



N°1958/18

ANNEE : 2017-2018

## THESE

Présentée en vue de l'obtention du

### DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

**BONY N'DA ALIPHA NELLY MARGUERITE**

**MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE DANS LE  
PLASMA, PAR HPLC-DAD DU DIAZEPAM : LA BENZODIAZEPINE LA PLUS  
UTILISEE DANS LE DISTRICT D'ABIDJAN.**

*Soutenue publiquement le 19 Octobre 2018*

#### COMPOSITION DU JURY :

<b>Président</b>	: Monsieur ABROGOUA DANHO PASCAL, Professeur Titulaire
<b>Directeur de thèse</b>	: Madame SANGARE TIGORI BEATRICE, Maître de Conférences Agrégé
<b>Assesseurs</b>	: Monsieur AMIN N'CHO CHRISTOPHE, Maître de Conférences Agrégé Madame KOUASSI AGBESSI THERESE, Maître-assistante

**ADMINISTRATION ET PERSONNEL ENSEIGNANT  
DE L'UFR SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET  
BIOLOGIQUES**

## **I. HONORARIAT**

Directeurs/Doyens Honoraires :

Professeur RAMBAUD André  
Professeur FOURASTE Isabelle  
Professeur BAMBA Moriféré  
Professeur YAPO Abbé †  
Professeur MALAN Kla Anglade  
Professeur KONE Moussa †  
Professeur ATINDEHOU Eugène

## **II. ADMINISTRATION**

Directeur	Professeur KONE Bamba
Sous-Directeur Chargé de la Pédagogie	Professeur Ag IRIE N'GUESSAN
Sous-Directeur Chargé de la Recherche	Professeur DEMBELE Bamory
Secrétaire Principal	Madame NADO-AKPRO Marie
Documentaliste	Monsieur N'GNIMMIEN Koffi
Intendant	Monsieur GAHE Alphonse
Responsable de la Scolarité	Madame DJEDJE Yolande

## **III. PERSONNEL ENSEIGNANT PERMANENT**

### **1. PROFESSEURS TITULAIRES**

Mme AKE Michèle	Chimie Analytique, Bromatologie
Mme ATTOUNGBRE HAUHOUOT M	Biochimie et Biologie Moléculaire
M DANO Djédjé Sébastien	Toxicologie.
Mme KONE BAMBA Diéneba	Pharmacognosie
M KOUADIO Kouakou Luc	Hydrologie, Santé Publique
M MALAN Kla Anglade	Chimie Analytique, Bromatologie
M MENAN Eby Ignace	Parasitologie – Mycologie
M YAVO William	Parasitologie – Mycologie
M MONNET Dagui	Biochimie et Biologie Moléculaire
Mme SAWADOGO Duni	Hématologie
M ABROGOUA Danho Pascal	Pharmacie Clinique
M INWOLEY Kokou André	Immunologie

Mme KOUAKOU-SIRANSY Gisèle

Pharmacologie

## 2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M AHIBOH Hugues

Biochimie et Biologie moléculaire

Mme AKE EDJEME N'guessan Angèle

Biochimie et Biologie moléculaire

M AMARI Antoine Serge G.

Législation

M BONY François Nicaise

Chimie Analytique

M DALLY Laba

Pharmacie Galénique

M DJOHAN Vincent

Parasitologie -Mycologie

M AMIN N'Cho Christophe

Chimie analytique

M DEMBELE Bamory

Immunologie

M GBASSI K. Gildas

Chimie Physique Générale

2Mme IRIE N'GUESSAN Amenan

Pharmacologie

M KOFFI Angely Armand

Pharmacie Galénique

Mme POLNEAU VALLEE Sandrine

Mathématiques-Statistiques

Mme SACKOU KOUAKOU Julie

Santé Publique

Mme SANGARE TIGORI Béatrice

Toxicologie

M KOUASSI Dinard

Hématologie

M LOUKOU Yao Guillaume

Bactériologie-Virologie

M OGA Agbaya Stéphane

Santé publique / Economie de la santé

M OUASSA Timothée

Bactériologie-Virologie

M OUATTARA Mahama

Chimie thérapeutique et organique

M YAPI Ange Désiré

Chimie Organique et thérapeutique

M ZINZENDORF Nanga Yéssé

Bactériologie – Virologie

## 3. MAITRES ASSISTANTS

M. ADJAMBRI Adia Eusebé

Hématologie

M. ADJOUNGOUA Attoli Léopold

Pharmacognosie

Mme ABOLI-AFFI Mihessé Roseline

Immunologie

Mme AKA ANY-GRAH Armelle Adjoua

Pharmacie Galénique

Mme ALLA-HOUNSA Annita Emeline

Santé Publique

M ANGORA Kpongbo Etienne

Parasitologie – Mycologie

Mme AYE-YAYO Mireille	Hématologie
Mme BAMBA-SANGARE Mahawa	Biologie Générale
Mme BARRO-KIKI Pulchérie	Parasitologie – Mycologie
M. CABLAN Mian N'Ddey Asher	Bactériologie-Virologie
M. CLAON Jean Stéphane	Santé Publique
Mme DIAKITE Aïssata	Toxicologie
Mme FOFIE N'Guessan Bra Yvette	Pharmacognosie
M. KASSI Kondo Fulgence	Parasitologie-Mycologie
Mme KONAN-ATTIA Akissi Régine	Santé publique
M. KONAN Konan Jean Louis	Biochimie et Biologie moléculaire
Mme KONATE Abibatou	Parasitologie-Mycologie
Mme KOUASSI-AGBESSI Thérèse	Bactériologie-Virologie
M. MANDA Pierre	Toxicologie
M. KONAN Jean Fréjus	Biophysique
M.N'GUESSAN Alain	Pharmacie Galénique
Mme VANGA ABO Henriette	Parasitologie-Mycologie
M. YAYO Sagou Eric	Biochimie et Biologie moléculaire

#### **4. ASSISTANTS**

M. ADIKO Aimé Cézaire	Immunologie
M. AMICHIA Attoumou Magloire	Pharmacologie
Mme AKOUBET-OUAYOGODE Aminata	Pharmacognosie
M. ALLOUKOU-BOKA Paule-Mireille	Législation
Mme. APETE Sandrine	Bactériologie-Virologie
Mme BEDIKON-GOKPEYA Mariette	Santé publique
Mme BLAO-N'GUESSAN Amoin Rebecca	Hématologie
M. BROU Amani Germain	Chimie Analytique
M. BROU N'Guessan Aimé	Pharmacie clinique
M. COULIBALY Songuigama	Chimie organique et thérapeutique
M. DJADJI Ayoman Thierry Lenoir	Pharmacologie

M. DJATCHI Richmond Anderson	Bactériologie-Virologie
Mme DONOU-N'DRAMAN Aha Emma	Hématologie
Mme. DOTIA Tiepordan Agathe	Bactériologie-Virologie
M. EFFO Kouakou Etienne	Pharmacologie
Mme KABLAN-KASSI Hermance	Hématologie
M. KABRAN Tano Kouadio Mathieu	Immunologie
M. KACOU Alain	Chimie organique et thérapeutique
M. KAMENAN Boua Alexis Thierry	Pharmacologie
M. KOFFI Kouamé	Santé publique
Mme KONE Fatoumata	Biochimie et Biologie moléculaire
M. KOUAHO Avi Kadio Tanguy	Chimie organique et thérapeutique
M. KOUAKOU Sylvain Landry	Pharmacologie
M. KOUAME Denis Rodrigue	Immunologie
M. KOUAME Jérôme	Santé publique
M. KPAIBE Sawa Andre Philippe	Chimie Analytique
Mme KRIZO Gouhonon Anne-Aymonde	Bactériologie-Virologie
M. LATHRO Joseph Serge	Bactériologie-Virologie
M. MIEZAN Jean Sébastien	Parasitologie-Mycologie
M. N'GBE Jean Verdier	Toxicologie
M. N'GUESSAN Déto Ursul Jean-Paul	Chimie organique et thérapeutique
Mme N'GUESSAN Kakwokpo Clémence	Pharmacie Galénique
Mme. N'GUESSAN-AMONKOU Anne Cynthia	Législation
Mme. ODOH Alida Edwige	Pharmacognosie
Mme. SIBLI-KOFFI Akissi Joëlle	Biochimie et Biologie moléculaire
M. SICA-DIAKITE Amelanh	Chimie organique et thérapeutique
Mme. TANOH-BEDIA Valérie	Parasitologie-Mycologie
M. TRE Eric Serge	Chimie Analytique
Mme TUO Awa	Pharmacie Galénique
M. YAPO Assi Vincent De Paul	Biologie Générale

Mme. YAPO-YAO Carine Mireille

Biochimie

## **5. CHARGES DE RECHERCHE**

Mme. ADIKO N'dri Marcelline

Pharmacognosie

Mme. OUATTARA N'gnôh Djénéba

Santé publique

## **6. ATTACHE DE RECHERCHE**

M. LIA Gnahoré José Arthur

Pharmacie Galénique

## **7. IN MEMORIUM**

Feu KONE Moussa

Professeur Titulaire

Feu YAPO Abbé Etienne

Professeur Titulaire

Feu COMOIE Léopold

Maître de Conférences Agrégé

Feu GUEU Kaman

Maître Assistant

Feu ALLADOUM Nambelbaye

Assistant

Feu COULIBALY Sabali

Assistant

Feu TRAORE Moussa

Assistant

Feu YAPO Achou Pascal

Assistant

## **IV. ENSEIGNANTS VACATAIRES**

### **1. PROFESSEURS**

M. DIAINE Charles

Biophysique

M. OYETOLA Samuel

Chimie Minérale

M ZOUZOU Michel

Cryptogamie

### **2 MAITRES DE CONFERENCES**

M. KOUAKOU Tanoh Hilaire

Botanique et Cryptogamie

M. SAKO Aboubakar

Physique (Mécanique des fluides)

Mme. TURQUIN née DIAN Louise

Biologie Végétale

M. YAO N'Dri Athanase

Pathologie Médicale

### **3 MAITRE-ASSISTANT**

M KONKON N'Dri Gilles

Botanique, Cryptogamie

### **4 NON UNIVERSITAIRES**

M AHOUSSE Daniel Ferdinand

Secourisme

M DEMPAAH Anoh Joseph

Zoologie

M GOUPEO Evariste

Techniques officinales

Mme KEI-BOGUINARD Isabelle	Gestion
M KOFFI ALEXIS	Anglais
M KOUA Amian	Hygiène
M KOUASSI Ambroise	Management
M N'GOZAN Marc	Secourisme
M KONAN Kouacou	Diététique
Mme PAYNE Marie	Santé Publique



**COMPOSITION DES LABORATOIRES ET  
DEPARTEMENTS DE L'UFR DES SCIENCES  
PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES**

## **I. BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE**

Professeur	LOUKOU Yao Guillaume	Maître de Conférences Agrégé Chef du département
Professeurs	ZINZENDORF Nanga Yessé	Maître de Conférences Agrégé
	OUASSA Timothée	Maître de Conférences Agrégé
Docteurs	KOUASSI AGBESSI Thérèse	Maître-assistante
	CABLAN Mian N'Dédey A.	Maître-assistant
	DOTIA Tiepordan Agathe	Assistante
	LATHRO Joseph Serge	Assistant
	APETE Yah Sandrine	Assistante
	KRIZO Gouhonnon A.A	Assistante
	DJATCHI Richmond A.	Assistant

## **II. BIOCHIMIE, BIOLOGIE MOLECULAIRE, BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION ET PATHOLOGIE MEDICALE**

Professeur	MONNET Dagui	Professeur Titulaire Chef du Département
Professeurs	HAUHOUOT épse ATTOUNGBRE M. L.	Professeur Titulaire
	AHIBOH Hugues	Maître de Conférences Agrégé
	AKE EDJEME N'Guessan Angèle	Maître de Conférences Agrégé
Docteurs	YAYO Sagou Eric	Maître-assistant
	KONAN Konan Jean Louis	Maître-assistant
	KONE Fatoumata	Assistante
	KOFFI Akissi Joelle épse SIBLI	Assistante
	YAPO NEE YAO Carine Mireille	Assistante

## **III. BIOLOGIE GENERALE, HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE**

Professeur	SAWADOGO Duni	Professeur Titulaire Chef du Département
Professeurs	INWOLEY Kokou André	Professeur Titulaire
	KOUASSI Dinard	Maître de Conférences Agrégé
	DEMBELE Bamory	Maître de Conférences Agrégé
Docteurs	SANGARE Mahawa	Maître-assistante
	AFFI-ABOLI Mihessé Roseline	Maître-Assistante
	ADJAMBRI Adia Eusebé	Maître-assistant

AYE YAYO Mireille	Maître-assistante
KABRAN Tano K. Mathieu	Assistant
KOUAME Denis Rodrigue	Assistant
N'GUESSAN-BLAO R. S.	Assistante
YAPO Assi Vincent De Paul	Assistant
ADIKO Assi Aimé Cézaire	Assistant
DONOU NEE N'DRAMAN Aha Emma	Assistante
KABLAN-KASSI Hermance	Assistant

#### **IV. CHIMIE ANALYTIQUE, CHIMIE MINERALE ET GENERALE, TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE**

Professeur	MALAN Kla Anglade	Professeur Titulaire Chef du Département
Professeurs	AKE Michèle Dominique	Professeur Titulaire
	AMIN N'Cho Christophe	Maître de Conférences Agrégé
	GBASSI K. Gildas	Maître de Conférences Agrégé
	BONY Nicaise François	Maître de Conférences Agrégé
Docteurs	BROU Amani Germain	Assistant
	KPAIBE Sawa Andre Philippe	Assistant
	TRE Eric Serge	Assistant

#### **V. CHIMIE ORGANIQUE ET CHIMIE THERAPEUTIQUE**

Professeur	OUATTARA Mahama	Maître de Conférences Agrégé Chef du Département
Professeur	YAPI Ange Désiré	Maître de Conférences Agrégé
Docteurs	KACOU Alain	Assistant
	N'GUESSAN Déto Ursul Jean-Paul	Assistant
	COULIBALY Songuigama	Assistant
	SICA NEE DIAKITE Amelanh	Assistante
	KOUAHO Avi Kadio Tanguy	Assistant

#### **VI. PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE, BIOLOGIE ANIMALE ET ZOOLOGIE**

Professeur	MENAN Eby Ignace H.	Professeur Titulaire Chef du Département
Professeurs	YAVO William	Professeur Titulaire
	DJOHAN Vincent	Maître de Conférences Agrégé

Docteurs	BARRO KIKI Pulchérie	Maître-assistante
	KASSI Kondo Fulgence	Maître-assistant
	VANGA ABO Henriette	Maître-assistante
	ANGORA Kpongbo Etienne	Maître-assistant
	KONATE Abibatou	Maître-assistante
	TANO H NEE BEDIA Akoua Valérie	Assistante
	MIEZAN Jean Sébastien	Assistant

## **VII. PHARMACIE GALENIQUE, BIOPHARMACIE, COSMETOLOGIE, GESTION ET LEGISLATION PHARMACEUTIQUE**

Professeur	KOFFI Armand A.	Maître de Conférences Agrégé Chef du Département
Professeurs	AMARI Antoine Serge G.	Maître de Conférences Agrégé
	DALLY Laba Ismaël	Maître de Conférences Agrégé
Docteurs	AKA-ANY Grah Armelle A.S.	Maître-assistante
	N'GUESSAN Alain	Maître-assistant
	BOKA Paule Mireille épse A.	Assistante
	N'GUESSAN Kakwopko C.	Assistante
	TUO Awa Nakognon	Assistante
	N'GUESSAN NEE AMONKOU Anne C.	Assistante
	LIA Gnahoré José Arthur	Attaché de recherche

## **VIII. PHARMACOGNOSIE, BOTANIQUE, BIOLOGIE VEGETALE, CRYPTOGRAMIE,**

Professeur	KONE BAMBA Diénéba	Professeur Titulaire Chef du Département
Docteurs	FOFIE N'Guessan Bra Yvette	Maître-Assistante
	ADJOUNGOUA Attoli Léopold	Maître-Assistant
	OUAYOGODE-AKOUBET Aminata	Assistante
	ODOH Alida Edwige	Assistante
	ADIKO N'dri Marcelline	Chargée de recherche

**IX. PHARMACOLOGIE, PHARMACIE CLINIQUE ET THERAPEUTIQUE, ET  
PHYSIOLOGIE HUMAINE**

Professeurs	ABROGOUA Danho Pascal	Professeur Titulaire
		Chef du Département
	KOUAKOU SIRANSY N'doua G.	Professeur Titulaire
	IRIE N'GUESSAN Amenan G.	Maître de Conférences Agrégé
Docteurs	AMICHIA Attoumou M.	Assistant
	DJADJI Ayoman Thierry Lenoir	Assistant
	EFFO Kouakou Etienne	Assistant
	KAMENAN Boua Alexis	Assistant
	KOUAKOU Sylvain Landry	Assistant
	BROU N'GUESSAN Aime	Assistant

**X. PHYSIQUE, BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES, STATISTIQUES ET  
INFORMATIQUE**

Professeur	POLNEAU VALLEE Sandrine	Maître de conférences Agrégé
		Chef de Département
Docteur	KONAN Jean-Fréjus	Maître-Assistant

**XI. SANTE PUBLIQUE, HYDROLOGIE ET TOXICOLOGIE**

Professeurs	KOUADIO Kouakou Luc	Professeur Titulaire
		Chef du département
	DANO Djédjé Sébastien	Professeur Titulaire
	OGA Agbaya Stéphane	Maître de Conférences Agrégé
	SANGARE Tigori B.	Maître de Conférences Agrégé
	SACKOU KOUAKOU J.	Maître de conférences Agrégé
Docteurs	CLAON Jean Stéphane	Maître-assistant
	MANDA Pierre	Maître-assistant
	DIAKITE Aissata	Maître-Assistante
	HOUNSA-ALLA Annita Emeline	Maître-assistante
	YAO ATTIA Akissi Régine	Maître-assistante
	N'GBE Jean Verdier	Assistant
	KOFFI Kouamé	Assistant
	BEDIAKON NEE GOKPEYA K	Assistante
	OUATTARA N'gnôh Djénéba	Chargée de Recherche

# DEDICACES

*Aucun mot ne saurait exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance.*

*Aussi, c'est d'une modeste manière que :*

*Je dédie cette thèse...*

**A Dieu le Père Tout-puissant**, Gloire, louange et honneur à toi oh père, qui m'a permis de mener à bien ce travail et qui permet ce moment. Merci de m'avoir donné la force, la sagesse et l'intelligence nécessaire pour aboutir à cette œuvre; elle est la tienne.

Que la gloire et l'honneur te reviennent éternel Dieu.

**Psaumes ch 32 V 8** : *'je t'instruirai et je monterai la voie que tu dois suivre ; je te conseillerai, j'aurai le regard sur toi'*.

#### ***A MON PERE : BONY INDAT JEAN MARIE VIANNEY***

Mon doux papa, toi qui occupe à jamais la place qu'aucun autre homme ne pourra occuper ; ce travail est pour moi le moyen de t'honorer, tu as fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Papa tu es une véritable école de la vie, je ne cesse d'apprendre tous les jours auprès de toi. Ce travail est le fruit de l'éducation que tu m'as donné. Que Dieu te garde longtemps et qu'il m'aide à prendre soin de toi tout le reste de ta vie comme tu l'as fait avec assiduité pour moi depuis ma naissance.

#### ***A MA MERE : BONY Née HOUESSOUE MARIE***

Ma tendre et vaillante mère, toi qui a toujours été pour moi un pilier; en ce jour j'ai une pensée spéciale pour toi. Tu as toujours été là pour moi et à aucun moment tu n'as cessé de me couvrir de tes bénédictions m'assurant à maintes reprises que je réussirai ma vie. Je saisi cette occasion pour te remercier infiniment pour tous les sacrifices que tu as pu consentir pour moi, jamais je ne pourrais te le rendre. De la haut ou tu es je sais que tu es si fière de la pharmacienne que je suis devenue. Désormais ange, mère veille davantage sur tes enfants que tu as laissés.

Reposes en paix ma douce Maman, je ne t'oublierai jamais.

***A MON JUMENTO CEDRIC HENRI et A MA SŒUR CHERIE CECILE***

Il n'y a pas de plus belle occasion que celle-ci pour vous exprimer tout l'amour que je vous porte. Sachez que vous êtes pour moi tout ce que j'ai de plus précieux sur la terre. Que DIEU permette que nous restions toujours unis et qu'il bénisse tous vos projets. Je vous aime très fort.

***A M. GBEDE ATHANASE,***

J'exprime ma profonde gratitude à toi mon oncle; car tu m'as conduit pour la première fois à l'école des Pharmaciens (tronc commun) et tes encouragements m'ont permis d'atteindre mon rêve. Merci énormément tonton.

***A M. OUATTARA IBRAHIM,***

Vous qui n'avez jamais cessé de m'encourager tout au long de mon cursus je vous dis infiniment merci à travers cette thèse. Que Dieu vous bénisse.



# REMERCIEMENTS

*Du plus profond du cœur, c'est tout simplement que je voudrais dire  
merci à :*

***A NOTRE CHER MAITRE LE PROFESSEUR SANGARE-TIGORI BEATRICE,***

Cher maitre recevez ma profonde reconnaissance pour votre disponibilité, votre  
patience et vos conseils. Que Dieu vous bénisse incessamment.

***TOUT LE PERSONNEL DU DEPARTEMENT DE TOXICOLOGIE***

Pr.DANO DJEDJE, Dr DIAKITE, Dr MANDA, Dr N'GBE. Grâce à vous, j'ai pu  
mener à bien mes travaux. Je vous en suis très reconnaissante. Que Dieu vous protège et  
vous bénisse.

***A GBETE YOLOU AUBIN, MON CHOUBEB***

Pour l'amour exemplaire dont tu me témoignes. Dans ta bonté, ta sérénité et ton  
humanité j'ai puisé le courage pour persévérer. Puisse cette thèse constituer pour toi un  
solide témoignage de mon sincère amour. Je t'aime mon choubeb.

***TOUT LE PERSONNEL DU SERVICE DE TOXICOLOGIE DU LABORATOIRE  
NATIONALE DE SANTE PUBLIQUE***

Vous m'avez permis de mener à bien mes activités de recherche et de dosages dans  
vos locaux. Je vous remercie du fonds du cœur.

Que l'Eternel veille sur vous et vos familles.

***A TOUT LE PERSONNEL DU SERVICE DE CHIMIE ET TOXICOLOGIE DE LA  
DIRECTION DU LABORATOIRE CENTRAL DE LA POLICE***

Je vous suis très reconnaissante de m'avoir accueilli dans vos locaux dans le cadre  
de mes travaux de recherche.

M. Dibi, chefs Yoro, Tchimou et Kouamé votre disponibilité et votre hospitalité m'ont permis de mener à bien ce travail. Merci d'être restés travailler avec moi parfois jusqu'à des heures tardives les soirs. Je n'oublierai jamais cela.

***A MES TANTES, ONCLES***

Merci pour votre présence dans ma vie. Que le tout puissant vous le rende au centuple.

***ALLY, EMMA,***

Bien plus que des amis vous êtes désormais des frères et sœurs que la vie m'a donnés. Puisse Dieu vous accorder bonheur et succès

***A MES AMIS DE LONGUE DATE***

Jeanne, Marie-blanc, Arielle, Aminata, Serge Akon, merci pour votre soutien et pour votre présence dans ma vie. Que Dieu vous bénisse.

***A CHRISTELLE ET INNOCENTE,***

Vos conseils et votre amitié m'ont été d'une grande aide. Merci pour les moments de prière.

***AUX PHARMACIENS 7 ETOILES (P7E),***

Grand merci à tous les amis de la 33<sup>ème</sup> promotion. Que DIEU trace pour nous les sillons d'un lendemain meilleur.

***A LA PROMOTION MASTER DE TOXICOLOGIE***

Merci pour votre soutien moral.

***A MES SŒURS DE STYL'FEM : Karen, Dany, Héléna, Maiga, Férima, Lydie, Angéla***

Ce travail vous est dédié avec toute ma reconnaissance et mon amitié sincère. Puisse Dieu nous garder unies autour de notre activité.

***A TOUS LES ETUDIANTS DE L'UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES,***

Merci pour nos relations qui ont toujours été cordiales. Courage ! Courage ! Courage !

***A TOUTE L'ASSEMBLEE ICI PRESENTE,***

Merci de m'accorder votre temps.

***A TOUS CEUX QUI, DE PRES OU DE LOIN, NOUS ONT SOUTENUS,***

Recevez nos remerciements.

# IN MEMORIUM

***WILLY,***

Mon frère, tu es partie si tôt de ma vie, voici ta petite sœur est devenue Pharmacien, j'espère que de la haut où tu es désormais tu fière de moi. Que le Seigneur veille sur toi ; et saches que j'ai une pensée spéciale pour toi en ce jour. Reposes en paix Willy.

***PEPE THOMAS, ONCLE ACHILLE,***

Chers pépé et oncle c'est à vous que tout ce travail revient. Reposez en paix.

***KOUASSI N'DAH FRANCK, SIAGBE CLEMENT,***

La vie a décidé que vous soyez absent ce jour, la bougie de l'amitié qui nous lie sera toujours allumée dans mon cœur. Que le Seigneur guide vos âmes.

# **A NOS MAITRES ET JUGES**

## A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DU JURY

### **Monsieur le Professeur ABROGOUA DANHO PASCAL**

- Professeur Titulaire de Pharmacie Clinique (UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny)
- Chef de Département de Pharmacologie, de Pharmacie clinique et Thérapeutique (UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny)
- Docteur de l'Université de Lyon en Pharmacie Clinique (France)
- Ancien Interne des Hôpitaux d'Abidjan
- Pharmacien Hospitalier au CHU de Cocody
- Membre du comité pédagogique de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny
- Titulaire du Master de Pharmaco-économie de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lyon (France)
- Titulaire des DESS de Toxicologie et de Contrôle qualité des médicaments (UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny)
- Membre associé de l'Association Nationale des Enseignants de Pharmacie Clinique de France (ANEPC)
- Membre de la Société Française de Pharmacie Clinique (SFPC)
- Membre de la Société Ivoirienne de Toxicologie (SITOX).

*Honorable Maître,*

*Nous sommes marqués par votre grande modestie et très sensible à l'honneur que Vous nous faites en acceptant de présider notre jury de thèse.*

*Nous avons eu le privilège de bénéficier de vos qualités d'enseignant méticuleux et rigoureux, durant notre parcours universitaire.*

*Vous avez toujours suscité notre admiration.*

*Nous Vous prions de trouver ici, cher Maître, l'expression de notre profonde gratitude.  
Que la grâce de Dieu soit sur Vous !*



## A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE

**Madame Le Professeur SANGARE-TIGORI BEATRICE**

- Professeur Agrégé en Toxicologie (UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny) ;
- Docteur en pharmacie ;
- Titulaire d'un Doctorat (PhD) en Toxicologie ;
- Experte en Toxicologie et Produits Pharmaceutiques près les Tribunaux de Côte d'Ivoire ;
- Pharmacien analyste au Laboratoire National de Santé Publique (LNSP) ;
- Titulaire d'un DEA de Valorisation de la Pharmacopée Africaine (UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny) ;
- Titulaire du DESS de Toxicologie (UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny) ;
- Membre de la Société Savante Pharmaceutique de Côte d'Ivoire (SOPHACI) ;
- Membre de la Société Ivoirienne de Toxicologie (SITOX) ;
- Membre de la Société Française de Toxicologie (SFT),
- Membre du bureau National de l'Ordre des Pharmaciens de Côte d'Ivoire (Conseil central 3)

.

*Cher Maître,*

*Permettez-moi de Vous adresser mes sincères remerciements pour l'honneur que Vous m'avez fait en me confiant ce travail.*

*Vos qualités scientifiques et humaines font de Vous un grand maître. Ce travail, je l'espère aura répondu à vos exigences de scientifique avertie.*

*Merci pour l'enseignement de qualité et tous les conseils dont nous avons bénéficiés.*

*Soyez assurée de notre haute considération et de notre profonde gratitude.*

*Que Dieu Vous bénisse !*

## A NOTRE MAITRE ET JUGE

### Monsieur le Professeur AMIN N'CHO CHRISTOPHE

- Maître de conférence Agrégé en Chimie Analytique, Bromatologie à l'Université Félix Houphouët-Boigny) ;
- Chef de service adjoint du laboratoire d'hygiène à l'Institut National d'Hygiène publique ;
- Ancien Interne des hôpitaux d'Abidjan
- Docteur en pharmacie diplômé de l'Université de Cocody
- Docteur des Sciences Pharmaceutiques et biologiques de l'Université de Montpellier 1
- Titulaire du DESS option Contrôle Qualité des médicaments, aliments et produits cosmétiques, du DEA en conception, réalisation, valorisation du médicament issu de la pharmacopée africaine option Chimie Analytique, du DEA option Chimie des matériaux, du CES de biochimie clinique, du CES d'hématologie-biologie, du CES d'Immunologie générale et médicale, de la Maîtrise professionnalisée option santé publique de l'Université Félix Houphouët-Boigny
- Membre de la Société Ouest Africaine de Chimie (SOACHIM) et de la Société Pharmaceutique de Côte d'Ivoire (SOPHACI)

*Cher Maître,*

*En acceptant spontanément de siéger au sein de ce jury, vous confirmez votre caractère d'humilité, de disponibilité et de simplicité. Nous avons eu le privilège de bénéficier de vos qualités d'enseignant au cours notre cursus universitaire. Nous vous prions de bien vouloir accepter, à travers ces mots l'expression de notre profonde gratitude.*

## A NOTRE MAITRE ET JUGE

**Madame le Docteur KOUASSI AGBESSI Thérèse**

- Docteur en pharmacie ;
- Maître-assistante au département de bactériologie virologie, à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny;
- Pharmacien biologiste (CES biochimie clinique, CES hématologie, CES parasitologie, CES bactériologie) ;
- Titulaire d'un DEA de biologie humaine tropicale option Bactériologie-virologie
- Chef de service adjoint du laboratoire d'hygiène chargé de la biologie médicale à l'INHP (Institut national d'hygiène publique);
- 1er prix d'infectiologie en 1992 ;
- Lauréat du concours d'internat (1989-1990);
- Membre de la Société Savante Pharmaceutique de Côte d'Ivoire (SOPHACI) ;

*Cher Maître,*

*Votre simplicité et votre amour pour le travail bien fait ont suscité en nous une très grande admiration.*

*C'est avec un immense honneur et une grande joie que nous vous comptons parmi les membres de ce jury. Nous vous remercions pour votre disponibilité et vous prions de bien vouloir accepter l'expression de notre profond respect.*

*Que Dieu Vous bénisse !*

## TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES .....	XXVII
LISTE DES ABREVIATIONS .....	XXXI
LISTE DES TABLEAUX .....	XXXIII
LISTE DES FIGURES .....	XXXIV
INTRODUCTION .....	1
PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE .....	4
Chapitre 1: GENERALITES SUR LES BENZODIAZEPINES .....	5
I. HISTORIQUE .....	6
II. DEFINITION ET CLASSIFICATION.....	7
II.1. Définition .....	7
II.2. Classification.....	7
III. STRUCTURE CHIMIQUE .....	9
IV. MECANISME D'ACTION .....	11
V. CRITERES DE CHOIX THERAPEUTIQUE.....	13
VI. PHAMACOCINETIQUE .....	13
VI.1. Absorption : .....	14
VI.2. Distribution .....	16
VI.3. Métabolisme : .....	17
VI.4. Elimination : .....	18
VII. INDICATIONS THERAPEUTIQUES.....	19
VII.1. Manifestations psychologiques et somatiques de l'anxiété:.....	20
VII.2. Insomnie occasionnelle ou transitoire .....	21
VII.3. L'épilepsie.....	24
VII.4. Anesthésie .....	25
VII.5. Prévention du <i>délirium tremens</i> et des autres manifestations du sevrage alcoolique .....	25
Chapitre 2: TOXICOLOGIE ANALYTIQUE .....	26
I. INTERET DU DOSAGE DES BENZODIAZEPINES .....	27
I.1. Intoxications aiguës.....	27
I.2. Suivi thérapeutique pharmacologique: .....	28
I.3. Contexte médico-légal .....	29

I.4.	Intoxication chronique -addictovigilance .....	29
I.5.	Stabilité des benzodiazépines .....	29
II.	METHODES DE DOSAGE DES BENZODIAZEPINES .....	33
II.1.	La chromatographie .....	33
II.1.1.	Historique .....	33
II.1.2.	Définition de la chromatographie .....	34
II.1.3.	Objectif d'une méthode chromatographique : .....	34
II.2.	La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) .....	35
II.2.1.	Principe de la HPLC .....	35
II.2.2.	Notions fondamentales .....	36
II.2.2.1.	Notions de phase stationnaire: .....	36
II.2.2.2.	Notion de temps de rétention (« HPLC Principe et appareillage » 2010).....	37
II.2.2.3.	Notion de pression: .....	37
II.2.2.4.	Notion de polarité et de polarisabilité .....	38
II.2.3.	Appareillage de la HPLC:.....	40
II.2.3.1.	Le réservoir de la phase mobile: .....	40
II.2.3.2.	Le dégazeur: .....	41
II.2.3.3.	La pompe.....	41
II.2.3.4.	L'injecteur: .....	41
II.2.3.5.	La colonne:.....	42
II.2.3.6.	La phase stationnaire normale: .....	43
II.2.3.7.	La phase stationnaire inversée: .....	43
II.2.3.8.	Le détecteur:.....	43
II.2.3.9.	L'enregistreur .....	44
	DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE .....	45
	Chapitre 1: CADRE ,MATERIELS ET METHODE .....	46
I.	CADRE ET TYPE DE L'ETUDE .....	47
I.1.	Cadre de l'étude .....	47
I.2.	Type et période de l'étude.....	47
II.	MATERIELS ET METHODE.....	48
II.1.	Matériels.....	48
II.1.1.	Fiche de l'enquête.....	48

II.1.2. Population d'étude .....	48
II.1.3. Prélèvement .....	49
II.1.4. Aspect analytique.....	49
II.1.4.1. Instrumentation et réactifs.....	49
II.1.4.1.1. Instrumentation.....	49
II.1.4.1.2. Réactifs.....	51
II.2. Méthode de dosage.....	51
II.2.1. Réalisation de l'enquête: .....	51
II.2.2. Mise au point de la méthode.....	51
II.2.2.1. Préparation des solutions standards .....	51
II.2.2.2. Détermination du temps de rétention et du maximum, d'absorption UV du diazépam .....	52
II.2.2.3. Préparation de la gamme étalon .....	52
II.2.2.4. Extraction du diazépam.....	53
II.2.2.5. Dosage du diazépam dans les échantillons : .....	54
II.2.3. Protocole de validation .....	55
II.2.3.1. La linéarité .....	55
II.2.3.2. La précision .....	56
II.2.3.3. L'exactitude .....	56
II.2.3.4. Les limites de détection LD et de quantification LQ .....	57
II.2.4. Application sur des échantillons de sang en milieu hospitalier ....	57
Chapitre 2:     RESULTATS ET COMMENTAIRES .....	58
I.   POPULATIONS ETUDIEES : .....	59
II.   ENQUETES .....	59
II.1. Répartition des BZD selon la DCI.....	59
II.1.1. Répartition dans les CHU : .....	59
II.1.2. Répartition dans les officines de pharmacie .....	60
II.1.3. Répartition dans les établissements sanitaires (CHU et officines de pharmacie) .....	60
III.   METHODE DE DOSAGE: .....	61
III.1. Résultats de la détermination du temps de rétention et du maximum d'absorption du diazépam .....	61
III.2. Résultats de la validation de la méthode analytique utilisée: .....	62

III.2.1. La linéarité de la méthode: .....	62
III.2.2. Précision de la méthode:.....	63
III.2.2.1. Répétabilité de l'analyse chromatographique.....	65
III.2.2.2. Fidélité intermédiaire de la méthode sur trois de concentrations en diazépam dans l'échantillon de plasma .....	66
III.2.3. Exactitude de la méthode: .....	67
III.2.4. Les limites de détection LD et de quantification LQ .....	69
III.3. Application au dosage du diazepam dans dix échantillons de plasma prélevés chez des patients .....	70
Chapitre 3: DISCUSSION .....	71
I. ENQUETE : .....	72
II. DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE .....	72
CONCLUSION.....	78
RECOMMANDATIONS .....	80
REFERENCES .....	82
ANNEXES.....	90

## LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

- AGNP** : Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie
- ANSM** : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé
- BHE** : Barrière Hémato-Encéphalique
- BZD** : Benzodiazépines
- CCM** : Chromatographie sur Couche Mince
- CG/SM** : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Dspectrométrie de Masse
- CHU** : Centre Hospitalier Universitaire
- CLHP** : Chromatographie Liquide à Haute Performance
- CLHP/DAD** : Chromatographie Liquide Haute Performance couplée au Détecteur à barrette de diodes
- CLHP/SM** : Chromatographie Liquide à Haute performance couplée à la Spectrométrie de Masse
- CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse
- CPL** : Chromatographie en Phase Liquide
- CPS** : Chromatographie en Phase Supercritique
- CV** : Coefficient de Variation
- DAD** : Détecteur à barrette de diodes
- DCI** : Dénomination Commune Internationale
- DLCP** : Direction du Laboratoire Central de la Police
- DP** : Diamètre des particules
- EME** : état de mal epileptique
- F1** : Facteur de dilution
- GABA** : Acide Gamma Amino-Butyrique
- ICH** : Internationale Conférence sur l'Harmonisation
- IMV** : Intoxications Médicamenteuses Volontaires
- LD** : Limites de Détection
- LNSP** : Laboratoire National de Santé Publique
- LQ** : Limite de Quantification
- Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>** : Carbonate de Sodium
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Dihydrogénophosphate de sodium



**ONU** : Organisation des Nations Unies

**PL** : Plasma

**SN** : Système Nerveux

**SNC** : Système Nerveux Central

**UFR** : Unité de Formation et de Recherche

## LISTE DES TABLEAUX

### Pages

<b>Tableau I:</b> Les BZD et apparentées actuellement commercialisées en France....	8
<b>Tableau II:</b> Mode de fonctionnement du récepteur GABA <sub>A</sub> .....	11
<b>Tableau III:</b> Caractéristiques pharmacologiques de quelques BZD .....	15
<b>Tableau IV:</b> BZD anxiolytiques classées selon leur demi-vie.....	21
<b>Tableau V:</b> Les BZD hypnotiques classées selon leur demi-vie.....	23
<b>Tableau VI:</b> Analogues aux BZD classées selon leur demi-vie .....	24
<b>Tableau VII:</b> Etude bibliographique de la stabilité des BZD .....	30
<b>Tableau VIII:</b> Préparation de la gamme étalon du diazépam .....	53
<b>Tableau IX:</b> Linéarité de la méthode de dosage .....	62
<b>Tableau X:</b> Répétabilité des solutions de référence de la gamme étalon.....	65
<b>Tableau XI:</b> Etude de la fidélité intermédiaire de la méthode sur trois concentrations en diazépam.....	66
<b>Tableau XII:</b> Paramètres de l'exactitude .....	68
<b>Tableau XIII:</b> Limite de détection et de quantification du diazépam.....	69
<b>Tableau XIV:</b> Concentrations plasmatiques de diazépam chez les patients.....	70
<b>Tableau XV:</b> Concentrations plasmatiques de diazépam.....	76

## LISTE DES FIGURES

### Pages

<b>Figure 1:</b> Structure chimique commune aux BZD .....	10
<b>Figure 2:</b> Représentation schématique du récepteur GABAA avec ses sous-unités et ses sites de fixations aux GABA et BZD .....	12
<b>Figure 3:</b> Voie métabolique de quelques BZD .....	18
<b>Figure 4:</b> Principe de fonctionnement d'une chaîne CLHP .....	36
<b>Figure 5:</b> Phase stationnaire d'une colonne .....	36
<b>Figure 6:</b> Schéma du principe de fonctionnement d'une chromatographie liquide .....	40
<b>Figure 7:</b> La chaîne CLHP .....	50
<b>Figure 8:</b> Diagramme de la répartition des BZD selon la DCI dans les CHU ...	59
<b>Figure 9:</b> Diagramme de répartition des BZD selon la DCI dans les officines de pharmacie .....	60
<b>Figure 10:</b> Diagramme de répartition des BZD selon la DCI dans les établissements sanitaires .....	61
<b>Figure 11:</b> Droite d'étalonnage du diazépam .....	63

# INTRODUCTION

Les benzodiazépines (BZD) sont des molécules qui présentent un large éventail d'utilisations thérapeutiques et ont acquis depuis plusieurs décennies une popularité dans le monde entier [1]

En effet les BZD sont utilisées dans de nombreuses indications notamment pour traiter l'anxiété, l'insomnie, l'agitation, les spasmes musculaires et le sevrage d'alcool [2]

Toutefois bien que leurs effets soient généralement bien tolérés dans la population générale, les molécules de BZD sont couramment impliquées dans les cas d'empoisonnements, de suicides et de criminalité [2] .

Aussi une étude récente dans les services d'urgence et de réanimation des trois Centres Hospitaliers Universitaires (CHU) d'Abidjan révèle que la première cause d'intoxication chez les enfants de 0 à 15 ans est liée à l'ingestion de benzodiazépines au domicile des parents.

Fort de ces constats, plusieurs techniques au nombre desquelles la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM), la Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP/SM) ainsi que la Chromatographie Liquide Haute Performance couplée au détecteur à barrette de diodes (CLHP/DAD) ont été développées en vue de l'identification et de la quantification des benzodiazépines dans des spécimens. [2]

En Côte d'Ivoire, nous ne disposons pas de données officielles sur la consommation de BZD par la population.

Par conséquent, il nous est paru judicieux de faire une étude pilote de mise en évidence des BZD les plus utilisées dans le district d'Abidjan. L'objectif général a été de mettre au point une méthode de dosage dans le plasma du diazépam par HPLC-DAD. Les objectifs spécifiques ont été :

- d'identifier les BZD les plus utilisées à Abidjan

- de développer et valider une méthode de dosage du diazépam dans le plasma par HPLC-DAD

- d'appliquer la méthode validée à dix échantillons de plasma

Cette étude comprend deux parties:

- une première partie consacrée à la revue de la littérature;
- une deuxième partie portant sur l'étude expérimentale et comportant la méthodologie, les résultats et la discussion

# **PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE**

# **CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LES BENZODIAZEPINES**



## I. HISTORIQUE

En 1957, Jean Delay, médecin psychiatre posa la définition d'une molécule psychotrope comme susceptible de modifier l'activité mentale, sans préjuger du type de cette modification. A la suite de cette définition, Jean Delay présenta une classification des psychotropes selon trois dimensions d'activités. Les BZD qui sont des psychotropes qui ralentissant l'activité du Système Nerveux (SN) appartiennent à la classe des psycholeptiques [3].

Au début des années 1960, l'arrivée des BZD sur le marché des médicaments fut une avancée importante [4]. La première molécule de BZD fut le chlórdiazépoxide (Librium®) qui à ce jour n'est plus commercialisée. Toutefois il est actuellement possible de la retrouver dans une association avec du clinidium bromure (Librax®). A sa suite vint en 1963, le diazépam (Valium®), qui rapidement devient une référence [5]. Les recherches sur les BZD se poursuivent intensément dans les laboratoires ROCHE et aboutissent à la mise sur le marché du Nitrazépam (MOGADON®) en 1966; de l'Oxazépam (SERESTA®) en 1966 et du Lorazépam (TEMESTA®) en 1971 par les laboratoires WYETH.

Le 21 février 1971, l'Organisation des Nations Unies (ONU) utilisera officiellement le terme psychotrope pour mettre ces substances dans une convention limitant ainsi la production et le commerce de substances psychotropes synthétiques

En 1974, le Bromazépam (LEXOMIL®) est mis sur le marché; le Clonazépam (RIVOTRIL®) en 1975 et le Flunitazépam (ROHYPNOL®) en 1976 ; le Triazolam (HALCINON®) en 1977 et l'Alprazolam (XANAX®) en 1982 par les laboratoires UP JOHN [3].

Ces molécules de BZD ainsi synthétisées présentent un rapport bénéfice/risque plus favorable que les barbituriques et le méprobamate utilisés jusque- là comme substances psychotropes, dotées toutefois d'un potentiel létal et addictogène [4,5].

## **II. DEFINITION ET CLASSIFICATION**

### **II.1. Définition**

Les BZD constituent des molécules appartenant à la classe des psychotropes. Selon Jean Delay les psychotropes sont des substances chimiques organiques naturelles ou artificielles ayant un tropisme psychologique, c'est-à-dire susceptibles de modifier l'activité mentale, sans préjuger du type de cette modification.

Elles agissent sur le système nerveux central par l'intermédiaire des récepteurs Acide Gamma Amino-Butyrique (GABA) et possèdent des propriétés anxiolytiques, hypnotiques, myorelaxantes et anticonvulsivantes [6]

### **II.2. Classification**

Les BZD ont des propriétés pharmacologiques communes à savoir sédatives, hypnotiques, myorelaxantes et anticonvulsivantes, en raison du fait qu'elles facilitent la transmission GABAergique. Toutefois ces molécules se différencient par un effet anxiolytique ou hypnotique dominant [7].

On distingue ainsi deux grandes catégories de BZD:

- Les anxiolytiques préférentiellement utilisés pour le traitement de l'anxiété: alprazolam, bromazépam, chlordiazépoxide, clorazépate, diazépam, lorazépam et oxazépam;
- Les hypnotiques préférentiellement utilisés pour le traitement de l'insomnie: flurazépam, midazolam, nitrazépam, témazépam et triazolam.

Il convient de noter cependant que cette distinction est assez arbitraire et qu'une BZD anxiolytique peut être utilisée comme hypnotique (ex: diazépam) et vice versa [7].

A ces deux catégories de BZD s'ajoutent

- Les myorelaxants: Tétrazépam

➤ Les anticonvulsivants: Clonazépam; Midazolam

Les différentes BZD et apparentées commercialisées en France en 2013, ainsi que leur classe thérapeutique, sont rapportées dans le Tableau 1 (adapté de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé ANSM) [8]

**Tableau I:** Les BZD et apparentées actuellement commercialisées en France

Substances actives	Noms des spécialités commercialisées
ANXIOLYTIQUES	
Alprazolam	Xanax <sup>®</sup> et génériques
Bromazépam	Lexomil <sup>®</sup> et génériques
Clobazam	Urbanyl <sup>®</sup>
Clorazépate dipotassique	Tranxène <sup>®</sup>
Clotiazépam	Veratran <sup>®</sup>
Diazépam	Valium <sup>®</sup>
Loflazépate d'éthyle	Victan <sup>®</sup>
Lorazépam	Témesta <sup>®</sup> et génériques
Nitrazépam	Nordaz <sup>®</sup>
Oxazépam	Seresta <sup>®</sup> et génériques
Prazépam	Lysanxia <sup>®</sup> et génériques

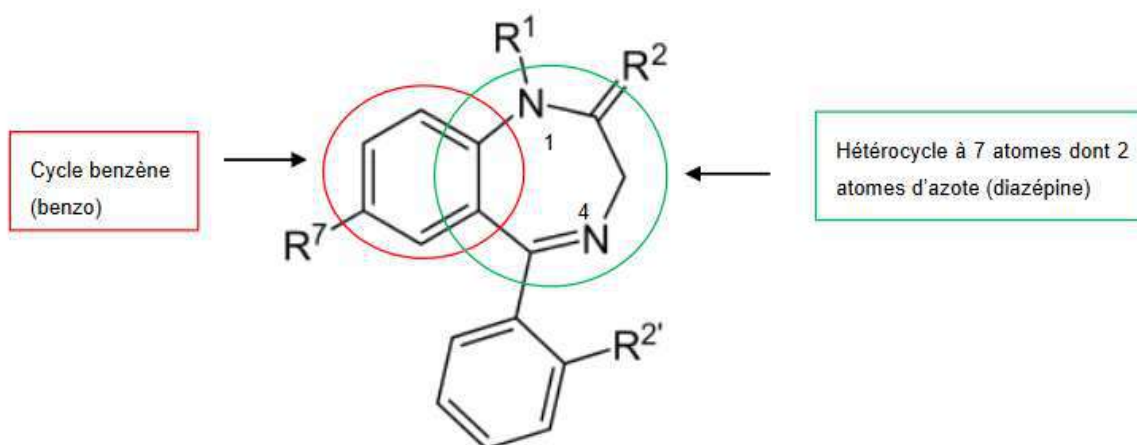
HYPNOTIQUES	
Estazolam	Nuctalon <sup>®</sup>
Flunitrazépam	Rohypnol <sup>®</sup>
	Narcozep <sup>®</sup>
Loprazolam	Havlane <sup>®</sup>
Lormétazépam	Noctamide <sup>®</sup>
Midazolam	Hypnovel <sup>®</sup>
	Versed <sup>®</sup>
Nitrazépam	Mogadon <sup>®</sup>
Témazépam	Normison <sup>®</sup>
APPARENTEES AUX BENZODIAZEPINES (HYPNOTIQUES)	
Zolpidem	Stilnox <sup>®</sup> et génériques
Zopiclone	Imovane <sup>®</sup> et génériques
MYRELAXANT	
Tétrazépam	Myolasta <sup>®</sup> n et génériques
ANTICONVULSIVANTS	
Clonazépam	Rivotril <sup>®</sup>
Midazolam	Buccolan <sup>®</sup>

### III. STRUCTURE CHIMIQUE

Les BZD appartiennent au groupe des substances psycholeptiques de la classification de Delay et Deniker [9]. Elles possèdent en commun un cycle diazépine à sept sommets sur lequel est greffé un cycle benzénique.

Le terme «azépine» désigne un hétérocycle, un cycle benzène où un atome de carbone a été remplacé par un atome d'azote. Le terme «di» signifie qu'un second atome de carbone a été remplacé par un azote. Le terme «benzo» désigne l'adjonction d'un cycle benzénique au cycle diazépine.

Par conséquent les BZD possèdent une structure commune représentée par la figure 1



**Figure 1:** Structure chimique commune aux BZD

Toutefois suivant la position des deux atomes d'azote on distinguera:

- les 1,4-benzodiazépines
- les 1,5-benzodiazépines
- les 2,3-benzodiazépines

Il existe également les dérivés tricycliques (suffixe « azolam ») qui correspondent à la présence des deux cycles de la structure de base, sur laquelle se fixe un troisième cycle. Suivant la nature de ce troisième cycle on distinguera : les triazolo-1,4-benzodiazépines et les imidazo-1,4-benzodiazépines. La structure chimique de base des BZD accepte ainsi des modifications importantes sans perte sensible de son activité pharmacologique, ce qui permet de comprendre la multiplication des produits commercialisés [10]. L'annexe 1 présente les structures chimiques des différentes BZD et apparentées retrouvées sur le marché.

## IV. MECANISME D'ACTION

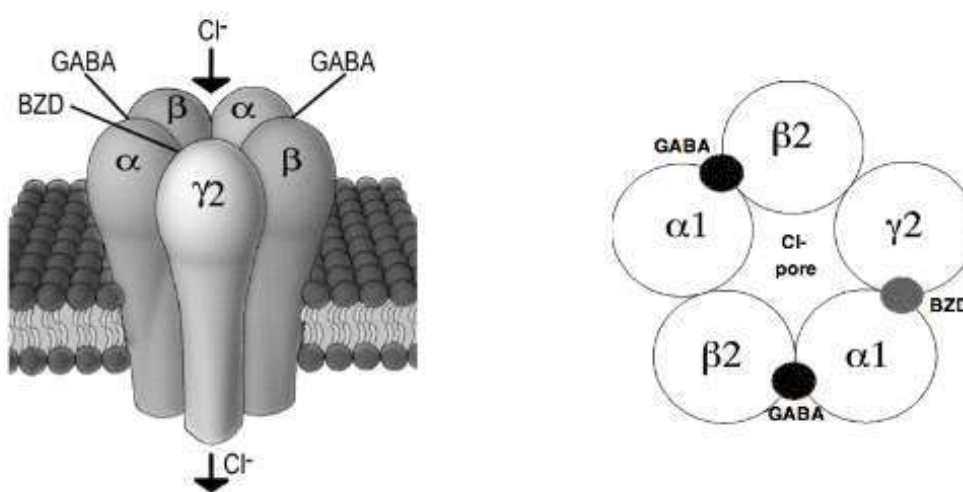
Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur du Système Nerveux Central (SNC). Il exerce ses effets par l'intermédiaire de deux types de récepteurs: le récepteur GABA<sub>A</sub> et le récepteur GABA<sub>B</sub>. Le récepteur GABA<sub>A</sub> comporte plusieurs sites récepteurs capables de reconnaître des substances actives au plan pharmacologique, dont les BZD [11]. Le récepteur GABA<sub>A</sub> est un canal perméable aux ions chlorure (Cl<sup>-</sup>). L'ouverture de ce récepteur-canal est commandée directement par le GABA.

La fixation de deux molécules de GABA entraîne son ouverture, la pénétration des ions Cl<sup>-</sup>, une hyperpolarisation cellulaire et un effet inhibiteur (Tableau II). Le récepteur GABA<sub>A</sub> peut être modulé allostériquement par d'autres récepteurs situés auprès des sites de fixation du GABA. Ces récepteurs allostériques augmentent ou inhibent l'effet du GABA [12].

**Tableau II:** Mode de fonctionnement du récepteur GABA<sub>A</sub>

<b>Ouverture du récepteur GABA<sub>A</sub></b> ⇒Entrée de Cl <sup>-</sup>	<b>Fermeture du récepteur GABA<sub>A</sub></b> ⇒Inhibition d'entrée de Cl <sup>-</sup>
Anxiolytique	Anxiogène
Hypnotique	Stimulant
Anticonvulsive	Proconvulsivant
Proamnésiant	Amnésique
Myorelaxante	

Différentes combinaisons de sous-unités du récepteur GABA<sub>A</sub> sont présentes dans le SNC et permettent de déterminer les propriétés pharmacologiques du récepteur. La stœchiométrie la plus communément rencontrée (environ 43% des récepteurs GABA<sub>A</sub>) est  $\alpha 1:\beta 2:\gamma 2$  (2:2:1), c'est à dire qu'elle est composée de l'assemblage de deux sous-unités  $\alpha 1$ , deux sous-unités  $\beta 2$  et une seule sous-unité  $\gamma 2$  [13] (Figure 2)



**Figure 2:** Représentation schématique du récepteur GABA<sub>A</sub> avec ses sous-unités et ses sites de fixations aux GABA et BZD

Les BZD ont une modulation allostérique positive sur le récepteur GABA<sub>A</sub> et potentialisent son action, mais sont sans effet en absence de GABA et ne peuvent dès lors pas activer le récepteur directement, ce qui explique leur sécurité dans le cadre d'un surdosage [14,15]

De nombreuses études ont été menées afin de déterminer si les actions des BZD pouvaient être attribuées à des sous-unités particulières du récepteur GABA<sub>A</sub>. Il est ressorti de ces études que différentes compositions des récepteurs GABA<sub>A</sub> conféraient des propriétés pharmacologiques distinctes.

Les propriétés pharmacologiques des BZD dépendent de variations dans leur affinité aux différents sous-types de récepteurs GABA<sub>A</sub> [16]. L'action anxiolytique

serait médiée par les récepteurs contenant la sous- unité  $\alpha_2$ , alors que la sous- unité  $\alpha_1$ , la plus abondante des sous- unités  $\alpha$  dans le cerveau, jouerait un rôle dans la sédation et contribuerait à l'activité anticonvulsivante [16]

## V. CRITERES DE CHOIX THERAPEUTIQUE

Le choix de la BZD se fait en fonction de :

- Sa demi-vie d'élimination :
  - Intermédiaire (6 à 12 heures) pour des prises ponctuelles ou dans l'insomnie. Les molécules à demi-vie d'élimination intermédiaire présentent une faible accumulation ce qui limite la survenue d'effets indésirables.
  - Longue (plus de 12 heures) : ces molécules s'accumulent et permettent un effet plus soutenu pour traiter des anxiétés généralisées par exemple.
- La physiopathologie du patient: chez les personnes âgées, les insuffisants hépatiques ou les personnes prenant des médicaments modifiant l'activité hépatique, il est préférable d'utiliser le lorazépam, oxazépam, témazépam car ces trois molécules sont peu métabolisées par le foie.

En définitif, le choix d'une BZD tient compte de ses propriétés pharmacocinétiques surtout (demi-vie, présence de métabolite actif ou non) et de ses interactions médicamenteuses potentielles [17].

## VI. PHAMACOCINETIQUE

Les BZD ont des différences dans leurs propriétés physico-chimiques notamment la liposolubilité qui influe sur le taux d'absorption et de diffusion dans les compartiments tissulaires et mais également au niveau de leur pharmacocinétique. Ainsi chaque BZD a un profil pharmacocinétique propre qui doit être considéré lorsque l'agent optimal est sélectionné pour un patient particulier et les conditions particulières.



Les principaux facteurs à prendre en considération sont la voie d'administration, le taux et le degré d'absorption, le métabolisme, la formation de métabolites actifs, l'élimination et les interactions médicamenteuses [18].

### **VI.1. Absorption :**

L'absorption des benzodiazépines est affectée par plusieurs variables, parmi lesquelles la voie d'administration, le véhicule pharmaceutique, les caractéristiques physicochimiques de la molécule (liposolubilité, degré d'ionisation), la médication conjointe, etc. Pour la plupart des BZD prises par la voie orale, l'effet apparaît 30 minutes à deux heures après leur ingestion [19]. Leur biodisponibilité varie de 70 à 90% [20].

Le bromazépam, le clorazépate, le diazépam, le flurazépam et le triazolam sont parmi les benzodiazépines ayant un début d'action rapide et sont habituellement moins utilisées, sauf pour des situations commandant un effet thérapeutique rapide, tel qu'une insomnie initiale. (Tableau III).

Le tableau III présente des caractéristiques pharmacologiques de quelques BZD.

**Tableau III:** Caractéristiques pharmacologiques de quelques BZD

Noms génériques	Début d'action	Liposolubilité	Demi-vie (heure)	Métabolites actifs
Alprazolam	1-2 heures	0,54	9-20	Oui
Bromazépam	0,5-4 heures	0,24	8-30	Non
Chlordiazépoxide	1-4 heures	-	4-29	Oui
Clonazépam	1-4 heures	0,28	19-60	Non
Clorazépaté	0,5-2 heures	0,79	1,3-120	Oui
Diazépam	1-2 heures	1,00	30-200	Oui
Flurazépam	0,5-1 heure 1-6 per os	-	40-250	Oui
Lorazépam	45-75 minutes intramusculaires	0,48	8-24	Non
Midazolam	0,5-1 minute intraveineuse	-	1-4	Oui
Nitrazépam	0,5-7 heures	0,29	15-48	Oui
Oxazépam	1-4 heures	0,45	3-25	Non
Témazépam	2,5 heures	0,5	3-25	Non
Triazolam	1-2 heures	0,64	1,5-5	Non

Dans leur forme orale standard, les BZD sont toutes facilement absorbées par le tractus gastro-intestinal, étant donné leur caractère liposoluble qui leur assure une diffusion passive à travers l'épithélium de la muqueuse intestinale vers les capillaires sanguins. Cependant tout ralentissement de la vidange gastrique, par exemple par la prise de nourriture, d'agents anticholinergiques ou antiacides, entraîne une absorption plus graduelle et, ainsi, un pic plasmatique moins marqué [21].

La quasi-totalité des BZD est dissoute par les enzymes des sucs gastriques sans aucune modification métabolique avant d'être absorbées à travers la muqueuse intestinale. Seul le clorazépate subit une modification métabolique dans l'estomac. Ce dernier est, en effet, un promédicament qui est inactif dans sa forme originale. Il doit d'abord être hydrolysé dans l'estomac en desméthyl-diazépam; ce qui permet alors à la molécule d'être absorbée et d'acquérir des propriétés thérapeutiques. Cette transformation chimique ne retarde cependant pas l'effet thérapeutique du médicament [17].

## **VI.2. Distribution**

La distribution des BZD dans les tissus en général et dans le cerveau en particulier est très rapide. Ce sont des molécules qui se lient très fortement aux protéines plasmatiques et essentiellement à l'albumine. Elles traversent la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) rapidement grâce à leur caractère lipophile. C'est le taux de diffusion à travers cette barrière, variant d'une BZD à une autre, qui détermine la rapidité et l'intensité des effets mais également la survenue d'effets indésirables [22].

Outre leur distribution dans le cerveau, la grande affinité des BZD pour les lipides favorise leur redistribution vers les tissus adipeux périphériques. Cela se traduit par une chute des concentrations cérébrale et plasmatique en deçà de la concentration minimale effective, concourant ainsi à une diminution de leur effet

thérapeutique [23]. Parmi les BZD, la liposolubilité est la plus grande pour le diazépam, suivi du clorazépate, puis du triazolam (Tableau III).

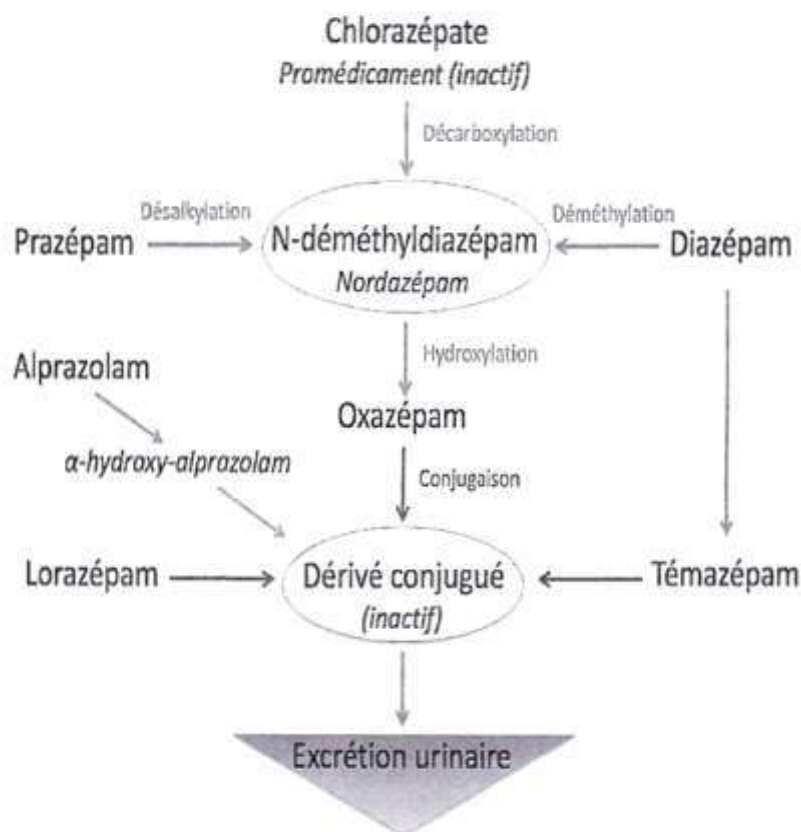
### **VI.3. Métabolisme :**

Les BZD vont subir dans l'organisme des modifications appelées métabolisations ou biotransformations, directement liées à la structure de la molécule, et destinées à les rendre plus facilement éliminables. Leur métabolisme est essentiellement hépatique et les principales transformations observées résultent de réactions de déméthylation et/ou d'hydroxylation (oxydation microsomiale) au niveau du foie consistant principalement en des réactions de [28] :

- n-désalkylation de l'azote en position 1;
- hydroxylation du carbone en position 3;
- réduction de groupements nitrés en groupements aminés suivie de leur acétylation;
- ouverture par hydrolyse de l'hétérocycle à 7 chaînons.

Ces voies de transformations peuvent donner naissance à des dérivés pharmacologiquement actifs (principalement en raison de la résistance de substituants en position 2 et 7 aux différentes voies de dégradation) [24]. Ces transformations sont illustrées à la figure 3

Ces métabolites actifs ainsi obtenus peuvent subir de nouveau des réactions d'oxydation puis de conjugaison pour être éliminés dans les urines. D'autres BZD (l'oxazépam, le lorazépam, le bromazépam) par contre n'auront pas besoin de subir d'oxydation, ils seront directement conjugués, aboutissant à des métabolites inactifs pouvant être éliminés dans les urines [17].



**Figure 3:** Voie métabolique de quelques BZD [25].

#### VI.4. Elimination :

L'élimination des BZD et de leurs dérivés par métabolisme hépatique et excrétion rénale se fait à un taux propre à chaque molécule. Ce taux est représenté par la demi-vie d'élimination ( $t_{1/2}$ ). Les dérivés d'un même sous- groupe ont des demi-vies d'élimination comparables, puisqu'ils sont biotransformés par les mêmes voies métaboliques [26].

Ces demi-vies doivent être connues car elles servent à classer les BZD en molécules à :

- durée d'action courte c'est-à-dire avec un  $t_{1/2}$  inférieur à cinq heures,
- durée d'action intermédiaire avec un  $t_{1/2}$  compris entre 5 et 24 heures ou
- durée d'action longue ayant un  $t_{1/2}$  supérieur à 24 heures [27].

La demi-vie des métabolites actifs peut contribuer à la durée d'action de la molécule mère. Le flurazépam en est un exemple éloquent, puisque sa demi-vie est d'environ deux à trois heures alors que la demi-vie de son métabolite principal, le N-désalkylflurazépam, est de plus de 50 heures [17].

Aussi la demi-vie d'élimination conditionne:

- les risques d'accumulation : plus la demi-vie d'élimination est longue, plus le risque d'accumulation est grand;
- le rythme des prises: chaque prise devrait être répétée toutes les demi-vies d'élimination;
- le délai pour l'obtention des concentrations plasmatiques à l'équilibre : ce délai correspond à 5 fois la demi-vie d'élimination de la substance mère et du métabolite actif.[28]

Ces différences pharmacocinétiques influent sur l'effet de chaque molécule et aboutissent à des indications différentes. Ainsi des paramètres tels que la puissance d'action, la demi-vie, la métabolisation et la liposolubilité vont orienter la molécule vers une indication précise en tant qu'hypnotique, anxiolytique, myorelaxant ou antiépileptique.

## VII. INDICATIONS THERAPEUTIQUES

Bien que la plupart des BZD commercialisées partagent la même activité pharmacodynamique, elles ne possèdent pas toutes pour autant les mêmes indications et relèvent donc de plusieurs classes pharmaco-thérapeutiques [29]. Ainsi, les BZD sont indiquées, selon leur propriété principale, dans le traitement de l'anxiété, des troubles sévères du sommeil, de l'épilepsie ou des contractures musculaires douloureuses. Seul le tétrazépam était prescrit dans cette dernière indication mais il a été retiré du marché au niveau européen en juillet 2013 suite à un signal de pharmacovigilance donné par l'ANSM. [8].

## **VII.1. Manifestations psychologiques et somatiques de l'anxiété:**

Les troubles anxieux sont les plus fréquents de tous les troubles mentaux en population générale. Les troubles anxieux couramment rencontrés sont : le trouble anxieux généralisé, le trouble panique avec ou sans agoraphobie, la phobie sociale et les troubles obsessionnels compulsifs.

Les BZD ont une efficacité incontestée sur l'anxiété. Cependant elles ne doivent être utilisées que lorsque les symptômes anxieux sont importants et interfèrent avec le fonctionnement quotidien normal.

Les limitations de l'utilisation de ces molécules sont liées à leurs nombreux effets indésirables qui apparaissent d'autant plus que les règles de prescription ne sont pas respectées. On distingue les BZD à demi-vie courte et les BZD à demi-vie longue.

Les molécules à demi-vie courte semblent plus efficaces dans les troubles anxieux paroxystiques tels que les attaques de panique. L'alprazolam est la BZD la plus utilisée dans cette indication.

Les BZD à demi-vie longue sont plus utilisées dans l'anxiété flottante et permanente du trouble anxieux généralisé [30]

Le tableau IV classe les BZD anxiolytiques en fonction de leur demi-vie :

**Tableau IV:** Classification de quelques BZD anxiolytiques selon leur demi-vie [31]

DCI	NOMS COMMERCIAUX	DEMI-VIE
Demi-vie courte ou intermédiaire (jusqu'à 20 heures)		
Clotiazépam	Veratran ®	7h
Oxazépam	Seresta®	4 à 8h
Alprazolam	Xanax®	12h
Lorazépam	Temesta®	15h
Bromazépam	Lexomil®	15 à 20h
Demi-vie longue (> 20 heures)		
Diazépam	Valium®	20 à 100h
Clobazam	Urbanyl®	40h
Nordazépam	Nordaz®	65h
Prazépam	Lysanxia®	65h
Loflazépate	Victan®	70h
Clorazépate dipotassique	Tranxène®	40h

## VII.2. Insomnie occasionnelle ou transitoire

L'insomnie désigne une plainte de mauvais sommeil associant diversement: difficultés d'endormissement, troubles du maintien du sommeil, réveil précoce et les conséquences diurnes rapportées à ce mauvais sommeil.

L'âge et le sexe constituent des facteurs influençant la qualité de sommeil [32].

On distingue 3 types d'insomnies:

- l'insomnie occasionnelle: la plus fréquente, elle dure d'une à quelques nuits. Elle se traduit par une difficulté d'endormissement, un ou plusieurs réveils nocturnes, ou un réveil précoce qu'on peut imputer à un souci sur lequel se fixe l'attention (bruit,



douleur, température...). En général, il est facile d'identifier la cause de cette insomnie.

- l'insomnie transitoire: elle dure plus longtemps, entre 1 et 4 semaines. C'est une insomnie en rapport avec un événement de vie source de stress physique ou psychologique (maladie, décès d'un proche...) auquel le sujet va devoir s'adapter.

- l'insomnie chronique: elle a une durée supérieure à 1 mois. Elle s'étend souvent sur plusieurs mois ou années. Elle est causée au début par certaines circonstances mais a tendance à s'auto-entretenir, et à représenter une gêne permanente dans la vie du sujet [33]. Les BZD hypnotiques peuvent être classées en fonction de leur demi-vie afin d'orienter plus précisément leurs indications.

Les tableaux V et VI en sont deux illustrations.

**Tableau V:** Classification de quelques BZD hypnotiques selon leur demi-vie.[31].

DCI	NOMS COMMERCIAUX	FORMES GALENIQUES ET DOSAGE	POSOLOGIE	DUREE DE PRESCRIPTION
Action intermédiaire (5 à 10h)				
Loprazolam	Havlan®	Cp 1 mg	AD : 0,5 à 1 mg au coucher	Prescription limitée à 4 semaines
Lormétazépam	Noctamide®	Cp 1 et 2 mg	AD : 0,5 à 1 mg au coucher	
Témazépam	Normison®	Cp 10 et 20 mg	AD : 10 mg au coucher	
Action prolongée (supérieure à 10h)				
Estazolam	Nuctalon®	Cp 2 mg	AD : 1 à 2 mg au coucher	Prescription limitée à 4 semaines
Nitrazépam	Mogadon®	Cp 5 mg	AD : 2,5 à 5 mg au coucher Enf >10ans : 1,25 à 5 mg au coucher	

**Tableau VI:** Classification de quelques analogues aux BZD selon leur demi-vie [31]

DCI	NOMS COMMERCIAUX	DEMI-VIE
Zopiclone	Imovane®	5 à 7h
Zolpidem	Stilnox®	2 à 3h

A partir de cette classification il conviendra de choisir :

- •une molécule à demi-vie courte pour les troubles de l'endormissement (Analogues aux BZD).
- •une molécule d'action intermédiaire afin de traiter les réveils nocturnes.
- •une molécule d'action prolongée afin de prendre en charge les insomnies rebelles avec syndrome anxieux associé.

### **VII.3. L'épilepsie**

En raison de leur action d'inhibition GABAergique, les BZD font partie des molécules d'ancienne génération parmi les médicaments actuels de l'épilepsie. Le clobazam, le diazépam et le clonazépam sont utilisés dans cette indication [34] avec une préférence pour le clonazepam et le diazepam lors des crises convulsives [35]. Le clobazam quant à lui est préconisé dans le traitement des épilepsies partielles et généralisées chez l'adulte et l'enfant de plus de 6 ans.

Malgré leur effet immédiat et important sur presque tous les types de crises, les BZD sont de plus en plus délaissées dans le traitement chronique de l'épilepsie au profit de nouveaux médicaments antiépileptiques mais restent tout de même des molécules de choix dans le traitement d'urgence, en particulier de l'état de mal épileptique (EME).

## **VII.4. Anesthésie**

Le midazolam est la BZD de choix dans ce domaine.

En prémédication, elle permet d'exercer des effets anxiolytiques, amnésiants et sédatifs recherchés en préopératoire. La voie orale est recommandée étant donné un délai d'action qui reste faible tout en étant moins anxiogène que la voie intramusculaire. En pré- et peropératoire, l'administration intraveineuse d'une BZD permet de diminuer les doses d'hypnotiques administrées [36].

## **VII.5. Prévention du délirium tremens et des autres manifestations du sevrage alcoolique**

Sur le plan pharmacologique, les BZD sont le fondement du traitement et on privilégie habituellement les molécules à demi-vie longue. La référence est le diazépam à la dose de 20 à 40 mg par jour en ambulatoire, mais ces doses peuvent être augmentées en fonction de l'importance de la dépendance physique et de l'efficacité clinique en allant jusqu'à 60 à 80 mg par jour en hospitalier. Mais en cas d'insuffisance hépatocellulaire l'on recommande l'oxazépam (100 mg/j per os voire 200 mg/j) ou le lorazépam. La durée de ce traitement doit être limitée dans le temps en raison du risque de dépendance aux BZD chez les patients alcoolos dépendants. Il n'y a pas de raison de poursuivre au-delà de 10 jours [37].

## **CHAPITRE 2 : TOXICOLOGIE ANALYTIQUE**

## **I. INTERET DU DOSAGE DES BENZODIAZEPINES**

Quel que soit le contexte, l'outil analytique doit être, soit capable de confirmer l'absence de BZD ce qui signifie que les limites de détection doivent être relativement faibles, soit capable au contraire capable de mesurer des concentrations très élevées ce qui signifie que la gamme d'étalonnage doit être suffisamment étendue. A titre d'illustration, en Annexe 2 sont rapportées les concentrations habituellement observées consécutivement à l'administration de doses thérapeutiques de BZD («zone thérapeutique»). On peut observer sur ce tableau qu'en fonction des molécules, ces dernières s'étendent de quelques  $\mu\text{g/L}$  à quelques centaines de  $\mu\text{g/L}$ .

Enfin, il faut tenir compte du fait que la plupart des BZD se métabolisent en composés actifs noté «A» dans le tableau de l'Annexe 2 qu'il sera également important de pouvoir détecter.

L'Annexe 3 illustre le métabolisme de certaines BZD. Par exemple, le témazepam est dans un premier temps métabolisé en une autre BZD l'oxazépam, avant d'être métabolisé en dérivé conjugué inactif. Certaines BZD sont directement métabolisées en dérivé conjugué inactif, d'autres en métabolite inactif.

Les BZD sont principalement éliminées par voie rénale. Par conséquent, le dosage de tous les composés actifs est nécessaire pour confirmer ou infirmer la présence de molécule. La présence de témazépam et d'oxazépam dans un échantillon est donc tout à fait normale, même si le patient n'a pris que du témazépam.

### **I.1. Intoxications aiguës**

En France, les BZD représentent la première classe médicamenteuse des intoxications volontaires, elles sont suspectées d'être ingérées dans plus de 70% des Intoxications Médicamenteuses Volontaires (IMV) chez l'adulte [38].

Les BZD peuvent être responsables d'intoxications aiguës ou subaiguës. Les signes cliniques d'une intoxication pure aux BZD sont les suivant : à la phase initiale,

on observe des troubles du comportement avec ébriété, agitation, désinhibition et agressivité. Il existe un risque important de potentialisation des effets en cas d'association avec d'autres psychotropes et surtout avec l'alcool. Puis, dans les heures qui suivent, peuvent survenir des phénomènes d'obnubilation, somnolence, hypotonie musculaire avec hyporéflexie, puis un coma calme hypotonique. Une dépression respiratoire modérée peut apparaître surtout avec les molécules d'action rapide. Il peut exister également des troubles cardiovasculaires (hypotension artérielle modérée, tachycardie).

D'une façon générale, les intoxications pures aux BZD sont d'évolution favorable en 24h-48h, mais la symptomatologie peut être plus marquée en cas de dose ingérée importante ou si la molécule est particulièrement hypnotique (loprazolam, lormétazepam ou flunitrazepam) et en cas d'associations à d'autres déprimeurs du SNC (antidépresseurs, neuroleptiques ou alcool).

Il existe un antidote lors d'intoxication aiguë aux BZD et apparentés. Il s'agit du flumazenil (Anexate®). Il ne traite pas l'intoxication mais antagonise les effets cliniques.

## **I.2. Suivi thérapeutique pharmacologique:**

Dans un contexte hospitalier, la recherche et le dosage des BZD ne se limitent pas qu'aux cas d'intoxications aiguës qui surviennent lors des tentatives de suicide ou de surexposition accidentelle ou d'une interaction médicamenteuse.

On peut rajouter les contextes suivants: surveillance de l'observance au traitement, ajustement de posologie (par exemple pour le midazolam utilisé en anesthésie, ou le clonazepam utilisé comme antiépileptique) et contrôle de l'absence de prise cachée de BZD.

### **I.3. Contexte médico-légal**

Il existe de multiples contextes de toxicologie médico-légale dont les plus fréquents sont: conduite automobile sous l'influence de psychotropes, soumission chimique (administration à l'insu) ou recherche des causes de la mort.

### **I.4. Intoxication chronique -addictovigilance**

Lors d'une intoxication chronique les BZD sont responsables de tolérance (diminution progressive de l'effet thérapeutique pour une même dose administrée pendant plusieurs semaines). La tolérance peut conduire à une augmentation des doses pour obtenir l'effet recherché. Elles sont également responsables de dépendance, surtout en cas de traitement prolongé. Leur utilisation prolongée peut entraîner un état de dépendance physique et psychique.

L'arrêt du traitement par une BZD, à posologie normale, peut entraîner un phénomène de sevrage. Certains symptômes du sevrage sont fréquents et d'apparence banale. On peut observer ainsi une insomnie, des céphalées, une anxiété importante, des myalgies, une tension musculaire et une irritabilité.

D'autres symptômes de survenue rare peuvent être observés: agitation voire épisode confusionnel, paresthésies des extrémités, hyperréactivité à la lumière, au bruit et au contact physique, dépersonnalisation, phénomènes hallucinatoires et convulsions.

Le syndrome de sevrage peut se manifester dans les jours qui suivent l'arrêt du traitement.

### **I.5. Stabilité des benzodiazépines**

De nombreuses études ont porté sur la stabilité des drogues, mais peu se sont intéressées à la stabilité des BZD dans le sang, le plasma ou l'urine. Voici les principales : le Tableau 4 présente une revue de la bibliographie concernant la stabilité de certaines BZD



**Tableau VII:** Etude bibliographique de la stabilité des BZD

Molécules étudiées	Echantillons	Stockage	Durée	Conclusion	Remarques	Auteurs
Benzodiazépines	sang, bile, humeur vitrée post-mortem	25°C	24 semaines	Instable	Analyse impossible (décomposition biologique, production d'interférents)	<b>[39]</b>
Lorazépam		-20°C ou -80°C		Stable		
Lorazépam		4°C		Instable	dégradation (ajout NaF permet de diminuer la dégradation du lorazépam)	
Estazolam		-80°C; -20°C; 4°C		Stable		
Estazolam	sang post mortem	-20°C ; 4°C	24 semaines		stable malgré une diminution des concentrations de 20%	<b>[40]</b>
Estazolam		25°C			diminution des concentrations de 25%	
Chlordiazépoxide		4°C ; 25°C		Instable	dégradation rapide	

Molécules étudiées	Echantillons	Stockage	Durée	Conclusion	Remarques	Auteurs
Chlordiazépoxide		-20°C ; -80°C		Stable		
Nitrazépam	plasma, sérum, sang	4°C	3 semaines	stable	dégradation à la lumière dégradation en 7-aminonitrazépam	[41]
		25°C		instable		
Témazépam	sang	-20°C	12 mois	Stable	Très stable (82% taux récupération)	[41]
		5°C et 25°C		Instable	Diminution significative de la concentration	
Nitrobenzodiazépines	stérile ou en présence de bactéries				Si échantillon stérile: composés relativement stables En présence de bactéries: pertes conséquentes en quelques heures (surtout si T°C élevée et absence de NaF)	[42]

Molécules étudiées	Echantillons	Stockage	Durée	Conclusion	Remarques	Auteurs
Flunitra-zépam					La plus instable des nitrobenzodiazépines (rapidement converti en 7 - aminoflunitrazépam (lui-même instable))	
Clonazé-pam					Disparition rapide, comme le 7 - aminoclonazépam	
Broma zépam	Plasma	-20°C ; 4°C	1 mois	Stable		[43]
		25°C		Instable		
Clonazépam, Midazolam		20°C		Instable	Diminution concentration de 70 à 100%	
Flunitra-zépam, Oxazépam		4°C	1 an	Instable	Diminution concentration assez élevée	[44]
		-20°C		Stable	Diminution concentration de 10 à 20%	
		- 80°C		Stable	Diminution non significative	

Molécules étudiées	Echantillons	Stockage	Durée	Conclusion	Remarques	Auteurs
Benzodiazépines	plasma, sang	4°C	240 jours		Diminution significative de la concentration	[45]
Diazépam, Nordazépam Flunitrazépam	sang post mortem	-20°C	16 à 18 ans	relativement stable	Légère diminution des concentrations	[46]
Clonazépam				instable	Diminution des concentrations	

En conclusion de cette étude, les échantillons cliniques ou médico-légal doivent être stockés de préférence à -20°C ou -80°C car seules ces températures permettent de stabiliser les BZD dans les échantillons [39–41,44].

Il en est de même pour toutes les solutions de travail. Toutes ces données suggèrent que les résultats quantitatifs concernant des stockages prolongés doivent être interprétés avec précaution [39,44].

## II. METHODES DE DOSAGE DES BENZODIAZEPINES

### II.1. La chromatographie

#### II.1.1. Historique

La première description de la méthode de séparation chromatographique est donnée dans le cadre d'une communication présentée en 1903 et a été appliquée en 1906. En 1930-31, la méthode est introduite en pratique dans les laboratoires par Kuhn et Elederer à Heidelberg en Allemagne. En quelques années, la chromatographie en phase liquide sur colonne devient une technique rendant possible de nombreuses découvertes concernant différentes disciplines. En 1938, Reichstein introduit la chromatographie liquide pour séparer des substances incolores.

Avant les années 1970, un petit nombre de méthode chromatographique est utilisé dans les laboratoires. Ultérieurement, des colonnes ouvertes sont utilisées pour initier l'introduction de Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) dans la séparation des composés chimiques complexes. [47]

### **II.1.2. Définition de la chromatographie**

La chromatographie est un ensemble de procédés applicables à des mélanges moléculaires ou ioniques, basés sur des différences de distribution des solutés entre une phase stationnaire et une phase mobile continue: les deux phases étant mises en contact intime et à contre-courant.

- Les différentes méthodes chromatographiques sont :
  - La Chromatographie en Phase Gazeuse CPG
  - La Chromatographie sur Couche Mince CCM
  - La Chromatographie en Phase Liquide CPL
  - La Chromatographie Liquide à Haute Performance CLHP
  - La Chromatographie en Phase Supercritique CPS

### **II.1.3. Objectif d'une méthode chromatographique :**

Lorsqu'il développe une méthode, l'objectif de technicien est triple: obtenir des pics chromatographiques les plus fins possible (grande efficacité), les mieux séparés possibles (bonne résolution), en un temps d'analyse minimum. La notion de résolution est directement liée à celles d'efficacité et de séparation. De l'efficacité de la colonne dépend la dispersion de l'ensemble des molécules d'un soluté autour de son temps de rétention: meilleure est l'efficacité et plus fins sont les pics chromatographiques.

La qualité de la séparation dépend également des rétentions relatives des différents analytes en mélange. La résolution augmente avec la longueur de la colonne, au détriment du temps d'analyse et de l'efficacité [48].

## **II.2. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

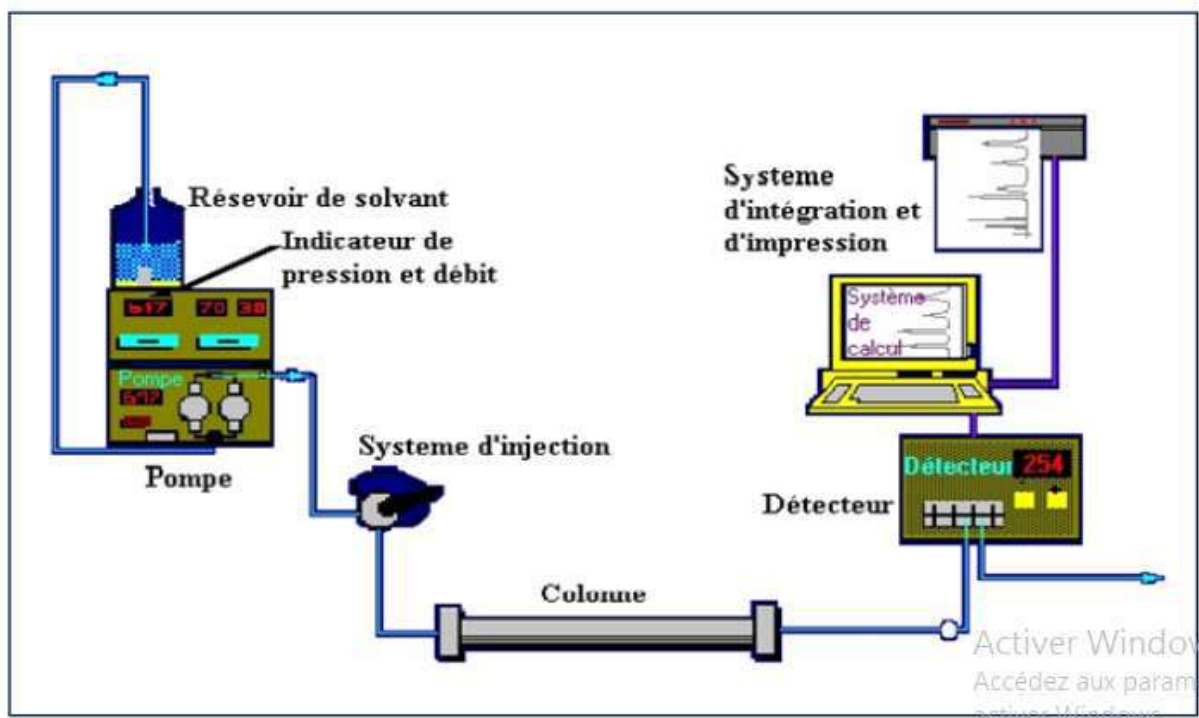
### **II.2.1. Principe de la HPLC**

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est injecté dans le chromatographe. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire contenu dans un tube appelé colonne.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme [47].

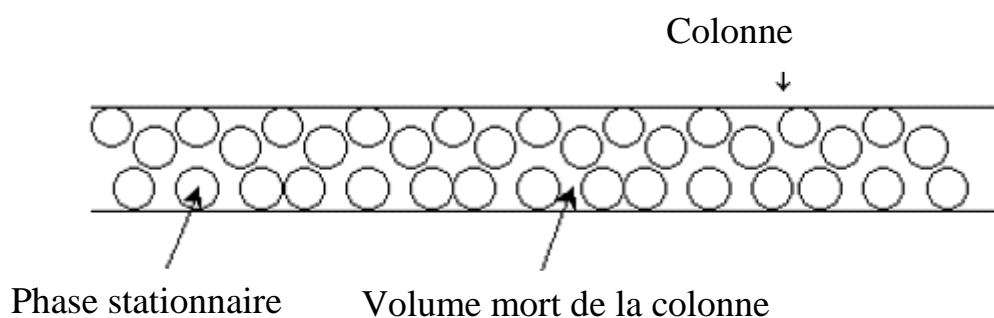
Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non-miscibles: l'une mobile et l'autre stationnaire. Ce principe est traduit par le schéma suivant:



**Figure 4:** Principe de fonctionnement d'une chaîne CLHP

## II.2.2. Notions fondamentales

### II.2.2.1. Notions de phase stationnaire:



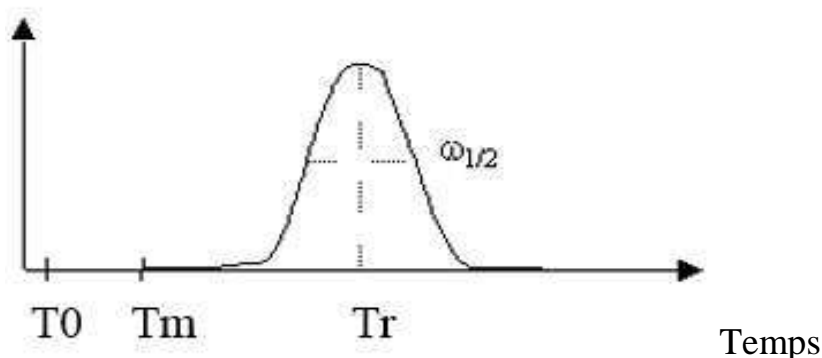
**Figure 5:** Phase stationnaire d'une colonne

La phase stationnaire est un support plus ou moins poreux recouvert d'un gel (liquide greffé) qui a les propriétés désirées pour retenir les molécules de solutés.

La phase mobile ou éluant est un liquide qui entraîne les solutés à travers la colonne.

### II.2.2.2. Notion de temps de rétention [49]

Valeur de détection



- $T_0$  est le temps du début de l'injection
- $T_m$ : temps mort; c'est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile).
- $T_r$ : temps de rétention; c'est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne (le temps passé dans la phase stationnaire et dans le volume mort de la colonne).

Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnée. La surface du pic est fonction de la quantité du constituant dont il est la trace.

Le temps de rétention réduit  $T'_r$  qui est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire pourra être définir comme suit :

$$T'_r = T_r - T_m$$

### II.2.2.3. Notion de pression:

Les particules de phase stationnaire sont sphériques. Si l'on divise leur diamètre par 10, on diminue leur surface d'un facteur 100 et leur volume d'un facteur 1000. On peut donc placer dans la colonne 1000 fois plus de particules et donc augmenter de 10 fois la surface en contact avec la phase mobile. La résistance à l'écoulement de la phase mobile sera donc augmentée.



En conséquence, pour maintenir un débit constant dans la colonne, il faut augmenter la pression. En CLHP, on travaille à des pressions comprises entre 20 et 150 bars [49]

#### **II.2.2.4. Notion de polarité et de polarisabilité**

La polarité d'une molécule est une notion intrinsèque. Certaines molécules étant dissymétriques, les électrons ne sont pas uniformément répartis autour d'elles. De ce fait, il existe un moment dipolaire permanent qui crée un champ électrique local. Ces molécules sont dites polarisées [49]

Sur certaines molécules isolées qui ne possèdent pas de moment dipolaire permanent, un champ électrique peut créer un champ dipolaire induit en modifiant la position relative des atomes. Ces molécules sont dites polarisables [49]

Il existe des échelles de polarité. On utilise la notion de polarité comme une donnée comparative entre molécules. On dit que tel composé est plus polaire ou moins polaire qu'un autre. De même, on dit que la phase mobile et la phase stationnaire sont polaires, peu polaires ou apolaires.

Pour qu'il y ait séparation chromatographique de composés, il faut que leurs molécules interagissent de manières différentes avec au moins une des phases (stationnaire et mobile). Ces phases doivent avoir des polarités différentes.

On peut appliquer la règle "qui se ressemble s'assemble" à l'ensemble soluté - phase stationnaire.

- Si la phase stationnaire est polaire, les composés polaires seront plus retenus que les composés non polaires.
- Si la phase stationnaire est apolaire, les composés apolaires seront plus retenus que les composés polaires.

A l'origine, les colonnes étaient remplies de silice (phase stationnaire polaire). La silice doit sa polarité aux groupements silanols Si-OH qui sont polaires. Pour que la séparation soit efficace, la phase mobile doit alors être peu polaire.

L'ensemble "phase stationnaire polaire et phase mobile peu polaire" forme la chromatographie à polarité de phase normale [49].

Par la suite, les particules de silice (support) ont été enrobées de paraffine en C 18 pour faire une phase apolaire. Dans ce cas, pour que la séparation soit efficace, la phase mobile est polaire (généralement à base d'eau). L'ensemble "phase stationnaire apolaire et phase mobile polaire" forme la chromatographie à polarité de phase inversée [49].

Aujourd'hui, les phases stationnaires sont greffées chimiquement pour la plupart sur de la silice sphérique et calibrée.

Dans la pratique, chaque séparation nécessite une polarité de la phase mobile qui lui est propre. Chaque solvant ayant une polarité donnée, on ajuste la polarité globale de la phase mobile en mélangeant plusieurs solvants miscibles. A cette composition de phase mobile correspond une force éluante qui caractérise le pouvoir d'entraîner les solutés.

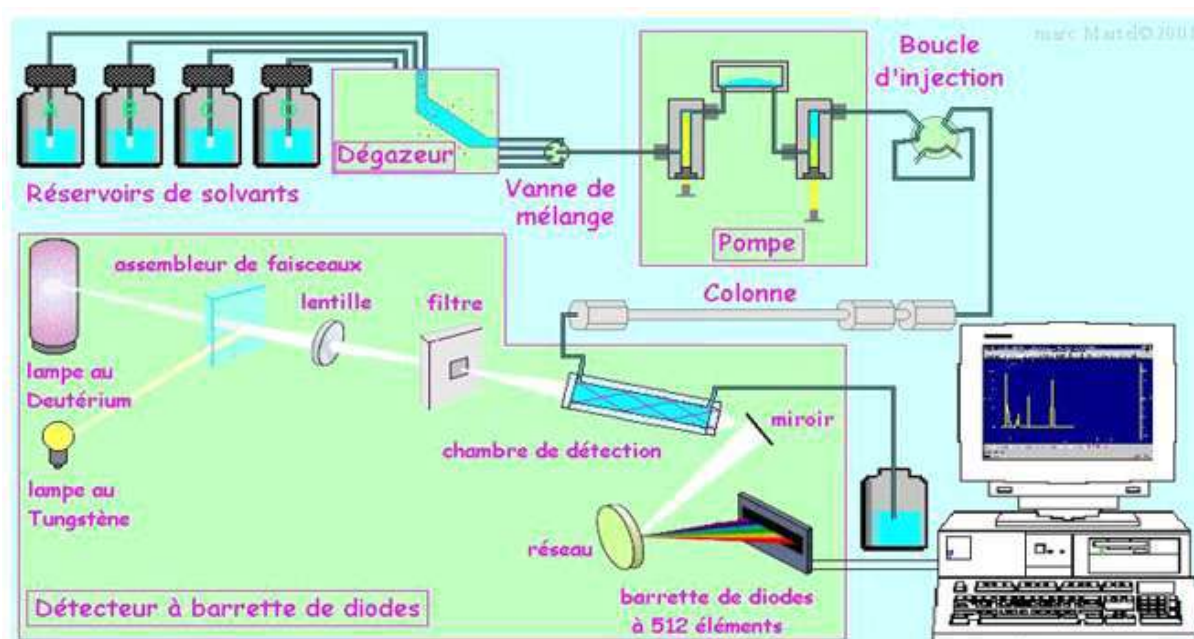
Il faut ajuster la force éluante en fonction des solutés à séparer. Pour cela, on peut utiliser un solvant pur ou un mélange de solvants de façon constante : on dit alors travailler en mode isocratique.

Dans certains cas, il est utile de faire varier la force éluante au cours de l'analyse. Si le mélange de différents solvants varie au cours de la séparation, on réalise alors un gradient d'élution, car la meilleure force éluante pour le début de l'analyse n'est pas forcément adaptée pour une bonne séparation des solutés sortant en fin de chromatogramme.

Ces 2 modes sont utilisés pour des analyses en chromatographie à polarité de phase normale ou inversé.

### II.2.3. Appareillage de la HPLC:

Les différentes composantes d'une chaîne CLHP sont présentées sur le schéma suivant (figure 5). Tous les organes du système sont liés à un micro-ordinateur qui pilote tous les processus.



**Figure 6:** Schéma du principe de fonctionnement d'une chromatographie liquide [50]

L'appareillage se compose d'un réservoir contenant la phase mobile, d'un système de pompage, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique (éventuellement thermostatée), d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (avec un logiciel pour traiter les signaux).

#### II.2.3.1. Le réservoir de la phase mobile:

Il contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluant (solvant de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe qui réalise le mélange demandé. Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans laquelle plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon.

### **II.2.3.2. Le Dégazeur:**

S'il est nécessaire le dégazage peut se faire par agitation de façon manuelle ou à l'aide d'un dispositif approprié.

### **II.2.3.3. La pompe**

Elle délivre la phase mobile à un débit constant et à une certaine pression en vue d'atteindre la colonne. Elle permet de travailler soit :

- En mode isocratique, c'est à dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- En mode gradient, c'est à dire avec une variation des constituants du mélange d'éluant.

Les paramètres actuels d'une pompe sont:

- débit: 0,01 à 10 mL/min
- stabilité < 1% (<0,2% pour des chromatographies d'exclusion diffusion)
- pression maximale < 350 bars

La pression à imposer dépend des facteurs suivants:

- débit de la phase mobile
- viscosité du modificateur organique
- taille des grains de la phase stationnaire
- géométrie de la colonne

### **II.2.3.4. L'injecteur:**

L'injection de l'échantillon se fait de deux manières:

- **Manuelle:** l'injecteur comporte une vanne à plusieurs voies montée sur le parcours de la phase mobile, juste avant la colonne.

L'échantillon à analyser est introduit avec une micro-seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle; l'échantillon est ainsi inséré avec un flux de phase mobile.

- **Automatique:** l'injection se fait automatiquement, l'injecteur utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50  $\mu$ L...), cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression Elle possède 2 positions. La première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe (load), la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique (inject).

Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue dans la colonne.

### **II.2.3.5. La colonne:**

La colonne est l'élément majeur de la chaîne CLHP. Le choix d'une colonne HPLC est lié aux paramètres suivants:

- Type de la phase stationnaire
- Longueur qui est de 5,10, 15, ou 25 cm
- Diamètre des particules (dp) qui est de 3, 5, ou 10  $\mu$ m
- Débit de la phase mobile supportable

En chromatographie liquide à haute performance de phase inversée, la phase stationnaire est apolaire et la phase mobile modérément polaire, l'efficacité de remplissage est fortement affectée par la qualité du gel de silice de la phase stationnaire. Il est possible d'utiliser une colonne de type C8, qui a plusieurs avantages et peut être utilisée pour les analyses des produits pharmaceutiques par CLHP. La Phase stationnaire apolaire, est formée d'un gel de silice dans lequel on a greffé des fonctions chimiques le plus souvent de chaînes alkyles à 8 atomes de carbone, hydrophobes.

La phase stationnaire est maintenue entre deux disques frittés, on distingue deux types de phase stationnaire:

### **II.2.3.6. La phase stationnaire normale:**

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête.

### **II.2.3.7. La phase stationnaire inversée:**

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire tels que l'acétonitrile, le méthanol et l'eau. Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

L'augmentation du nombre de chaîne greffée par unité de surface fait diminuer le temps de rétention et augmenter la séparation des signaux ainsi que le facteur de la sélectivité. A des pH supérieur à 8, les greffons se trouvent instables. Pour les composés ionisés, il faut ajuster le pH pour que les composés gardent leur forme neutre nécessaire à leur rétention par la colonne.

Les gels de silice sont stables dans une grande gamme de pH mais ils ne supportent pas des pH trop extrêmes. Il y a des risques de dissolution pour des pH trop acides ou trop basiques, il convient par conséquent de se limiter à la gamme de pH comprise entre 2 et 12.

### **II.2.3.8. Le détecteur:**

Le détecteur est relié à la sortie de la colonne. Les solutés en sortie de la colonne chromatographique sont en solution très diluée dans une phase éluant dont la nature et la composition varient d'une analyse à l'autre, de ce fait un détecteur est nécessaire puisqu'il permet de suivre en continu la séparation et de mesurer la

concentration des solutés. Le choix d'un détecteur dépend à la fois des caractéristiques physiques des composés à séparer et des conditions opératoires.

Le détecteur suit l'apparition des analytes. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps.

Il existe différents types de détecteurs:

- Détecteur UV-visible
- Réfractomètre
- Détecteur à fluorescence
- Détecteur à barrette de diodes (DAD)

Ainsi que différents types de couplage :

- Chromatographie liquide/Spectrométrie infrarouge
- Chromatographie liquide/Spectrométrie de masse

### **II.2.3.9. L'enregistreur**

L'enregistreur reçoit un signal électrique proportionnel à la concentration de l'analyte qui traverse le détecteur. Ce signal est traité, amplifié puis utilisé pour tracer le chromatogramme. Pour qu'un pic soit exploitable, on considère généralement que le rapport signal/bruit doit être au moins de trois. Le bruit se traduit par des oscillations plus ou moins marquées autour de la ligne de base, ce bruit de fond aléatoire provient de diverses causes :

- la variation de température de la pression
- l'instabilité électronique

Par ailleurs il convient d'avoir une ligne de base aussi proche que possible de l'horizontale.

## **DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE**



# **CHAPITRE 1 : CADRE MATERIEL ET METHODE**

## **I. CADRE ET TYPE DE L'ETUDE**

### **I.1. Cadre de l'étude**

L'étude a porté sur la mise au point et la validation d'une méthode analytique pour l'identification et la quantification en routine de BZD dans le plasma par CLHP-DAD.

Cette étude a été initiée par le Service de Toxicologie du Laboratoire National de Santé Publique (LNSP) en collaboration avec le Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Agro-industrielle de l'Unité de Formation et de Recherche (UFR) des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët Boigny d'Abidjan ; puis s'est achevée à la Direction du Laboratoire Central de la Police (DLCP)

Une enquête préliminaire s'est déroulée dans les pharmacies des CHU de Cocody, Yopougon et Treichville.

### **I.2. Type et période de l'étude**

Il s'agissait d'une étude transversale à visée descriptive, qui comportait deux volets:

- un volet enquête qui s'est déroulé de septembre à décembre 2017
- un volet analytique qui a pris fin en juillet 2018

## **II. MATERIELS ET METHODE**

### **II.1. Matériels**

#### **II.1.1. Fiche de l'enquête**

Afin de mener à bien nos enquêtes sur l'utilisation des molécules de benzodiazépines dans les officines de pharmacie et dans les CHU, une fiche d'enquête a été établie. Sur chaque fiche l'on retrouvait deux sections :

- Section 1 : Identification de l'établissement sanitaire;
- Section 2 :
  - ✓ Pour les fiches destinées aux CHU : Renseignements sur les molécules BZD disponibles et sur le traitement.
  - ✓ Pour les fiches destinées aux officines : Renseignements sur les molécules BZD disponibles.

Ces fiches sont présentées en les annexes 4 et 5.

Dans le cadre de cette étude, ont été retenues dix (10) échantillons de plasma prélevés chez 10 patients internés dans le service des Urgences du CHU de Yopougon

#### **II.1.2. Population d'étude**

##### **➤ Critères d'inclusion :**

Etaient inclus dans l'étude les patients alités dans l'établissement sanitaire retenu pour l'échantillonnage après l'enquête; étant en état de conscience et consentants.

##### **➤ Critère de non inclusion :**

Les patients ne répondant pas aux critères d'inclusion ou s'étant retiré de l'acceptation de coopération.

➤ **Considération éthique:**

A chaque patient répondant aux critères l'on a expliqué le thème et les objectifs de l'étude. Le prélèvement sanguin s'est fait après l'obtention du consentement éclairé, par le patient lui-même ou son tuteur légal. Lequel consentement a été recueilli par signature ou par une croix apposée sur le formulaire de consentement.

### **II.1.3. Prélèvement**

A la suite de l'enquête et du développement et validation de la méthode d'analyse du diazépam dix (10) échantillons de sang ont été prélevés dans des tubes EDTA. Les prélèvements ont été réalisés chez des patients internés au CHU de Yopougon. Le plasma de chaque échantillon a été ensuite séparé par centrifugation à 2000 rpm pendant 10 minutes et conservé à 4°C en vue du dosage.

### **II.1.4. Aspect analytique**

Le dosage a été réalisé au moyen d'une méthode chromatographique CLHP avec un détecteur à barrette de diodes

#### **II.1.4.1. Instrumentation et réactifs**

##### **II.1.4.1.1. Instrumentation**

- **Verrerie et accessoires :**

Ils sont constitués des éléments suivants :

- spatule ;
- micropipettes de P1000; P200; P 20.
- béchers 250ml; 100ml et 50ml en verre;
- entonnoir en verre;
- erlenmeyers de 250ml et 500 ml en verre;
- pissette à eau;
- fiole jaugée de 10ml, 50ml, 250ml en verre;
- chronomètre;

- gants en latex;
- bavettes;
- blouse blanche à longues manches
  - **Appareillage:**
- une chaine CLHP de type *SHIMADZU*<sup>®</sup> avec:
  - une Pompe d'injection (4 à 400 bar)
  - un Injecteur automatique muni d'une boucle d'injection
  - un four (25 à 90 °C)
  - d'un détecteur UV/Vis à barrette de diodes de longueurs d'ondes 200 à 800 nm
  - une colonne de type Waters Spherisorb (4,6\*250 mm ; 5µm)



**Figure 7: La chaine CLHP**

- une Balance analytique de précision de METTLER TOLEDO<sup>®</sup> série MS 204 S ;
- un vortex;
- un bain ultrason de type SONOREX DIGITAL 10P
- un bain marie de type STUART-RE 3000 B
- une hotte.
- une centrifugeuse type 80-2B

## **II.1.4.1.2. Réactifs**

La liste des réactifs ayant servi à l'analyse est composée de :

- méthanol grade CLHP et eau déminéralisée pour préparer la phase mobile.
- solution étalon de diazépam à 0,025 g/L dans du méthanol (grade CLHP).
- dihydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )
- carbonate de Sodium (0,7M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).
- .dichlorométhane

## **II.2. Méthode**

### **II.2.1. Réalisation de l'enquête:**

L'enquête s'est déroulée du mardi au vendredi de 09h à 17h dans 125 officines de pharmacie ainsi que dans les pharmacies de 03 CHU du district d'Abidjan à savoir le CHU de Yopougon, de Treichville et celui de Cocody. Elle a duré 4 mois allant de Septembre à Décembre 2017

Elle a consisté à répondre au questionnaire de la fiche d'enquête (Annexes 4 et 5)

### **II.2.2. Mise au point de la méthode**

#### **II.2.2.1. Préparation des solutions standards**

➤ Préparation de la solution tampon

Peser 3,9 g de dihydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) à dissoudre dans 1 litre d'eau ultrapure.

Faire passer la solution obtenue à la sonication.

Ajuster le pH à 2,625 avec l'acide orthophosphorique.

Filtrer la solution sur un filtre 0,45  $\mu\text{m}$  pour obtenir la solution tampon de pH 2,625.

➤ Préparation de la phase mobile

La phase mobile est constituée du mélange Tampon/Acétonitrile : 50/50 (V/V)

➤ Préparation la solution mère diazépam

Une prise d'essai de 2,50mg de la poudre pure de diazépam est dissoute dans une fiole de 100 ml avec du méthanol grade HPLC afin d'obtenir une solution.

#### **II.2.2.2. Détermination du temps de rétention et du maximum, d'absorption UV du diazépam**

L'instrument utilisé est un appareil HPLC de type SHIMADZU. L'analyse est effectuée à température ambiante (22°C) dans des conditions isocratiques. La séparation est réalisée à partir d'un point de la gamme à 2µg/ml en utilisant une colonne de type Waters spherisorb (4,6\*250 mm ; 5µm). La phase mobile est constituée d'acétonitrile - tampon phosphate (pH 2,625; 25mM) (50:50; v/v). L'élution est faite en mode isocratique un débit 0,5 mL min<sup>-1</sup> selon la séquence balayage allant de 200 à 400nm. Le pH de la solution tampon est mesuré à l'aide d'un pH-mètre (Seven Compact Ph).

#### **II.2.2.3. Préparation de la gamme étalon**

A partir de la solution étalon (Se) de diazépam à 0,025 g/L nous préparons par dilution successive une gamme de six solutions diluées dans des fioles jaugées de 10ml numérotées de 1 à 6 selon les tableaux ci-dessous. On injecte chacune des solutions préparées dans la chaîne CLHP.

Le tableau VIII illustre la préparation de la gamme étalon du diazépam.

**Tableau VIII:** Préparation de la gamme étalon du diazépam

Numéro de la fiole	1	2	3	4	5	6
<b>Solution étalon prélevée (ml)</b>	7 S <sub>2</sub>	6,25 S <sub>3</sub>	7,273 S <sub>4</sub>	7,857 S <sub>5</sub>	8,235 S <sub>6</sub>	8,5 SE
<b>Volume final après ajout d'eau (ml)</b>	10	10	10	10	10	10
<b>Concentration en diazépam (µg/ml)</b>	0,35	0,5	0,8	1,4	1,7	2

Les surfaces des pics obtenues pour chaque injection de concentration connue permettent de tracer la courbe d'étalonnage à partir de laquelle l'on détermine les paramètres de régressions linéaires.

Il s'agit d'une droite d'équation  $y = aX + b$  avec :

y = Surface du pic

X = Concentration connue du diazépam en µg/ml

a = Coefficient directeur et b = Ordonnée à l'origine

Chaque concentration de diazépam de nos échantillons sera déduite à partir de cette équation. Nous aurons ainsi:

$$X = (Y-b)/a$$

#### II.2.2.4. Extraction du diazépam

Le solvant d'extraction retenu pour le diazépam est un mélange dichlorométhane, hexane (3,4 v / v).

Pour la réalisation de l'extraction, préparer dans trois fioles, des solutions de plasma de concentration en diazépam correspondant à 800 ng/ml ; 1400 ng/ml et 2000 ng/ml et représentant les niveaux bas, moyen et élevé.



Pour chaque solution de plasma prélever 1ml de plasma et le mettre dans un tube à essai Ajouter à la solution 1 ml de carbonate de sodium puis 4ml du mélange de solvant d'extraction

Agiter au vortex pendant 5 min; puis Centrifuger à 2000 rpm pendant 10 min la solution.

Récupérer dans un tube à essai la phase organique obtenue après centrifugation.

Réaliser une deuxième puis une troisième extraction avec 4ml du solvant d'extraction.

La phase organique récupérée à chaque extraction est évaporée au bain marie à 70°C.

L'extrait sec est reconstitué avec 1,5ml du mélange solution tampon-acétonitrile (50 :50 v/v) ; agité au vortex puis soumis au bain à ultrason pendant 5 min.

#### **II.2.2.5. Dosage du diazépam dans les échantillons :**

Le résidu sec de diazépam récupéré avec 1,5 ml de l'éluant (mélange tampon-acétonitrile 50 :50 (V/V)) est injecté dans la chaîne CLHP.

Le facteur de dilution (F1) pour obtenir la concentration de diazépam dans notre 1ml d'échantillon de plasma de départ est de : 1,5.

La quantité de diazépam (Q) pour chacun des échantillons de plasma analysés sera donc :

$$Q = X \times F1 \leftrightarrow Q = X \times 1,5$$

X = Concentration de diazépam du résidu dilué obtenue à partir de la droite d'étalonnage (ng/ml).

### **II.2.3. Protocole de validation**

Le procédé a été validé par la détermination de la linéarité, exactitude, limites de détection (LD) et de quantification (LQ) selon les directives de l'Internationale Conférence sur l'Harmonisation (ICH) [51] dont l'objectif est de démontrer que la méthode d'analyse considérée convient pour l'usage auquel elle est destinée .

En règle générale, la validation d'une méthode quantitative doit couvrir les critères suivants :

- linéarité
- fidélité ou précision (reproductibilité et répétabilité)
- justesse
- sensibilité : limite de détection et de quantification

#### **II.2.3.1. La linéarité**

La linéarité est la capacité d'obtenir à l'intérieur d'un certain intervalle des résultats directement proportionnels à la concentration de la substance analysée dans un échantillon. La linéarité est étudiée sur un intervalle de mesure couvert par une série de six concentrations : 350 ng mL<sup>-1</sup>; 500 ng mL<sup>-1</sup>; 800 ng mL<sup>-1</sup>; 1400 ng mL<sup>-1</sup> et 1700 ng mL<sup>-1</sup> et 2000 ng.mL<sup>-1</sup>) On effectue trois séries de mesures six concentrations pendant trois jours consécutifs. Chaque solution est injectée 3 fois avec un volume de 10 µL. Avant l'injection des solutions, la colonne était équilibrée pendant au moins 20 min avec la phase mobile. Les aires des pics des substances ont été tracées en fonction des concentrations du diazépam

La droite d'étalonnage à partir des dilutions obtenues est déterminée avec les paramètres suivants:

- coefficient de corrélation r
- coefficient de détermination r<sup>2</sup>
- équation de la droite de régression  $Y = aX + b$

### **II.2.3.2. La précision**

Elle traduit l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un échantillon homogène dans les conditions précises. Elle comprend la répétabilité et la reproductibilité.

La répétabilité exprime la fidélité sous des conditions identiques: même analyse, même équipement, même réactif, et dans des conditions aussi stables que possible sur un intervalle de temps court.

- Etude de la fidélité des solutions de référence

Les solutions de référence diluées de diazépam ont été analysées (n=3) puis les coefficients de variation des surfaces ont été calculés.

$$CV = 100 \cdot \sigma / X$$

$$\sigma = \text{écart type} \quad X = \text{moyenne}$$

- Etude de la fidélité de la procédure d'analyse

Trois échantillons de plasma de concentrations 500 ng/ml ; 1400ng/ml et 2000 ng/ml retenus pour l'étude sont soumis à la procédure d'extraction à six reprises (n=6). Chaque extrait est analysé dans les mêmes conditions.

Le Coefficient de Variation (CV) des surfaces obtenues est calculé.

### **II.2.3.3. L'exactitude**

L'exactitude correspond au degré de concordance entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention. Elle est déterminée sur trois échantillons de plasma de concentrations 500 ng/ml ; 1400 ng/ml et 2000 ng/ml. Le principe de l'exactitude est de calculer les valeurs de recouvrements en % entre les quantités retrouvées et les quantités introduites.

#### **II.2.3.4. Les limites de détection LD et de quantification LQ**

La LD correspond à la plus petite concentration de substance pouvant être mise en évidence dans un échantillon sans pouvoir être quantifiée. La LQ correspond à la plus faible concentration détectable.

La LD et la LQ ont été déterminées à partir de la courbe analytique et expérimentalement selon le rapport signal-bruit tel que défini par ICH [51]

#### **II.2.4. Application sur des échantillons de sang en milieu hospitalier**

Dix échantillons de sang sont prélevés au service des Urgences du CHU de Yopougon

On applique la procédure d'extraction puis le dosage par chromatographie liquide haute performance sur chacun des échantillons.

Les concentrations obtenues sont comparées aux concentrations thérapeutiques admises.

## **CHAPITRE 2 : RESULTATS**

## I. POPULATIONS ETUDIEES :

Pour la réalisation de notre enquête préliminaire; nous nous sommes rendues dans cent vingt-deux (122) officines de pharmacies et les pharmacies des trois CHU du district d'Abidjan.

Sur les cent vingt-deux officines de pharmacie visitées plus de la moitié a accepté de fournir les informations utiles à notre étude

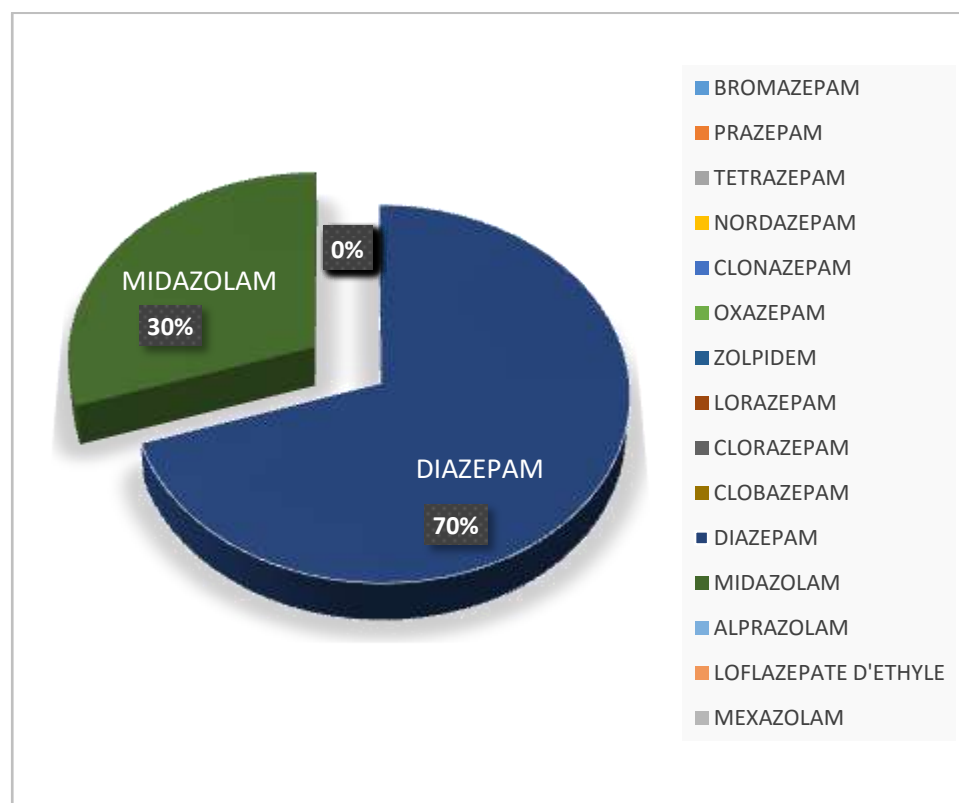
Au total, notre population d'étude se composait de quatre-vingt-huit (88) officines de pharmacie et des trois (03) pharmacies des CHU.

## II. ENQUETES

### II.1. Répartition des BZD selon la Dénomination Commune Internationale (DCI)

#### II.1.1. Répartition dans les CHU :

L'emploi des BZD dans les CHU était représenté suivant la DCI comme la montre la figure 8.

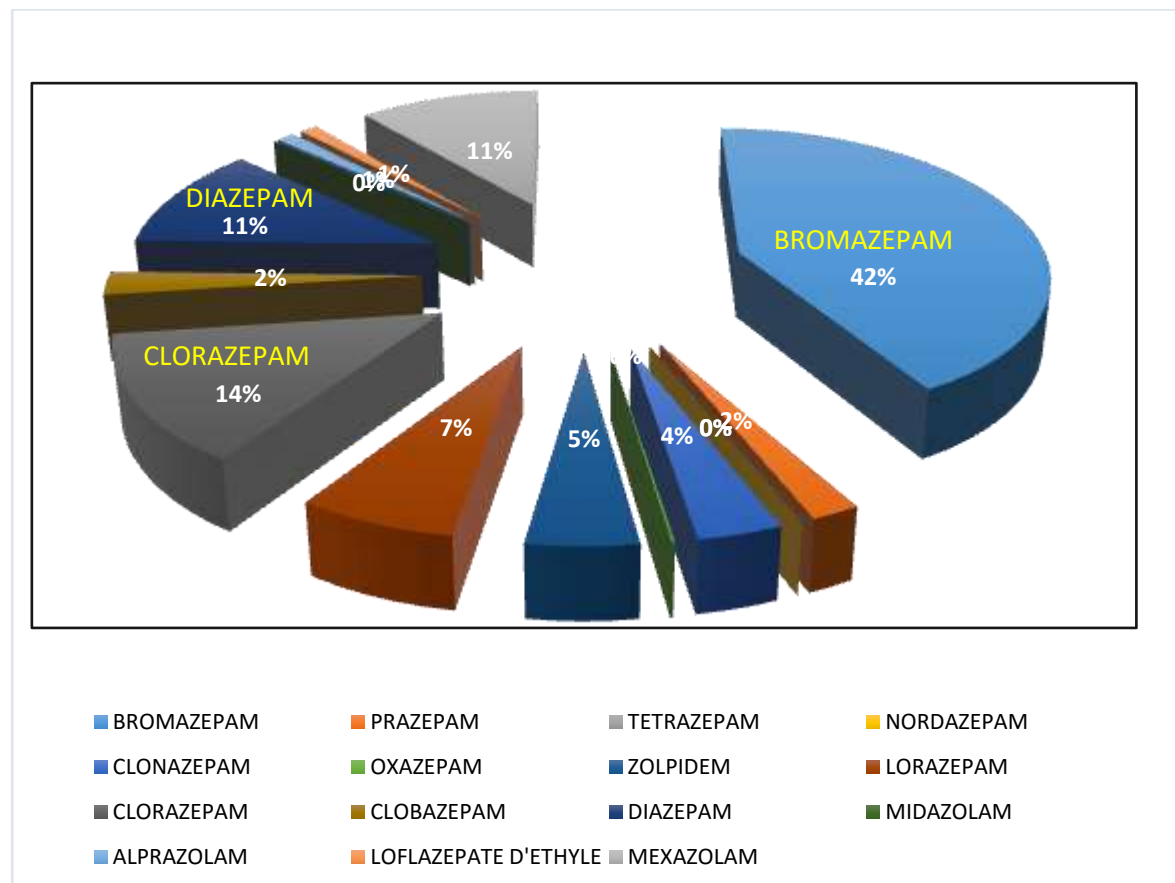


**Figure 8:** Diagramme de la répartition des BZD selon la DCI dans les CHU

La molécule de BZD la plus employée était diazépam (70%); suivie du midazolam (30%). Les autres molécules de BZD n'étaient pas employées dans les CHU.

### II.1.2. Répartition dans les officines de pharmacie

La figure 9 illustre la distribution des BZD dans les 88 officines de pharmacie.

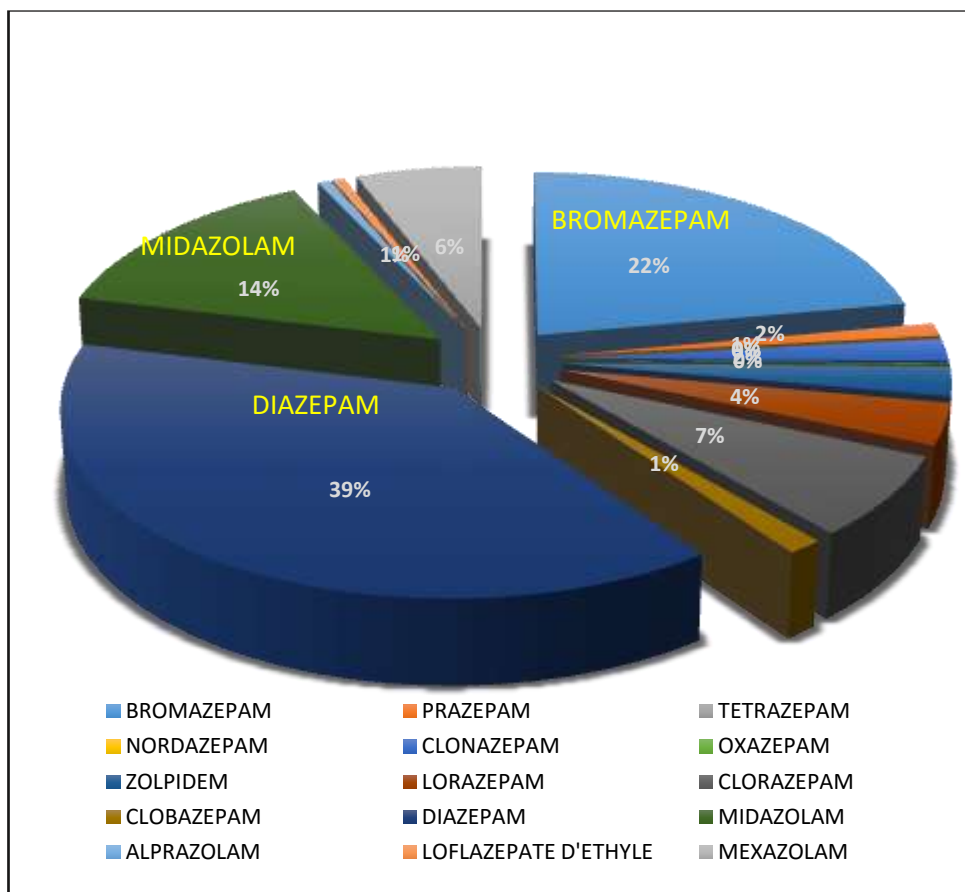


**Figure 9:** Diagramme de répartition des BZD selon la DCI dans les officines de pharmacie

Les trois (03) molécules de BZD les plus employées étaient respectivement le bromazépam (42%); le clorazépam (14%) puis le diazépam (11%).

### II.1.3. Répartition dans les établissements sanitaires (CHU et officines de pharmacie)

La figure 9 présente la répartition des BZD dans les établissements sanitaires.



**Figure 10:** Diagramme de répartition des BZD selon la DCI dans les établissements sanitaires

Les trois (03) molécules de BZD les plus employées dans les établissements sanitaires visités étaient respectivement le diazépam (39%); le bromazépam (22%) puis le midazolam (14%).

### III. METHODE DE DOSAGE:

#### III.1. Résultats de la détermination du temps de rétention et du maximum d'absorption du diazépam

La détermination du temps de rétention et du maximum d'absorption du diazépam faite à partir d'un point de la gamme à 2000 ng/ml et en utilisant une colonne de type Waters spherisorb (4,6\*250 mm ; 5µm), une phase mobile constituée d'acétonitrile - tampon phosphate (pH 2,625; 25mM) (50:50; v/v) et un débit à 0,5 mL min<sup>-1</sup> a conduit à l'obtention d'un temps de rétention de 8 min et un maximum d'absorption de 230 nm



## **III.2. Résultats de la validation de la méthode analytique utilisée:**

### **III.2.1. La linéarité de la méthode:**

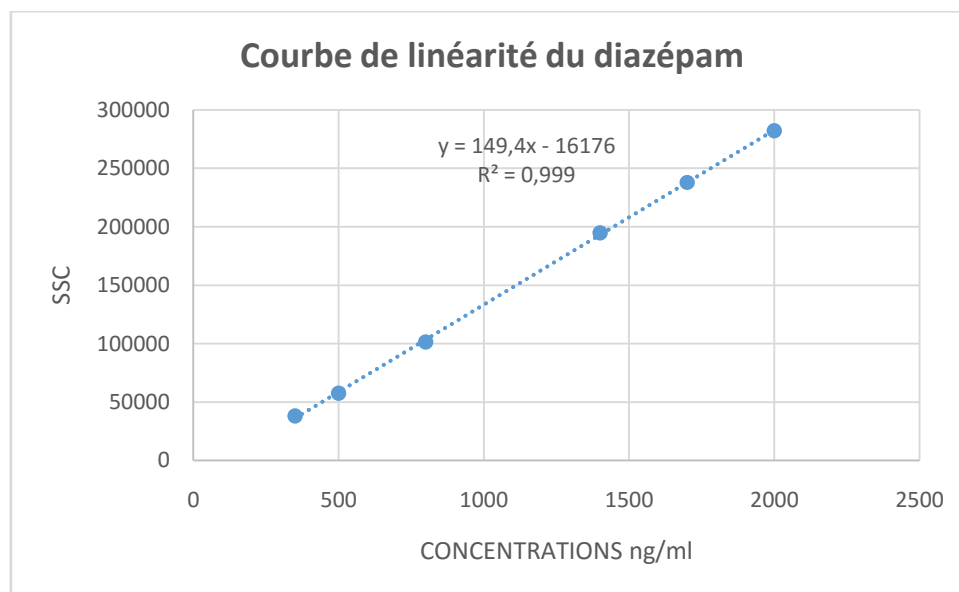
La courbe d'étalonnage du diazépam est linéaire sur toute la gamme de concentration de 350 à 2000 ng mL<sup>-1</sup> (6 concentrations différentes ont été utilisées, et chaque solution a été injectée 3 fois). Le tableau IX et les figures 11 représentent respectivement les points de linéarité et la courbe de régression correspondant au diazépam.

Le tableau IX présente les paramètres de linéarité de la méthode.

**Tableau IX:** Linéarité de la méthode de dosage

Concentration pondérale (ng/ml)	Surfaces
350	37935
500	57506
800	101362
1400	194763
1700	237960
2000	282264

La figure 11 représente la courbe de linéarité du diazépam.



**Figure 11:** Droite d'étalonnage du diazépam

Les caractéristiques de la droite de régression du diazépam sont les suivantes:

Coefficient de détermination:  $r^2 = 0,9998$

Equation de la droite de régression :  $Y = 149,46 X - 16176$

X = concentration en  $\mu\text{g/ml}$  et

Y = surface du pic

Le coefficient de détermination est très proche de 1.

Le coefficient de corrélation de la droite de régression correspondant au diazépam est supérieur à 0,9998. On peut donc conclure, que la méthode de dosage du diazépam par CLHP est linéaire

### III.2.2. Précision de la méthode:

La répétabilité et la fidélité intermédiaire du diazépam sont évaluées à l'aide du CV calculé d'une part sur les 3 injections des solutions de référence et d'autres part sur les 6 injections de 3 solutions à 800 ng/ml ; 1400 ng/ml et 2000 ng/ml. Les

résultats sont présentés dans les tableaux X et XI. Les valeurs obtenues montrent une précision convenable pour la méthode analytique.

### III.2.2.1. Répétabilité de l'analyse chromatographique

Le tableau X résume les caractéristiques de la répétabilité de la méthode.

**Tableau X:** Répétabilité des solutions de références de la gamme étalon

Concentration pondérale (ng /ml)	800	1400	2000
Surface	100129	197217	276606
	102084	192966	282784
	101872	194107	287401
Moyenne	101361,667	194763	282263,667
Ecart-type	1072,77	2200,19	5416,28
Coefficient de variation (CV) (%)	1,06	1,13	1,92

La répétabilité des solutions de référence du diazépam à 0,8µg/ml ; 1,4µg/ml et 2µg/ml a donné des coefficients de variation correspondant à 1,06 %; 1,13 %et 1,92 %.

Ces différentes valeurs de CV sont admises dans le domaine de l'analyse quantitative [52].

### III.2.2.2. Fidélité intermédiaire de la méthode sur trois de concentrations en diazépam dans l'échantillon de plasma

Le tableau XI présente les paramètres de fidélité de la méthode.

**Tableau XI:** Etude de la fidélité intermédiaire de la méthode sur trois concentrations plasmatiques en diazépam

Concentration pondérale (ng /ml)	800	1400	2000
Surface	54858	117635	169536
	50802	110480	171333
	53124	121254	174840
	55398	126400	181489
	49333	115196	169286
	52993	120211	183010
Moyenne	52751,33	118529,33	174915,67
Ecart-type	2329,17	5457,14	6036,59
Coefficient de variation	4,41	4,60	3,45

La répétabilité des solutions de référence ont donné des coefficients de variation inférieurs à 2%. Celle de l'ensemble de la procédure a donné un coefficient de variation inférieure à 5%, ce qui est généralement admis dans le domaine de l'analyse quantitative

### **III.2.3. Exactitude de la méthode:**

Elle s'exprime par les pourcentages de recouvrement par rapport à la quantité introduite en principe actif dans les échantillons. Les résultats obtenus lors de l'étude de l'exactitude relative au diazépam sont rassemblés dans le tableau XII.

**Tableau XII:** Paramètres de l'exactitude

Concentration théorique (ng mL <sup>-1</sup> )	Essais	Concentration retrouvée (ng mL <sup>-1</sup> )	Concentration Moyenne retrouvée (ng mL <sup>-1</sup> )	Recouvrement (%)
800	1	712,91	691,76	86,47
	2	672,20		
	3	695,50		
	4	718,32		
	5	657,46		
	6	694,19		
1400	1	1342,94	1351,92	96,56
	2	1271,14		
	3	1379,26		
	4	1430,91		
	5	1318,47		
	6	1368,80		
2000	1	1863,83	1917,82	95,89
	2	1881,86		
	3	1917,06		
	4	1983,79		
	5	1861,32		
	6	1999,06		

Le calcul du pourcentage moyen de recouvrement exprimant l'exactitude de la méthode donne pour les niveaux bas moyen et haut respectivement les valeurs suivantes: 86,47 % ; 96,56 % et 95,89 % lors de l'analyse. Les valeurs pour les niveaux moyen et haut sont comprises dans l'intervalle [95 ,105 %] en plus du fait

que les coefficients de variation relatifs au diazépam dans le plasma sont inférieurs à 5%. La méthode est donc exacte.

### III.2.4. Les limites de détection LD et de quantification LQ

Le tableau XII résume les paramètres de détection et de quantification de la méthode.

**Tableau XIII:** Limite de détection et de quantification du diazépam

Concentration pondérale (ng/ml)	Surface
250	19.731
200	13.316
150	10.030
100	6.206
50	.....

La limite de détection est de 50 ng/ml et la limite de quantification est de 100 ng/ml.



### III.3. Application au dosage du diazepam dans dix échantillons de plasma prélevés chez des patients

Le tableau XIV montre les concentrations plasmatiques de diazépam chez les patients

**Tableau XIV:** Concentrations plasmatiques de diazépam chez les patients

Echantillons		Administration du diazépam		Prélèvement des échantillons sanguins		Concentrations mesurées (ng/ml)	Concentrations moyennes mesurées (ng/ml)
		Dates	Heures	Dates	Heures		
PL-A	PL-A1	24/07/18	23h03	25/07/18	09h05	1043,89	1016,92
	PL-A2					989,95	
PL-B	PL-B1	24/07/18	00h28	25/07/18	09h12	1301,41	1320,875
	PL-B2					1340,34	
PL-C	PL-C1	25/07/18	01h12	25/07/18	10h03	359,75	351,415
	PL-C2					343,08	
PL-D	PL-D1	25/07/18	06h18	26/07/18	11h	1008,24	998,15
	PL-D2					988,06	
PL-E	PL-E1	25/07/18	17h35	26/07/18	19h14	518,95	507,805
	PL-E2					496,66	
PL-F	PL-F1	26/07/18	18h20	27/07/18	10h55	587,47	574,8
	PL-F2					562,13	
PL-G	PL-G1	26/07/18	18h37	27/07/18	11h07	667,59	656,385
	PL-G2					645,18	
PL-H	PL-H1	27/07/18	10h	27/07/18	17h22	937,01	917,17
	PL-H2					897,33	
PL-I	PL-I1	27/07/18	07h10	27/07/18	18h	391,17	396,85
	PL-I2					299,53	
PL-J	PL-J1	27/07/18	22h30	28/07/18	9h35	1107,15	1115,62
	PL-J2					1124,09	

## **CHAPITRE 3 : DISCUSSION**

## **I. ENQUETE :**

L'enquête a permis de montrer que les benzodiazépines les plus employées dans les établissements sanitaires visités sont respectivement le diazépam (39%); le bromazépam (22%) et le midazolam (14%) (Figure 10). Ces résultats diffèrent de ceux rapportés par l'ANSM (8).lors du rapport sur l'état des lieux de la consommation des benzodiazépines. Ce rapport met en évidence l'alprazolam (3,8 %), le zolpidem (3,1 %) et le bromazépam (2,7 %) comme les plus fréquemment utilisés en France dans la période de 2012-2015.

## **II. DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE**

Guidée par les Directives de l'ICH [51] nous avons réalisé la validation du dosage dans le plasma de la BZD la plus fréquemment utilisée dans les établissements sanitaires : le diazépam (figure10). Cette validation de la méthode fait suite à la mise au point de la méthode.

Pour expérimenter le développement puis la validation de la méthode, nous avons extrait le diazépam du plasma avec un mélange de dichlorométhane-hexane et procédé à un dosage par chromatographie liquide haute performance.

La méthode d'extraction choisie est une extraction liquide-liquide, le choix de ce type d'extraction est fonction de plusieurs intérêts à savoir : le coût de l'extraction qui n'exige pas de grandes dépenses et d'investissement en matériels et en réactifs. Aussi ce type d'extraction permet la concentration des échantillons grâce à l'utilisation d'un solvant organique volatile assurant la concentration du soluté par évaporation [53].

Le diazépam, selon la pharmacopée britannique est très peu soluble dans l'eau mais soluble dans l'alcool [54].

Le dichlorométhane et l'hexane sont des choix judicieux pour extraire le diazépam. Puisque la température d'ébullition du dichlorométhane est autour de 39,6°C, celui de

l'hexane est autour de 68°C et que le diazépam reste solide jusqu'à 125,5°C. Il est possible de séparer le mélange dichlorométhane-hexane du diazépam en le faisant évaporer au moyen d'un bain-marie.

La phase mobile était composée d'un mélange tampon/acétonitrile (50/50 V/V).

Notre choix a porté sur l'acétonitrile car il est d'un coût accessible pour les laboratoires et permet d'obtenir de meilleurs pics au chromatographe.

La phase stationnaire utilisée était une colonne de silice greffée en C8 de type Waters spherisorb (4,6\*250 mm ; 5µm).

Le diazépam absorbe entre 200 et 300 nm, ce qui signifie qu'il absorbe dans l'ultraviolet. D'où l'utilisation pour son dosage d'un détecteur à barrette d'iode réglé à 230 nm, longueur d'onde d'absorption retenue pour le diazépam après réalisation d'un balayage entre 200 nm et 400nm.

Nous avons donc effectué une gamme d'étalonnage avec la substance de référence du diazépam et tracé la droite d'étalonnage qui met en relation la concentration de diazépam et la surface du pic obtenu.

Il s'agit d'une droite ascendante qui ne passe pas par l'origine de la forme

$$y = aX + b \text{ (b différent de zéro).}$$

Elle nous a permis de déterminer la concentration du diazépam dans les échantillons de plasma.

Concernant les critères de validation de la méthode :

- La linéarité de la méthode

Nous avons obtenu une droite d'étalonnage à partir de concentrations du diazépam allant de 350 ng/ml à 2000 ng/ml avec des points qui se situent très près de la droite.

Le coefficient de détermination  $r^2$  étant égal à 0,9998 donc très proche de 1, ceci montre qu'il existe une relation de proportionnalité entre tous les points.

Les valeurs de ces paramètres attestent d'une bonne linéarité de la méthode et que cette droite obtenue nous permet de déterminer les différentes concentrations de diazépam dans les échantillons de plasma.

- La précision de la méthode

La méthode proposée a une répétabilité satisfaisante car les coefficients de variation sont conformes aux normes en vigueur [52].

Ainsi, pour des solutions de référence du diazépam, la répétabilité des solutions donne respectivement des coefficients de variation de 1,06 %; 1,13 % et 1,92 %.

Ces résultats sont satisfaisants car la norme exige un coefficient de variation inférieure à 2%

La fidélité intermédiaire de la procédure pour six essais de chacune des concentrations 800ng/ml ; 1400ng/ml ; 2000ng/ml donne respectivement les coefficients de variation suivant 4,41 % ; 4,60 % et 3,45 % conformément aux normes car est inférieur 5% d'erreur généralement toléré en analyse quantitative [52].

Cela montre que notre dosage est précis.

- L'exactitude de la méthode

Les pourcentages de recouvrement de la méthode pour les concentrations de 800 ng/ml ; 1400 ng/ml et 2000 ng/ml sont respectivement de 86,47 % ; 96,56 % et 95,89 %. Le pourcentage de recouvrement de la méthode obtenu pour la concentration de 800 ng/ml pourrait s'expliquer par des pertes au cours de la manipulation notamment au cours de l'extraction.

Excepté celui de la concentration à 800ng/ml les pourcentages obtenus sont conformes à la norme car compris entre 95 – 105%. Valeur généralement recommandée en analyse quantitative [52].

Notre méthode est donc exacte.

- La sensibilité de la méthode

La méthode de dosage proposée donne une limite de détection est de 50 ng/ml et la limite de quantification est de 100 ng/ml.

Comme le montrent les résultats de la validation, la méthode est précise, fiable et rapide. Les résultats des critères de validation justifient l'application de cette méthode au dosage quantitatif du diazépam dans le plasma.

### III. APPLICATION A NOTRE ETUDE

Les concentrations plasmatiques de diazépam chez des patients obtenues à l'issue des analyses sont présentées dans le tableau XV

**Tableau XV:** Concentrations plasmatiques de diazépam

Echantillons : Plasma (PL)		Concentrations moyennes mesurées (ng/ml)
PL-A	PL-A1	1016,92
	PL-A2	
PL-B	PL-B1	1320,875
	PL-B2	
PL-C	PL-C1	351,415
	PL-C2	
PL-D	PL-D1	998,15
	PL-D2	
PL-E	PL-E1	507,805
	PL-E2	
PL-F	PL-F1	574,8
	PL-F2	
PL-G	PL-G1	656,385
	PL-G2	
PL-H	PL-H1	917,17
	PL-H2	
PL-I	PL-I1	396,85
	PL-I2	
PL-J	PL-J1	1115,62
	PL-J2	

Les lignes directrices de consensus Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie (AGNP) pour la surveillance des médicaments en psychiatrie ont fixées l'intervalle thérapeutique du diazépam à [200-2500] ng/ml [55].

Nous remarquons dans ce tableau que les concentrations sont toutes comprises dans l'intervalle thérapeutique recommandé pour le diazépam par les lignes directrices de consensus AGNP. Les concentrations obtenues respectent ainsi l'index thérapeutique défini pour le diazépam.

Ces concentrations qui s'étendent de 351 à 1320 ng/ml sont en accord avec l'Annexe 2 [56] qui fixe les concentrations thérapeutiques du diazépam entre 125 et 1500 ng/ml.

Nous pouvons donc dire que les posologies prescrites conduisent à des concentrations plasmatiques qui demeurent toujours des concentrations thérapeutiques.

Aucune concentration n'atteint la valeur toxique de 1500 ng/ml retrouvée dans l'Annexe 2 [56]



# CONCLUSION

L'objectif général de notre travail était de mettre au point une méthode de dosage de la BZD la plus utilisée dans le district d'Abidjan.

Pour atteindre cet objectif général, nous avons dans un premier temps procédé à l'identification de la BZD la plus employée dans les établissements sanitaires d'Abidjan ; puis avons mise au point une méthode de dosage par chromatographie liquide haute performance de cette molécule identifiée et enfin avons validé la méthode développée tout en veillant à appliquer cette méthode à des échantillons de plasma provenant d'un CHU.

Des analyses ont été effectuées sur des échantillons de plasma, notamment le dosage du diazépam : molécule retenue après enquête. Des critères de validation de la méthode ont été déterminés :

- la linéarité ;
- la répétabilité-reproductibilité ;
- l'exactitude ;
- la limite de détection (LD) ;
- la limite de quantification (LQ).

Il en ressort que la méthode de dosage du diazépam dans le plasma par la CLHP-DAD est une méthode fiable et rapide avec des critères de validations satisfaisantes.

La méthode ainsi proposée peut être utilisée pour le dosage en routine du diazépam dans le plasma.

## RECOMMANDATIONS

Au terme de cette étude, nous pouvons suggérer les recommandations suivantes :

➤ **AUX AUTORITES ADMINISTRATIVES :**

- renforcer les capacités techniques des laboratoires d'analyse toxicologique des médicaments
- renforcer l'évaluation scientifique et technique de la qualité, l'efficacité et la sécurité d'emploi des BZD

➤ **AUX CHERCHEURS :**

- optimiser la méthode de dosage du diazépam dans le plasma par CLHP,
- réaliser la mise au point et la validation de méthode de dosage des autres molécules BZD dans le plasma par CLHP.

➤ **AUX AUTORITES SANITAIRES:**

- renforcer la surveillance continue des effets indésirables prévisibles ou inattendus des molécules BZD par le système de fiches de notification de la pharmacovigilance.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. **GRIFFIN C, KAYE A, BUENO F, et al.**  
Benzodiazepine Pharmacology and Central Nervous System–Mediated Effects.  
Ochsner J. 2013;13(2):214- 223.
2. **MARIN S, ROBERTS M, WOOD M, et al.**  
Sensitive UPLC–MS-MS Assay for 21 Benzodiazepine Drugs and Métabolites,  
Zolpidem and Zopiclone in Serum or Plasma.  
J Anal Toxicol. 1 sept 2012;36(7):472- 476.
3. **BRIOT.**  
Rapport sur le bon usage des médicaments psychotropes (Consulté le 15/01/2018)  
< <http://www.ladocumentationfrancaise.fr/rapports-publics/064000593/index.shtml>>.
4. **WICK J.**  
The history of benzodiazepines.  
Consult Pharm J Am Soc Consult Pharm. sept 2013;28(9):538- 548.
5. **O'CONNOR K, BELANGER L, LECOMTE Y.**  
Benzodiazépines : santé mentale et santé sociale.  
Santé Ment Au Qué. 2003;28(2):15- 21.
6. **ALLGULANDER C, NASMAN P.**  
Regular hypnotic drug treatment in a sample of 32,679 Swedes: associations with  
somatic and mental health, inpatient psychiatric diagnoses and suicide, derived  
with automated record-linkage.  
Psychosom Med. févr 1991;53(1):101- 108.
7. **SANGER D, SOUBRANE C, SCATTON B.**  
New perspectives for the treatment of disorders of sleep and arousal.  
Ann Pharm Fr. juill 2007;65(4):268- 274.
8. **ANSM.**  
Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, Richard N. Etat  
des lieux de la consommation des benzodiazépines en France. (Consulté le  
11/01/2018)  
< [file:///C:/Users/HP/AppData/Local/Temp/ANSM\\_Rapport%20Benzo\\_09012014-1.pdf](file:///C:/Users/HP/AppData/Local/Temp/ANSM_Rapport%20Benzo_09012014-1.pdf)  
>
9. **DELBROUCK M.**  
Psychopharmacologie: à l'usage du médecin et du psychothérapeute. 1<sup>ère</sup> édition.  
Louvain-la Neuve De Boeck Supérieur; 2016. 484 p.

**10. YVES L, JEAU-PIERRE G.**

Des cibles à la thérapeutique (Consulté le 11/01/2018).

<<https://www.dunod.com/sciences-techniques/pharmacologie-cibles-therapeutique>>

**11. BERTILSSON L.**

Mechanism of action of benzodiazepines - the GABA hypothesis.

Acta Psychiatr Scand Suppl. 1978;(274):19- 26.

**12. REYNOLDS D.**

The value of genetic and pharmacological approaches to understanding the complexities of GABAA receptor subtype functions: The anxiolytic effects of benzodiazepines. Pharmacol Biochem Behav. 1 juill 2008;90(1):37- 42.

**13. TAN K, RUDOLPH U, LUSCHER C.**

Hooked on benzodiazepines: GABA<sub>A</sub> receptor subtypes and addiction.

Trends Neurosci. avr 2011;34(4):188- 97.

**14. ATTACK J.**

The benzodiazepine binding site of GABA(A) receptors as a target for the development of novel anxiolytics.

Expert Opin Investig Drugs. mai 2005;14(5):601- 18.

**15. ROY-BYRNE P.**

The GABA-benzodiazepine receptor complex: structure, function, and role in anxiety.

J Clin Psychiatry. 2005;66 Suppl 2:14- 20.

**16. SANKAR R.**

GABA(A) receptor physiology and its relationship to the mechanism of action of the 1,5-benzodiazepine clobazam.

CNS Drugs. 1 mars 2012;26(3):229- 244.

**17. LANDRY P, GERVAIS M, O'CONNOR K.**

Mise à jour sur les considérations pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et les interactions médicamenteuses dans le choix d'une benzodiazépine.

Ann Méd-Psychol Rev Psychiatr. 1 août 2008;166(7):585- 594.

**18. FAUGHT E.**

Pharmacokinetic considerations in prescribing antiepileptic drugs.

Epilepsia. 2001;42 Suppl 4:19- 23.

19. **COWLEY D, ROY-BYRNE P, GREENBLATT D et al.**  
Personality and benzodiazepine sensitivity in anxious patients and control subjects.  
Psychiatry Res. mai 1993;47(2):151- 162.
20. **SCHOLTZ J.**  
Benzodiazepines: Current concepts. Biological, Clinical and Social Perspectives.  
Edited by I. Hindmarch, G. Beaumont, S. Brandon and B. E. Leonard. John Wiley &  
Sons Ltd. England. 1989. 32.50 £. Pharm Unserer Zeit. 1990;19(6):263- 263.
21. **GREENBLATT D, ALLEN M, MACLAUGHLIN D et al.**  
Diazepam absorption: effect of antacids and food.  
Clin Pharmacol Ther. nov 1978;24(5):600- 609.
22. **REY E, TRELUYER J, PONS G.**  
Pharmacokinetic optimization of benzodiazepine therapy for acute seizures. Focus on  
delivery routes.  
Clin Pharmacokinet. juin 1999;36(6):409- 424.
23. **CHOUINARD G, LEFKO-SINGH K, TEBOUL E.**  
Metabolism of anxiolytics and hypnotics: benzodiazepines, buspirone, zopiclone, and  
zolpidem.  
Cell Mol Neurobiol. août 1999;19(4):533- 552.
24. **RISS J, CLOYD J, GATES J et al.**  
Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics.  
Acta Neurol Scand. août 2008;118(2):69- 86.
25. **PETIT.** *Precis de Psychopharmacologie Medicale.* (Consulté le 11/01 2018).  
<<https://www.amazon.ca/Precis-Psychopharmacologie-Medicale-Petit/dp/284023727X>>
26. **BASKYS A, REMINGTON G, BRAIN**  
Mechanisms and Psychotropic Drugs.  
CRC Press; 1996. 296 p.
27. **GELPIN E, BONNE O, PERI T et al.**  
Treatment of recent trauma survivors with benzodiazepines: a prospective study.  
J Clin Psychiatry. sept 1996;57(9):390- 394.



**28. VAUBOURDOLLE M.**

Médicaments (Consulté le 15/08/2018).

<[https://www.unitheque.com/Livre/wolters\\_kluwer/Le\\_Moniteur\\_internat/Medicaments-49903.html](https://www.unitheque.com/Livre/wolters_kluwer/Le_Moniteur_internat/Medicaments-49903.html)>

**29. LEGRAIN M, LECOMTE T.**

Psychotropic drug consumption in France and several European countries.  
Bull Acad Natl Med. juill 1997;181(6):1073-1084; discussion 1084-1087.

**30. GOURION D.**

Les traitements médicamenteux des troubles anxieux.  
Ann Méd-Psychol Rev Psychiatr. 1 avr 2003;161(3):255- 259.

**31. REYSSET A.**

Les benzodiazépines dans l'anxiété et l'insomnie : dangers liés à leur utilisation et alternatives thérapeutiques chez l'adulte.  
154p Th Pharm: Grenoble (France)], 2010

**32. MADRID-VALERO J, MARTINEZ-SELVA J, RIBEIRO D et al.**

Age and gender effects on the prevalence of poor sleep quality in the adult population.  
Gac Sanit. févr 2017;31(1):18- 22.

**33. LAGRANGE F.**

Les troubles du sommeil.( Consulté le 23/05/ 2018)  
<<http://www.em-consulte.com/en/article/728417>>

**34. DUPONT S.**

Traitement médical de l'épilepsie de l'adulte.(Consulté 23/05/2018)  
<<http://www.em-consulte.com/en/article/872587>>

**35. GIROT M, TYVAERT L.**

Convulsioni dell'adulto.  
EMC - Urgenze. 1 mars 2018;22(1):1- 13.

**36. RAUCOULES-AIME M, BOUSSOFARA M.**

Fármacos de la premedicación.  
EMC - Anest-Reanim. 1 avr 2013;39(2):1- 6.

**37. COTTENCIN O, GUARDIA D, KARILA L**

Alcoologie clinique.

Presse Médicale. 1 déc 2012;41(12, Part 1):1248- 1258.

**38. REYDEL T.**

Examens biologiques de routine chez les patients présentant une intoxication  
médicamenteuse volontaire: Resultats d'une étude observationnelle prospective  
et multicentrique.

44pTh med: Université d'Angers, 2014

**39. MELO P, BASTOS M, TEIXEIRA H.**

Benzodiazepine stability in postmortem samples stored at different temperatures.

J Anal Toxicol. févr 2012;36(1):52- 60.

**40. JAMEY C, TRACQUI A, LUDES B et al.**

Étude de la stabilité de sept benzodiazépines, de la méthadone et du zolpidem dans  
des taches de sang.

Toxicol Anal Clin. 1 avr 2014;26(1):32- 38.

**41. AL-HADIDI K, OLIVIER J.**

Stability of temazepam in blood.

Sci Justice J Forensic Sci Soc. juin 1995;35(2):105- 108.

**42. ROBERTSON M, DRUMMER O.**

Postmortem drug metabolism by bacteria.

J Forensic Sci. mai 1995;40(3):382- 386.

**43. LE SOLLEU H, DEMOTES-MAINARD F, VINCON G et al.**

The determination of bromazepam in plasma by reversed-phase high-performance  
liquid chromatography.

J Pharm Biomed Anal. août 1993;11(8):771- 775.

**44. EL MAHJOUB, STAUB C.**

Stability of benzodiazepines in whole blood samples stored at varying temperatures.

J Pharm Biomed Anal. nov 2000;23(6):1057- 1063.

**45. SKOPP G, POTSCH L, KONIG I et al.**

A preliminary study on the stability of benzodiazepines in blood and plasma stored at  
4 degrees C.

Int J Legal Med. 1998;111(1):1- 5.

46. **KARINEN.R, ANDRESEN W, SMITH-KIELLAND A et al.**  
Long-term storage of authentic postmortem forensic blood samples at -20°C:  
measured concentrations of benzodiazepines, central stimulants, opioids and  
certain medicinal drugs before and after storage for 16-18 years.  
J Anal Toxicol. déc 2014;38(9):686- 695.
47. **CUQ J.**  
Chromatographie liquide-2007 (Consulté le 20/08/2018).  
< <https://fr.scribd.com/doc/49835926/chromato-liquide-2007>>
48. **BOUCHONNET S, LIBONG D.**  
Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse [Gas  
chromatography-mass spectrometry coupling].  
Actual Chim. 2004;(275):7- 14.
49. **HPLC PRINCIPE ET APPAREILLAGE** (Consulté le 20/08/2018).  
< <http://hplc.chem.shu.edu/HPLC/index.html>>
50. **ATEM - CLHP - PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT**  
(Consulté le 20 /08/2018).  
<<http://atechimie.univ-lille1.fr/Techniques/CLHP/Principe-fonctionnement>>
51. **BRANCH S.**  
Guidelines from the International Conference on Harmonisation (ICH).  
J Pharm Biomed Anal. 10 août 2005;38(5):798- 805.
52. **SFSTP, FRA, J C-G, et al.**  
Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. I :  
Méthodologie<br/>Guide to analytical validation. Report of an SFSTP  
commission. I. Methodology<br/>.  
STP Pharma Prat. 1992;2(4):205- 226.
53. **ABE E, DELYLE S, ALVAREZ J.**  
Extraction liquide-liquide : théorie, applications, difficultés.  
Ann Toxicol Anal. 2010;22(2):51- 59.
54. **GALASSO P, STANTON M, VOGEL H.**  
Propafenone-induced peripheral neuropathy.  
Mayo Clin Proc. mai 1995;70(5):469- 472.
55. **HIEMKE C, BAUMANN P, BERGEMANN N et al.**  
AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry:  
Update 2011.

Pharmacopsychiatry. sept 2011;44(6):195- 235.

**56. PONCELET L.**

Mise au point d'une méthode d'extraction par les sels QuEChERS pour  
l'identification et la quantification des benzodiazépines dans les prélèvements  
biologiques par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de  
masse en tandem.

103p. Th Pharm:Limoges. Université de Bordeaux, 2016, 28

# ANNEXES

## ANNEXE 1:

**Flunitrazépam** ( $C_{16}H_{12}FN_3O_3$ )

M.M. = 313,29 g.mol<sup>-1</sup>



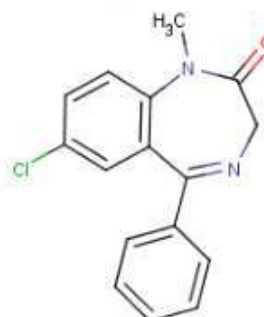
**Triazolam** ( $C_{17}H_{12}Cl_2N_4$ )

M.M. = 343,21 g.mol<sup>-1</sup>



**Diazépam** ( $C_{16}H_{13}ClN_2O$ )

M.M. = 284,74 g.mol<sup>-1</sup>



**Chlordiazépoxide** ( $C_{16}H_{14}ClN_3O_3$ )

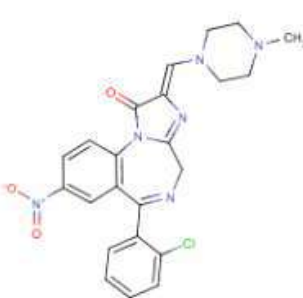
M.M. = 299,76 g.mol<sup>-1</sup>



**Loprazolam** ( $C_{23}H_{21}ClN_5O_3$ )

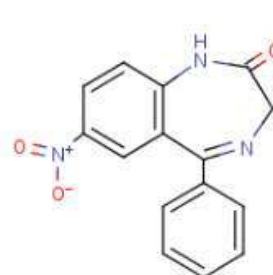
M.M. = 464,91 g.mol<sup>-1</sup>

(méthanesulfonate monohydraté =  $CH_4O_3S.H_2O$ , MM totale = 578,9 g.mol<sup>-1</sup>)



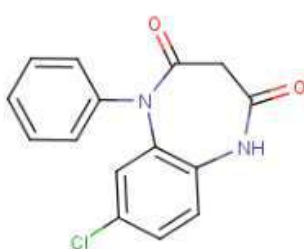
**Nitrazépam** ( $C_{15}H_{11}N_3O_3$ )

M.M. = 281,27 g.mol<sup>-1</sup>



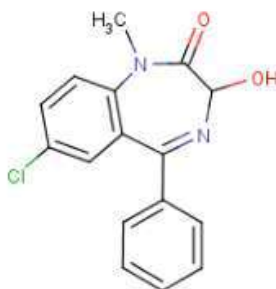
**DM-Clobazam** ( $C_{15}H_{11}ClN_2O_2$ )

M.M. = 286,72 g.mol<sup>-1</sup>



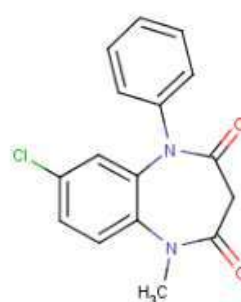
**Témazépam** ( $C_{16}H_{13}ClN_2O_2$ )

M.M. = 300,74 g.mol<sup>-1</sup>



**Clobazam** ( $C_{16}H_{13}ClN_2O_2$ )

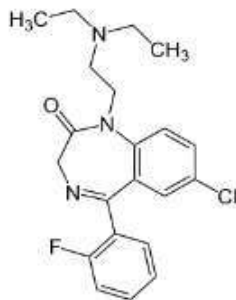
M.M. = 300,74 g.mol<sup>-1</sup>



Clotiazépam ( $C_{16}H_{15}ClN_2OS$ )  
M.M. = 318,83 g.mol<sup>-1</sup>



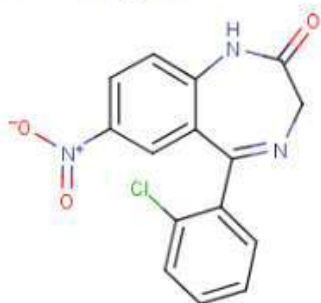
Flurazépam ( $C_{21}H_{23}ClN_3O$ )  
M.M. = 387,88 g.mol<sup>-1</sup>



Midazolam ( $C_{16}H_{13}ClFN_3$ )  
M.M. = 325,77 g.mol<sup>-1</sup>



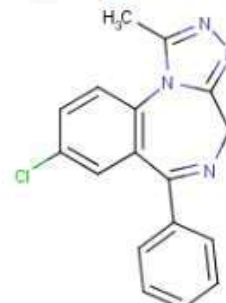
Clonazépam ( $C_{15}H_{10}ClN_3O_2$ )  
M.M. = 315,72 g.mol<sup>-1</sup>



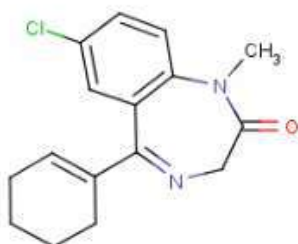
7 aminoflunitrazépam ( $C_{16}H_{14}FN_3O$ )  
M.M. = 288,77 g.mol<sup>-1</sup>



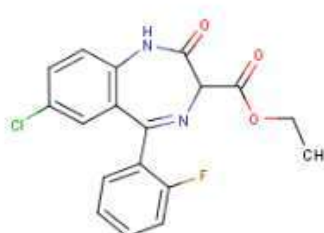
Alprazolam ( $C_{17}H_{13}ClN_4$ )  
M.M. = 308,77 g.mol<sup>-1</sup>



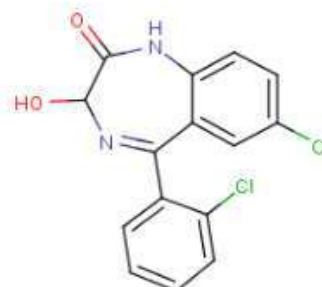
Tétrazépam ( $C_{16}H_{17}ClN_2O$ )  
M.M. = 288,78 g.mol<sup>-1</sup>



Loflazépate d'éthyle  
( $C_{18}H_{14}ClFN_2O_3$ )  
M.M. = 360,77 g.mol<sup>-1</sup>

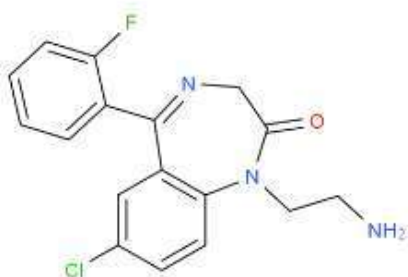


Lorazépam ( $C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$ )  
M.M. = 321,16 g.mol<sup>-1</sup>

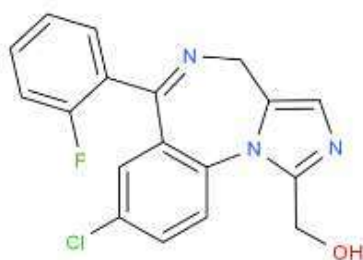




Desalkylflurazépam ( $C_{17}H_{15}ClFN_3O$ )  
M.M. = 331,09 g.mol<sup>-1</sup>



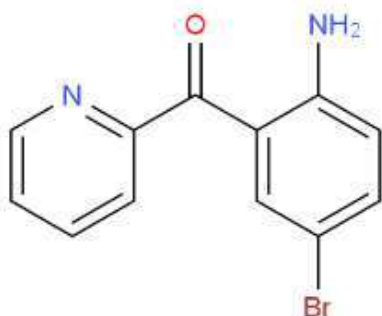
1-OH midazolam ( $C_{18}H_{13}ClFN_3O$ )  
M.M. = 341,77 g.mol<sup>-1</sup>



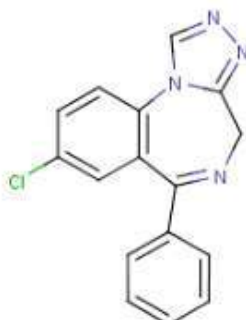
4-OH midazolam  
( $C_{18}H_{13}ClFN_3O$ )  
M.M. = 341,07 g.mol<sup>-1</sup>



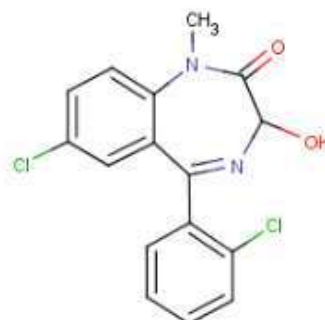
2(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine  
( $C_{12}H_9BrN_2O$ )  
M.M. = 277,12 g.mol<sup>-1</sup>



Estazolam ( $C_{15}H_{11}ClN_4$ )  
M.M. = 294,74 g.mol<sup>-1</sup>



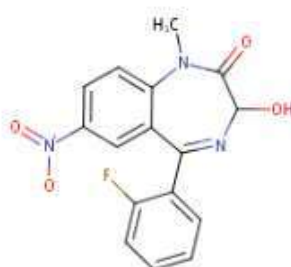
Lormétazépam ( $C_{16}H_{12}Cl_2N_2O_2$ )  
M.M. = 335,19 g.mol<sup>-1</sup>



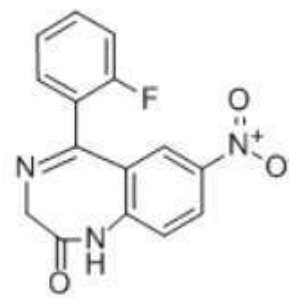
3-OH bromazépam ( $C_{14}H_{10}BrN_3O_2$ )  
M.M. = 332,15 g.mol<sup>-1</sup>



3-OH flunitrazépam  
( $C_{16}H_{12}FN_3O_4$ )  
M.M. = 328,9 g.mol<sup>-1</sup>



Desmethylflunitrazépam  
( $C_{15}H_{10}FN_3O_3$ )  
M.M. = 299,26 g.mol<sup>-1</sup>

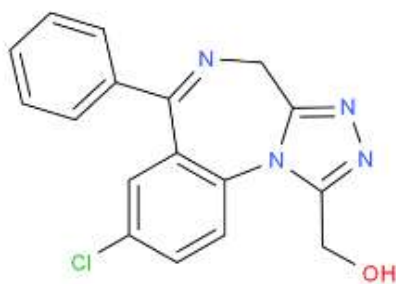




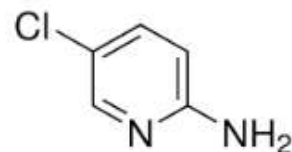
7 aminoclonazépam ( $C_{15}H_{12}ClN_3O$ )  
M.M. = 285,73 g.mol<sup>-1</sup>



OH-alprazolam ( $C_{17}H_{13}ClN_4O$ )  
M.M. = 324,76 g.mol<sup>-1</sup>



ACP ( $C_5H_5ClN_2$ )  
M.M. = 128,56 g.mol<sup>-1</sup>



### Structures chimiques des différentes BZD et apparentées

## ANNEXE 2

### Paramètres pharmacocinétiques de quelques BZD[56]

Principes actifs	Spécialités Pharmaceutiques	Demi vie (heures)	Concentrations thérapeutiques (µg/L)	Concentrations toxiques (µg/L)	Métabolites Actifs : A
<b>Alprazolam</b>	Xanax	6-18	5-50 (100)	100-400	<b>Alpha-hydroxyalprazolam A</b> 4-hydroxyalprazolam A, 4-dihydroxyalprazolam
<b>Bromazepam</b>	Lexomil	8-20	80-170	300-400	<b>3-hydroxybromazepam A</b> <b>2-(2-amino-3-hydroxy-5-bromobenzoyl) pyridine</b>
<b>Chlordiazepoxide</b>	Librax	6-27	400-4000	3000-10000	Desméthylchlordiazépoxide A Demoxépam A Desmethyldiazépam ( <b>nordazépam</b> ) A <b>Oxazépam A</b>
<b>Clobazam</b>	Urbanyl	10-31	100-400		Desméthylclobazam ( <b>norclobazam</b> ) A 4-hydroxyclobazam 4-hydroxydesméthylclobazam
<b>Clonazepam</b>	Rivotril	19-60	20-70	100	<b>7-aminoclonazépam A</b> 7-acétamidoclonazépam 3-hydroxy-7-aminoclonazépam

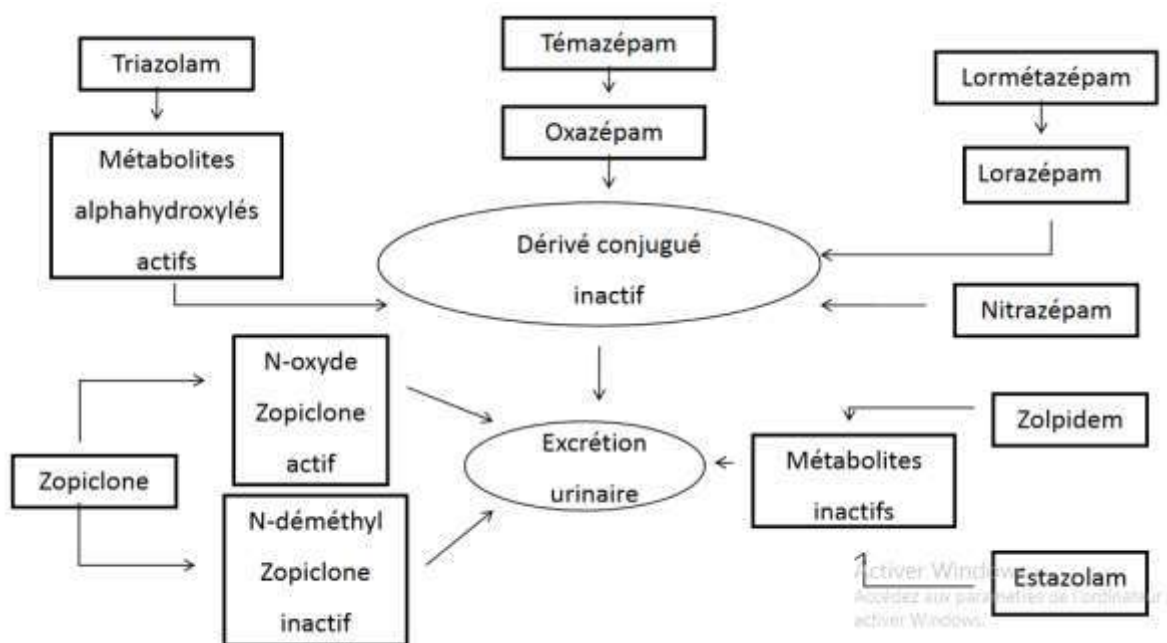
					3-hydroxy-7-acétamidoclonazépam
Principes actifs	Spécialités Pharmaceutiques	Demi vie (heures)	Concentrations thérapeutiques (µg/L)	Concentrations toxiques (µg/L)	Métabolites Actifs : A
<b>Chlorazepate dipotassique *</b>	Tranxene	2	200-800	1500-2000	N-Desméthyldiazépam (nordazépam) A Oxazépam A
<b>Clotiazepam</b>	Veratran	4	100-700		N-Desméthylclotiazépam A Hydroxyclozépam
<b>Diazepam</b>	Valium	15-60	125-1500	1500	N-Desméthyldiazépam (nordazépam) A Oxazépam A 3-hydroxydiazépam ( <b>témazépam</b> ) A
<b>Estazolam</b>	Nuctalon	10-31	55-200		5 métabolites hydroxylés à cycle triazolé ouvert
<b>Loflazepate d'éthyle</b>	Victan	73-119	49-72		2-fluoro-clorazépate 2-fluoro-desméthyldiazépam

Principes actifs	Spécialités Pharmaceutiques	Demi vie (heures)	Concentrations thérapeutiques (µg/L)	Concentrations toxiques (µg/L)	Métabolites Actifs : A
<b>Flunitrazepam</b>	Rohypnol	9-30	5-15	50	<b>Desmethylflunitrazepam A</b> <b>7-aminoflunitrazepam A</b> <b>3-hydroxyflunitrazepam A</b> 3-hydroxy-desmethylflunitrazepam 7-acétamidoflunitrazepam 7-acétamido-3OHflunitrazepam 7-amino-desmethylflunitrazepam 7-amino-3 OH-desmethylflunitrazepam 7-amino-3 OH-flunitrazepam
<b>Flurazepam</b>	Fluraz	40-250	0.5 -		<b>Desalkylflurazepam</b>
<b>Loprazolam</b>	Havlane	3.3-14.8	3-10		Loprazolam-N-oxyde Acétamidoloprazolam Hydroxyloprazolam
<b>Lorazepam</b>	Temesta	9-20	20-250	300-600	Hydroxylorazepam
<b>Lormetazepam</b>	Noctamide	10	1-20		N-desméthyl-lormétazepam ( <b>lorazepam</b> ) A

Principes actifs	Spécialités Pharmaceutiques	Demi vie (heures)	Concentrations thérapeutiques (µg/L)	Concentrations toxiques (µg/L)	Métabolites Actifs : A
<b>Midazolam</b>	Hypnovel	1-4	80-250	1000-1500	<b>Alpha-hydroxymidazolam A</b> <b>4-hydroxymidazolam</b> 1,4-dihydroxymidazolam
<b>Nitrazepam</b>	Mogadon	17-48	30-120	200-500	<b>7-aminonitrazepam</b> 7-acetylaminonitrazepam Hydroxynitrazepam 7-acétamido-nitrazepam
<b>Nordazepam</b>	Nordaz	31-97	200-800	1500-2000	Oxazepam A
<b>Oxazepam</b>	Seresta	4-11	500-2000	2000	
<b>Temazepam</b>	Normison	3-13	300-900	1000	Desméthyltéamazepam (oxazepam) A
<b>Tetrazepam</b>	Myolastan	10-25	50-600		3-hydroxytétrazepam
<b>Triazolam</b>	Halcion	1.8-3.9	2-20		<b>Alpha-Hydroxytriazolam A</b> 4-hydroxytriazolam

					(peu)
<b>Zolpidem</b>	Stilnox	0.7-3.5	150-250		
<b>Zopiclone</b>	Imovane	5	50-100		

### ANNEXE 3



### Métabolisme et élimination des BZD

## ANNEXE 4

### QUESTIONNAIRE SUR LES BENZODIAZEPINES PRESCRITS AU CHU

IDENTIFICATION FICHE N.: |\_\_|\_\_|\_\_|

DATE : |\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|

Dans le cadre d'un travail portant sur l'identification des benzodiazepines un questionnaire est réalisé en vue d'une collecte de données.

Ce questionnaire permettra de recueillir des données utiles à l'identification de benzodiazepines les plus utilisés en Cote d'Ivoire

Le pharmacien de la pharmacie de chaque CHU est invité à répondre aux différentes questions en cochant la ou les cases correspondantes aux choix.

#### IDENTIFICATION

NOM DU CHU .....

NOM DU PHARMACIEN:.....

#### RENSEIGNEMENTS SUR LES MOLECULES DE BENZODIAZEPINES

1. La pharmacie a-t-elle commandé des molécules de benzodiazépines au cours de ces 6 derniers mois ?

OUI ☐ NON ☐

2. Quels sont les molécules de benzodiazépines retrouvées au sein de la pharmacie du CHU au cours de ces six (06) derniers mois?

☐ DIAZEPAM

☐ CLORAZEPATE

☐ CLOBAZAM

☐ NORDAZEPAM

☐ BROMAZEPAM

☐ ALPRAZOLAM

☐ OXAZEPAM

☐ PRAZEPAM

☐ TEMAZEPAM

☐ ZOLPIDEM



Autres.....

3. Les ordonnances de benzodiazepines recues dans la phamacie CHU appartiennent: (numéroter par ordre croissant allant de 1 à 5):

Enfants (<12 ans): ☐

Adolescents (12ans – 17 ans) ☐

Jeunes (18 ans – 35 ans) ☐

Adultes (36 ans -70ans) ☐

Vieillards ( >71 ans )

4. Quels sont les génériques retrouvés au sein de la phamacie au cours de ces six (06) dernier mois?  
Péciser pour chaque générique, les différents dosages ainsi que les formes galéniques correspondants

.....  
.....

4. Au cours de ces six (06) derniers mois et pour chaque générique de benzodiazépines cité ci-dessus mentionner la fréquence moyenne de commande estimée par mois

0/mois ☐ 1/ mois ☐ 2/mois ☐ 3/mois ☐ Autre quantité ☐ ;

préciser.....

..... ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

préciser .....

..... ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

préciser .....

..... ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

préciser .....

..... ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

préciser .....

..... ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

préciser .....

..... ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

préciser .....

..... ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

préciser .....

..... ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

préciser.....

..... ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

préciser .....

..... ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

préciser .....

5. Au cours de ces six (06) dernier mois et pour chaque générique de benzodiazépines cité ci-dessus mentionner la fréquence moyenne de sortie estimée par mois ?

0/mois ☐ 1/ mois ☐ 2/mois ☐ 3/mois ☐ Autre quantité ☐ ;

préciser.....

..... ☐ ☐ .☐ .☐ ☐

préciser .....

..... ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ préciser

.....

..... ☐ ☐ ☐ ..☐ ☐ préciser

.....

..... ☐ ☐ ☐ ..☐ ☐ préciser

.....

..... ☐ ☐ ☐ ..☐ ☐

préciser .....

..... ☐ ☐ ☐ ..☐ ☐

préciser .....

6. Au cours de ces six (06) derniers mois, préciser pour chacune des formes galéniques de benzodiazépines ci-dessous citées le pourcentage de sorties enregistrés

☐ Comprimés:.....

☐ Gelules:.....

☐ Solutions buvables: .....

☐ Solutions injectables:.....

7. Cochez les services de provenance des prescriptions de benzodiazépines que vous receviez au cours de ces six (6) derniers mois.

☐ CHIRURGIE

☐ HEMATOLOGIE

☐ REANIMATION

- |                                       |  |   |
|---------------------------------------|--|---|
| <input type="checkbox"/> DERMATOLOGIE | <input type="checkbox"/> MEDECINE GENERALE | <input type="checkbox"/> RHUMATOLOGIE     |
| <input type="checkbox"/> DIABETOLOGIE | <input type="checkbox"/> NEPHROLOGIE       | <input type="checkbox"/> STOMATOLOGIE     |
| <input type="checkbox"/> GYNECOLOGIE  | <input type="checkbox"/> PEDIATRIE         | <input type="checkbox"/> URGENCE MEDICALE |

8. Précisez pour chaque service la nombre de prescriptions de benzodiazépines au cours de ces six (6) derniers mois.....

9. Quelle est la forme galénique la plus retrouvée sur les prescriptions de benzodiazépines

- ☐ Comprimés  
☐ Solutions buvables  
☐ Solutions injectables

10. La durée du traitement est-elle précisée sur les prescriptions de benzodiazépines que vous recevez ?

**OUI** ☐      **NON** ☐      **SOUVENT** ☐      **RAREMENT** ☐

11. Lorsque la durée du traitement par les benzodiazépines est mentionnée; elle correspond à:

- ☐ Moins de 4 semaines  
☐ 4 semaines  
☐ Plus de 4 semaines

## ANNEXE 5

### QUESTIONNAIRE SUR LES BENZODIAZEPINES PRESCRITS EN OFFICINE DE PHARMACIE

**IDENTIFICATION FICHE\_N° :** |\_|\_|\_|\_|

**DATE :** |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

Dans le cadre d'un travail portant sur l'identification des benzodiazepines un questionnaire est réalisé en vue d'une collecte de données dans quelques officines de pharmacie.

Ce questionnaire permettra de recueillir des données utiles à l'identification de benzodiazepines les plus utilisés en Cote d'Ivoire.

L'assistant de l'officine de pharmacie est invité à répondre aux différentes questions en cochant la ou les cases correspondantes aux choix.

Toutes les informations recueillies sur chacun des sites sélectionnés auront un caractère confidentiel

#### IDENTIFICATION

**NOM DE LA PHARMACIE**.....

**LOCALISATION PHARMACIE**:.....

#### RENSEIGNEMENTS SUR LES MOLECULES DE BENZODIAZEPINES

1. La pharmacie a-t-elle commandé des molécules de benzodiazépines au cours de ces 6 derniers mois ?

**OUI** ☐ **NON** ☐

2. Quels sont les spécialités de benzodiazépines retrouvées au sein de la pharmacie au cours de ces six (06) derniers mois ?

☐ LEXOMIL® (BROMAZEPAM)

☐ STILNOX® (ZOLPIDEM)

☐ LYSANXIA® (PRAZEPAM)

☐ TEMESTA® (LORAZEPAM)

☐ MYLASTAN® (TETRAZEPAM)

☐ TRANXENE® (CLORAZEPAM)

☐ NORDAZ® (NORDAZEPAM)

☐ URBANYL® (URBANYL)

☐ RIVOTRIL® (CLONAZEPAM)

☐ VALIUM® (DIAZEPAM)

☐ SERESTA® (OXAZEPAM) ☐ XANAX® (ALPRAZOLAM)

(Autres.....)

3. Les ordonnances de benzodiazepines recues dans votre officine de phamacie appartiennent: (numéroter par ordre croissant allant de 1 à 5):

Enfants (<12 ans): ☐

Adolescents (12ans – 17 ans) ☐

Jeunes (18 ans – 35 ans) ☐

Adultes (36 ans -70ans) ☐

Vieillards (>71 ans ) ☐

3. Quels sont les génériques retrouvés au sein de la phamacie au cours de ces six (06) dernier mois? Péciser pour chaque générique, les différents dosages ainsi que les formes galéniques correspondants

.....  
.....  
.....  
.....

4. Au cours de ces six (06) derniers mois et pour chaque générique de benzodiazépines cité ci-dessus mentionner la fréquence moyenne de commande estimée par mois

2/mois ☐ 3/ mois ☐ 4/mois ☐ 5/mois ☐ Autre quantité ☐ ; préciser.....

.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> préciser .....
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> préciser .....
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> préciser .....
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> préciser .....
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> préciser .....

5. Au cours de ces six (06) dernier mois et pour chaque générique de benzodiazépines cité ci-dessus mentionner la fréquence moyenne de sortie estimée par mois ?

2/mois ☐ 3/ mois ☐ 4/mois ☐ 5/mois ☐ Autre quantité ☐ ; préciser.....

.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> préciser .....
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> préciser .....
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> préciser .....
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> préciser .....

6. Au cours de ces six (06) derniers mois, préciser pour chaque forme galénique de benzodiazépines les sorties enregistrées

☐ Comprimés: .....

☐ Gelules: .....

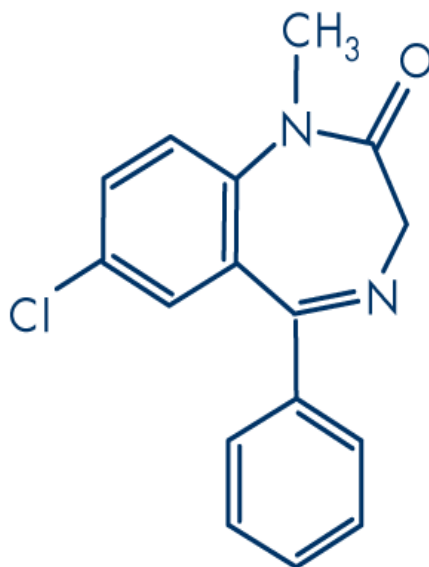
- ☐ Solutions buvables: .....
- ☐ Solutions injectables:.....

7. Au cours des six (06) derniers mois avez-vous trouvé mentionné sur les prescriptions de benzodiazépines reçues la durée de traitement ? **OUI**☐      **NON**☐      **SOUVENT**☐      **RAREMENT**☐

8. Si OUI pour la question 06, la durée du traitement par les benzodiazepines mentionnée sur les prescriptions correspondait en moyenne à:

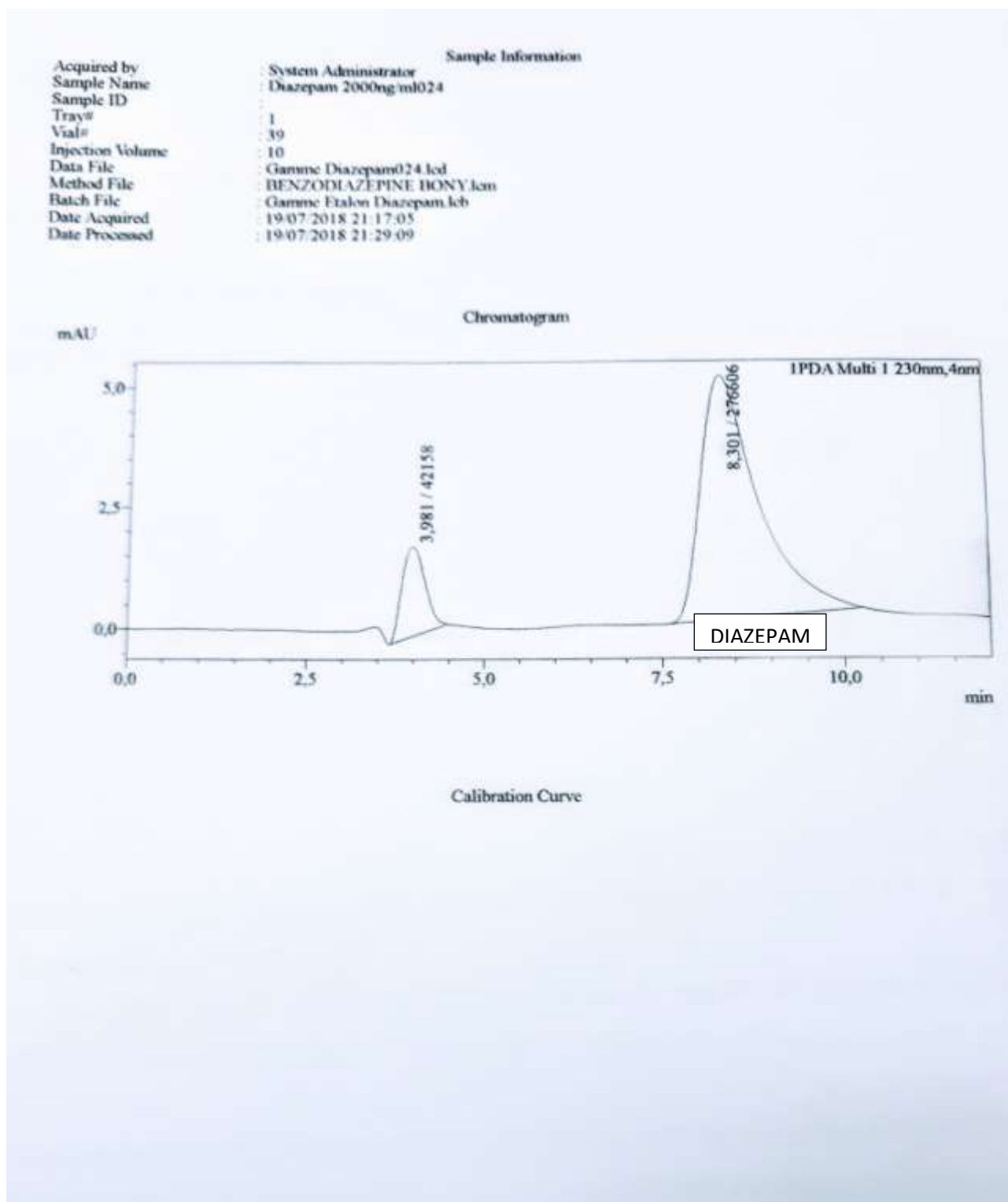
- ☐ Moins de 4 semaines
- ☐ 4 semaines
- ☐ Plus de 4 semaines

## ANNEXE 6



Stucture moléculaire du diazépam

## ANNEXE 7



Le chromatogramme du diazépam



## RESUME :

L'objet de ce travail est le développement et la validation d'une méthode de dosage par HPLC/DAD de la BZD la plus utilisés dans le district d'Abidjan : le diazépam.

La longueur d'onde de détection, la composition, le débit ainsi que le pH de la phase mobile de même que la température de la colonne ont été étudiée.

La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne waters Spherisorb C8 (250 mm \* 4,0 mm et une granulométrie de 5  $\mu$ m) à 22 °C à 230 nm avec une phase mobile constituée d'acétonitrile-tampon phosphate  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  25 mM de pH 2,625 (50:50, v/v) et à débit 0,5 mL min<sup>-1</sup>. La méthode est linéaire dans une gamme de concentration de 350 à 2000 ng.ml<sup>-1</sup>.

Le coefficient de corrélation ( $R^2$ ) d'équation de régression est supérieur à 0,995.

La précision de la méthode est démontrée par les valeurs des coefficients de variance inférieurs à 2%. Selon les résultats de la validation, la méthode proposée est simple, linéaire, précise, exacte et peut être appliquée en routine à l'analyse du diazépam avec un taux de recouvrement satisfaisant.

**Mots clés** : Benzodiazépines, Diazépam, HPLC/DAD, Validation.

