

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :

2 978 555

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

11 57001

⑤① Int Cl⁸ : **G 01 N 33/50** (2013.01)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 29.07.11.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 01.02.13 Bulletin 13/05.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS - Etablissement
public — FR et UNIVERSITE DE STRASBOURG Eta-
blissement public — FR.

⑦② Inventeur(s) : GOUMON YANNICK, LAUX BIEHL-
MANN ALEXIS, STUBER DENISE, SCHNEIDER
FRANCIS, WELTERS, INGEBORG et GRAFE NADJA.

⑦③ Titulaire(s) : CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS - Etablissement
public, UNIVERSITE DE STRASBOURG Etablissement
public.

⑦④ Mandataire(s) : NOVAGRAAF TECHNOLOGIES.

⑤④ UTILISATION DU LITHIUM ET DE SES DERIVES POUR LE DOSAGE DES ALCALOIDES.

⑤⑦ La présente invention se rapporte au dosage amélioré
des taux d'alcaloïdes endogènes ou exogènes, en particu-
lier de morphine, dans les tissus ou fluides corporels d'un
animal ou d'un humain, à l'aide du lithium ou d'un dérivé de
celui-ci.

FR 2 978 555 - A1



UTILISATION DU LITHIUM ET DE SES DERIVES POUR LE DOSAGE DES ALCALOIDES

5

DESCRIPTION

Domaine technique

La présente invention se rapporte à l'utilisation
10 du lithium ou d'un dérivé de celui-ci pour mesurer le
taux d'alcaloïdes endogènes ou exogènes, en particulier
la morphine, dans les tissus et fluides corporels
animal ou humain.

La présente invention trouve notamment une
15 application dans le domaine diagnostic, pour améliorer
l'évaluation des niveaux en alcaloïdes endogènes ou
exogènes chez un patient animal ou humain susceptibles
de représenter un marqueur pathologique.

Dans la description ci-dessous, les références
20 entre crochets ([]) renvoient à la liste des
références présentée à la fin du texte.

Etat de la technique

Le lithium, connu comme un composé ayant une
25 importance thérapeutique majeure, semble agir sur
l'activité du système nerveux central, mais à ce jour
aucun mode d'action spécifique n'a été décrit. Le
lithium semble traverser les membranes par diffusion
passive ou par des transports membranaires actifs des
30 ions sodium, potassium et calcium sur lesquels il
semble agir [Pasquali et al., Behav. Pharmacol., 21(5-
6) : 473-492, 2010 ; Phiel et al., Annu. Rev.

Pharmacol. Toxicol., 41 : 789-813, 2001] [1, 2].
D'autre part, à titre d'exemple, il semble que le
lithium affecte à la fois certaines activités
enzymatiques intracellulaires et seconds messagers
5 (systèmes inositol-phosphate et adénylate-cyclase). Il
agit également sur des neuromédiateurs, soit par action
sur le transport des précurseurs des neuromédiateurs
(diminution du passage de la choline, élévation du taux
intracérébral du tryptophane), soit par interaction
10 directe avec le système des neuromédiateurs tels que la
sérotonine (effet potentialisateur sur la fonction
sérotoninergique), la noradrénaline (diminution du turn
over), l'acide gamma-amino-butyrique (GABA) dont il
facilite l'activité et l'acétylcholine (effet
15 stabilisateur). Différentes pathologies psychiatriques,
e.g. la schizophrénie [Ebmeier et al., Practitioner,
254(1729) : 19-22, 2010 ; Buckley, CNS Spectr., 13 : 1-
10, 2008 ; Ratanajamit et al., J. Med. Assoc. Thai.,
89(11) : 1954-1960, 2006 ; Frye et Salloum, Bipolar
20 Disord., 8 : 677-685, 2006] [3-6], la dépression [Frye
et Salloum, 2006, précité ; Kovacsics et al., Annu.
Rev. Pharmacol. Toxicol., 49 : 175-198, 2009] [6, 7],
l'alcoolisme [Rosenberg et Salzman, CNS Spectr., 12 :
831-841, 2007 ; Salzman, Harv. Rev. Psychiatry, 11 :
25 230-244, 2003] [8, 9] et autres troubles du
comportement ; pathologies douloureuses, e.g. algie
vasculaire de la face [Bussone et al., Headache, 30 :
411-417, 1990 ; Leroux et Ducros, Orphanet. J. Rare
Dis., 3 : 20, 2008] [10, 11], herpès douloureux [Gaby,
30 Altern. Med. Rev., 11 : 93-101, 2006] [12], la
fibromyalgie [Fontrier, Anesth. Analg., 98 : 1505,
2004 ; Teasell, CMAJ, 144 : 122-123, 1991 ; Tyber,

CMAJ, 143 : 902-904, 1990] [13-15] ; pathologies immunitaires, e.g. leucopénies [Focosi et al., J. Leukoc. Biol., 85 : 20-28, 2009] [16] ; pathologies hormonales, e.g. hyperthyroïdie, hyponatrémie [Zietse et al., NDT Plus, 2 : iii12-iii19, 2009 ; Akin et al., Med. Princ. Pract., 17 : 167-170, 2008] [17, 18] ; sont déjà traitées par le lithium.

Les alcaloïdes sont des molécules organiques hétérocycliques azotées basiques d'origine naturelle, pouvant avoir une activité pharmacologique. Bien que beaucoup d'alcaloïdes soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), certains sont employés dans la médecine pour, par exemple, leurs propriétés analgésiques (comme la morphine, la codéine), dans le cadre de protocoles de sédation (anesthésie) souvent accompagnés d'hypnotiques, ou comme agent antipaludéen (quinine, chloroquinine) ou agent anticancéreux (taxol, vinblastine, vincristine).

Les opiacés sont des molécules chimiques qui agissent en se liant aux récepteurs opioïdes Mu, Delta ou Kappa, qui sont exprimés dans le système nerveux central et périphérique et le tractus gastro-intestinal. Ces récepteurs médient à la fois les effets bénéfiques et les effets secondaires des opiacés (alcaloïdes) et opioïdes (peptides). Les opiacés sont parmi les plus anciennes drogues connues. Les effets analgésiques (antidouleurs) des opiacés sont dus à une perception diminuée de la douleur, une réaction diminuée à la douleur ainsi qu'une tolérance augmentée à la douleur. Les principaux effets secondaires des opiacés sont la sédation, la dépression respiratoire, et la constipation. Les opiacés peuvent provoquer la

suppression de la toux, qui peut être à la fois une indication pour l'administration d'opiacés ou d'un effet secondaire imprévu. Une dépendance psychique et physique peut se développer avec l'administration continue d'opiacés, ce qui conduit à un syndrome de sevrage à l'arrêt brusque. Les opiacés sont bien connus pour leur capacité à produire un sentiment d'euphorie, motivant ainsi certains à les utiliser à des fins récréatives. Il existe cinq grandes classes d'opiacés:

(A) les opiacés naturels sont des alcaloïdes contenus dans la résine du pavot à opium (*Papaver somniferum*) mais également chez d'autres organismes vivants (mammifères et invertébrés), à savoir principalement la morphine et des dérivés morphiniques par exemple la codéine et la thébaïne, mais pas la papavérine et la noscapine qui ont un mécanisme d'action différent. Les éléments suivants pourraient être considérés comme les opiacés naturels: les feuilles de *Mitragyna speciosa* (également appelé Kratom) contiennent quelques opiacés naturels, actifs via les récepteurs Mu et Delta. La Salvinorine A, trouvée naturellement dans la plante *Salvia divinorum*, est un agoniste des récepteurs opioïdes kappa ; (B) les opiacés semi-synthétiques créés à partir des opiacés naturels tels que l'hydromorphone, l'hydrocodone, l'oxycodone, l'oxymorphone, la désomorphine, la nicomorphine, la dipropanoylmorphine, la benzylmorphine, l'éthylmorphine et la buprénorphine ; (C) les opiacés entièrement de synthèse tels que le fentanyl, la péthidine, la méthadone, le tramadol et le dextropropoxyphène ; (D) les opioïdes endogènes peptidiques produits naturellement dans le corps (comme les endorphines, les

enképhalines, les dynorphines, et les endomorphines) ;
et (E) leurs dérivés synthétiques ou semi-synthétiques
(DDPE, etc...).

La morphine est un alcaloïde opiacé naturel utilisé
5 comme médicament contre la douleur (analgésique).
Principal alcaloïde issu du pavot à opium (*Papaver
somniferum*), la morphine est considérée comme la
référence à laquelle sont comparés tous les autres
analgésiques en termes d'efficacité. Elle est le plus
10 souvent utilisée sous la forme d'un sel, de sulfate ou
de chlorhydrate, d'efficacités identiques. À ce jour,
la morphine est le médicament analgésique le plus
efficace et le plus couramment utilisé pour soulager
divers types de douleur physique. Toutefois son emploi
15 pose de nombreux problèmes dus à la dépendance qu'elle
peut induire. Aussi est-elle listée comme stupéfiant au
niveau international (CII). La morphine endogène (ME),
structuralement identique à la morphine du pavot à
opium, ainsi que plusieurs de ses dérivés ont été
20 caractérisés dans différents tissus et cellules de
mammifères (cellules chromaffines et neutrophiles
polymorphonucléaires) [Herbert et al., Nat. Prod. Rep.,
17 : 317-322, 2000 ; Stefano et al., Trends Neurosci.,
23 : 436-442, 2000 ; Zhu et al., J. Immunol., 175(11) :
25 7357-7362, 2005 ; Glattard et al., PLoS One, 5(1) :
e8791, 2010] [19-22], et sont présents, par exemple,
dans des vésicules de sécrétion de certains neurones
[Bianchi et al., Brain Res., 627 : 210-215, 1993 ;
Bianchi et al., Adv. Neuroimmunol., 4 : 83-92, 1994 ;
30 Guarna et al., J. Neurochem., 70 : 147-152, 1998 ;
Muller et al., PLoS One, 3 : Epub
www.plosone.org/doi/pone.0001641, 2008] [23-26]. On

retrouve également de la ME dans différents fluides biologiques incluant le liquide céphalorachidien, le sang et l'urine. Tout comme chez les plantes, la voie de synthèse de la morphine chez les mammifères dérive de celle de la dopamine (figure 2) [Boettcher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102 : 8495-8500, 2005 ; Goumon et al., An. R. Acad. Nac. Farm., 75 : 389-418, 2009 ; Neri et al., J. Neurochem., 106(6) : 2337-2344, 2008 ; Stefano et al., Trends Neurosci., 23(9) : 436-442, 2000] [27-30]. Le catabolisme de la morphine (endogène et exogène) par la superfamille des UDP-glucuronosyltransférases (UGT) aboutit à la formation de la morphine-3-glucuronide (M3G, dénuée d'activité analgésique) et de la morphine-6-glucuronide (M6G qui possède une activité analgésique supérieure à celle de la morphine, 1 à 600 fois) [Lotsch et Geisslinger, Clin. Pharmacokinet., 40 : 485-499, 2001] [31]. Cependant, d'autres dérivés endogènes sont également retrouvés : la normorphine, nocodéine-3-6-diglucuronide, l'hydrocodone, l'hydromorphone, etc... Il a été mis en évidence une corrélation entre le taux de morphine sérique et le sepsis (infection systémique grave) qui indique que la morphine endogène représente un biomarqueur sérique des infections [Demande de Brevet en Europe No. 07301692.5] [32]. D'autre part, de récents résultats indiquent qu'une immunoréactivité apparentée à la morphine est distribuée dans tout le cerveau de la souris et avec une densité de marquage plus forte localisée dans les régions cérébrales impliquées dans la motricité et la mémoire [Laux et al., J. Comp. Neurol., 519(12) : 2390-2416, 2011 ; Charron et al., Brain, PMID : 21742735, 2011] [33, 34].

Un nombre croissant d'études suggère que la ME est un important modulateur dans les états physiologiques et pathophysiologiques. Par exemple, des patients ayant un sepsis ont des taux circulants de ME significativement plus élevés par rapport à des patients ayant un syndrome de réponse inflammatoire systémique ou des donneurs sains [Glattard et al., 2010, précité] [22]. Les traitements au lipopolysaccharide (LPS) sont également associés avec une augmentation des taux de ME chez les rats [Goumon et al., *Neurosci. Lett.*, 293(2) : 135-138, 2000 ; Meijerink et al., *Shock*, 12(3) : 165-173, 1999] [35, 36]. Des taux élevés de ME dans le sang de patients ont également été associés à d'autres états pathologiques incluant le pontage cardiovasculaire [Brix-Christensen et al., *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 44(10) : 1204-1208, 2000 ; Brix-Christensen et al., *Int. J. cardiol.*, 62(3) : 191-197, 1997] [37, 38], la chirurgie invasive [Madbouly et al., *Br. J. Surg.*, 97(5) : 759-764, 2010 ; Yoshida et al., *Surg. Endosc.*, 14(2) : 137-140, 2000] [39, 40], et le traitement de la maladie de Parkinson avec de la L-DOPA [Arun et al., *Indian J. Med. Res.*, 107 : 231-238, 1998 ; Matsubara et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 260(3) : 974-978, 1992] [41, 42].

La liaison de la morphine ou de ses dérivés à des protéines a déjà été décrite [Misra et al., *Nature*, 232 : 48-50, 1971 ; Mullis et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 208 : 228-231, 1979 ; Nagamatsu et al., *Drug Metab. Dispos.*, 11 : 190-194, 1983 ; Olsen et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 17(6) : 677-684, 1975] [43-46]. En effet la morphine a été caractérisée pour se lier faiblement à la sérum albumine, ainsi qu'à l'alpha 1-

acid glycoprotein [Leow et al., Ther. Drug Monit., 15 : 440-447, 1993] [47], et il a récemment été décrit que la protéine de liaison de la phosphatidyléthanolamine (la phosphatidyléthanolamine-binding protein, PEBP) était capable de lier uniquement la M6G et la M3G à faible affinité, mais ne possédait aucune affinité pour la morphine [Atmanene et al., Med. Sci. Monit., 15 : BR178-187, 2009 ; Goumon et al., J. Biol. Chem., 281(12) : 8082-9, 2006] [48, 51]. D'autres études ont indiqué qu'une protéine de 50-53kDa pouvait spontanément lier la morphine radioactive de manière covalente (protéine non caractérisée, sans mise en évidence biochimique) [Nagamatsu et Hasegawa, Biochem. Pharmacol., 43 : 2631-2635, 1992] [49]. Il a également été décrit que cette liaison morphine-protéine était diminuée en présence de sélénium [Nagatmasu et Hasegawa, Drug Chem. Toxicol., 16 : 241-253, 1993] [50].

Récemment, les Inventeurs ont mis en évidence la formation de complexes entre la créatine kinase et les alcaloïdes apparentés à la morphine endogènes ou exogènes, et plus largement de complexes protéine-alcaloïde.

La créatine kinase (CK, EC 2.7.3.2), également appelée phosphocréatine kinase ou créatine phosphokinase (CPK), est une enzyme exprimée par différents tissus incluant le cerveau et les muscles où elle est présente sous une forme cytoplasmique et mitochondriale. Il existe plusieurs isoenzymes (présents sous forme de dimères non covalents) : la CK-MM présente dans les muscles, la CK-MB trouvée dans les cellules myocardiaques, et la CK-BB qui se trouve dans

le cerveau. On trouve également de la CK mitochondriale (mtCK). Cette enzyme catalyse la conversion réversible de la créatine en phosphocréatine via l'utilisation de l'adénosine triphosphate (ATP, figure 1). Cette enzyme
5 est primordiale pour la production d'ATP à partir des stocks de phosphocréatine. La phosphocréatine, par l'intermédiaire de l'ATP, constitue ainsi un réservoir d'énergie rapidement utilisable pour les muscles et autres organes incluant le cerveau. La CK (isoformes MM
10 et MB ; dimères) est libérée dans le sang lors de lésions tissulaires provoquant une lyse cellulaire (par exemple atteinte musculaire telle que la rhabdomyolysis, efforts musculaires, etc...). Le dosage des isoenzymes dans le sang permet de distinguer
15 l'origine de la destruction cellulaire. L'augmentation de CK-MB sanguine a été utilisée en dosage sanguin pour diagnostiquer l'infarctus du myocarde. Il est en outre connu de l'art que plusieurs pathologies sont associées à une augmentation des taux en créatine kinase ou en
20 d'autres protéines liant les alcaloïdes par rapport à la normale. Il s'agit par exemple de la rhabdomyolyse [Cervellin et al., Clin. Chem. Lab. Med., 48(6) : 749-756, 2010] [40], de l'infarctus du myocarde [Navin et Hager, Curr. Probl. Cardiol., 3 : 1-32, 1979] [41], de
25 lésions musculaires, d'un accident vasculaire cérébral, etc....

Il a été montré que cette liaison créatine kinase-alcaloïde est forte mais labile (non covalente), et que la dissociation de ces complexes nécessite des
30 conditions extrêmes [présence d'urée associée à un traitement thermique (100°C, 10 minutes)]. Plus récemment, les inventeurs ont montré toutefois que le

lithium et ses dérivés étaient capables d'inhiber et/ou de dissocier les complexes créatine kinase-alcaloïde, et plus largement des complexes protéine-alcaloïde, dans des conditions douces.

5 Du fait de cette complexion, les taux circulants ou tissulaires d'alcaloïdes endogènes ou exogènes libres seraient minorés d'où une diminution de leurs effets (analgésique, anti-inflammatoire, etc...).

10 Du fait également des faibles taux circulants ou tissulaires de ME (0-25ng/ml), un protocole précis pour quantifier la ME serait nécessaire. Encore actuellement, il n'existe aucun consensus concernant la préparation d'échantillon pour mesurer les taux d'alcaloïdes endogènes et exogènes dans le sang. Par
15 exemple, les meilleurs rendements actuellement décrits ne dépassent pas les 50% pour des quantités faibles de morphine exogène (pg-ng).

Il existe donc un réel besoin d'identifier des protocoles et/ou molécules susceptibles d'améliorer le
20 rendement de détection, à moindre coût, des taux d'alcaloïdes endogènes et exogènes circulants dans les tissus et fluides corporels d'un animal ou d'un humain, notamment des taux de morphine, ainsi que d'alcaloïdes qui en dérivent (codéine, morphine-6-gucuronide, morphine-3-gucuronide, etc...).

Description de l'invention

Les Inventeurs ont été les premiers à avoir observé que (i) la créatine kinase et les alcaloïdes formaient
30 des complexes de très forte affinité, et plus largement des complexes protéine-alcaloïde, dans les tissus et les fluides corporels animal ou humain, et que (ii) le

lithium et ses dérivés étaient capables d'inhiber et/ou de dissocier lesdits complexes en conditions douces. Ils ont, à partir de cette observation, émis l'hypothèse que le lithium et ses dérivés pourraient a
5 *priori* permettre d'améliorer le rendement de détection de la morphine dont les taux circulants ou tissulaires sont faibles, et par extension de tout alcaloïde endogène et exogène une fois ainsi extrait sous forme libre.

10 Les Inventeurs ont alors mis en évidence de manière tout à fait inattendue que le lithium et ses dérivés, en particulier l'héparinate de lithium, permettait de quantifier la morphine endogène et exogène avec une meilleure efficacité dans le sang, et n'interféraient
15 pas avec (*i.e.*, ne surévaluaient ou ne sous-évaluaient pas) la détection de la morphine dans les échantillons.

La présente invention a donc pour objet l'utilisation du lithium ou d'un dérivé de celui-ci pour le dosage du taux d'alcaloïde dans les tissus et
20 fluides corporels d'un animal ou d'un humain.

Par « dérivé du lithium » au sens de la présente invention, on entend par exemple l'héparinate de lithium, le chlorure de lithium, le citrate de lithium, le bromure de lithium, le gluconate de lithium, le
25 carbonate de lithium, etc... En particulier, il s'agit de l'héparinate de lithium, du chlorure de lithium et du carbonate de lithium.

Par « fluide corporel » au sens de la présente invention, on entend par exemple la salive, l'urine, le
30 sang, le liquide céphalorachidien, etc...

La présente invention a encore pour objet un procédé d'analyse d'un alcaloïde dans un échantillon biologique comprenant :

a) la mise en contact dudit échantillon avec le
5 lithium ou un dérivé de celui-ci ;

b) la mesure du taux d'alcaloïde obtenu à l'étape a).

Par « échantillon biologique » au sens de la présente invention, on entend tout fluide corporel ou
10 tissu provenant d'un animal ou d'un humain. Par exemple, le fluide corporel comprend le sang, l'urine, la salive, le liquide céphalorachidien, et par exemple, le tissu comprend le tissu cérébral, pulmonaire, musculaire ou hépatique.

Selon un mode particulier de mise en œuvre du
15 procédé de l'invention, le lithium ou un dérivé de celui-ci est ajouté à l'échantillon à tester dans une quantité suffisante pour dissocier tous les complexes protéine-alcaloïde. Par exemple, le lithium ou un
20 dérivé de celui-ci est ajouté à une concentration de 0.001 à 1000 UI/ml d'échantillon, de préférence à une concentration de 17 UI/ml d'échantillon.

Selon un mode de réalisation particulier, ledit
procédé d'analyse peut comprendre en outre une étape c)
25 dans laquelle les résultats de détection obtenus à l'étape b) sont comparés par rapport à un contrôle négatif et/ou positif.

Par « contrôle positif » et « contrôle négatif »
au sens de la présente invention, on entend un
30 échantillon témoin respectivement comprenant ou ne comprenant pas au moins un alcaloïde. Ce témoin permet de comparer le résultat de mesure obtenu à l'étape b)

du procédé de l'invention et de déceler un faux positif ou faux négatif, le cas échéant.

Selon un mode de réalisation particulier, ledit procédé d'analyse peut comprendre en outre une étape
5 c_{bis}) dans laquelle les résultats de détection obtenus à l'étape b) sont comparés à un étalon de mesure ; ce qui permet une analyse qualitative et/ou quantitative des opiacés.

Par « étalon de mesure » au sens de la présente
10 invention, on entend une ou plusieurs analyse(s) réalisée(s) sur des solutions fabriquées pour les besoins de l'analyse selon l'invention comprenant une teneur connue en alcaloïde(s). A partir des résultats d'analyse obtenus sur ces solutions fabriquées, il est
15 possible de déterminer la présence d'alcaloïde(s) dans l'échantillon et même sa(leur) concentration par comparaison, par exemple au moyen d'une courbe étalon réalisée à partir des étalons de mesure.

Selon l'invention, les étapes c) et c_{bis}) peuvent
20 être mises en œuvre toutes les deux, avant pendant ou après les étapes a) et b) du procédé de l'invention. Selon l'invention, les étapes c) et c_{bis}) peuvent être mises en œuvre simultanément ou successivement, y compris aux étapes a) et b), par exemple sur une plaque
25 multipuits permettant de réaliser simultanément ou successivement plusieurs analyses, y compris des mesures étalons.

Les procédés d'analyse d'alcaloïdes selon la présente invention, servent à analyser par exemple les
30 alcaloïdes naturels endogènes ou exogènes, par exemple la morphine, ainsi que ses dérivés, par exemple à l'aide de test ELISA, EIA ou RIA utilisant des

anticorps spécifiques ou une protéine/peptide de liaison.

La présente invention a encore pour objet un kit d'analyse d'un alcaloïde comprenant le lithium ou un
5 dérivé de celui-ci et les moyens de mesure des taux d'alcaloïde circulants. Les moyens de mesure sont par exemple les tests précités (ELISA, etc...).

D'autres avantages pourront encore apparaître à l'homme du métier à la lecture des résultats
10 expérimentaux obtenus à partir des protocoles décrits dans les exemples ci-dessous mis en œuvre par les inventeurs, et illustrés de manière non limitative par les figures annexées.

15 **Brève description des figures**

La figure 1 représente la réaction enzymatique catalysée par la créatine kinase.

La figure 2 représente la voie de synthèse putative de la morphine endogène chez les mammifères d'après
20 [23].

La figure 3 représente les concentrations sériques en morphine en fonction des concentrations plasmatiques en morphine chez des patients gravement malades (points) et des patients traités à la morphine (croix).
25 L'encart en haut à gauche montre un agrandissement des résultats pour les plus faibles concentrations. Tous les patients sous la ligne diagonale pointillée présentent une concentration en morphine plus élevée dans le plasma que dans le sérum.

EXEMPLES

Cette étude a été approuvée par le conseil d'examen institutionnel pour l'expérimentation humaine des hôpitaux universitaires de Strasbourg.

EXEMPLE 1 :

Les échantillons ont été prélevés à partir de patients ayant besoin d'analyses de laboratoire et qui ont donné par écrit leur consentement éclairé.

Le sang de 80 patients a été collecté, en même temps, dans deux types de tubes de prélèvement : (i) pour l'analyse du sérum, le sang a été collecté dans des tubes secs (BD vacutainer® SST II advance, réf. : 367957), et le sérum a été obtenu après centrifugation (4°C, 4000rpm, 10min), (ii) pour l'analyse du plasma, le sang a été collecté dans des tubes d'héparinate de lithium (BD Vacutainer® LH PST II, réf : 367378, 17UI/ml), et le plasma a été obtenu après centrifugation (4°C, 4000rpm, 10min).

Les taux en morphine du plasma et du sérum ont été mesurés en utilisant un kit ELISA commercial spécifique de la morphine (kit ELISA réf : 213-0480, Immunalysis Corporation). Les échantillons du plasma et du sérum (40µl) ont été testés en double, et les valeurs du coefficient de variation (CV) étaient sous la limite des 8%. Les échantillons avec des CV plus élevés ont été re-testés afin d'obtenir des CV en dessous de 8%. Pour tous les tests, une morphine standard (0-25ng/ml) a été diluée dans 1% de PBS-BSA (w/v) pour les échantillons du sérum et dans 1% de PBS-BSA (w/v) contenant de l'héparinate de lithium (17UI/ml) pour les

échantillons du plasma. La limite de détection calculée dans cette étude pour le lot de kit ELISA a été de 0,1ng/ml de morphine. Comme expérience de contrôle, des concentrations connues de morphine diluée dans des tampons PBS ou PBS-héparinate de lithium ont été d'abord testés à l'aide du test ELISA. Aucune différence n'a été observée, montrant que l'héparinate de lithium n'affecte pas la détection de la morphine.

Dans une seconde étape, des concentrations connues de morphine ont été ajoutées à du sérum et des tubes d'héparinate de lithium avant de collecter le sang frais (donneurs sains, n=4). Dans les échantillons de plasma, 86% de la concentration de morphine initiale a été récupéré, alors que seulement 42% a été récupéré dans les échantillons de sérum.

Enfin, 80 patients ont été inclus dans trois groupes : (i) les donneurs sains (n=16), (ii) les patients traités à la morphine (patch transdermique de morphine, 12-48h avant la prise de sang, 20mg/jour, n=8), et (iii) les patients gravement malades (non traités à la morphine et de pathologies diverses, n=56).

Les résultats sont présentés dans la figure 3.

Chez les donneurs sains, la ME n'est pas détectable dans le sérum et dans les échantillons de plasma. Chez les patients traités à la morphine (figure 3, croix), les concentrations moyennes de morphine dans les échantillons de sérum ont varié de 3,2ng/ml à 31ng/ml, alors que celles du plasma ont été trouvées entre 25,7ng/ml et 114,8ng/ml. Par rapport à la concentration plasmatique, les concentrations en morphine dans le sérum ont été significativement plus faibles ($-78 \pm 15\%$

en moyenne). Chez les patients gravement malades (figure 3, points), les taux de ME ont varié entre 0ng/ml (non détectable) et 23,6ng/ml dans les échantillons de sérum et entre 0,15ng/ml et 76,3ng/ml dans les échantillons de plasma. Par rapport aux échantillons de plasma, les concentrations en ME dans le sérum ont été significativement plus faibles (de 13% à -98%, en moyenne $-65 \pm 32\%$).

Comme le montre la figure 3, la concentration en ME ou en morphine exogène a été systématiquement plus élevé dans le plasma par rapport aux échantillons de sérum pour 61 sur 64 patients testés.

Ensemble, ces résultats ont montré que les tubes d'héparinate de lithium ont été les plus appropriés pour quantifier efficacement la morphine endogène (ME) et exogène. Ainsi, lors de l'ajout de quantités connues de morphine, avant le prélèvement de sang, 86% de morphine initialement ajoutée a été détectée dans les échantillons « héparinate de lithium » tandis que seulement 42% de celle-ci a été détecté dans les échantillons « sérum ». Une explication de l'échec de la quantification de la morphine libre dans le sérum pourrait impliquer la liaison de la morphine à des protéines du sang. En effet, différentes liaisons de la morphine à des protéines ont d'ores et déjà été identifiées et comprennent l'albumine sérique et l'alpha-1-glycoprotéines acide [47]. Fait intéressant, la détection de la morphine exogène dans le sang a montré qu'elle était très dépendante de l'urémie, une hypoalbuminémie, suggérant un lien important entre les protéines liant la morphine et la biodisponibilité de la morphine [47]. Autre fait intéressant, le lithium

est considéré comme un agent chaotropique/dénaturant et peut donc augmenter la quantité de morphine libre et ainsi permettre la réalisation de dosage avec un meilleur rendement que les techniques de l'art.

5 *In vivo*, la libération de ME dans le sang est susceptible de survenir au cours de stress ou de situations pathologiques. Du fait du rôle majeur joué par la ME dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques, ainsi que du fait des résultats
10 des inventeurs qui ont montré la perte conséquente de morphine endogène et exogène dans les sérums, la concentration en morphine endogène et exogène dans le sang doit être analysée sur du plasma collecté en tube héparinate de lithium plutôt que dans le sérum.

15

Listes des références

- 5 1. Pasquali et al., *Behav. Pharmacol.*, 21(5-6) : 473-492, 2010
2. Phiel et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 41 : 789-813, 2001
3. Ebmeier et al., *Practitioner*, 254(1729) : 19-22,
10 2010
4. Buckley, *CNS Spectr.*, 13 : 1-10, 2008
5. Ratanajamit et al., *J. Med. Assoc. Thai.*, 89(11) : 1954-1960, 2006
6. Frye et Salloum, *Bipolar Disord.*, 8 : 677-685, 2006
- 15 7. Kovacsics et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 49 : 175-198, 2009
8. Rosenberg et Salzman, *CNS Spectr.*, 12 : 831-841, 2007
9. Salzman, *Harv. Rev. Psychiatry*, 11 : 230-244, 2003
- 20 10. Bussone et al., *Headache*, 30 : 411-417, 1990
11. Leroux et Ducros, *Orphanet. J. Rare Dis.*, 3 : 20, 2008
12. Gaby, *Altern. Med. Rev.*, 11 : 93-101, 2006
13. Fontrier, *Anesth. Analg.*, 98 : 1505, 2004
- 25 14. Teasell, *CMAJ*, 144 : 122-123, 1991
15. Tyber, *CMAJ*, 143 : 902-904, 1990
16. Focosi et al., *J. Leukoc. Biol.*, 85 : 20-28, 2009

17. Zietse et al., NDT Plus, 2 : iii12-iii19, 2009
18. Akin et al., Med. Princ. Pract., 17 : 167-170, 2008
19. Herbert et al., Nat. Prod. Rep., 17 : 317-322, 2000
20. Stefano et al., Trends Neurosci., 23 : 436-442,
5 2000
21. Zhu et al., J. Immunol., 175(11) : 7357-7362, 2005
22. Glattard et al., PLoS One, 5(1) : e8791, 2010
23. Bianchi et al., Brain Res., 627 : 210-215, 1993
24. Bianchi et al., Adv. Neuroimmunol., 4 : 83-92, 1994
- 10 25. Guarna et al., J. Neurochem., 70 : 147-152, 1998
26. Muller et al., PLoS One, 3 : Epub
www.plosone.org/doi/pone.0001641, 2008
27. Boettcher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102 :
8495-8500, 2005
- 15 28. Goumon et al., An. R. Acad. Nac. Farm., 75 : 389-
418, 2009
29. Neri et al., J. Neurochem., 106(6) : 2337-2344,
2008
30. Stefano et al., Trends neurosci., 23(9) : 436-442,
20 2000
31. Lotsch et Geisslinger, Clin. Pharmacokinet., 40 :
485-499, 2001
32. Demande de Brevet en Europe No. 07301692.5
33. Laux et al., J. Comp. Neurol., 519(12) : 2390-2416,
25 2011
34. Charron et al., Brain, PMID : 21742735, 2011

35. Goumon et al., *Neurosci. Lett.*, 293(2) : 135-138, 2000
36. Meijerink et al., *Shock*, 12(3) : 165-173, 1999
37. Brix-Christensen et al., *Acta Anaesthesiol. Scand.*,
5 44(10) : 1204-1208, 2000
38. Brix-Christensen et al., *Int. J. cardiol.*, 62(3) :
191-197, 1997
39. Madbouly et al., *Br. J. Surg.*, 97(5) : 759-764,
2010
- 10 40. Yoshida et al., *Surg. Endosc.*, 14(2) : 137-140,
2000 Matsubara et al., 1992
41. Arun et al., *Indian J. Med. Res.*, 107 : 231-238,
1998
42. Matsubara et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*,
15 260(3) : 974-978, 1992
43. Misra et al., *Nature*, 232 : 48-50, 1971
44. Mullis et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 208 : 228-
231, 1979
45. Nagamatsu et al., *Drug Metab. Dispos.*, 11 : 190-
20 194, 1983
46. Olsen et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 17(6) : 677-
684, 1975
47. Leow et al., *Ther. Drug Monit.*, 15 : 440-447, 1993
48. Atmanene et al., *Med. Sci. Monit.*, 15 : BR178-187,
25 2009
49. Nagamatsu et Hasegawa, *Biochem. Pharmacol.*, 43 :
2631-2635, 1992

50. Nagatmasu et Hasegawa, Drug Chem. Toxicol., 16 :
241-253, 1993
51. Goumon et al., J. Biol. Chem., 281(12) : 8082-9,
2006

REVENDEICATIONS

1) Procédé d'analyse d'un alcaloïde dans un échantillon biologique comprenant :

5 a) la mise en contact dudit échantillon avec le lithium ou un dérivé de celui-ci ;

 b) la mesure du taux d'alcaloïde obtenu à l'étape a).

10 2) Procédé d'analyse selon la revendication 1, ledit procédé comprenant en outre une étape c) dans laquelle les résultats de mesure obtenus à l'étape b) sont comparés par rapport à un contrôle négatif et/ou positif.

15

 3) Procédé d'analyse qualitative et/ou quantitative d'un alcaloïde dans un échantillon biologique comprenant :

20 a) la mise en contact dudit échantillon avec le lithium ou un dérivé de celui-ci ;

 b) la mesure du taux d'alcaloïde obtenu à l'étape a).

 c) la comparaison des résultats de mesure obtenus à l'étape b) par rapport à une courbe étalon.

25

4) Procédé d'analyse selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, où le taux d'alcaloïde mesuré est choisi parmi les alcaloïdes naturels exogènes ou endogènes, de préférence la morphine et ses dérivés.

30

5) Kit d'analyse d'un alcaloïde comprenant du lithium ou un dérivé de celui-ci, et les moyens de

mesure de taux d'alcaloïde circulant dans les tissus et fluides corporels.

5 6) Utilisation du lithium ou d'un dérivé de celui-ci pour le dosage du taux d'alcaloïde dans les tissus et fluides corporels d'un animal ou d'un humain.

10 7) Utilisation du lithium ou d'un dérivé de celui-ci selon la revendication 6, où le fluide corporel est choisi parmi l'urine, le sang, la salive et le liquide céphalorachidien.

15 8) Utilisation du lithium ou d'un dérivé de celui-ci selon la revendication 6, où le tissu est choisi parmi le tissu cérébral, pulmonaire, hépatique, ou musculaire.

1/2

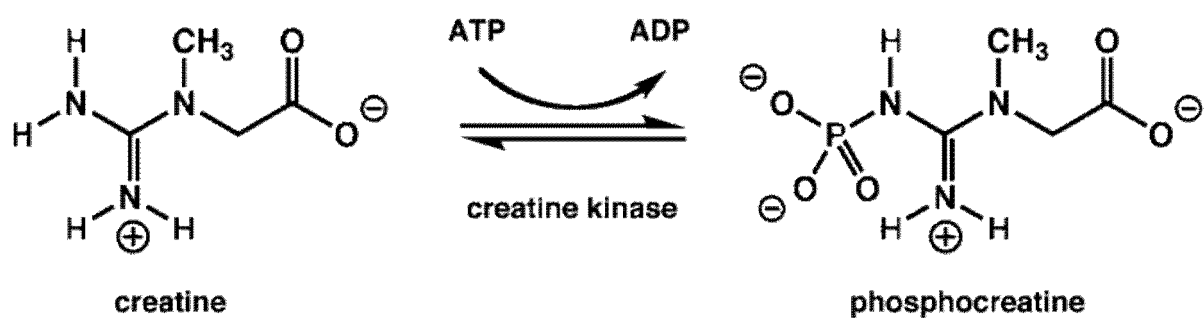


Figure 1

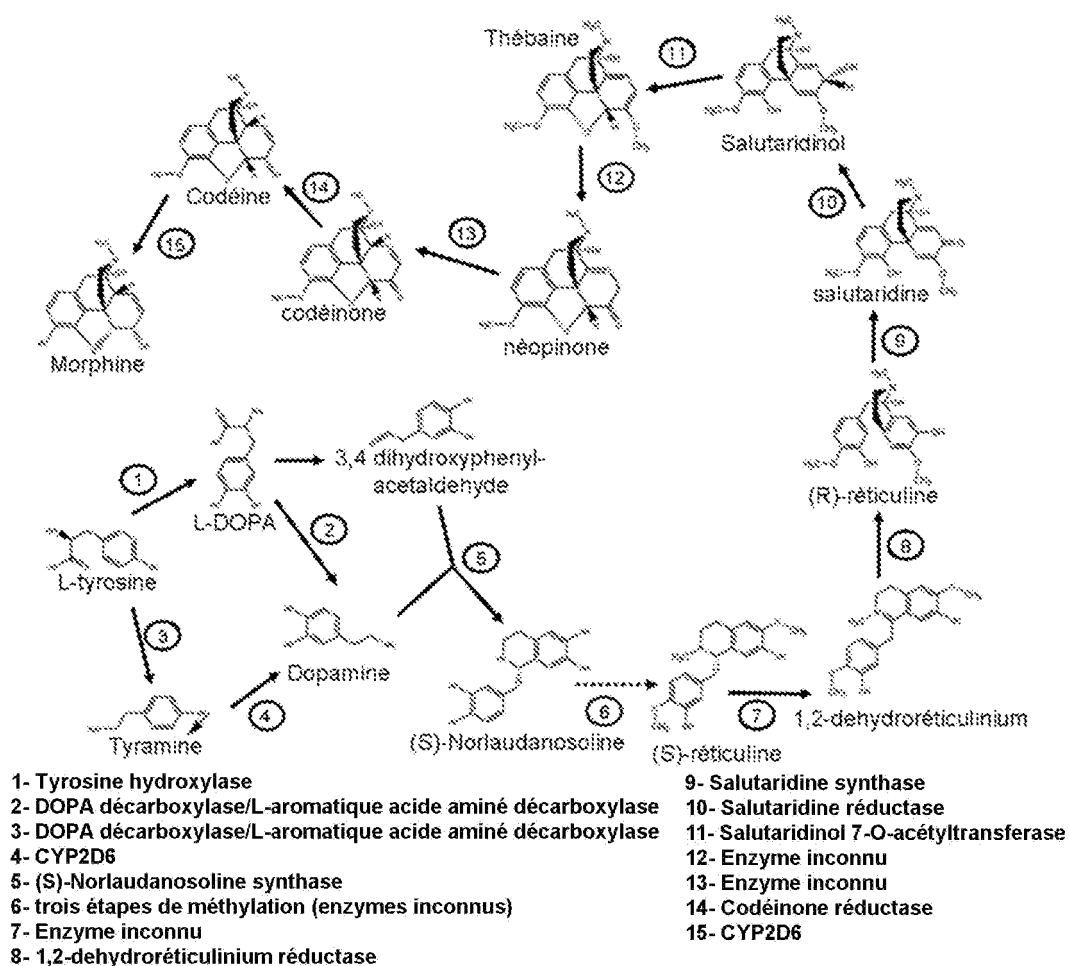
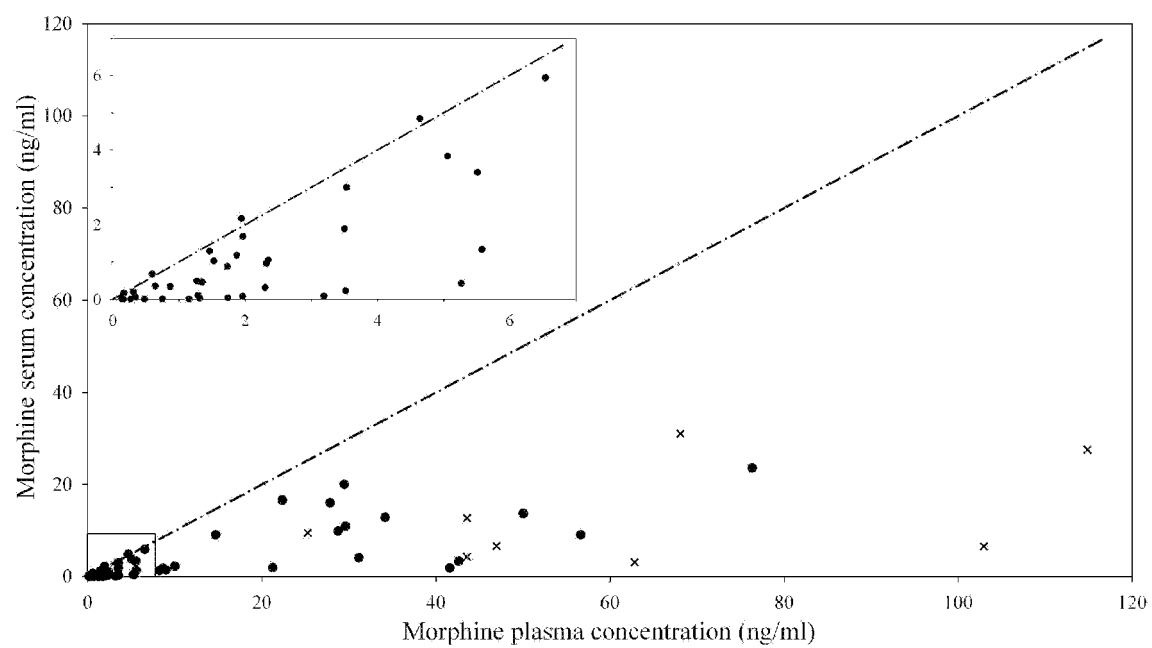


Figure 2

2/2





RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 754199
FR 1157001

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	CHARLET ALEXANDRE ET AL: "Abnormal nociception and opiate sensitivity of STOP null mice exhibiting elevated levels of the endogenous alkaloid morphine", MOLECULAR PAIN, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 6, no. 1, 20 décembre 2010 (2010-12-20), page 96, XP021089973, ISSN: 1744-8069, DOI: 10.1186/1744-8069-6-96 * (p 10, colonne 2, para 4) * -----	1-8	G01N33/50
A	MENG-YAO ZHAO ET AL: "Optimization of the Extraction Conditions and Simultaneous Quantification by RP-LC of Six Alkaloids in Evodiae Fructus", CHROMATOGRAPHIA ; AN INTERNATIONAL JOURNAL FOR RAPID COMMUNICATION IN CHROMATOGRAPHY, ELECTROPHORESIS AND ASSOCIATED TECHNIQUES, VIEWEG VERLAG, WI, vol. 67, no. 7-8, 13 février 2008 (2008-02-13), pages 543-550, XP019596886, ISSN: 1612-1112 * (résumée; p 545, col 1, dernier paragraphe) * ----- -/--	1-8	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) G01N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
8 mars 2012		Bigot-Maucher, Cora	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 754199
FR 1157001

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	STENGAARD-PEDERSEN K ET AL: "In vitro and in vivo inhibition by lithium of enkephalin binding to opiate receptors in rat brain", NEUROPHARMACOLOGY, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 21, no. 8, 1 août 1982 (1982-08-01), pages 817-823, XP025526553, ISSN: 0028-3908, DOI: 10.1016/0028-3908(82)90070-3 [extrait le 1982-08-01] * abrégé * -----	5	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
8 mars 2012		Bigot-Maucher, Cora	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			