non protégées.

Le traitement par seringue auto-injectable a été développé dans ce contexte. Elle est disponible pour les forces armées, mais pourra également être employée dans des circonstances d'attentat, sur ordre médical, par les médecins du SAMU, pour leur permettre de mieux gérer un afflux saturant de victimes. Incluse dans les plans Piratox hospitaliers, elle

pourrait être utilisée par du personnel de type " secouriste formé aux risques toxiques " chez les victimes les plus graves en amont de la chaîne de décontamination, leur permettant de survivre jusqu'à la prise en charge médicale spécialisée. Le médicament présente également un intérêt dans les intoxications accidentelles par organophosphorés en milieu agricole ou industriel. Elle présente donc un rapport bénéfice/risque favorable pour les populations civiles.

D'autre part, l'étude ASIRI a permis dans sa partie pharmacocinétique de déterminer la dose de riluzole à administrer chez les patients atteints d'ALS dans le cadre de l'étude préliminaire à l'essai clinique pédiatrique d'efficacité conduit à plus grande échelle.

Les données récoltées ont été analysées par deux approches différentes : approche non compartimentale et approche compartmentale. Pour cette dernière deux méthodes de modélisation ont été appliquées : une analyse individuelle permettant d'ajuster les données sujet par sujet, et une analyse dite " de population " permettant l'analyse de tous les sujets en même temps s'appuyant sur une méthode de régression non-linéaire à effets mixtes.

Les résultats des analyses pharmacocinétiques ont montré que les deux approches sont complémentaires afin de comprendre le processus selon lequel le médicament est assimilé par l'organisme.

L'analyse non compartimentale permet d'obtenir des paramètres cinétiques concernant l'exposition totale à un médicament, exprimé par l'AUC, le pic d'absorption, par la C_{max} et le T_{max} expérimentaux, ainsi que l'élimination par l'estimation de la demi-vie d'élimination.

D'autre part l'analyse compartmentale par modélisation individuelle, permet de définir le modèle mathématique selon lequel le médicament est disposé dans l'organisme, tout en permettant d'estimer des paramètres concernant l'absorption et la distribution de la molécule, qui sont par ailleurs indéterminables par une approche non compartimentale.

De plus, l'application de l'approche de modèles à effets mixtes permet d'estimer la variabilité inter-occasion ainsi que d'analyser les données de la population en une seule étape.

BIBLIOGRAPHIE

1. Gunderson CH, Lehmann CR, Sidell FR, et al. Nerve agents: a review. *Neurology* 1992 May;42 (5): 946-50.
2. Public health response to biological and chemical weapons: WHO guidance. *Biosecure Bioterror* 2005;3 (3): 268-9.
3. Ricordel I, Meunier J. [Chemical weapons: antidotes. View about the real means, perspectives]. *Ann Pharm Fr* 2000 Jan;58 (1): 5-12.
4. Dunn MA, Sidell FR. Progress in medical defense against nerve agents. *Jama* 1989 Aug 4;262 (5): 649-52.
5. Rousseau JM, Ruttimann M, Brinquin L. [Acute neurotoxic organophosphate poisoning: insecticides and chemical weapons]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2000 Oct;19 (8): 588-98.
6. Dawson RM. Review of oximes available for treatment of nerve agent poisoning. *J Appl Toxicol* 1994 Sep-Oct;14 (5): 317-31.
7. Lallement G, Denoyer M, Collet A, et al. Changes in hippocampal acetylcholine and glutamate extracellular levels during soman-induced seizures: influence of septal cholinergic cells. *Neurosci Lett* 1992 May 11;139 (1): 104-7.
8. Guidance document on the use of medicinal products for the treatment of patients exposed to terrorist attacks with chemical agents.: EMEA, 2003.
9. Fiche n° 2 " Neurotoxiques organophosphorés" (NOP's). AFSSAPS, 2003.
10. Shih TM, Duniho SM, McDonough JH. Control of nerve agent-induced seizures is critical for neuroprotection and survival. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003 Apr;188 (2): 69-80.
11. Shih TM, Rowland TC, McDonough JH. Anticonvulsants for nerve agent-induced seizures: The influence of the therapeutic dose of atropine. *J Pharmacol Exp Ther* 2007 Jan;320 (1): 154-61.

12. Knudson GB. Operation Desert Shield: medical aspects of weapons of mass destruction. *Mil Med* 1991 Jun;156 (6): 267-71.
13. Newmark J. Therapy for nerve agent poisoning. *Arch Neurol* 2004 May;61 (5): 649-52.
14. Nozaki H, Aikawa N. Sarin poisoning in Tokyo subway. *Lancet* 1995 Jun 3;345 (8962): 1446-7.
15. Okumura T, Takasu N, Ishimatsu S, et al. Report on 640 victims of the Tokyo subway sarin attack. *Ann Emerg Med* 1996 Aug;28 (2): 129-35.
16. Lallement G, Rüttimann M, F D. Les neurotoxiques organophosphorés. In: Eurotext JL, editor. *de Revel T Menace terroriste approche médicale*, 2005. 327-237.
17. Flaishon R, Sotman A, Ben-Abraham R, et al. Antichemical protective gear prolongs time to successful airway management: a randomized, crossover study in humans. *Anesthesiology* 2004 Feb;100 (2): 260-6.
18. Berkenstadt H, Ziv A, Barsuk D, et al. The use of advanced simulation in the training of anesthesiologists to treat chemical warfare casualties. *Anesth Analg* 2003 Jun;96 (6): 1739-42, table of contents.
19. Vardi A, Berkenstadt H, Levin I, et al. Intraosseous vascular access in the treatment of chemical warfare casualties assessed by advanced simulation: proposed alteration of treatment protocol. *Anesth Analg* 2004 Jun;98 (6): 1753-8, table of contents.
20. Carpentier P, Foquin A, Rondouin G, et al. Effects of atropine sulphate on seizure activity and brain damage produced by soman in guinea-pigs: ECoG correlates of neuropathology. *Neurotoxicology* 2000 Aug;21 (4): 521-40.
21. Ellinwood EH, Jr., Nikaido AM, Gupta SK, et al. Comparison of central nervous system and peripheral pharmacodynamics to atropine pharmacokinetics. *J Pharmacol Exp Ther* 1990 Dec;255 (3): 1133-9.

22. Hinderling PH, Gundert-Remy U, Schmidlin O. Integrated pharmacokinetics and pharmacodynamics of atropine in healthy humans. I: Pharmacokinetics. *J Pharm Sci* 1985 Jul;74 (7): 703-10.
23. Atropine Sulphate. *Martindale*. 34 ed, 2005. 477-9.
24. Willems JL, Langenberg JP, Verstraete AG, et al. Plasma concentrations of pralidoxime methylsulphate in organophosphorus poisoned patients. *Arch Toxicol* 1992;66 (4): 260-6.
25. Medicis JJ, Stork CM, Howland MA, et al. Pharmacokinetics following a loading plus a continuous infusion of pralidoxime compared with the traditional short infusion regimen in human volunteers. *J Toxicol Clin Toxicol* 1996;34 (3): 289-95.
26. Pralidoxime. *Martindale*. 34 ed, 2005. 1050.
27. Houzé P, Monnier C, Risède P, et al. Pharmacocinétique du méthylsulfate de pralidoxime chez le rat naïf et intoxiqué par le paraoxon. *SRLF congrès*, 2005.
28. McDonough JH, Jr., Dochterman LW, Smith CD, et al. Protection against nerve agent-induced neuropathology, but not cardiac pathology, is associated with the anticonvulsant action of drug treatment. *Neurotoxicology* 1995 Spring;16 (1): 123-32.
29. Taysse L, Daulon S, Delamanche S, et al. Protection against soman-induced neuropathology and respiratory failure: a comparison of the efficacy of diazepam and avizafone in guinea pig. *Toxicology* 2006 Aug 1;225 (1): 25-35.
30. Shih TM. Anticonvulsant effects of diazepam and MK-801 in soman poisoning. *Epilepsy Res* 1990 Nov;7 (2): 105-16.
31. Shih TM, Koviak TA, Capacio BR. Anticonvulsants for poisoning by the organophosphorus compound soman: pharmacological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 1991 Fall;15 (3): 349-62.

32. Lallement G, Carpentier P, Collet A, et al. Extracellular acetylcholine changes in rat limbic structures during soman-induced seizures. *Neurotoxicology* 1992 Fall;13 (3): 557-67.
33. Hayward IJ, Wall HG, Jaax NK, et al. Decreased brain pathology in organophosphate-exposed rhesus monkeys following benzodiazepine therapy. *J Neurol Sci* 1990 Aug;98 (1): 99-106.
34. Lallement G, Renault F, Baubichon D, et al. Compared efficacy of diazepam or avizafone to prevent soman-induced electroencephalographic disturbances and neuropathology in primates: relationship to plasmatic benzodiazepine pharmacokinetics. *Arch Toxicol* 2000 Oct;74 (8): 480-6.
35. Lipp J, Dola T. comparison of the efficacy of HS-6 versus HI-6 when combined with atropine, pyridostigmine and clonazepam for soman poisoning in the monkey. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1980 Jul;246 (1): 138-48.
36. Lallement G, Masqueliez C, Baubichon D, et al. Protection against soman-induced lethality of antidote combination atropine -pralidoxime-prodiazepam packaged as a freeze-dried form. . *J Med Chem Def* 2004;2: 1-11.
37. Maidment MP, Upshall DG. Pharmacokinetic of the conversion of a peptido-aminobenzophenone prodrug of diazepam in guinea pigs and rhesus monkeys. *J Biopharm Sci* 1990;1: 19-32.
38. Breton D, Buret D, Mendes-Oustric AC, et al. LC-UV and LC-MS evaluation of stress degradation behaviour of avizafone. *J Pharm Biomed Anal* 2006 Jun 16;41 (4): 1274-9.
39. Monographies du NORDAZ Vidal, 2005.
40. Mostacciolo ML, Danieli GA, Trevisan C, et al. Epidemiology of spinal muscular atrophies in a sample of the Italian population. *Neuroepidemiology* 1992;11 (1): 34-8.

41. Munsat TL, Skerry L, Korf B, et al. Phenotypic heterogeneity of spinal muscular atrophy mapping to chromosome 5q11.2-13.3 (SMA 5q). *Neurology* 1990 Dec;40 (12): 1831-6.
42. Melki J, Sheth P, Abdelhak S, et al. Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators. *Lancet* 1990 Aug 4;336 (8710): 271-3.
43. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995 Jan 13;80 (1): 155-65.
44. Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, et al. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 1997 Jul;16 (3): 265-9.
45. Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G. The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* 1997 Sep 19;90 (6): 1023-9.
46. Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, et al. A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* 1998 Nov 25;95 (5): 615-24.
47. Paushkin S, Gubitz AK, Massenet S, et al. The SMN complex, an assembly of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* 2002 Jun;14 (3): 305-12.
48. Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, et al. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 2002 Feb;70 (2): 358-68.
49. Roy N, Mahadevan MS, McLean M, et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 1995 Jan 13;80 (1): 167-78.

50. Drachman DB, Frank K, Dykes-Hoberg M, et al. Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol* 2002 Dec;52 (6): 771-8.
51. Frey JR, Kaeser HE, Krause R. Therapeutic trials with an anabolic steroid and hexahydrocoenzyme Q4 in a case of spinal muscular atrophy. *Eur Neurol* 1970;3 (5): 308-18.
52. Angelini C, Micaglio GF, Trevisan C. Guanidine hydrochloride in infantile and juvenile spinal muscular atrophy. A double blind controlled study. *Acta Neurol (Napoli)* 1980 Dec;2 (6): 460-5.
53. Harpey JP, Charpentier C, Paturneau-Jouas M, et al. Secondary metabolic defects in spinal muscular atrophy type II. *Lancet* 1990 Sep 8;336 (8715): 629-30.
54. Kinali M, Mercuri E, Main M, et al. Pilot trial of albuterol in spinal muscular atrophy. *Neurology* 2002 Aug 27;59 (4): 609-10.
55. Sumner CJ, Huynh TN, Markowitz JA, et al. Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Ann Neurol* 2003 Nov;54 (5): 647-54.
56. Weihl CC, Connolly AM, Pestronk A. Valproate may improve strength and function in patients with type III/IV spinal muscular atrophy. *Neurology* 2006 Aug;67 (3): 500-1.
57. Mercuri E, Bertini E, Messina S, et al. Pilot trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 2004 Feb;14 (2): 130-5.
58. Mercuri E, Bertini E, Messina S, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neurology* 2007 Jan 2;68 (1): 51-5.
59. Tzeng AC, Cheng J, Fryczynski H, et al. A study of thyrotropin-releasing hormone for the treatment of spinal muscular atrophy: a preliminary report. *Am J Phys Med Rehabil* 2000 Sep-Oct;79 (5): 435-40.
60. Miller RG, Moore DH, Dronsky V, et al. A placebo-controlled trial of gabapentin in spinal muscular atrophy. *J Neurol Sci* 2001 Oct 15;191 (1-2): 127-31.

61. Merlini L, Solari A, Vita G, et al. Role of gabapentin in spinal muscular atrophy: results of a multicenter, randomized Italian study. *J Child Neurol* 2003 Aug;18 (8): 537-41.
62. Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med* 1994 Mar 3;330 (9): 585-91.
63. Estevez AG, Stutzmann JM, Barbeito L. Protective effect of riluzole on excitatory amino acid-mediated neurotoxicity in motoneuron-enriched cultures. *Eur J Pharmacol* 1995 Jun 23;280 (1): 47-53.
64. Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, et al. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet* 1996 May 25;347 (9013): 1425-31.
65. Haddad H, Cifuentes-Diaz C, Miroglio A, et al. Riluzole attenuates spinal muscular atrophy disease progression in a mouse model. *Muscle Nerve* 2003 Oct;28 (4): 432-7.
66. Frugier T, Nicole S, Cifuentes-Diaz C, et al. The molecular bases of spinal muscular atrophy. *Curr Opin Genet Dev* 2002 Jun;12 (3): 294-8.
67. Cifuentes-Diaz C, Nicole S, Velasco ME, et al. Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Hum Mol Genet* 2002 Jun 1;11 (12): 1439-47.
68. Russman BS, Iannaccone ST, Samaha FJ. A phase 1 trial of riluzole in spinal muscular atrophy. *Arch Neurol* 2003 Nov;60 (11): 1601-3.
69. Doble A. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology* 1996 Dec;47 (6 Suppl 4): S233-41.
70. Monographie de Rilutek. 2007 .
71. Miller RG, Bouchard JP, Duquette P, et al. Clinical trials of riluzole in patients with ALS. ALS/Riluzole Study Group-II. *Neurology* 1996 Oct;47 (4 Suppl 2): S86-90; discussion S-2.

72. Le Liboux A, Lefebvre P, Le Roux Y, et al. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of riluzole in white subjects. *J Clin Pharmacol* 1997 Sep;37 (9): 820-7.
73. Bryson HM, Fulton B, Benfield P. Riluzole. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in amyotrophic lateral sclerosis. *Drugs* 1996 Oct;52 (4): 549-63.
74. Sanderink GJ, Bournique B, Stevens J, et al. Involvement of human CYP1A isoenzymes in the metabolism and drug interactions of riluzole in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1997 Sep;282 (3): 1465-72.
75. Groeneveld GJ, Van Kan HJ, Torano JS, et al. Inter- and intraindividual variability of riluzole serum concentrations in patients with ALS. *J Neurol Sci* 2001 Oct;15 (191): 121-5.
76. Hubert JP, Delumeau JC, Glowinski J, et al. Antagonism by riluzole of entry of calcium evoked by NMDA and veratridine in rat cultured granule cells: evidence for a dual mechanism of action. *Br J Pharmacol* 1994 Sep;113 (1): 261-7.
77. Martin D, Thompson MA, Nadler JV. The neuroprotective agent riluzole inhibits release of glutamate and aspartate from slices of hippocampal area CA1. *Eur J Pharmacol* 1993 Dec 21;250 (3): 473-6.
78. Couratier P, Sindou P, Esclaire F, et al. Neuroprotective effects of riluzole in ALS CSF toxicity. *Neuroreport* 1994 Apr 14;5 (8): 1012-4.
79. Mizoule J, Meldrum B, Mazadier M, et al. 2-Amino-6-trifluoromethoxy benzothiazole, a possible antagonist of excitatory amino acid neurotransmission--I. Anticonvulsant properties. *Neuropharmacology* 1985 Aug;24 (8): 767-73.
80. Berard C, Payan C, Fermanian J, et al. [A motor function measurement scale for neuromuscular diseases - description and validation study]. *Rev Neurol (Paris)* 2006 Apr;162 (4): 485-93.

81. Midha KK, Ormsby ED, Hubbard JW, et al. Logarithmic transformation in bioequivalence: application with two formulations of perphenazine. *J Pharm Sci* 1993 Feb;82 (2): 138-44.
82. Statistical approaches to establishing bioequivalence. Food and Drug Administration, Guidance for Industry January 2001.
83. Gabrielsson J, Weiner D. *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis: Concepts and Applications*. Forth ed. stockholm, Sweden: Swedish Pharamceutical Press, 2006.
84. Gibaldi M, Koup JR. Pharmacokinetic concepts - drug binding, apparent volume of distribution and clearance. *Eur J Clin Pharmacol* 1981;20 (4): 299-305.
85. Metzler CM. Assessment of variance in bioavailability studies: comments on the article by McNamara et al. *Pharm Res* 1987 Dec;4 (6): 536.
86. Samara E, Granneman R. Role of population pharmacokinetics in drug development. A pharmaceutical industry perspective. *Clin Pharmacokinet* 1997 Apr;32 (4): 294-312.
87. Beal SL, Sheiner BL. *NONMEM user's guides*. An Francisco: NONMEM project group: University of California, 1992.
88. Mallet A, Mentre F, Steimer JL, et al. Nonparametric maximum likelihood estimation for population pharmacokinetics, with application to cyclosporine. *J Pharmacokinet Biopharm* 1988 Jun;16 (3): 311-27.
89. Sheiner LB, Rosenberg B, Melmon KL. Modelling of individual pharmacokinetics for computer-aided drug dosage. *Comput Biomed Res* 1972 Oct;5 (5): 411-59.
90. Sheiner LB, Rosenberg B, Marathe VV. Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data. *J Pharmacokinet Biopharm* 1977 Oct;5 (5): 445-79.

91. Davidian M, Giltinian DM. *Nonlinear Models for Repeated Measurement Data*. London: Chapman et Hall, 1995.
92. Schumitzky A. Nonparametric. EM algorithms for estimating prior distributions. *Applied Math and Comput* 1991;45: 141-57.
93. Bajgar J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv Clin Chem* 2004;38: 151-216.
94. McDonough JH, Jr., McMonagle J, Copeland T, et al. Comparative evaluation of benzodiazepines for control of soman-induced seizures. *Arch Toxicol* 1999 Nov;73 (8-9): 473-8.
95. Worek F, Widmann R, Knopff O, et al. Reactivating potency of obidoxime, pralidoxime, HI 6 and HLo 7 in human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by highly toxic organophosphorus compounds. *Arch Toxicol* 1998 Mar;72 (4): 237-43.
96. Capacio BR, Shih TM. Anticonvulsant actions of anticholinergic drugs in soman poisoning. *Epilepsia* 1991 Sep-Oct;32 (5): 604-15.
97. Sarin RK, Sharma GP, Varshney KM, et al. Determination of diazepam in cold drinks by high-performance thin-layer chromatography. *J Chromatogr A* 1998 Oct 2;822 (2): 332-5.
98. El Mahjoub A, Staub C. High-performance liquid chromatographic method for the determination of benzodiazepines in plasma or serum using the column-switching technique. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000 Jun 9;742 (2): 381-90.
99. Robertson MD, Drummer OH. High-performance liquid chromatographic procedure for the measurement of nitrobenzodiazepines and their 7-amino metabolites in blood. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995 May 5;667 (1): 179-84.
100. Samanidou VF, Pechlivanidou AP, Papadoyannis IN. Development of a validated HPLC method for the determination of four 1,4-benzodiazepines in human biological fluids. *J Sep Sci* 2007 Mar;30 (5): 679-87.

101. Jones CE, Wians FH, Jr., Martinez LA, et al. Benzodiazepines identified by capillary gas chromatography-mass spectrometry, with specific ion screening used to detect benzophenone derivatives. *Clin Chem* 1989 Jul;35 (7): 1394-8.
102. Kleinschnitz M, Herderich M, Schreier P. Determination of 1,4-benzodiazepines by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996 Feb 9;676 (1): 61-7.
103. Laloup M, Fernandez Mdel M, Wood M, et al. Detection of diazepam in urine, hair and preserved oral fluid samples with LC-MS-MS after single and repeated administration of Myolastan and Valium. *Anal Bioanal Chem* 2007 Aug;388 (7): 1545-56.
104. McClean S, O'Kane E, Hillis J, et al. Determination of 1,4-benzodiazepines and their metabolites by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography using ultraviolet and electrospray ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1999 Apr 9;838 (1-2): 273-91.
105. McClean S, O'Kane EJ, Smyth WF. The identification and determination of selected 1,4-benzodiazepines by an optimised capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometric method. *Electrophoresis* 2000 Apr;21 (7): 1381-9.
106. Houze P, Borron SW, Scherninski F, et al. Measurement of serum pralidoxime methylsulfate (Contrathion) by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005 Jan 5;814 (1): 149-54.
107. Rbeida O, Christiaens B, Hubert P, et al. Integrated on-line sample clean-up using cation exchange restricted access sorbent for the LC determination of atropine in human plasma coupled to UV detection. *J Pharm Biomed Anal* 2005 Jan 4;36 (5): 947-54.
108. Boermans PA, Go HS, Wessels AM, et al. Quantification by HPLC-MS/MS of atropine in human serum and clinical presentation of six mild-to-moderate intoxicated atropine-adulterated-cocaine users. *Ther Drug Monit* 2006 Jun;28 (3): 295-8.

109. J. Bayer, F.T. Peters, T. Kraemer, et al. *J Mass Spectrom* 2007;42: 621.
110. Eckert M, Hinderling PH. Atropine: a sensitive gas chromatography-mass spectrometry assay and prepharmacokinetic studies. *Agents Actions* 1981 Nov;11 (5): 520-31.
111. Pihlajamaki K, Kanto J, Aaltonen L, et al. Pharmacokinetics of atropine in children. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1986 May;24 (5): 236-9.
112. Kentala E, Kaila T, Kanto J. Intramuscular atropine in elderly people: pharmacokinetic studies using the radioreceptor assay and some pharmacodynamic responses. *Pharmacol Toxicol* 1989 Aug;65 (2): 110-3.
113. Hardman JG, Limbird LE, editors. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Ninth Edition ed: McGraw-Hill, 2001.
114. Wetherell J, Price M, Mumford H, et al. Development of next generation medical countermeasures to nerve agent poisoning. *Toxicology* 2007 Apr 20;233 (1-3): 120-7.
115. Carpentier P, Lambrinidis M, Blanchet G. Early dendritic changes in hippocampal pyramidal neurones (field CA1) of rats subjected to acute soman intoxication: a light microscopic study. *Brain Res* 1991 Feb 15;541 (2): 293-9.
116. McDonough JH, Jr., Shih TM. Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev* 1997 Sep;21 (5): 559-79.
117. Carpentier P, Foquin-Tarricone A, Bodjarian N, et al. Anticonvulsant and antilethal effects of the phencyclidine derivative TCP in soman poisoning. *Neurotoxicology* 1994 Winter;15 (4): 837-51.
118. McDonough JH, Jr., Shih TM. Pharmacological modulation of soman-induced seizures. *Neurosci Biobehav Rev* 1993 Summer;17 (2): 203-15.
119. Eddleston M, Buckley NA, Eyer P, et al. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet* 2008 Feb 16;371 (9612): 597-607.

120. Lallement G. [Interest in an glutamate antagonistic compound for the treatment of organophosphate poisoning]. *Ann Pharm Fr* 2000 Jan;58 (1): 17-9.
121. Rowland M. *Towards better safety of drugs and pharmaceutical products*. . Amsterdam: Elsevier North-Holland, 1980.
122. Bonate P. *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation*: Springer, 2006.
123. Ludden TM, Beal SL, Sheiner LB. Comparison of the Akaike Information Criterion, the Schwarz criterion and the F test as guides to model selection. *J Pharmacokinet Biopharm* 1994 Oct;22 (5): 431-45.
124. Carpentier P, Lallement G, Bodjarian N, et al. Effects of paraldehyde on the convulsions induced by administration of soman in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 1992;6 (7): 309-18.
125. Eddleston M. The pathophysiology of organophosphorus pesticide self-poisoning is not so simple. *Neth J Med* 2008 Apr;66 (4): 146-8.
126. Pawar KS, Bhoite RR, Pillay CP, et al. Continuous pralidoxime infusion versus repeated bolus injection to treat organophosphorus pesticide poisoning: a randomised controlled trial. *Lancet* 2006 Dec 16;368 (9553): 2136-41.
127. Hmouda H, Ben Salem C, Bouraoui K. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet* 2008 Jun 28;371 (9631): 2169-70; author reply 70-1.
128. Thomas NH, Dubowitz V. The natural history of type I (severe) spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 1994 Sep-Nov;4 (5-6): 497-502.
129. Ignatius J. The natural history of severe spinal muscular atrophy--further evidence for clinical subtypes. *Neuromuscul Disord* 1994 Sep-Nov;4 (5-6): 527-8.
130. Greensmith L, Vrbova G. Possible strategies for treatment of SMA patients: a neurobiologist's view. *Neuromuscul Disord* 1995 Sep;5 (5): 359-69.

131. Bruno R, Vivier N, Montay G, et al. Population pharmacokinetics of riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Pharmacol Ther* 1997 Nov;62 (5): 518-26.
132. Le Liboux A, Cachia JP, Kirkesseli S, et al. A comparison of the pharmacokinetics and tolerability of riluzole after repeat dose administration in healthy elderly and young volunteers. *J Clin Pharmacol* 1999 May;39 (5): 480-6.
133. Groeneveld GJ, Van Kan HJ, Kalmijn S, et al. Riluzole serum concentrations in patients with ALS: associations with side effects and symptoms. *Neurology* 2003 Oct 28;61 (8): 1141-3.
134. Groeneveld GJ, van Kan HJ, Lie AHL, et al. An association study of riluzole serum concentration and survival and disease progression in patients with ALS. *Clin Pharmacol Ther* 2008 May;83 (5): 718-22.
135. Grant P, Lougee L, Hirschtritt M, et al. An open-label trial of riluzole, a glutamate antagonist, in children with treatment-resistant obsessive-compulsive disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2007 Dec;17 (6): 761-7.
136. Benet LZ, Hoener BA. Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2002 Mar;71 (3): 115-21.