

ETUDE DE LA STABILITE DU METHOXYFLURANE (PENTHROX®) AU FROID

Mémoire

Par le Docteur LEROUlLEY Damien

Né le 29 avril 1984 à Cluses (74)

Ancien élève de l'Ecole du Service de Santé des Armées de Lyon–Bron

(Université Lyon Claude Bernard)

Ancien élève de l'Ecole du Val de Grâce

(Université Paris-Descartes)

Pour l'obtention du DIU de Médecine d'Urgence de Montagne

Table des matières

Etude de la stabilité du Methoxyflurane (pentrox®) au froid	1
I PROBLEMATIQUE DE LA GESTION DE LA DOULEUR EN MEDECINE D'URGENCE DE MONTAGNE	4
II PROBLEMATIQUE LIEE A LA STABILITE DES DROGUES D'URGENCE AU FROID	5
III ENJEU D'UNE ANTALGIE DE PREMIER RECOURS EN MILIEU ALPIN/ARCTIQUE DANS UN CONTEXTE MILITAIRE	6
IV DONNEES PHARMACOLOGIQUES DU METHOXYFLURANE (PENTHROX®) ¹⁷	7
1. Pharmacocinétique, pharmacodynamie et mode d'administration	7
2. Caractéristiques physico chimiques ¹⁷	9
3. recommandation de la prise en charge de la douleur chez le traumatisé	9
a. Moyens médicamenteux	9
b. Moyens non médicamenteux :	10
V. PRINCIPE D'UN CHROMATOGRAPHE EN PHASE GAZEUSE COUPLÉ A UN SPECTROMETRE DE MASSE	11
VI. MATERIELS ET METHODES	12
1. Critère de jugement principal	12
2. Produits chimiques et réactifs.....	12
3. Consommables.....	12
4. Equipements	13
5. Traitement des données analytiques	13
6. Echantillonnage.....	16
7. Préparation des échantillons et de l'étalon	17
8. Conditions expérimentales	17
VII. RESULTATS	18
1. Acquisition des données brutes.....	18
a. Détection mode SCAN	18
b. Spectrométrie de masse	18
c. Quantification des ions caractéristiques.....	20
2. Gamme d'étalonnage.....	21
a. Etude sur la linéarité.....	21
b. Etude sur la précision	21
3. Critère de jugement principal	23
4. Analyse du critère de jugement principal	24
VIII. DISCUSSION.....	25
1. Contexte.....	25
2. Perspectives d'utilisation	26

3. Analyse des biais	27
IX. CONCLUSION	28
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES :	29

I PROBLEMATIQUE DE LA GESTION DE LA DOULEUR EN MEDECINE D'URGENCE DE MONTAGNE

La gestion de la douleur est une problématique importante de la prise en charge des urgences en milieu montagnard particulièrement liée à la contrainte du froid. Cette composante doit être évaluée au plus juste par le soignant et doit être organisée par une stratégie claire en fonction de plusieurs variables (localisation, vecteur, temps d'intervention, météo, météo).

L'antalgie nécessaire et suffisante est un des objectifs pour une prise en charge optimale du traumatisé en milieu périlleux. Elle permet un confort d'évacuation et une sérénité pour le patient et les soignants.

L'administration *per os* d'antalgiques est une possibilité mais n'est souvent pas suffisante chez les traumatisés ayant une évaluation initiale de la douleur modérée à sévère. L'administration par voie veineuse périphérique permet d'obtenir des analgésies intenses mais leur mise en œuvre et leur stabilité reste une contrainte en terme logistique et de fluidité d'intervention. Des études montrent ainsi que dans un contexte d'urgence, l'antalgie est bien souvent insuffisante voire non réalisée.^{1,2,3}

Une alternative existe avec l'administration par voie inhalée d'un antalgique de type hydrocarbure fluoré qu'est le méthoxyflurane⁴. Cette hypothèse thérapeutique a été évaluée en milieu aseptisé et est reconnue efficace pour les traumatismes dont la douleur est évaluée de légère à modérée^{5,6}. Elle a reçu son autorisation de mise sur le marché en Juin 2016.

II PROBLEMATIQUE LIEE A LA STABILITE DES DROGUES D'URGENCE AU FROID

La stabilité d'un médicament peut s'avérer précaire lors d'une exposition à des contraintes physiques telles que la congélation.

La stabilité d'une molécule pharmacologique est définie comme étant une quantité supérieure ou égale à 90% de la quantité initiale décrite après une exposition à un stress physique (ici la température). Ce seuil de 90% de composé résiduel après stress physico-chimique est une norme pharmaceutique.²⁷

Johansen et al. (1993) ont montré que les températures extrêmes (- 20 °C / + 40 °C) appliquées sur des drogues d'urgences injectables pouvaient provoquer leur dégradation⁸. La revue de la littérature⁹ ainsi que les observations lors d'expéditions militaires¹⁰ en milieu arctique tendent à montrer que certaines espèces comme l'adrénaline¹³ et la morphine¹⁵ restent stables à la congélation prolongée ainsi qu'à des cycles de congélation/décongélation. Certaines drogues comme la naloxone^{8,14,15}, l'atropine^{8,14,15} et la lidocaïne^{8,14} présentent une relative stabilité à la congélation mais sont dégradées lors d'une exposition aux cycles congélation/décongélation. Finalement, le midazolam et le fentanyl¹⁵ présentent une instabilité constante au froid. D'autres molécules moins utilisées en médecine pré-hospitalière française ont été étudiées et s'avèrent instables à la congélation prolongée^{11,12,13}.

Aucune donnée du distributeur ou de la science ne permet à ce jour de connaître la stabilité du méthoxyflurane à une exposition à des conditions similaires.

III ENJEU D'UNE ANTALGIE DE PREMIER RECOURS EN MILIEU ALPIN/ARCTIQUE DANS UN CONTEXTE MILITAIRE

La 27^{ème} Brigade d'Infanterie de Montagne composée d'environ 7000 hommes est une unité spécialisée dans le combat montagneux et dans des conditions de froid intense voire extrême. Compte tenu des modifications climatiques observées, les perspectives stratégiques à moyen et long terme font envisager une certaine probabilité d'engagement des forces armées sur des territoires arctiques ou polaires. Un travail d'adaptation de tous les matériels est ainsi demandé dès à présent.

Depuis 2008, la doctrine sanitaire prévalente dans toutes les unités conventionnelles de l'armée française est de fournir à chaque combattant une trousse sanitaire et une formation au sauvetage au combat de premier niveau. Ainsi, chaque soldat possède sa propre antalgie en cas de blessure grave par le biais de 2 syrettes de morphine de 10 mg en solution à s'auto-administrer par voie sous cutanée ¹⁶.

Bien que la morphine soit une molécule stable à la congélation ¹⁵, une forme injectable revêt un inconvéniant majeur en condition de grand froid dans le fait qu'elle se retrouve à l'état solide et inutilisable en cas de nécessité.

L'exploration vers une forme inhalée d'antalgie comme le méthoxyflurane sous forme commerciale du PENTHROX[®] pourrait permettre de contourner ce problème.

Toutefois, les observations par les équipes médicales et paramédicales (utilisation du PENTHROX[®] sur les Antennes médicales de la 27^{ème} Brigade d'infanterie de montagne) tendent à montrer que l'activité antalgique est altérée lors d'une utilisation en milieu montagneux (froid et/ou altitude). Cette tendance n'est pas documentée par des écrits et n'est le reflet que d'une appréciation subjective.

L'objectif de ce travail est de déterminer si le méthoxyflurane présente une stabilité suffisante au froid. Nous réalisons cette expérimentation en partant de l'hypothèse que la molécule est instable à la congélation.

IV DONNEES PHARMACOLOGIQUES DU METHOXYFLURANE (PENTHROX®) ¹⁷

1. PHARMACOCINETIQUE, PHARMACODYNAMIE ET MODE D'ADMINISTRATION

Cette molécule est un analgésique, anesthésique antipyrétique volatile qui produit des effets à de faibles doses chez des patients conscients par perturbation de la transmission du message nerveux au niveau du récepteur NMDA (N-méthyl-D-aspartate ^{4,7}). L'inhibition de ces derniers par le méthoxyflurane empêche la sommation des signaux post synaptiques au niveau central, bloquant ainsi les messages nociceptifs.

Son administration auto-inhalée est préconisée (figure 1). Cela permet une auto-régulation par le patient de la quantité de gaz inhalée. Pendant cette auto-administration, le soignant peut réaliser une autre tâche. Un très bon rapport efficacité/délai d'action serait atteint par cette stratégie ⁷.

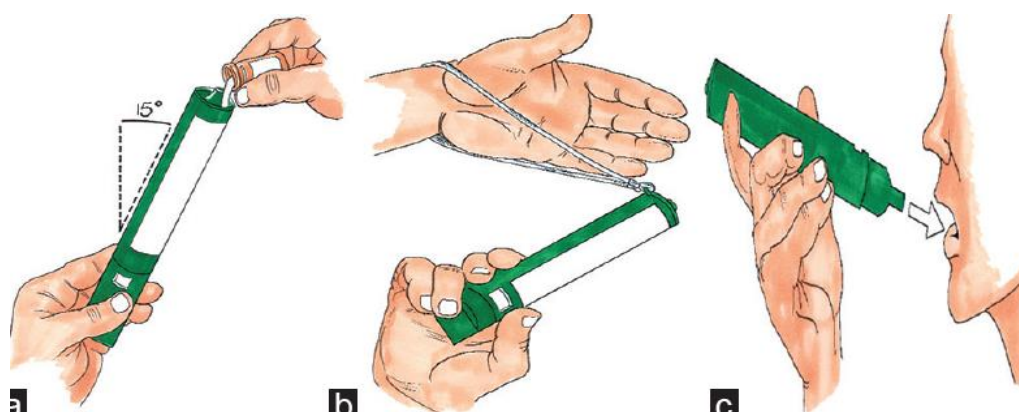


Figure 1 : Représentation artistique du mode opératoire pour l'auto-administration de PENTHROX® méthoxyflurane par le patient.

Un flacon contenant 3 ml de méthoxyflurane pur à 99.9 %, se verse sur une matière absorbante contenue dans un cylindre en plastique. Le patient inhale à travers le cylindre en fonction de la réponse antalgique obtenue.

Petite molécule volatile et légèrement apolaire, le méthoxyflurane est rapidement absorbé et diffusé. Passant ainsi facilement la barrière hémato-encéphalique, l'effet principal est perceptible en moins de 5 minutes et est maximal en 15 minutes. Les effets de 3 ml durent au maximum 30 minutes ⁷.

L'efficacité et la sécurité de son emploi ont été démontrés lors d'une étude randomisée ^{5,6} en double aveugle réalisée sur 300 patients avec une échelle visuelle analogique (EVA) entre >3 et <8. La baisse de l'EVA était significativement plus importante dans le groupe « méthoxyflurane » par rapport au groupe placebo ($p < 0.0001$). Il est toutefois notable que l'efficacité du dispositif sur les douleurs sévères (8 et plus) n'a pas été évaluée.

Une métabolisation hépatique importante (environ 60 %) via les cytochromes P450 est rapportée (CYP 2E1 et CYP 2B6). Sont produits des ions fluorures, de l'acide oxalique, de l'acide difluorométhoxyacétique et de l'acide dichloroacétique. Environ 40 % du méthoxyflurane est éliminé sous forme inchangée par expiration.

L'élimination des produits de dégradation se fait par voie rénale. Ces métabolites peuvent être responsables de néphropathies par nécrose tubulaire aiguë lors de surdosages. Ainsi, la dose recommandée ne doit pas excéder 6 ml par jour et 15 ml par semaine⁷.

Les effets indésirables de cette molécule sont répertoriés ci-dessous en fonction des études pré-cliniques, et suite à l'usage de la molécule en post-commercialisation⁷ :

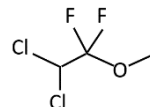
- Effets indésirables graves : néphrotoxicité par nécrose tubulaire aiguë lors de surdosage (administration de fortes doses en milieu anesthésique) – cytolyse hépatique (modèle animal)
- Effets indésirables bénins :
 - Très fréquents > 1/10 : vertige ;
 - Fréquents > 1/100 : somnolence – céphalées - sécheresse buccale – nausées ;
 - Peu fréquents > 1/1000 : perturbation de l'attention, euphorie, anxiété, amnésie, dysarthrie, dysgueusie, paresthésie, diplopie, flush, instabilité tensionnelle, toux, prurit buccal, vomissement, fatigue, sensation d'ivresse, relaxation¹⁷.

2. CARACTERISTIQUES PHYSICO CHIMIQUES ¹⁷

La durée de conservation préconisée par l'ANSM est de 36 mois et il n'existe pas de température de stockage décrite. Les données chimiques montrent une température de solidification à -36 °C et d'ébullition à 104,8 °C.

La formule brute se définit comme suit :

- C₃H₄Cl₂F₂O
- 2,2-dichloro-1,1-difluoro-1méthoxy-éthane



La masse molaire est de 164.966 g/mol et le coefficient de partage huile/gaz étant assez grands (logP ≈ 2), la diffusion en milieu adipeux est très importante permettant sa diffusion rapide dans les graisses.

3. RECOMMANDATION DE LA PRISE EN CHARGE DE LA DOULEUR CHEZ LE TRAUMATISÉ

Des recommandations de sociétés savantes ¹⁸ ont depuis plusieurs années décrit des stratégies de prise en charge de la douleur. Elles se basent sur l'évaluation de l'intensité algique en fonction d'échelles validées. Ainsi, 2 types de moyens sont décrits.

a. Moyens médicamenteux

- Médicaments de palier I : le paracétamol ¹⁹, les anti-inflammatoires non stéroïdiens et le protoxyde d'azote ²⁰

Ils s'administrent soit par voie *per os*, soit en intraveineux soit par voie inhalée. Leur niveau d'antalgie est plutôt adapté aux douleurs légères ou en coanalgie sur des douleurs sévères en vue d'une potentialisation de l'analgésie. Le protoxyde d'azote est principalement utilisé dans les services d'urgence afin d'obtenir une analgésie rapide pour des douleurs traumatiques modérées et intenses ou lors de la réalisation de gestes invasifs désagréables ou douloureux. Néanmoins, étant stocké dans une bouteille sous pression de 5 litres, son encombrement et sa praticabilité sont un frein à leur utilisation en milieu préhospitalier.

- Médicaments de palier II : la codéine, le tramadol et la nalbuphine ^{21,22}

Ces molécules sont utilisées pour des douleurs modérées en milieu hospitalier et préhospitalier. Elles répondent à une alternative immédiate selon le niveau de douleur présentée par le patient. La nalbuphine, utilisée régulièrement en pédiatrie est un opioïde synthétique agoniste/antagoniste des récepteurs κ et μ. L'utilisation de ces paliers II se fait *per os* ou par voie intraveineuse avec un délai d'action dépassant les 10 minutes. La nalbuphine présente une rapidité d'action de l'ordre de la minute mais nécessite une voie d'abord veineuse.

- Médicaments de palier III : morphiniques (morphine – fentanyl – sufentanyl)^{23,25}

Ces médicaments sont indiqués seuls ou en coanalgie avec d'autres substances lors de douleurs intenses en l'absence de contre-indication formelle (inconscience, allergie et détresse respiratoire). De nombreuses formes galéniques sont disponibles permettant soit un transport aisé, soit un délai d'action court soit des capacités antalgiques puissantes. Toutefois, leur administration nécessite la présence d'équipements et de professionnels de santé afin de maîtriser la présence d'éventuels effets indésirables. Ainsi, la perte de conscience ou l'hypoxie sont des issues potentielles lors d'un surdosage en palier III. La balance bénéfice/risque est un élément à prendre en compte lors d'une prise en charge en milieu montagnard de ce type de médicament. Le sufentanyl est une molécule qui permet d'obtenir une analgésie avec de très faibles doses et en utilisant des voies d'abord muqueuses. Cependant, son délai d'action et son temps de demi-vie d'élimination sont des inconvénients à son utilisation en milieu préhospitalier.

- Anesthésie loco-régionale

Cette méthode consiste à injecter un anesthésiant au contact direct du nerf sensitif d'un membre lésé. Son action profonde et rapide demande toutefois un savoir-faire et un temps de mise en place de plusieurs minutes. Par ailleurs, des échecs sont observés ainsi que des complications. Le bloc ilio-facial est un exemple d'anesthésie loco-régionale efficace dans les douleurs de hanche ou fémorale. Sa mise en œuvre nécessite une formation et une certaine dextérité du soignant.

- Coanalgie

La kétamine²⁴ est une molécule inhibitrice du glutamate au niveau du récepteur NMDA. Elle permet, en association avec la morphine, d'optimiser l'analgésie de palier III et de potentialiser l'analgésie de surface. Son utilisation est essentiellement intraveineuse mais peut être administrée par voie intramusculaire ou intranasale. Maintenant une fonction ventilatoire spontanée elle est appréciée des urgentistes mais nécessite là aussi une surveillance étroite et une formation dédiée.

b. Moyens non médicamenteux :

Le glaçage : moyen ancien et empirique, il diminue la nociception par diminution de la conduction du signal douloureux nerveux et abaisse la vascularisation du site par vasoconstriction.

L'immobilisation : en réduisant les mouvements d'un membre lésé, il y a réduction des signaux nocicepteurs.

L'aspect psychologique : le maintien d'un contact régulier et bienveillant avec le patient permet une meilleure analgésie par l'instauration d'un climat de confiance et d'alliance thérapeutique.

Compte tenu de ces aspects développés ci-dessus et des propriétés physico-chimiques du méthoxyflurane, nous avons proposé de mesurer sa quantité résiduelle par spectrométrie de masse et chromatographie en phase gazeuse à l'issue d'une exposition à une phase de stress physique au froid de sa forme commercialisée.

Ainsi, cette expérimentation permettra de mieux connaître les propriétés de cette molécule au froid intense.

V. PRINCIPE D'UN CHROMATOGRAPHE EN PHASE GAZEUSE COUPLÉ A UN SPECTROMETRE DE MASSE

Cette approche analytique (figure 2) a pour but de séparer les molécules volatiles et thermostables composant un mélange. Après introduction et volatilisation de l'échantillon dans l'injecteur du chromatographe, les molécules sont entraînées par un gaz vecteur neutre dans un capillaire (la colonne de chromatographie).

L'interaction chimique entre les différents composés du mélange et la surface interne de la colonne est propre à chaque entité du composé étudié. Elle est fonction d'un gradient de température appliqué dans l'enceinte contenant la colonne (four). Cela provoque une séparation basée sur la différence de vitesse de progression des espèces chimiques de l'échantillon à travers la colonne.

Pour des conditions données, le temps de rétention d'un analyte, c'est-à-dire le temps nécessaire pour qu'une molécule traverse le capillaire et atteigne le détecteur, est stable et représente donc une valeur de référence. En sortie de colonne, un détecteur permet d'enregistrer le signal suivi ainsi que son intensité. La grandeur expérimentale mesurée sera alors soit l'intensité des pics observés (hauteurs) soit l'aire sous courbes de ces pics.

Le détecteur mis en oeuvre dans le cadre de ce travail est un spectromètre de masse. Il permet, après ionisation des molécules (par impact électronique), à la sortie de la colonne, de détecter tous les ions des espèces chimiques selon leur rapport masse/charge (m/z). En fonction des objectifs des essais, il sera possible de travailler en mode SCAN, c'est-à-dire de détecter l'ensemble des ions générés. Il s'agit d'un mode de travail qualitatif permettant de d'obtenir un spectre de masse caractéristique des molécules à étudier. A partir de cette signature, il est ensuite possible de travailler avec une méthode ciblée, permettant une quantification des molécules. L'enregistrement d'un nombre plus restreint de signaux de rapport m/z sélectionnés représente le Courent Total Ionique (TIC). A partir de ce TIC, il est ensuite possible d'extraire le signal d'un seul rapport m/z , il s'agit du mode SIM (Single Ion Monitoring). Il permet d'optimiser le rapport signal/bruit et donc la sensibilité de la méthode.

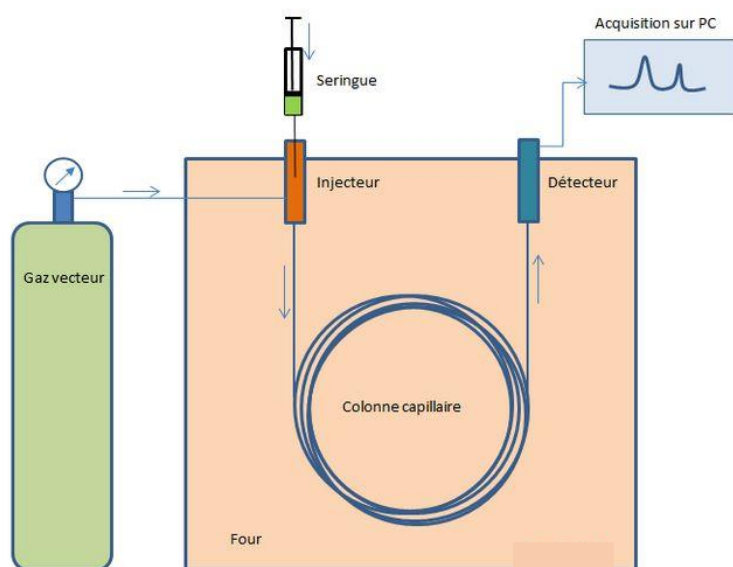


Figure 2 : Représentation simplifiée de la chromatographie en phase gazeuse.

VI. MATERIELS ET METHODES

1. CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL

Le critère de jugement principal est une baisse de plus de 10 % de la quantité de méthoxyflurane après une exposition à un stress de congélation ²⁷.

Ainsi, nous allons comparer à une concentration théorique les mesures de concentration de méthoxyflurane par un signal électronique en spectrométrie de masse après chromatographie en phase gazeuse dans trois configurations différentes de conservation : température ambiante, congélation constante et cycle congélation/décongélation.

2. PRODUITS CHIMIQUES ET REACTIFS

Les réactifs et produits nécessaires à cette étude sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : liste de produits chimiques et réactifs

Produit	CAS	Lot	Pureté	Fournisseur
Méthoxyflurane	76-38-0	MD816	99.9 %	Mundipharma SAS
1,4-Dioxane	123-91-1	T26F759	> 99 %	Thermo Fisher
Eau ultrapure	Néant	Néant	≥ 99.9999 %	milliQ IQ (Merck-Millipore®)
Hélium	7440-59-7	Inconnu	≥ 99.9999 %	Messer

3. CONSOMMABLES

La liste des consommables est résumée dans le tableau 2.

Tableau 2 : liste des consommables utilisés

Description	Référence	Lot	Fabricant
Vials 10 mL Headspace	702866	nd	Macherey Nagel
Bouchons pour vials headspace Silicone/PTFE	702827	nd	Macherey Nagel

4. EQUIPEMENTS

Le matériel nécessaire à la réalisation de cette étude est résumé dans le tableau 3.

Tableau 3 : liste des équipements utilisés

Désignation	Modèle		N°série	Fabricant
Passeur d'échantillon	MPS ROBOTIC		506030	Gerstel
Chromatographe phase gazeuse	7890A		CN1945A024	Agilent
Spectromètre de masse	MSD 5975C		US11034605	Agilent
Pipette	Micropipette 100-1000	Reaserch	933958	Eppendrof
Pipette	Micropipette 20-200	Reaserch	933957	Eppendrof
Pipette	Micropipette 10-100	Reaserch	933956	Eppendrof
Vortex	TX4 digital IR Mixer			VALP Scientifica

La colonne de chromatographie utilisée dans le chromatographe est un capillaire de silice fondue exerçant une fonction de séparateur. Ses caractéristiques techniques sont les suivantes : HP-5MS 20 m x 180 μm x 0,18 μm (Agilent 19091S-577UI). Cette phase stationnaire de 0,18 μm d'épaisseur est composée à 95% de dimethylpolysiloxane et à 5% de phenyl-arylene.

5. TRAITEMENT DES DONNEES ANALYTIQUES

Le logiciel MassHunter 10.0 (Agilent) est utilisé pour l'acquisition et le retraitement des données.

L'ensemble de ces équipements se situe à l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées à Brétigny-sur-Orge. Ils sont représentés sur les figures 3 à 8.



Figure 3 : Représentation d'ensemble du système de chromatographie en phase gazeuse et du spectromètre de masse avec leur PC d'exploitation. Source : Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny sur Orge 91220.



Figure 4 : Vortex TX4 digital IR Mixer utilisé pour le mélange des solutions. Source : Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny sur Orge 91220.



Figure 5 : Exemple de micropipette Research d'EPENDORF utilisée pour réaliser les dilutions. Source : Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny sur Orge 91220.



Figure 6 : Passeur d'échantillon MPS ROBOTIC 2 twister chargé de chauffer la préparation, de mélanger, de ponctionner l'espace de tête et de l'injecter dans le système de chromatographie. Source : Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny sur Orge 91220.

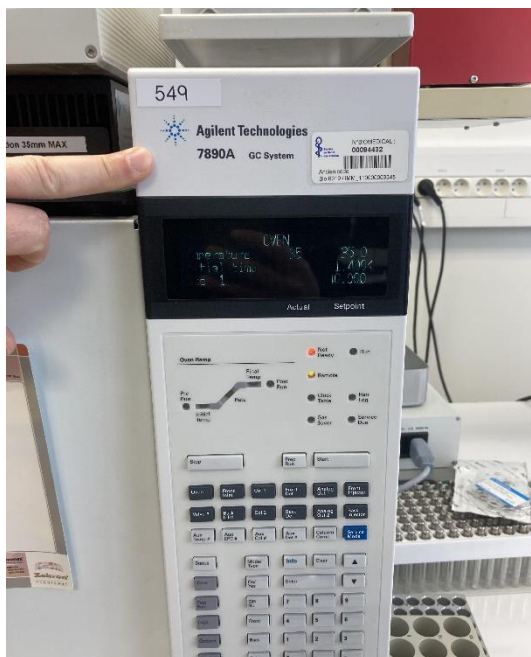


Figure 7 : Unité centrale de l'appareil de chromatographie en phase gazeuse 7890A (AGILENT). Source : Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny sur Orge 91220.



Figure 8 : Spectromètre de masse 5975C (AGILENT). Source : Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny sur Orge 91220.

6. ECHANTILLONNAGE

Le méthoxyflurane est stocké dans sa forme commerciale de trois manières différentes :

- un flacon est placé à température ambiante durant 3 semaines ;
- un autre est congélation - 20 °C durant 3 semaines ;
- le dernier subit trois cycles de congélation/décongélation à – 20 °C (congélation durant 12h puis décongélation à température ambiante durand 4 heures et ce 3 fois).

Afin d'éviter le risque d'évaporation ou encore d'interaction avec les contenants, le choix a été fait de travailler avec les flacons commercialisés non ouverts et du même lot de production (MD816).

Une recherche bibliographique menée en amont de l'étude a permis de confirmer le choix d'une analyse de l'espace de tête d'une solution de méthoxyflurane diluée à l'eau pure (figure 9). En raison d'une température d'ébullition (101 °C) proche de celle du méthoxyflurane, le 1,4-dioxane est choisi comme étalon interne à toutes les solutions et permettra de normaliser le signal ²⁶. La normalisation est effectuée en considérant les rapports d'aires sous pics méthoxyflurane / 1-4 dioxane.

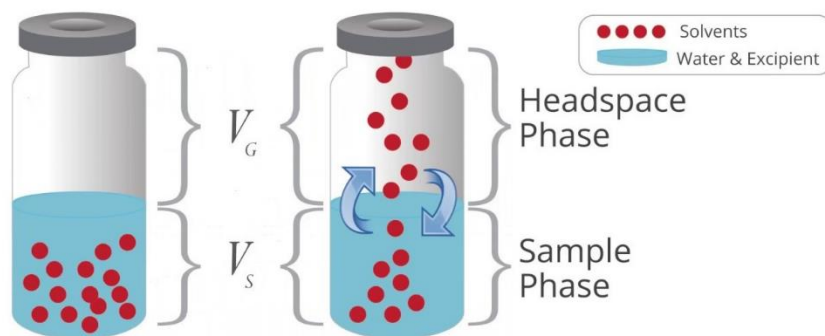


Figure 9 : l'espace de tête (headspace phase) présente un volume de gaz (V_G) contenant de l'air, du méthoxyflurane et du dioxane. Cette portion de l'échantillon sera analysée.

7. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ET DE L'ÉTALON

Une gamme d'étalonnage a été créée à partir de l'échantillon stocké à température ambiante avec la production de 6 vials possédant respectivement une concentration de 1.5, 3.0, 6.25, 12.5, 25 et 50 ng/mL.

Chaque échantillon est dilué dans un vial avec l'eau ultrapure à la concentration de 10 ng/ml. Cette opération est répétée 6 fois pour les échantillons congelés et congelés/décongelés et 3 fois pour l'échantillon à température ambiante.

Le 1,4-Dioxane étalon a été ajouté dans chaque vial à la concentration de 10 ng/mL.

Un total de 21 vials a été réalisé et l'ordre de passage des échantillons a été randomisé.

8. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Cent microlitres de solution sont initialement mélangés et portés à 55 °C par le passeur d'échantillon durant 30 minutes. Un millilitre d'espace de tête est placé dans l'injecteur de la colonne de chromatographie après ponction. Un taux de partage (*split rate*) de 1/50 a été appliqué à l'échantillon en début de chromatographie afin de ne pas saturer le système et affiner la mesure.

Un gradient de température est appliqué selon les modalités suivante : palier de 1.4 min à 35 °C puis gradient de 40 °C / min jusqu'à 80 °C et maintien d'un palier à cette température pendant 2 min. L'hélium pur entre en circulation constante dans la colonne à un débit de 1 mL/min et entraîne l'ensemble de l'échantillon.

VII. RESULTATS

1. ACQUISITION DES DONNÉES BRUTES

a. Détection mode SCAN

La figure 10 montre des chromatogrammes suite à la détection en mode SCAN des 2 espèces. Il s'agit d'injections effectuées séparément afin d'obtenir le spectromètre de masse représentatif de chaque analyte. Les temps de rétention ont été de 2.04 min et de 2.06 min respectivement pour le 1-4 Dioxane et le méthoxyflurane.

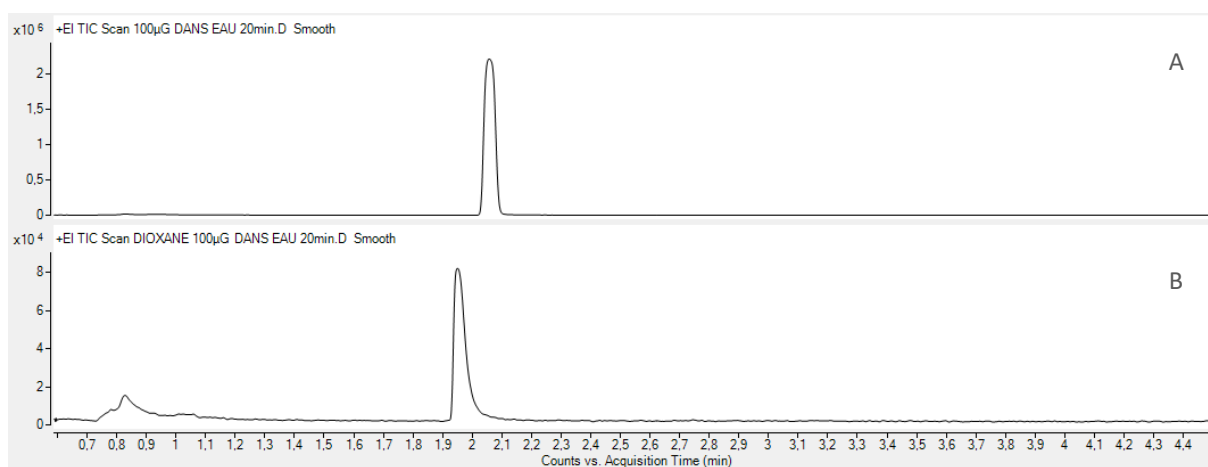


Figure 10 : Chromatogrammes représentant l'intensité du signal en fonction du temps en mode SCAN après injection de l'espace de tête de 100 μ L de solution à 1 μ g/mL de méthoxyflurane (A) et de 1-4 Dioxane (B).

b. Spectrométrie de masse

Les figures 11 et 12 montrent les spectres de masse obtenus à partir des chromatogrammes précédents et au temps de rétention des 2 analytes (soit l'ensemble des m/z constituant le signal total). Le temps de rétention des 2 molécules étant sensiblement identiques, il est important de considérer des ions caractéristiques propres à chaque molécule afin d'éviter les risques d'interférence. Sont identifiés :

- m/z à 81 pour le méthoxyflurane ;
- m/z à 88 pour le 1-4 dioxane.

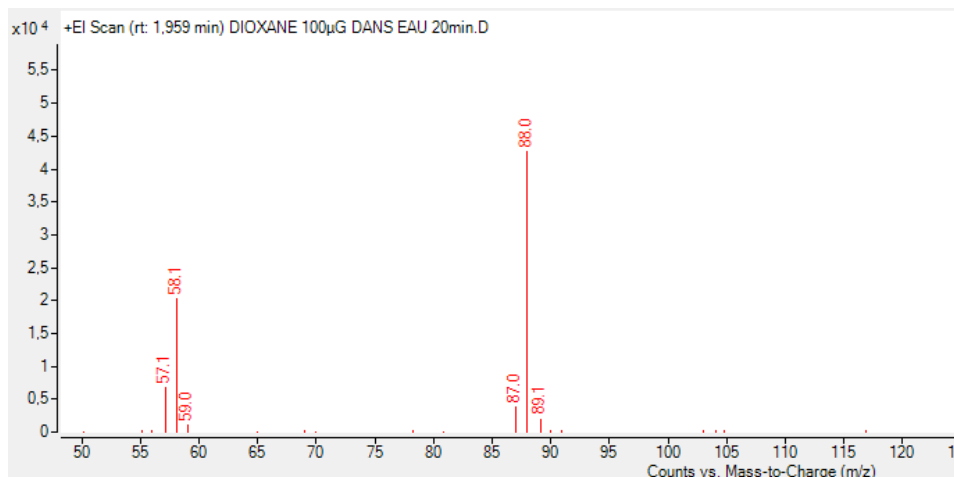


Figure 11 : Spectre de masse du 1-4 Dioxane. L'ion 88 est choisi pour sa présence majoritaire et son absence sur le spectre de masse du méthoxyflurane.

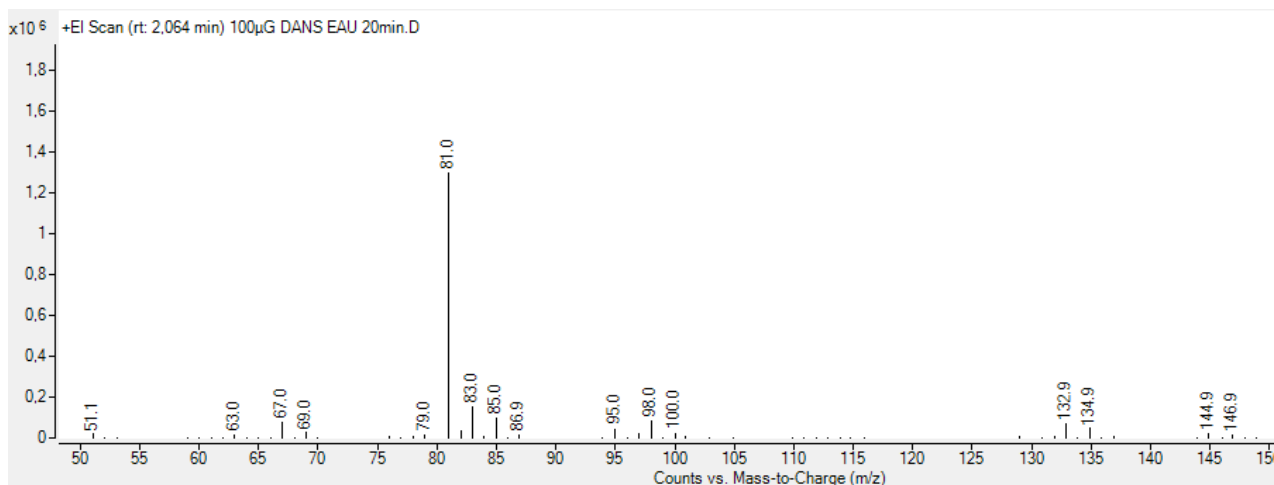


Figure 12 : Spectre de masse du méthoxyflurane. L'ion 81 est choisi pour sa présence majoritaire et son absence dans le spectre de masse du 1-4 Dioxane.

c. Quantification des ions caractéristiques

La figure 13 montre des exemples de chromatogrammes obtenus pour la mesure du signal spécifique des ions 81 et 88 en fonction du temps à la concentration de 10 ng/mL. La sensibilité de la mesure est augmentée.

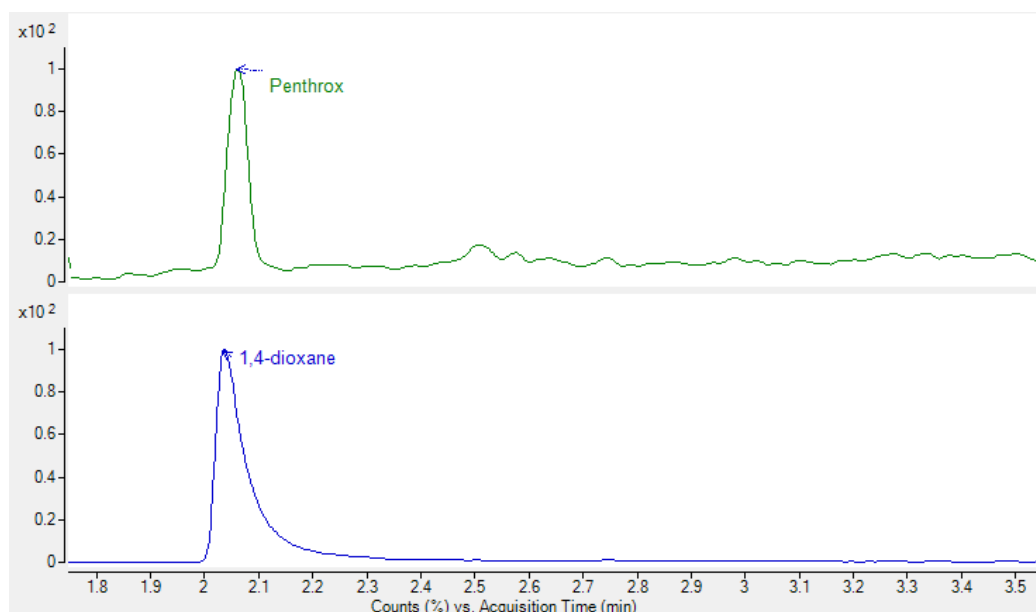


Figure 13 : Chromatogrammes obtenus à partir d'une solution dosée à 10 ng/mL de méthoxyflurane et de 1-4 dioxane respectivement ion de rapport m/z 81 et 88.

Afin de s'assurer d'aucune interférence dans les mesures, le chromatogramme de l'ion 81 du méthoxyflurane à la concentration de 1.5 ng/mL (limite basse de quantification) est comparé à celui obtenu à partir d'un flacon contenant uniquement de l'eau ultra pure (figure 14).

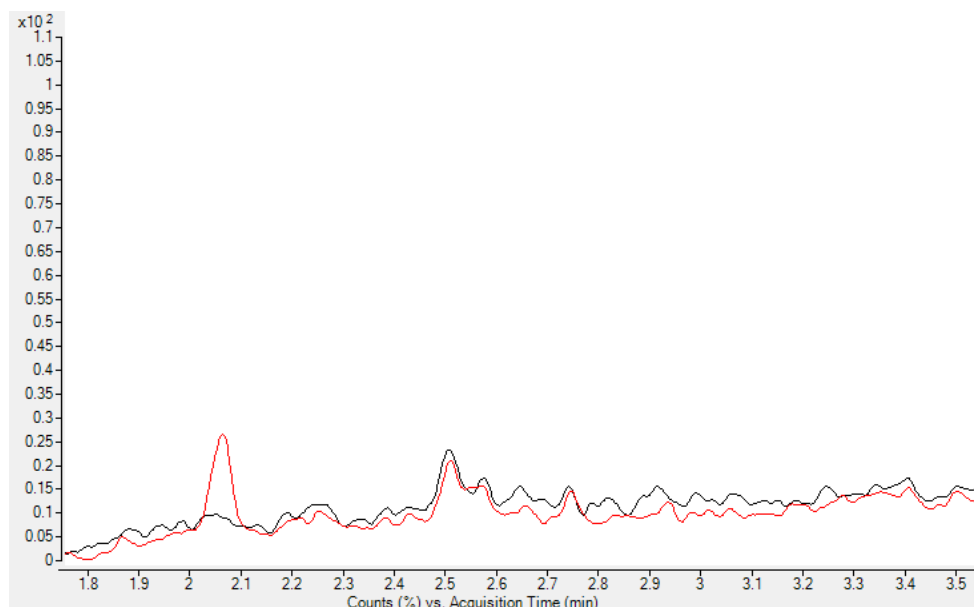


Figure 14 : Superposition de chromatogrammes obtenus en mode SIM pour l'ion 81 à partir d'une solution dosée à 1.50 ng/mL en méthoxyflurane (rouge) et de l'eau pure (noir).

2. GAMME D'ÉTALONNAGE

a. Etude sur la linéarité

L'étude de la relation réponse / concentration a été effectuée sur l'intervalle 1.5 – 50 ng/mL. La gamme était constituée de 6 points d'étalonnage : 1.5, 3.0, 6.25, 12.5, 25 et 50 ng/mL (figure 15). Une régression linéaire pondérée par la concentration a pu être appliquée.

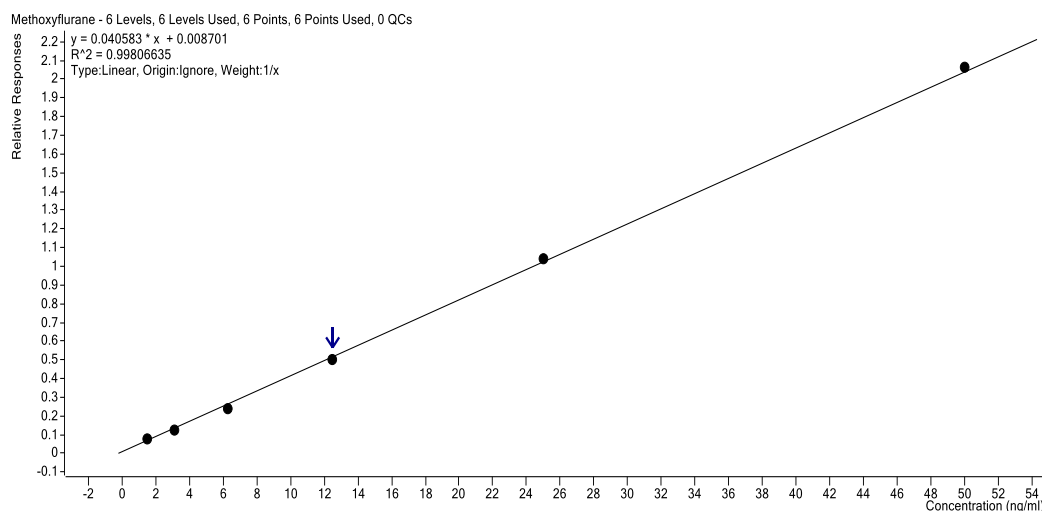


Figure 15 : Représentation graphique du rapport d'intensité du signal dioxane/méthoxyflurane en fonction de la concentration (ng/mL) des 6 échantillons de la gamme d'étalonnage.

La réalisation de la gamme d'étalonnage permet de montrer une bonne linéarité ($r^2 = 0.9980$). La fonction mathématique mise en évidence est $y = 0.040583 \cdot x + 0.008701$.

b. Etude sur la précision

La précision de la méthode correspond au pourcentage de la concentration théorique recalculé à partir du signal et de la droite de régression. Pour ce faire on réalise le ratio du signal entre le méthoxyflurane et le 1-4 dioxane que l'on intègre dans l'équation à la place de y. On trouve alors x étant la concentration recalculée. Les critères d'acceptabilité sont un écart de $\pm 20\%$ à la limite basse de quantification et $\pm 15\%$ pour les autres points de gamme. Le tableau 4 montre que la précision de la méthode est acceptable.

Tableau 4 : Précision de la gamme d'étalonnage.

Concentration Théorique (ng/mL)	Signal Méthoxyflurane	Signal Dioxane	Ratio M/D	Concentration recalculée (ng/mL)	Précision (%)
1,5	93,79	1174,37	0,08	1,75	116,9
3,1	155,70	1241,02	0,13	2,88	92,8
6,25	288,99	1206,38	0,24	5,69	91,0
12,5	567,15	1137,32	0,50	12,07	96,6
25	1154,25	1110,85	1,04	25,39	101,6
50	2388,07	1158,72	2,06	50,57	101,1

Ainsi, la mesure par cette méthode permet de quantifier avec fiabilité le méthoxyflurane mesuré dans chaque échantillon. Pour rappel, les échantillons à tester ont été dilués à la concentration de 10 mg/mL. En cas de différence significative, l'écart pourra être rattaché à la variable de condition de stockage.

3. CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL

Un total de 15 mesures a été pratiqué sur les 3 configurations d'échantillons :

- 6 mesures sur l'échantillon congelé à -20 °C constant ;
- 6 mesures sur échantillon congelé/décongelé ;
- 3 mesures sur l'échantillon à température ambiante (ces derniers ont été également utilisés comme échantillons contrôle-qualité pour valider la gamme d'étalonnage).

Les résultats des concentrations mesurées des échantillons sont récapitulés dans les tableaux 5,6 et 7.

Tableau 5 : Résultats des mesures par spectrométrie de masse en ng/mL des échantillons congelés où VT = valeur théorique (10 ng/mL)

Echantillons Congelés	concentrations	% VT
Mesure 1	11,83	118%
Mesure 2	9,19	92%
Mesure 3	11,61	116%
Mesure 4	9,60	96%
Mesure 5	8,65	87%
Mesure 6	9,27	93%
moyenne	10,03	101%
écart type	1,13	

Tableau 6 : Résultats des mesures par spectrométrie de masse en ng/mL des échantillons congelés/décongelés où VT = valeur théorique (10ng/mL)

Echantillons congelés/décongelés	concentrations	% VT
Mesure 1	14,32	143%
Mesure 2	16,58	166%
Mesure 3	10,21	102%
Mesure 4	9,77	98%
Mesure 5	10,78	108%
Mesure 6	9,27	93%
moyenne	11,82	118%
écart type	2,42	

Tableau 7 : Résultats des mesures par spectrométrie de masse en ng/mL des échantillons à température ambiante où VT = valeur théorique (10 ng/mL)

Echantillons température ambiante	concentrations	% VT
Mesure 1	9,61	96%
Mesure 2	12,98	130%
Mesure 3	11,08	111%
<i>moyenne</i>	11,22	112%
<i>écart type</i>	1,17	

4. ANALYSE DU CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL

Les concentrations mesurées sont toutes supérieures à 90 % de la concentration théorique de la solution mesurée à l'exception d'une mesure (mesure 5 de l'échantillon congelé).

La moyenne des concentrations des échantillons est de 10.03 ng/mL pour l'échantillon congelé, 11.82 ng/mL pour l'échantillon congelé/décongelé et 11.22 ng/mL pour l'échantillon à température ambiante.

Les coefficients de variation montrent une dispersion autour des moyennes de 10 à 20 % par rapport à la valeur théorique de 10 ng/mL.

Les résultats montrent donc une absence de dégradation du méthoxyflurane vis à vis du stockage à - 20 °C ou d'une séquence de congélation/décongélation. En effet, la quantité mesurée des 3 conditions des échantillons n'est pas significativement différente de la concentration théorique de préparation de 10 ng/mL.

VIII. DISCUSSION

1. CONTEXTE

La recherche d'une antalgie efficace et fiable est un objectif important du secours en montagne. Tout en améliorant le vécu du patient, il permet à l'équipe de secouristes de développer son évacuation de manière plus performante et sereine. Le choix de la molécule à utiliser est la synthèse d'une analyse complexe faisant intervenir plusieurs variables dont, l'intensité et le site de la douleur, l'état de conscience et la gravité du patient, la situation géographique, le délai d'action sur le site de l'accident et les conditions climatiques. Comme nous l'avons montré en introduction, le choix d'une mauvaise molécule peut conduire à un échec d'antalgie pour le blessé en milieu montagneux voire à son aggravation.

En outre, le Service de Santé des Armées s'intéresse au milieu arctique et l'armée française souhaite développer une trousse sanitaire individuelle du combattant en « milieu grand froid ». De récentes collaborations ont permis de dégager un cahier des charges sur l'antalgie nécessaire à la confection d'une trousse individuelle du combattant en milieu grand-froid. D'autres pays, comme le Royaume-Uni, cherchent un moyen antalgique pré-hospitalier selon ces critères ²⁸. La prise de l'antalgique doit se faire en autonomie, en une prise rapide, avec une efficacité sur les douleurs modérées à fortes et disponible idéalement sans soluté pour éviter sa congélation. La molécule doit également résister au froid et aux variations extrêmes de températures (cycles congélation/décongélation). La galénique doit également apporter une stabilité sur un plan mécanique car il n'est pas envisageable de retrouver un comprimé écrasé ou une ampoule de soluté rompue. Finalement, un surdosage ne doit pas conduire à une complication immédiate irréversible et d'impact vital ou à une complication métabolique grave à moyen ou long terme.

Le méthoxyflurane répond partiellement à ce cahier des charges. En effet, sa stabilité à la congélation est confirmée, il peut s'administrer seul ou accompagné, il est indiqué lors de douleurs traumatiques légères à modérées, il est rapidement efficace. Il ne provoque pas d'effet indésirable métabolique lors d'une administration dans des proportions recommandées. Il ne provoque pas d'arrêt respiratoire ni de complication neurologique ou cardiaque immédiate. Par ailleurs, sa forme commerciale, PENTHROX®, semble résistante aux compressions ou écrasements.

Toutefois, il reste encombrant pour le soldat du fait de sa forme et de son système de filtre à charbon. Il n'est pas validé sur les douleurs sévères. Son efficacité reste transitoire et son administration ne peut être répétée qu'une seule fois. Il peut provoquer un certain inconfort psychologique pour le patient et une nausée avec vomissement. Ce dernier peut revêtir une certaine dangerosité en cas d'inhalation et doit être considéré comme la condition la plus défavorable à son utilisation.

Son rapport bénéfice/risque, coût/efficacité et efficacité/temps de mise en oeuvre doivent être comparés avec ceux d'autres molécules comme l'oxycodone ou le fentanyl en forme solide à sucer. Ainsi, des pistes d'études complémentaires pourraient être menées s'attachant à mieux évaluer ces rapports.

2. PERSPECTIVES D'UTILISATION

Afin de mieux évaluer la pertinence de l'utilisation du méthoxyflurane en milieu froid, nous avons dans cette étude procédé à une mesure de la stabilité du méthoxyflurane après congélation et cycles congélation/décongélation. Les résultats ont montré que les échantillons congelés et les échantillons congelés/décongelés maintenaient une concentration correspondant à celle de la valeur théorique attendue. L'hypothèse testée est donc infirmée par cette expérience. Le méthoxyflurane semble être stable chimiquement lors d'une exposition prolongée au froid intense.

En l'état actuel des connaissances et à la lumière de cette expérience, l'utilisation du méthoxyflurane en milieu alpin reste licite. Son utilisation simple et autogérée par le patient en fait un antalgique potentiel dans des conditions périlleuses ou l'accès au patient est difficile.

Une utilisation par le patient après explications claires, loyales et appropriées du PENTHROX[®] par un personnel formé (médecin, infirmier, secouriste voire professionnel de la montagne) peut en faire un antalgique de premier rang en médecine de montagne.

Actuellement son utilisation reste dédiée aux équipes médicales. Toutefois, les données de sécurité et le mode d'administration pourraient conduire à un élargissement de son utilisation par les secouristes (PGHM – CRS – sécurité civile) ou par les personnels employés pour la sécurité des pistes (pisteurs secouristes). En effet, l'administration de PENTHROX[®] restant autogérée par le patient, l'antalgie procurée permettra un conditionnement efficace, confortable et une évacuation en toute sécurité.

Des investigations complémentaires doivent être menées dans ce sens afin de s'assurer de la bonne tolérance des patients, de la facilité d'utilisation par les équipes secouristes et de la bonne qualité de service rendu aux victimes. Par ailleurs, une application concrète peut être proposée en milieu militaire afin de mettre à disposition des équipes encadrantes ce type de dispositif moyennant une protocolisation et une formation au sein de structures dédiées.

3. ANALYSE DES BIAIS

Cette étude expérimentale repose sur un principe de mesure et une méthode validée qui est la spectrométrie de masse après chromatographie en phase gazeuse. La validité interne a été étudiée par la mise en évidence d'une précision acceptable d'une gamme d'étalonnage et d'une linéarité du signal mesurée par rapport à la concentration recherchée du composé. L'utilisation de lot de PENTHROX® de la même série dans leur conditionnement original permettant de s'assurer d'une homogénéité du substrat. La présence d'un groupe témoin (échantillon à température ambiante) permet de conforter les résultats. L'élaboration du protocole expérimental ainsi que sa retranscription pourront permettre à d'autres investigateurs de reproduire cette expérience afin de vérifier sa solidité.

Toutefois, cette étude possède des biais qui nécessitent d'être précisés. Un nombre limité de mesures est proposé ce qui a pour effet de minimiser la puissance statistique. Il aura été impossible par exemple de fournir plus de mesures notamment auprès de l'échantillon à température ambiante.

Bien entendu, les conclusions de ce travail ne permettent pas de répondre à l'intégralité des questions entourant l'utilisation de cette drogue. Il existe d'autres variables non explorées par notre protocole qui peuvent encore expliquer un manque d'efficacité de cette molécule lors de son utilisation au froid.

Tout d'abord, deux facteurs physiques peuvent modifier la volatilité du méthoxyflurane de sa forme liquide à sa forme gazeuse : la température et la pression. En effet, le volume de gaz généré par évaporation à des pressions atmosphériques plus faibles (altitude) peut être augmenté. Toutefois, la température basse peut altérer le processus d'évaporation en gaz et limiter l'apport de gaz au patient lors de l'inhalation. Ainsi, il s'avère difficile d'anticiper le comportement physique de ce produit lors de son utilisation pratique en milieu alpin.

La vérification de cette hypothèse doit nécessairement passer par une comparaison entre la mesure des quantités de méthoxyflurane évaporées en conditions "niveau marin" et celles en conditions "alpin". En cas de mesure de quantités évaporées différentes de méthoxyflurane, l'hypothèse sera vérifiée.

Ensuite, la pression partielle présente au niveau des alvéoles pulmonaires peut à elle seule expliquer un manque de passage de méthoxyflurane dans le sang du patient. En effet, à volume égal de méthoxyflurane au niveau de l'alvéole, une pression partielle plus faible (altitude) peut contribuer à un passage plus faible de la barrière alvéolo-capillaire. Une baisse significative de la concentration plasmatique du méthoxyflurane pourra s'observer et une baisse de l'analgésie sera observée.

La vérification de cette hypothèse doit passer par une comparaison de la concentration plasmatique en méthoxyflurane sous des conditions de pression atmosphérique différentes chez 2 patients inhalant le même volume (la même quantité) de méthoxyflurane.

IX. CONCLUSION

Cette étude montre la stabilité du méthoxyflurane (PENTHROX[®]) au froid intense. Ainsi, son utilisation en milieu froid (montagneux ou arctique) semble tout à fait possible à la vue de ces résultats. Des investigations complémentaires sont à envisager pour cette molécule afin d'étudier plus finement ses caractéristiques physico-chimiques (étude de volatilité et niveau d'absorption sanguine en milieu froid et/ou de basse pression) et d'étudier le niveau de sa balance bénéfice/risque.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

1. Berben SAA, et al. Pain prevalence and pain relief in trauma patients in the Accident & Emergency department. *Injury*. mai 2008;39(5):578-85.
2. Ahmadi A, et al. Pain management in trauma: A review study. *J Inj Violence Res*. 2016;8:10.
3. Guru V, Dubinsky I. The patient vs. caregiver perception of acute pain in the emergency department. *J Emerg Med*. janv 2000;18(1):7-12
4. Marjanovic N et al. Le methoxyflurane : agent analgésique utile aux urgences ? *Prat En Anesth Réanimation*. juin 2018;22(3):129-33.
5. Tomi K, et al. Alteration of pain threshold and psychomotor response associated with subanaesthetic concentrations of inhalation anesthetics in humans. *Br J Anaesth*, 1993;70(6): 684-86
6. Coffey F, et al. STOP!: a randomised, double-blind, placebo-controlled study of the efficacy and safety of methoxyflurane for the treatment of acute pain. *Emerg Med J*. août 2014;31(8):613-8.
7. Jephcott C, et al. A review of the safety and efficacy of inhaled methoxyflurane as an analgesic for outpatient procedures. *Br J Anaesth*. mai 2018;120(5):1040-8.
8. Johansen R.B., et al. Effect of extreme temperatures on drugs for prehospital ACLS. *American Journal of Emergency Medicine*, (1993).
9. Küpper, T.E.A.H., et al. Drugs and drug administration in extreme environments. *Journal Travel Med* 13 (35-47) 2006
10. De Lamberterie J-B, Ginon B. Stabilité chimique des drogues d'urgence en ambiance froide : état des lieux, retour d'expérience sur 3 expéditions en zone froide et perspectives. Mémoire de DESC de médecine d'urgence. Faculté de médecine Aix-Marseille 2018
11. Rachid O, et al. Epinephrine autoinjectors: does freezing or refrigeration affect epinephrine dose delivery and enantiomeric purity? *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2015;3:294e296
12. Beasley, H., et al. The impact of freeze-thaw cycles on epinephrine. *Wilderness and environmental medicine*, 26(514-519) (2015).
13. De Winter, S., et al. Impact of temperature exposure on stability of drugs in a real-world out-of-hospital setting. *Emergency services/original research*, 62(4) (2013).
14. Dustin L Gammon, et al. Alteration in prehospital drug concentration after thermal exposure. *The american journal of emergency medicine* 0735-6757/S (2007).
15. Armenian, P., et al. Hot and cold drugs : national park service medication stability at the extremes of temperature. *Prehospital emergency care* 21 :3(378-385) (2017).
16. NSTRUCTION N° 340057/DEF/RH-AT/EP/PMF/DS/32 - N° 126/DEF/CoFAT/DF/B/COORD/FORM relative à l'enseignement du secourisme dans l'armée de terre. 26 mars 2009
17. [Thériaque \(theriaque.org\) https://theriaque.org/apps/content/accueil.php](https://theriaque.org/apps/content/accueil.php)

18. Trinh-Duc et al. Actualisation 2007 de la III^e Conférence de consensus en médecine d'urgence (Créteil, avril 1993) : le traitement médicamenteux de la douleur de l'adulte dans le cadre de l'urgence. SFMU 2007
19. Anderson BJ. Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Pediatr Anesth*. 008;18(10):915-21.
20. Ducassé J-L, et al. Nitrous Oxide for Early Analgesia in the Emergency Setting: A Randomized, Double-blind Multicenter Prehospital Trial. *Miner JR, éditeur. Acad Emerg Med*. févr 2013;20(2):178-84.
21. Keene DD, Rea WE, Aldington D. Acute pain management in trauma. *Trauma*. juill 2011;13(3):167-79.
22. Chambers JA, Guly HR. Prehospital intravenous nalbuphine administered by paramedics. *Resuscitation*. mars 1994;27(2):153-8.
23. Galinski M, Adnet F. Prise en charge de la douleur aiguë en médecine d'urgence. *Réanimation*. nov 2007;16(7-8):652-9.
24. Galinski M, et al. Management of severe acute pain in emergency settings: ketamine reduces morphine consumption. *Am J Emerg Med*. mai 2007;25(4):385-90.
25. Aubrun F, Valade N, Riou B. La titration intraveineuse de morphine. *Ann Fr Anesth Réanimation*. oct 2004;23(10):973-85.
26. Yang et al. Reliable gas chromatographic – mass spectrometric method combined with a headspace autosampler for iso flurane determination in blood. *J Chrom B*. 742 (2000) 277-282
27. GUIDELINES on declaration of storage conditions : a: in the product information of medicinal products for active substances. European Medicines Agency London 2007 cpmq/609/96/rev 2
28. Cohen HML, Wolstenholme R. Pentrox: a breath of PHEC air for the military? *J R Army Med Corps*. 6 févr 2019;jramc-2018-001122.