

Article original

Passage des benzodiazépines dans le lait maternel : aspects cliniques et analytiques

Transfer of benzodiazepines into breast milk: clinical and analytical aspects

Dalia Khachman^{1,2}, Peggy Gandia^{1,*}, Francisco Sena¹, Caroline Tortissier¹, Patrick Seraissol¹, Corinne Assouline³, Alain Berrebi³, Georges Houin¹

¹ Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie Clinique, Hôpital Purpan, Institut Fédératif de Biologie, 330 Avenue de Grande Bretagne, TSA 40031, 31059 Toulouse Cedex 09, France

² Laboratoire de Physiopathologie et Toxicologie expérimentales, UMR 181 INRA, ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 87614, 31076 Toulouse Cedex 03, France

³ Service de gynécologie-obstétrique, hôpital Paule-de-Viguier, CHU de Toulouse, 330 Avenue de Grande Bretagne, TSA 70034, 31059 Toulouse Cedex 09, France

Résumé – Objectif : Valider la méthode de dosage par HPLC des benzodiazépines dans le lait afin d'évaluer l'exposition du nourrisson allaité et mettre en place un suivi thérapeutique. **Méthodes :** La linéarité, le rendement d'extraction, la répétabilité et la reproductibilité sur trois jours du diazépam, desméthyl diazépam, bromazépam, oxazépam et lorazépam ont été étudiés avec trois matrices différentes, du lait de vache Candia[®], du lait lyophilisé pour nourrissons O-Lac Enfamil[®] et du lait maternel. Le midazolam a été utilisé comme étalon interne. Le système chromatographique a consisté en une colonne Nucléosil avec un détecteur UV (254 nm). Le débit de la pompe était réglé à 1,2 mL/min avec une durée d'acquisition de 20 min. **Résultats :** La linéarité allait de 50 à 5000 ng/mL pour diazépam, bromazépam et lorazépam, et de 100 à 10 000 ng/mL pour desméthyl diazépam et oxazépam ($r^2 > 0,99$). Le rendement d'extraction était de l'ordre de 100 % (± 15 %) pour chaque benzodiazépine testée. Coefficients de variation (CV) et biais intra-jour et inter-jour des cinq benzodiazépines allaient de -15,3 % à 17,4 %. **Conclusion :** La méthode validée est simple, rapide et applicable à des échantillons réels de lait maternel contenant des benzodiazépines.

Mots clés : Lait, suivi biologique thérapeutique, benzodiazépines, HPLC

Abstract – Objective: To validate an HPLC analytical assay of benzodiazepines in milk to assess the degree of exposure of the breastfed infant and set up a therapeutic drug monitoring. **Methods:** The linearity, the recovery, the within-day repeatability and inter-day reproductibility over three days of diazepam, desmethyldiazepam, bromazepam, oxazepam and lorazepam were studied with three different matrices, cow's milk Candia[®], freeze-dried milk dedicated for infants O-Lac Enfamil[®] and mother breast milk. Midazolam was used as internal standard. The chromatographic system consisted of a Nucleosil column with an UV detection (254 nm). The flow of the pump was adjusted at 1.2 mL/min with an acquisition period of 20 min. **Results:** The linearity for diazepam, bromazepam and lorazepam ranged from 50 to 5000 ng/mL whereas for desmethyldiazepam and oxazepam, it ranged from 100 to 10 000 ng/mL ($r^2 > 0.99$). The recovery was around 100% ($\pm 15\%$) for each tested benzodiazepine. Within-day and inter-day coefficients of variation (CV) for the five benzodiazepines ranged from -15.3% to 17.4%. **Conclusion:** The validated method is simple, fast and applicable to maternal milk samples containing benzodiazepines.

Key words: Milk, therapeutic drug monitoring, benzodiazepines, HPLC

Reçu le 24 juillet 2008, accepté après modifications le 22 janvier 2009
Publication en ligne le 19 mars 2009

* Correspondance : Dr Peggy Gandia, Tél. (33) 5 67 69 03 83, Fax (33) 5 67 69 03 84, gandia.p@chu-toulouse.fr

1 Introduction

Vu les nombreux avantages de l'allaitement, à la fois pour la mère et l'enfant [1–3], les organisations professionnelles telles que l'*American Academy of Pediatrics* et la *Canadian Pediatric Society*, recommandent l'allaitement maternel exclusif des nourrissons pendant les six premiers mois après la naissance et la poursuite de l'allaitement jusqu'à l'âge d'un an ou plus [4]. Les bienfaits de l'allaitement sont d'ordre, aussi bien nutritionnel, immunologique, psychologique, émotionnel, économique que social [5]. Dans les pays en voie de développement, la mortalité et la morbidité des bébés nourris au sein sont considérablement réduites, soit 300 décès en moins pour 1000 naissances [6]. Des résultats similaires sont observés dans les pays industrialisés [6]. Après un fort déclin de l'allaitement dans ces pays-là dans les années 50, l'allaitement au sein connaît un regain d'intérêt atteignant des taux stables de 60–90 % dans la plupart des sociétés industrialisées [6, 7].

Avec l'augmentation de la prévalence et de la durée de l'allaitement, les occasions pour les mères d'avoir besoin de prendre des médicaments sont plus nombreuses et posent le problème du risque de l'exposition du nourrisson au médicament pris par sa mère [8, 9]. Dès lors, un compromis s'impose entre, d'un côté, la privation de la mère allaitante du traitement le mieux approprié pour elle, compte tenu des nombreux avantages de l'allaitement et, d'un autre côté, la privation du nourrisson des bienfaits de l'allaitement suite à l'indication d'un traitement médicamenteux à la mère [10]. La décision d'interrompre ou de contre-indiquer l'allaitement ne peut donc se justifier que si les risques pour l'enfant sont supérieurs aux bénéfices attendus pour celui-ci. La prescription est donc une analyse permanente du meilleur rapport bénéfice/risque.

Cependant, la prescription d'un traitement médicamenteux à la mère allaitant est le plus souvent responsable d'un arrêt abusif de l'allaitement [11–15]. Afin d'estimer le degré d'exposition de l'enfant et l'éventuel impact du médicament sur celui-ci, il est nécessaire de connaître les mécanismes pharmacocinétiques du passage des médicaments dans le lait pour pouvoir choisir le traitement posant le moins de risque d'effets indésirables. Or, l'étude de la diffusion des médicaments dans le lait ne constitue pas un préalable exigé avant l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché. De ce fait, mais également pour des raisons éthiques, les études pharmacocinétiques et cliniques sur l'excrétion des médicaments dans le lait manquent dans l'espèce humaine [16]. La majorité des données humaines dont nous disposons provient d'études réalisées chez des mères n'allaitant pas (collecte mécanique de lait) ou de cas ponctuels [17].

Plus de 90 % des mères sont susceptibles de recevoir un ou plusieurs médicaments pendant la première semaine périnatale [18]. Même si les femmes allaitant consomment moins de médicaments qu'il y a dix ans, cette consommation reste supérieure en France en comparaison avec celle d'autres pays [16]. Selon une étude prospective réalisée au Canada portant sur les effets indésirables observés chez des nourrissons allaités en rapport avec la prise de médicament par la mère, les sédatifs (5 %) figurent au quatrième rang des médicaments concernés après les analgésiques (23,4 %), les antibiotiques (20 %) et les antihistaminiques (10 %) [19]. De même, les résultats d'une

étude française [16] concernant la consommation de médicaments pendant l'allaitement montrent que 6 % des femmes allaitant consomment des psychotropes (benzodiazépines et apparentés). L'anxiété, comme la dépression, est très courante à la fois pendant la grossesse et la période périnatale [20]. L'importance d'étudier le passage des benzodiazépines dans le lait maternel est liée au fait que le lait maternel constitue l'alimentation exclusive du bébé et que la plupart des études menées à ce jour [21–25] sur ces molécules ont révélé leur présence et celle de leurs métabolites dans le lait maternel ainsi que dans le sérum et/ou les urines du nourrisson allaité. Par ailleurs, aucune étude n'a encore fait état des conséquences à long terme sur le développement du système nerveux central du nourrisson exposé de façon chronique aux benzodiazépines par l'allaitement exclusivement.

D'un point de vue analytique, les méthodes de dosage des benzodiazépines dans le lait maternel précédemment publiées sont peu nombreuses et pour la plupart sont des techniques de chromatographie gazeuse [26–30] dont les caractéristiques analytiques (sensibilité, précision et exactitude) ne sont pas clairement détaillées. Ainsi, l'objectif de cette étude a été de valider une méthode de chromatographie liquide simple, adaptée à un usage en routine, afin de doser les principales benzodiazépines présentant une demi-vie d'élimination longue et/ou étant elles-mêmes des métabolites actifs (diazépam, desméthylthiazépam, bromazépam, oxazépam et lorazépam) dans le lait maternel pour permettre la mise en place d'un suivi thérapeutique du nourrisson lors d'une exposition chronique de la maman de la grossesse à l'allaitement.

2 Rappels physiologiques sur le transfert des médicaments dans le lait maternel

2.1 Rappel sur la production du lait maternel

La glande mammaire est composée de glandes acineuses entourées de cellules myoépithéliales et reliées aux canaux excréteurs. Le lait est éliminé dans les canaux galactophores qui se terminent au niveau du mamelon. Le lait est sécrété de manière continue mais l'ocytocine est nécessaire pour l'éjection du lait [31].

Quatre processus simultanés sont impliqués dans la production et la sécrétion des composants du lait par les cellules acineuses, les rendant uniques parmi les différentes sécrétions : exocytose du lactose et des protéines du lait, sécrétion des graisses en gouttelettes, sécrétion de l'eau et des ions, pinocytose-exocytose des immunoglobulines [31–33].

Le passage des médicaments dans le lait suit les règles de passage à travers les membranes. Chez la femme qui allaite, le lait et le plasma peuvent être considérés comme deux compartiments physiologiques indépendants [34].

Les facteurs à prendre en compte sont la mère, le médicament, le lait et le nouveau-né (nourrisson) (figure 1) [8, 35, 36].

2.2 Mécanismes de transfert des médicaments dans le lait maternel [31]

Passage dans le lait

Pendant les 48 à 72 premières heures *post partum*, l'épithélium alvéolaire est toujours en constitution. Les jonctions entre

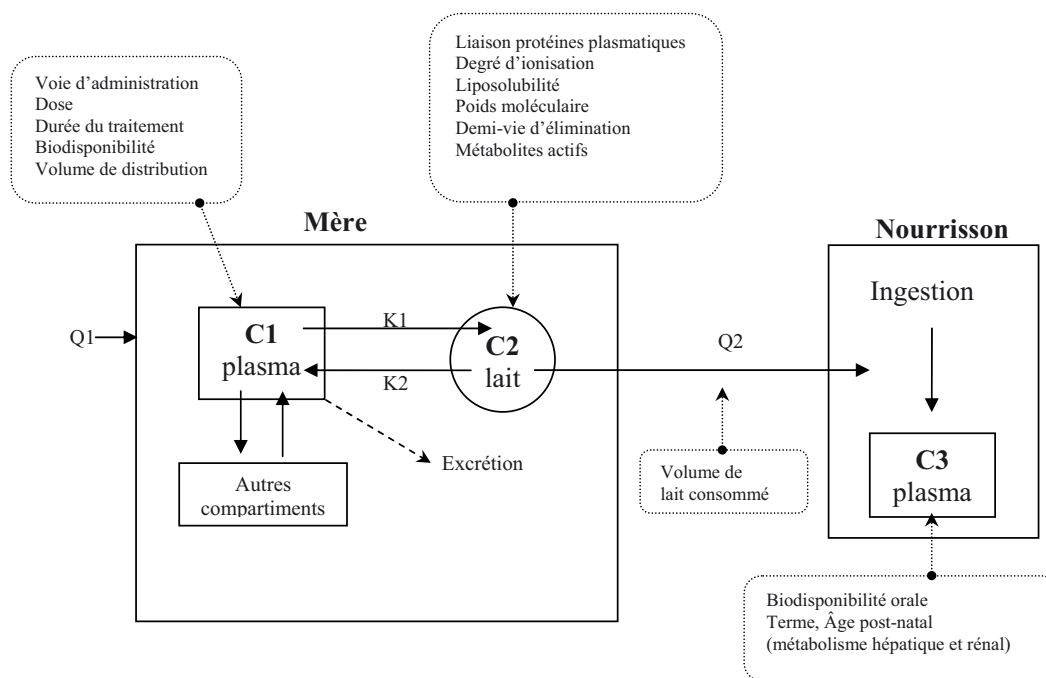


Fig. 1. Représentation schématique du circuit d'un médicament de la mère à l'enfant *via* le lait maternel et des facteurs qui l'influencent. Le modèle pharmacocinétique utilisé est un système à trois compartiments : le compartiment plasmatique maternel, le compartiment lacté, le nourrisson. Le médicament passe par diffusion du plasma vers le lait (ou du lait vers le plasma). Le lait ingéré et le médicament diffuse du tube digestif vers le secteur plasmatique du nourrisson. Q1 : Dose administrée à la mère ; Q2 : Quantité ingérée par le nourrisson *via* le lait maternel. C : Concentration. C1 : dans le plasma maternel ; C2 : dans le lait ; C3 : dans le plasma du nourrisson. K : Constantes de transfert. K1 : plasma-lait ; K2 : lait-plasma [8, 36].

les cellules n'étant pas toutes formées, ceci permet l'entrée du médicament du fluide interstitiel directement dans le lait. Ce processus de diffusion aqueuse correspond au transfert du médicament par voie paracellulaire. Cependant, à cause de cette voie paracellulaire, les médicaments utilisés dans cette période périnatale précoce, doivent être étudiés au cas par cas [37].

Après les premiers jours *post partum*, les jonctions intercellulaires sont formées et le transfert des médicaments dans le lait doit se faire à travers les cellules épithéliales alvéolaires elles-mêmes. Le principal mécanisme de passage des médicaments dans le lait est la diffusion passive de la forme non liée aux protéines plasmatiques et non ionisée de la molécule (figure 2) [31, 37-40]. Le rapport lait/plasma de cette forme peut être prédit par l'équation de Henderson-Hasselback [31, 40-43]. Pour les molécules à caractère acide, ce rapport est donné par la formule suivante :

$$\text{Rapport } L_{\text{fraction libre}}/P_{\text{fraction libre}} = \frac{1 + 10^{(\text{pH Lait} - \text{pKa})}}{1 + 10^{(\text{pH Plasma} - \text{pKa})}}$$

Pour les molécules basiques, ce rapport vaut :

$$\text{Rapport } L_{\text{fraction libre}}/P_{\text{fraction libre}} = \frac{1 + 10^{(\text{pKa} - \text{pH Lait})}}{1 + 10^{(\text{pKa} - \text{pH Plasma})}}$$

avec L, lait maternel et P, plasma maternel.

Ainsi, le rapport lait/plasma est inférieur à 1 pour les acides, supérieur à 1 pour les bases et égal à 1 pour les médicaments neutres [31].

Cette voie de transfert expose les molécules à une fixation ou à une transformation métabolique dans les cellules acineuses avant d'être excrétées. Cependant, la mise en évidence dans le lait de métabolites du médicament n'est pas suffisante pour démontrer leur formation dans le tissu mammaire. Par ailleurs, un médicament peut être expulsé des cellules dans la lumière des glandes acineuses en même temps que des gouttelettes de lipides ou de granules de protéines [31].

Pendant le sevrage ou au cours d'une mammite, les molécules peuvent entrer plus directement dans le lait par l'intermédiaire d'espaces intercellulaires entre les cellules acineuses [31] en empruntant la voie paracellulaire.

De rares substances font l'objet d'un transfert actif (l'iode radioactif [31], la cimétidine [44] et le nitrofurantoïne [45]) et sont retrouvées dans le lait en plus grande quantité que dans le plasma.

Réabsorption

Une réabsorption des médicaments à partir du lait vers le plasma a été mise en évidence dans un petit nombre d'études [31] montrant une décroissance parallèle des concentrations dans le plasma et dans le lait. Ceci a été montré pour la théophylline et pour la zoplicone. Une excellente corrélation a été mise en évidence pour le moclobémide entre la concentration dans le lait et celle dans le plasma [46]. L'ensemble de ces données est en faveur d'une diffusion passive bidirectionnelle rapide et d'une équilibration rapide des concentrations libres de ces médicaments entre le plasma et le lait [31].

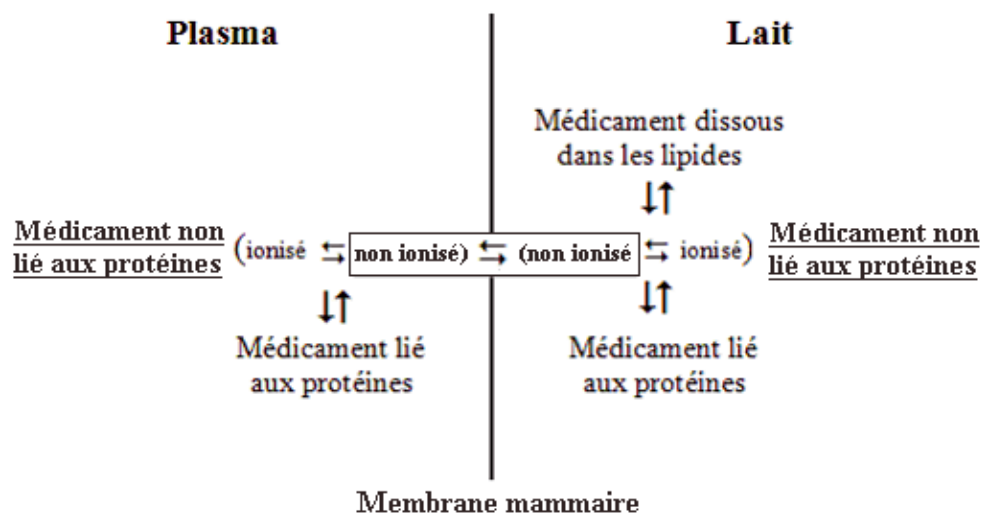


Fig. 2. Représentation schématique de la distribution du médicament entre le lait et le plasma [38–40].

2.3 Facteurs influençant le passage d'un médicament de la mère à l'enfant via le lait maternel (tableau I) [47]

Concentration plasmatique maternelle du médicament : la concentration plasmatique maternelle du médicament est le seul facteur maternel essentiel à retenir. Celle-ci dépend de la posologie (dose et durée du traitement), de la voie d'administration et des capacités maternelles d'élimination hépatique et rénale [35, 36].

Degré d'ionisation du médicament : il dépend de son pKa et du pH du milieu. Seule la forme non ionisée des médicaments diffuse dans le lait à travers les membranes biologiques. Les médicaments acides faibles sont généralement plus ionisés et passent donc moins facilement que les bases faibles. Ainsi, les bases faibles (barbituriques, bêtabloquants) se trouvent piégées dans le compartiment lacté [13, 34] du fait de son pH légèrement plus acide que celui du plasma [13, 34]. Le pH du lait est en moyenne égal à 6,98, 6,90 et 6,80 aux jours 3, 4 et 5 *post partum*, respectivement. Dans le lait mature, il varie entre 6,60 et 6,95 [48, 49].

Liposolubilité : plus une substance est liposoluble, plus elle passe facilement à travers les membranes biologiques [34, 48] et plus elle se concentre dans les lipides du lait [48].

Liaison aux protéines : seule la fraction libre du médicament peut passer dans le lait. Un fois dans le lait, le médicament peut se lier aux protéines du lait (8 à 11 g/L), notamment la lactoférine et l'albumine [31].

Poids moléculaire : quand il est très faible (< 200 daltons) comme celui de l'éthanol, il y a un passage par diffusion directe par l'espace intercellulaire (diffusion paracellulaire). À l'inverse, les substances dont le poids moléculaire est supérieur à 800–1000 daltons, passent plus difficilement dans le lait. Pour les substances dont le poids moléculaire est très élevé (25 000 à 200 000 daltons), il n'y a pratiquement pas de passage lacté (insuline, interféron, immunoglobulines, héparine y compris les héparines de bas poids moléculaire) [31].

Demi-vie d'élimination : plus elle est courte, moins il y a de risques de passage dans le lait. Si le médicament est pris

Tableau I. Facteurs déterminants pour l'usage de médicaments chez la mère sans risque pour le nourrisson allaité [47].

Facteurs liés au lait	*Composition du lait (concentration en lipides et en protéines)
Facteurs liés à la mère	*Métabolisme hépatique et rénal *Dose administrée *Durée du traitement *Voie d'administration *Volume de distribution *Compliance de la mère au traitement
Facteurs liés à l'enfant	*Âge *Résorption orale *Métabolisme hépatique et rénal *Volume de lait ingéré *Innocuité du médicament chez le nourrisson
Facteurs liés au médicament	*pKa (degré d'ionisation) *Hydrosolubilité, liposolubilité *Poids moléculaire *Biodisponibilité orale *Liaison aux protéines plasmatiques *Demi-vie d'élimination *Existence de métabolites actifs *Toxicité

juste après une tétée, le taux plasmatique au moment de la tétée suivante aura beaucoup diminué [34].

Métabolites actifs : l'existence de métabolites actifs ayant une demi-vie d'élimination plus longue que celles de la substance mère (diazépan, fluoxétine, amitriptyline...) peut poser un problème [8].

Les substances susceptibles de « passage maximum » sont donc des bases faibles, très liposolubles, peu liées aux protéines plasmatiques, à demi-vie d'élimination longue et/ou possédant des métabolites actifs.

Flux sanguin mammaire : le débit sanguin augmente au cours de la tétée. Les modifications du débit sanguin mammaire au cours de la tétée pourraient conditionner les heures d'administration du médicament au cours de la journée, de sorte que l'enfant au sein soit exposé à la quantité de médicament la plus faible possible [31].

Perméabilité capillaire : en tout début de lactation, l'épithélium alvéolaire étant beaucoup plus perméable, la concentration lactée des médicaments peut être plus élevée. Mais, étant donné le faible volume de colostrum sécrété et consommé, la dose totale reçue par l'enfant reste encore très faible [34, 50].

Qualité du lait : la composition du lait, notamment en lipides, est évolutive au cours du temps [51]. Durant les trois premiers jours de l'allaitement, le lait de femme alors appelé colostrum, est particulièrement moins riche en lipides et en lactose que le lait mature [3]. Les lipides du lait représentent en moyenne 40 g/L [31]. Le contenu en lipides du lait varie considérablement au cours d'une tétée, d'une tétée à l'autre, et d'une femme allaitante à une autre [31]. En cours de tétée, la composition du lait change et s'enrichit en graisses et en micelles de caséine [3]. Le lait de fin de tétée est de 2 à 3 fois plus riche en lipides que le lait de début de tétée [31]. Le contenu en lipides dans le lait mature ne semble pas varier en fonction du délai écoulé après l'accouchement [31].

Volume ingéré par l'enfant et capacités métaboliques du nourrisson : la quantité de médicament ingérée par l'enfant au sein dépend de sa concentration dans le lait maternel, variable au cours du temps [8], et de la quantité de lait que l'enfant boit, variable selon l'âge de l'enfant et le caractère plus ou moins exclusif de l'allaitement [8]. L'effet des médicaments auquel l'enfant au sein est exposé, dépend non seulement de la dose ingérée mais aussi de la pharmacocinétique de ces médicaments chez l'enfant. La biodisponibilité orale du médicament chez l'enfant peut être différente de celle de l'adulte en raison de la différence de superficie du tractus gastro-intestinal par rapport au poids corporel, de la motricité, du pH, du métabolisme intestinal et hépatique et de l'existence ou pas d'un cycle entéro-hépatique [52]. Ainsi, un certain nombre de médicaments sont détruits par les enzymes du tube digestif du nouveau-né. À l'inverse, certains enfants ont des facteurs de risque particuliers tels que la prématurité (capacités d'élimination immatures) et des déficits enzymatiques (déficit en glucose 6-phosphate déshydrogénase) [36, 53, 54]. La demi-vie des médicaments est donc généralement d'autant plus longue chez l'enfant qu'il est immature et jeune [34].

2.4 Estimation de l'exposition du nourrisson au médicament

Estimation du passage lacté

Le rapport des concentrations d'une substance entre le lait et le plasma est exprimé par le rapport lait/plasma (L/P). Mais

cette mesure est temps-dépendante [8, 55], influencée par le profil pharmacocinétique de la substance chez la mère et les modifications de la composition du lait [55].

$$\text{Rapport L/P} = \frac{\text{Concentration de la substance dans le lait}}{\text{Concentration plasmatique maternelle}}$$

Ce rapport est souvent mal interprété [8, 56] et il peut même donner la fausse impression que de grandes quantités de médicament passent dans le lait. En effet, même s'il est élevé, la quantité de médicament qui passe dans le lait est avant tout déterminée par sa concentration dans le sang de la mère. En effet, si un médicament a un rapport L/P élevé et si le taux plasmatique chez la mère de ce médicament est bas, la quantité de médicament qui passera dans le lait sera faible de toute façon [13, 34, 49, 57].

C'est la raison pour laquelle les pharmacologues s'attachent à mesurer l'évolution des concentrations du médicament en fonction du temps dans le lait et dans le plasma, ce qui fournit des données beaucoup plus fiables, et même indispensables pour les médicaments dont les concentrations n'évoluent pas en parallèle entre les différents compartiments biologiques (bupropion, sumatriptan, sertraline, paroxétine...) [8, 58]. Ces mesures permettent de connaître la concentration maximale (C_{\max}) ou la concentration moyenne (C_{moy}) calculée à partir de l'aire sous la courbe des concentrations en fonction du temps (ASC) et de calculer un rapport L/P moyen [8].

Par ailleurs, il faut prendre en considération la clairance du médicament chez le nourrisson. À titre d'exemple, pour une substance à clairance élevée et dont une concentration importante est nécessaire chez le nourrisson pour observer un effet clinique, même un rapport L/P de 10 serait cliniquement insignifiant chez le nourrisson. À l'inverse, pour une substance présentant une faible clairance chez le nourrisson et dont une très faible quantité de substance suffit pour provoquer un effet clinique chez ce dernier, même avec un rapport L/P de 0,1, une exposition du nourrisson à ce principe actif n'est pas acceptable [56]. Ainsi, la clairance d'un médicament chez le nourrisson est un facteur important pour la détermination du niveau d'exposition du bébé [56].

Le rapport L/P peut servir à évaluer la concentration de médicament dans le lait à partir d'une concentration plasmatique moyenne ou maximale connue.

$$\begin{aligned} \text{Concentration lactée} &= \\ &\text{Concentration plasmatique} \times \text{rapport L/P.} \end{aligned}$$

Dose reçue par le nourrisson

On peut évaluer la dose que l'enfant reçoit en multipliant la concentration lactée du médicament par le volume de lait ingéré.

$$\begin{aligned} \text{Dose reçue par le nourrisson} &= \\ &\text{Concentration lactée} \times \text{Volume de lait ingéré} \quad (\text{équation 1}). \end{aligned}$$

Le volume de lait ingéré est estimé théoriquement à 150 mL/kg/j [13], ce qui correspond à la quantité de lait ingérée au maximum au cours de l'allaitement à l'âge de 2-3 mois.

Par assimilation à l'équation (1), le produit de la concentration lactée moyenne de médicament par le volume de lait théoriquement ingéré, donne la dose théorique reçue par l'enfant. À ce jour, la validité de cette méthode n'est toujours pas vérifiée [31].

Dose théorique reçue par l'enfant =

$$C_{\text{moy}} \times 0,150 \text{ L/kg} \quad (\text{équation 2}).$$

Cette dose théorique reçue par l'enfant peut être comparée à la dose thérapeutique pédiatrique lorsque le médicament est déjà utilisé en pédiatrie.

Dose enfant relative

La dose reçue par l'enfant peut être exprimée en pourcentage par rapport à la dose maternelle rapportée au poids [47].

Dose enfant relative (%) =

$$\frac{\text{Dose reçue par l'enfant (g/kg/j)} \times 100}{\text{Dose maternelle (g/kg/j)}}.$$

Les pédiatres s'accordent à définir une limite arbitraire de 10 % de la dose maternelle, en deçà de laquelle les effets cliniques sont très probablement insignifiants pour des nouveau-nés nés à terme et en bonne santé [13, 49, 51, 57]. Il est à noter que la quantité de métabolites actifs doit être prise en compte dans le calcul de la quantité de médicament à laquelle l'enfant au sein est exposé [31].

Index d'exposition

L'index d'exposition a été proposé comme un concept unissant deux facteurs indépendants : un paramètre pharmacocinétique (la clairance) et un paramètre physicochimique (le rapport L/P) [56, 57].

$$\text{Index d'exposition} = \frac{100 \times \text{Rapport L/P} \times Q}{Cl_N};$$

Q : quantité de lait ingérée, soit $150 \text{ mL/kg/j} = 0.1 \text{ mL/kg/min}$;
 Cl_N : clairance de la substance chez le nourrisson exprimée en mL/kg/min .

Ce paramètre présente un intérêt équivalent à la dose enfant relative exprimée en pourcentage [55] mais, étant donné qu'il tient compte de la clairance du médicament chez le nouveau-né, celui-ci devient plus pertinent lorsque le nouveau-né est prématuré ou présente une pathologie pouvant affecter l'élimination du xénobiotique.

2.5 Conclusion

La plupart des médicaments administrés à la femme allaitante atteignent des concentrations très modérées dans le lait et les quantités effectivement ingérées par le nourrisson sont souvent très modestes, représentant le dixième ou le vingtième de la posologie néonatale habituelle [36]. Cependant, selon Larsen et ses collaborateurs [59], aucun modèle mathématique ne peut prédire de façon suffisamment exacte et précise les concentrations d'un médicament dans le lait maternel, justifiant pleinement le monitoring biologique et clinique des bébés à risque.

3 Passage des benzodiazépines dans le lait maternel

Les benzodiazépines sont utilisées fréquemment par les femmes en période périnatale pour contrôler l'anxiété, les troubles psychiques et les convulsions [1]. L'incidence de dépression périnatale est élevée et estimée à 1 femme sur 8 [60].

L'effet des médicaments psychotropes chez le nourrisson est devenu sujet d'intérêt suite à la détection, à la fois dans le lait maternel, et dans le plasma et les urines du nourrisson du diazépam administré à la mère [21–23]. Les métabolites actifs, desméthyl diazépam, oxazépam et témazépam ont aussi été identifiés dans le lait maternel et le sérum du nourrisson [24, 25]. Par la suite, d'autres molécules benzodiazépiniques et apparentées aux benzodiazépines [25–29, 34, 36, 46, 61–72] ont aussi été détectées dans le lait maternel (tableaux II et III).

L'*American Academy of Pediatrics* a classé les benzodiazépines parmi les médicaments dont l'effet sur les nourrissons nourris au sein est inconnu, mais qui peut être conséquent, et donc à prendre en considération [1, 47].

Bien que ce soient des nouveaux-nés, aucune modification neurobiologique, voire aucun effet clinique n'a été décelé chez ces nourrissons exposés au médicament uniquement après la naissance *via* le lait maternel [14, 25]. Les problèmes surviennent si le nourrisson est prématuré ou bien s'il a été exposé à de fortes concentrations durant la grossesse et/ou l'accouchement [25, 73]. L'accumulation possible des dérivés à demi-vie d'élimination longue et la sommation possible avec une administration pendant la grossesse doivent toujours être prises en compte au cours de l'allaitement [36]. En effet, une addition des apports pré- et postnataux atteignant des taux thérapeutiques, a été décrite avec les benzodiazépines administrées au long cours chez la mère pendant la grossesse [36]. C'est ainsi qu'un cas de somnolence a été décrit pour le clonazépam et quelques cas de cyanose et d'hypotonie avec le diazépam administré en traitement répété chez la mère pendant la grossesse et l'allaitement [35]. À l'inverse, l'arrêt brutal chez une femme traitée pendant sa grossesse expose le nouveau-né au syndrome de sevrage [36]. Un cas a été observé avec l'alprazolam [35].

D'un point de vue pharmacocinétique, il est aujourd'hui largement reconnu que toutes les benzodiazépines sont absorbées rapidement et distribuées dans le lait maternel atteignant des concentrations maximales en 60 min. Chez le nouveau-né et le jeune nourrisson, les benzodiazépines sont métabolisées et éliminées plus lentement, d'où des demi-vies plus longues [34, 74, 75]. En effet, des taux mesurables de diazépam et de son métabolite déméthylé ont été retrouvés dans le plasma du nourrisson sept jours après une administration unique chez la mère [23]. Quant aux substances apparentées aux benzodiazépines, il s'est avéré que leur concentration ($\sim 4 \text{ ng/mL}$) était dix fois inférieure à celle de la concentration des benzodiazépines dans le lait après administration chez la mère [76].

En règle générale, pour limiter le risque dû à l'exposition chez le nourrisson, les molécules apparentées aux benzodiazépines (zolpidem) ou les benzodiazépines à courte durée d'action (alprazolam, lorazépam) sont conseillées tant qu'elles sont utilisées à court terme, à faible dose, de façon intermittente et après la première semaine périnatale [1, 77]. Par ailleurs, il est conseillé de surveiller l'apparition de signes de

Tableau II. Estimation du passage des benzodiazépines dans le lait maternel : revue de littérature.

DCI	Rapport L/P moyen	Dose enfant relative (%)	Référence	Commentaires
Les molécules benzodiazépines				
diazépam	0,10–0,58	14 %	[61]	Les métabolites actifs du diazépam sont le desméthyl-diazépam, le témazépam et l'oxazépam [62]. La dose enfant relative de diazépam et de ses métabolites est estimée à 14 % [61]. L'index d'exposition maximum possible du diazépam serait de 3 % [26].
clonazépam	0,33–0,37	DM	[25]	Birnbaum <i>et coll.</i> [25] ont étudié les concentrations de clonazépam chez 5 nourrissons exposés <i>via</i> le lait maternel. Seul un enfant sur 5 a présenté des concentrations plasmatiques détectables de clonazépam, et ceci suite à son exposition préalable <i>in utero</i> pendant la grossesse [25].
desméthyl-diazépam ou nordiazépam	0,10–0,58	DM	[61]	
oxazépam	0,1–0,2	DM	[36]	
alprazolam	0,36	3 %	[36]	3 % correspond à la dose enfant relative rapportée au poids [63].
lorazépam	0,15–0,26	DM	[34, 64]	
quazépam	4,19*	0,11 %	[27]	*4,19, 2,02 et 0,091 correspondent respectivement aux rapports L/P des AUC de quazépam, 2-oxoquazépam et N-desalkyl-2-oxoquazépam [27]. La quantité totale de quazépam et de ses métabolites trouvées dans le lait en 24 h est seulement de 0,11 % [27].
2-oxoquazépam	2,02*			
N-desalkyl-2-oxoquazépam	0,091*			
midazolam	0,15	0,002 %–0,013 %	[29, 65]	La quantité de midazolam retrouvée dans le lait en 24 h correspond en moyenne à 0,005 % (0,002 %–0,013 %) de la dose maternelle rapportée au poids [65]. Aussi, le bébé allaité n'est plus exposé au médicament 4 h après la prise du comprimé de midazolam par la mère [29].
nitrazépam	0,27	DM	[29]	
Les molécules apparentées aux benzodiazépines				
zopiclone	0,5–0,8	DM	[36]	La zopiclone serait retrouvée dans le lait à des concentrations supérieures à 2 µg/L 22 h après une dose unique [36].
zolpidem	0,13–0,18	0,004 %–0,019 %	[36]	L'excrétion de zolpidem dans le lait maternel est faible (moins de 0,02 %) et celle-ci a lieu en majorité pendant les 3 premières heures après l'administration du médicament à la mère [46]. Certains auteurs rapportent que le zolpidem n'est plus détectable dans le lait 10 h après l'administration [36].
zaleplon	0,5	0,013 %–0,017 %**	[36]	**0,013 %–0,017 % correspond à la quantité maximale reçue par l'enfant en pourcentage de la dose maternelle [36].

Rapport L/P instantané correspond au rapport de la concentration lactée au temps *t* sur la concentration plasmatique maternelle au même temps *t*.

Rapport L/P moyen correspond à la moyenne de plusieurs rapports L/P instantanés mesurés à différents instants sur une période de 24 h.

Dose enfant relative correspond à la dose théorique reçue par l'enfant exprimée en pourcentage par rapport à la dose maternelle.

DM : Données manquantes.

dépression nerveuse centrale et d'apnée chez le nourrisson exposé [34]. En cas de prise temporaire de benzodiazépine à demi-vie courte, la tétée qui suit la prise peut être remplacée par un allaitement artificiel [36]. Compte tenu du fait que l'on remplace habituellement la tétée de nuit par un allaitement artificiel chez les mamans sous hypnotique, l'utilisation ponctuelle du zolpidem en cas de nécessité ne semble pas poser de problème particulier [36].

4 Matériels et méthodes

4.1 Réactifs et solutions standards

Les solvants de qualité chromatographie liquide haute performance (HPLC), ont été commandés chez Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France) pour le méthanol, l'ammoniaque et la soude, chez Merck (Darmstadt, Allemagne) pour

Tableau III. Comparaison des rapports L/P moyens de différentes benzodiazépines par rapport à celui de l'oxazépam [59].

Substance X	Rapport L/P de la substance X Rapport L/P de l'Oxazépam	Référence
témazépam	1	[28, 67]
lormétazépam	1	
diazépam	2	[68, 69]
N-desméthyldiazépam	2	
lorazépam	2	[70]
clonazépam	3	
nitrazépam	5	[71, 72]
flunitrazépam	5	
quazépam	40	[27]

l'acétonitrile et le dihydrogénophosphate de potassium, et chez Scharlau (Sentmenat, Espagne) pour le diisopropyléther et l'isooctane. L'éther éthylique a été fourni par Scharlau (Sentmenat, Espagne). Les benzodiazépines (diazépam, desméthyldiazépam, bromazépam, oxazépam et lorazépam) ont été commandées chez Sigma (Steinheim, Allemagne) et le midazolam chez Panpharma (Trittau, Allemagne).

Le lait de vache utilisé était du lait Candia® entier non normalisé (Lyon, France) stérilisé UHT, provenant du commerce. Le lait lyophilisé, O-Lac Enfamil®, utilisé comme préparation pour les nourrissons dès la naissance, est fabriqué par Mead Johnson Nutritionals (Nijmegen, Pays-Bas) et est distribué par Mead Johnson Nutritionals France (Rueil-Malmaison, France). Quant au lait maternel, il nous a été gracieusement fourni par une maman qui avait initialement stocké ce lait (2^e mois d'allaitement) pour un éventuel usage ultérieur.

Pour chaque molécule de benzodiazépines, une solution étalon mère a été préparée à une concentration de 2 500 mg/L dans du méthanol. Les solutions étalons filles ont été obtenues par dilution dans de l'eau distillée à trois niveaux de concentration par molécule, soit 1,25, 12,5 et 125 mg/L pour le diazépam, le bromazépam et le lorazépam, et 2,5, 25 et 250 mg/L pour l'oxazépam et le desméthyldiazépam. Trois points de gamme sont alors préparés par molécule, soit 50, 500 et 5 000 ng/mL pour le diazépam, le bromazépam et le lorazépam, et 100, 1 000 et 10 000 ng/mL pour l'oxazépam et le desméthyldiazépam, et ceci par addition de 20 µL de chaque solution fille correspondante et complétés par 400 µL de lait, et ce pour chaque type de lait.

Deux niveaux de contrôle qualité (QC) ont été préparés pour chaque benzodiazépine, de 300 et 3 000 ng/mL pour le diazépam, bromazépam et lorazépam et de 500 et 5 000 ng/mL pour l'Oxazépam et le Desméthyldiazépam. Une solution mère à 150 µg/mL et à 1 500 µg/mL dans le méthanol a été préparée pour le diazépam, le bromazépam et le lorazépam. De même, une solution mère à 250 µg/mL et à 2 500 µg/mL dans le méthanol a été préparée pour l'oxazépam et le desméthyldiazépam. Deux solutions filles ont été préparées par addition d'un millilitre de chaque solution mère à 150 et 250 µg/mL ou 1 500 et 2 500 µg/mL (soit 5 mL par solution fille), et complétée chacune par 15 mL d'eau distillée. À 0,4 mL de chacune de ces

deux solutions filles, ont été ajoutés 9,6 mL de lait permettant de constituer les deux niveaux de QC.

Une solution mère d'étalon interne de chlorhydrate de midazolam a été préparée à une concentration de 500 mg/L dans du méthanol, puis diluée dans de l'eau distillée afin d'obtenir une solution fille d'étalon interne à 10 mg/L.

4.2 Préparation de l'échantillon

Les échantillons lactés ont été prétraités avant dosage. À 500 µL d'échantillon, ont été ajoutés 25 µL de la solution fille à 10 mg/L d'étalon interne et 500 µL de tampon à pH 7,4. Le tampon utilisé était une solution de Dihydrogénophosphate de Potassium, (KH₂PO₄, 0,05 M) ajustée au pH 7,4 par de la soude (NaOH, 0,2 M).

L'extraction a été réalisée en ajoutant 10 mL d'éther éthylique au précédant mélange. Après agitation sur agitateur horizontal pendant 10 min, 6 mL de la phase organique étherée ont été transvasés dans un tube rodé en verre et évaporés à sec sous azote à 50 °C. Le résidu sec a été repris par 400 µL de phase mobile puis 50 µL ont été injectés dans la colonne.

4.3 Analyse par HPLC

Les concentrations lactées de diazépam, desméthyldiazépam, bromazépam, oxazépam et Lorazépam ont été déterminées par chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec détection UV (254 nm).

La chaîne chromatographique était constituée d'un injecteur automatique Series AS100XR (Thermo Separation Products, Les Ulis, France), d'une colonne à support Nucléosil 50-5 µm, de longueur 15 cm et diamètre 4 mm (Bischoff, Leonberg, Allemagne).

La phase mobile était constituée d'un mélange filtré et dégazé de méthanol (3,7 %), acétonitrile (3,3 %), eau distillée (0,2 %), ammoniacque 16,4 M (0,2 %), diisopropyléther (50 %) et isooctane (42,6 %). Le débit de la pompe (HPLC-ICS, Bischoff, Lapeyrouse Fossat, France) était réglé à 1,2 mL/min, l'élution a été faite à température ambiante, la durée d'acquisition était de 20 min. La détection des pics a été effectuée avec un détecteur UV (Spectra System UV6000LP, Thermo Fisher, Courtabœuf, France), relié à un système informatique Optiplex GX620 (Dell, Austin, Texas, USA). Les chromatogrammes ont été analysés et interprétés par le logiciel ChromQuest (Thermo Fisher, Courtabœuf, France).

4.4 Validation analytique

Cette méthode de dosage a été préalablement validée dans le plasma humain selon les *bonnes pratiques de laboratoire* [78] et est couramment utilisée en routine pour les échantillons plasmatiques au Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie Clinique (Toulouse, France).

Un essai de répétabilité et de reproductibilité a été réalisé en utilisant du lait de vache, du lait lyophilisé pour nourrissons et du lait maternel pour les différentes benzodiazépines (diazépam, desméthyldiazépam, bromazépam, oxazépam et lorazépam).

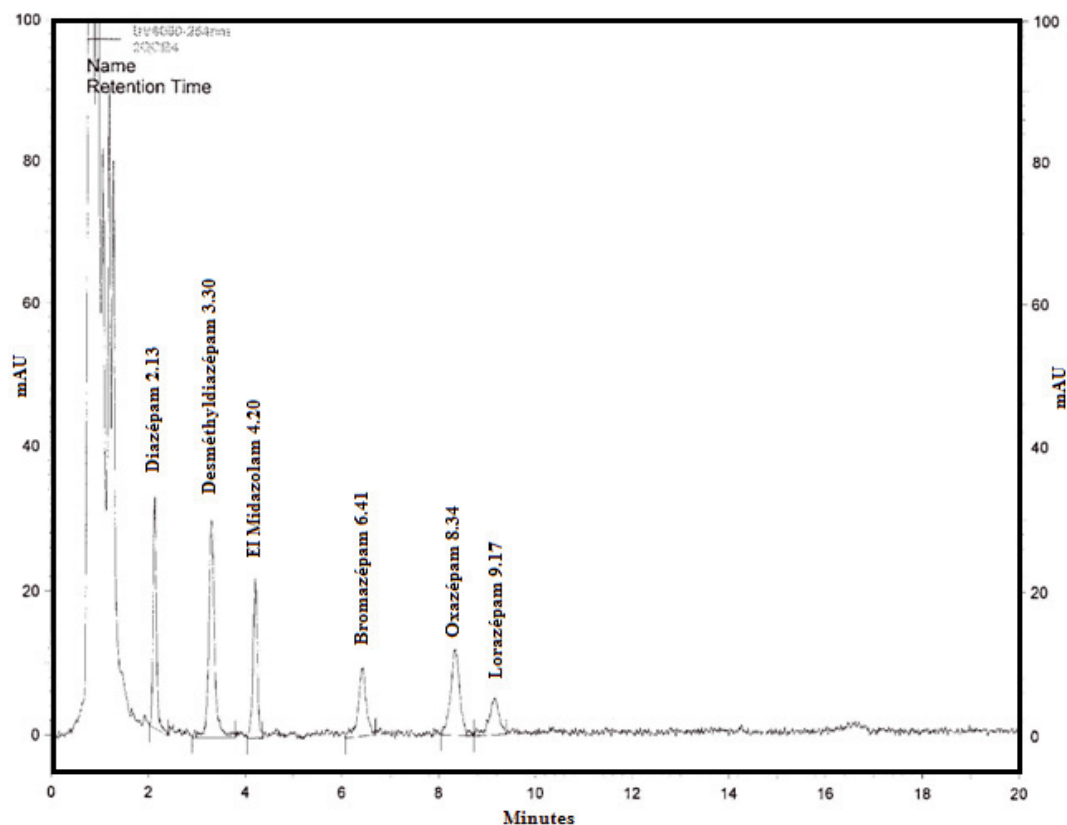


Fig. 3. Chromatogramme obtenu pour le QC bas dans du lait de vache avec diazépam 300 ng/mL, desméthylidiazépam 500 ng/mL, bromazépam 300 ng/mL, oxazépam 500 ng/mL et lorazépam 300 ng/mL. QC, contrôle qualité ; EI, étalon interne.

La répétabilité a été évaluée sur une même journée à partir d'une gamme d'étalonnage et de deux niveaux de QC analysés cinq fois chacun.

La reproductibilité de la méthode a été évaluée sur trois jours ($n = 15$). Chaque jour, une gamme d'étalonnage et deux niveaux de QC ont été testés pour chaque molécule. La précision (coefficient de variation) et la justesse (biais) ont été calculées pour la limite de quantification (LOQ) et pour chaque niveau de QC.

Pour les QC et la LOQ, les critères d'acceptabilité reposaient sur une précision (CV) et une justesse (biais) inférieures à 20 %.

Afin d'évaluer le rendement d'extraction pour chaque molécule de benzodiazépines, la réponse obtenue pour une solution non extraite a été comparée à celle obtenue après extraction, et ceci pour chaque niveau de QC et pour l'étalon interne.

5 Résultats

Sous les conditions pré-définies et quel que soit le type de lait, les temps de rétention du diazépam, desméthylidiazépam, midazolam, bromazépam, oxazépam et lorazépam ont été en moyenne de 2,17, 3,33, 4,29, 5,85, 9,86 et 10,69 min, respectivement (figures 3-6).

Avec le lait de vache, le lait lyophilisé pour nourrissons et le lait maternel, la linéarité allait de 50 ng/mL (LOQ) à 5 000 ng/mL pour le diazépam, le bromazépam et le lorazépam, et de 100 ng/mL (LOQ) à 10 000 ng/mL pour le desmé-

thylidiazépam et l'oxazépam avec des coefficients de corrélation moyens supérieurs à 0,99 ($n = 3$).

Les précisions et justesses intra- et inter-jour de la méthode de dosage des benzodiazépines dans le lait de vache, le lait lyophilisé pour nourrissons et le lait maternel sont présentées dans les tableaux IV, V et VI.

Le rendement d'extraction des cinq benzodiazépines et de l'étalon interne a été de 100 % dans les trois types de lait ainsi que pour le plasma.

6 Discussion

La prise de médicaments pendant l'allaitement est un dilemme pour les praticiens et débouche souvent sur une contre-indication ou un arrêt de l'allaitement. Il n'y a pourtant que très peu de médicaments qui présentent des risques cliniquement significatifs pour les nourrissons allaités. La décision d'initier et/ou de poursuivre ou non l'allaitement ne doit pas être prise à la légère. Il est donc nécessaire de pouvoir évaluer de façon individualisée le bénéfice de l'allaitement et du traitement par rapport au risque lié à l'exposition au médicament. Cette évaluation devant reposer sur des informations scientifiques validées et actualisées, il est donc indispensable de savoir doser les médicaments dans le lait, en particulier ceux pouvant poser problème chez le nouveau-né ou le nourrisson allaité, comme c'est le cas des benzodiazépines et des psychotropes en général.

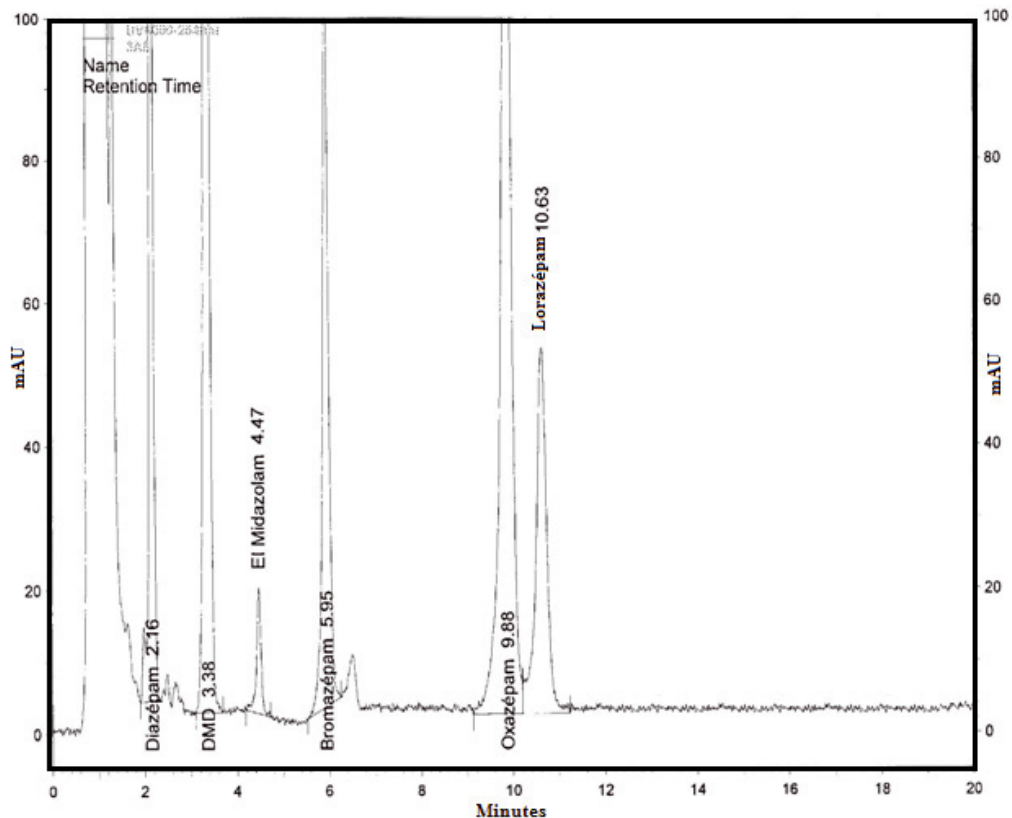


Fig. 4. Chromatogramme obtenu pour le point haut de la gamme d'étalonnage dans du lait lyophilisé pour nourrissons avec diazépam 5 000 ng/mL, desméthyl diazépam 10 000 ng/mL, bromazépam 5 000 ng/mL, oxazépam 10 000 ng/mL et lorazépam 5 000 ng/mL. DMD, desméthyl diazépam ; EI, étalon interne.

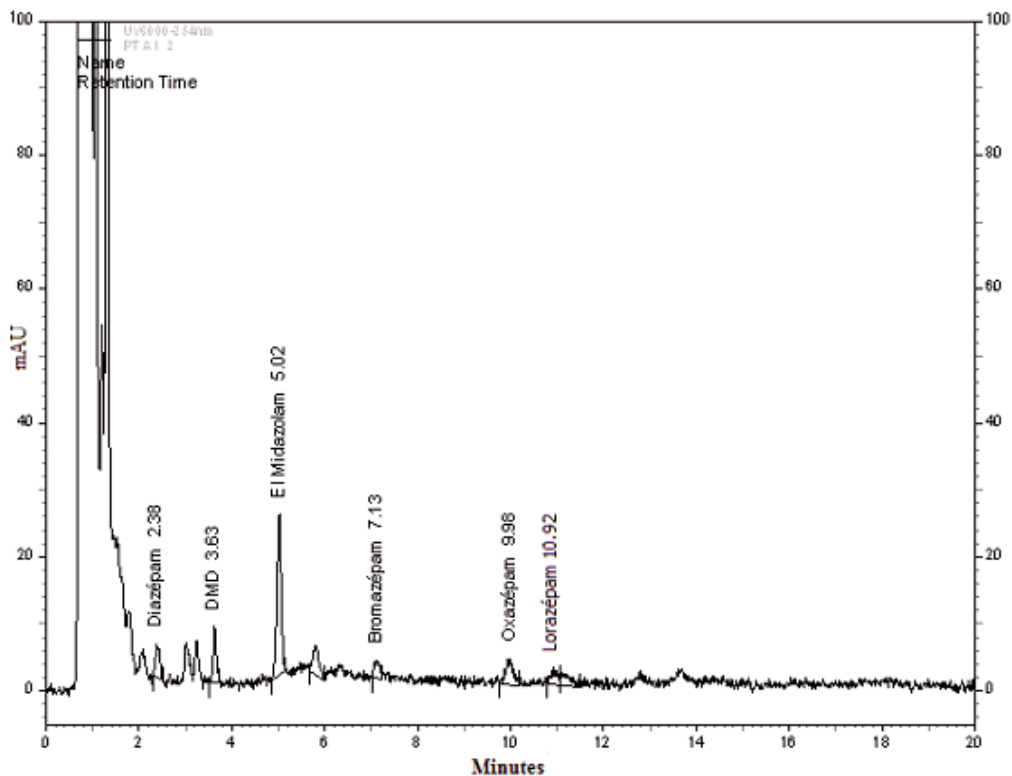


Fig. 5. Chromatogramme obtenu pour la LOQ dans du lait maternel avec diazépam 50 ng/mL, desméthyl diazépam 100 ng/mL, bromazépam 50 ng/mL, oxazépam 100 ng/mL et lorazépam 50 ng/mL. DMD, desméthyl diazépam ; LOQ, limite basse de quantification ; EI, étalon interne.

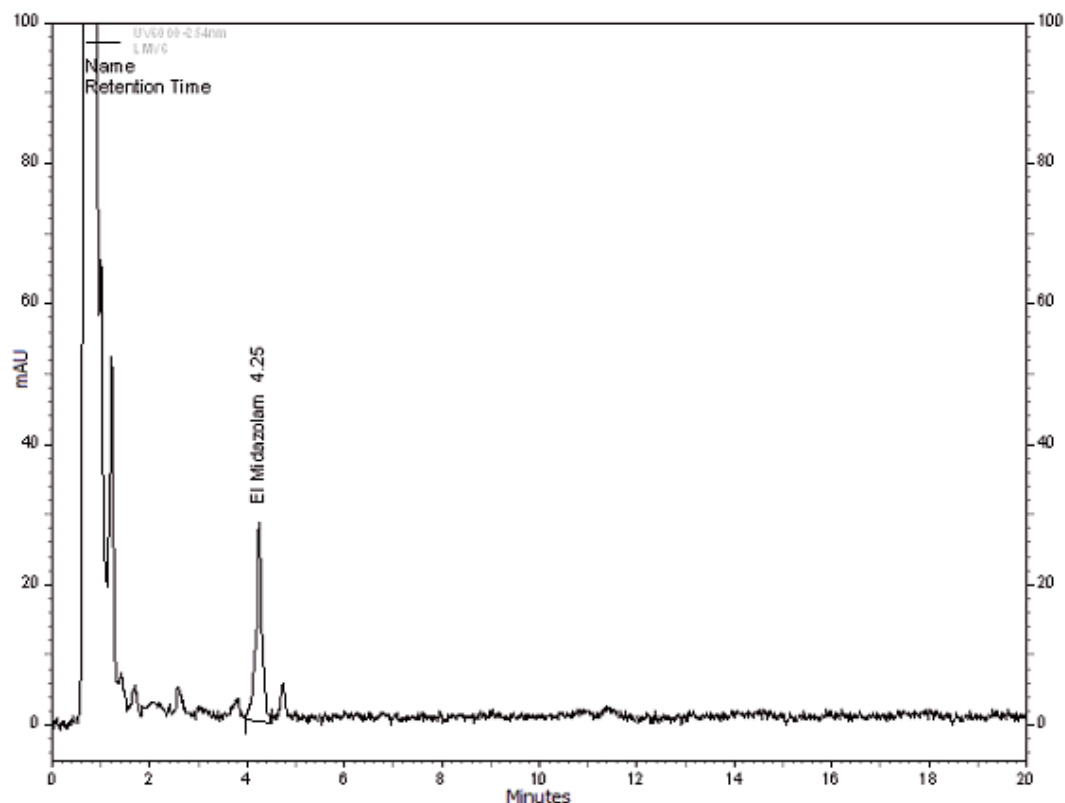


Fig. 6. Chromatogramme obtenu pour le blanc dans du lait maternel avec uniquement l'étalon interne, le midazolam 10 mg/L. EI, étalon interne.

Tableau IV. Paramètres de validation du dosage des benzodiazépines dans le lait de vache.

Molécule	Valeur cible (ng/mL)	Reproductibilité				Répétabilité	
		Précision inter-jour		Justesse inter-jour		Précision intra-jour (CV %, n = 5)	Justesse intra-jour (biais %, n = 5)
		CV (%)	n	biais (%)	n		
diazépam	LOQ 50	14,8	3	-1,7	3	ND	ND
	QCB 300	6,5	15	1,6	15	3,8	-0,8
	QCH 3 000	6,7	15	0,4	15	3,8	6,3
desméthyl diazépam	LOQ 100	3,5	3	12,8	3	ND	ND
	QCB 500	8,1	15	3,6	15	5,3	4,5
	QCH 5 000	6,1	15	-6,1	15	3,1	-0,4
bromazépam	LOQ 50	13,3	3	-9,0	3	ND	ND
	QCB 300	9,1	15	-11,8	15	9,2	-11,7
	QCH 3 000	4,2	15	-6,4	15	2,7	-3,4
oxazépam	LOQ 100	9,2	3	-15,0	3	ND	ND
	QCB 500	13,4	15	-1,5	15	14,6	-2,3
	QCH 5 000	7,3	15	-10,9	15	2,1	-4,5
lorazépam	LOQ 50	11,4	3	-13,2	3	ND	ND
	QCB 300	12,6	15	-3,4	15	9,2	-9,3
	QCH 3 000	6,8	15	-11,9	15	3,0	-11,1

CV : coefficient de variation ; LOQ : limite basse de quantification ; QCB : contrôle qualité bas ; QCH : contrôle qualité haut ; ND : non déterminé ; n : nombre d'échantillons par benzodiazépine et par niveau de concentration.

Tableau V. Paramètres de validation du dosage des benzodiazépines dans le lait lyophilisé pour nourrissons.

Molécule	Valeur cible (ng/mL)	Reproductibilité				Répétabilité		
		Précision inter-jour		Justesse inter-jour		Précision intra-jour (CV %, n = 5)	Justesse intra-jour (biais %, n = 5)	
		CV (%)	n	biais (%)	n			
diazépam	LOQ	50	8,9	3	3,6	3	ND	ND
	QCB	300	12,9	15	4,4	15	8,5	-9,1
	QCH	3 000	8,2	15	7,7	15	8,3	2,8
desméthyl-diazépam	LOQ	100	10,9	3	-4,3	3	ND	ND
	QCB	500	13,2	15	-3,7	15	6,5	3,5
	QCH	5 000	17,3	15	-1,6	15	4,3	8,8
bromazépam	LOQ	50	14,7	3	1,4	3	ND	ND
	QCB	300	5,4	15	6,0	15	4,8	7,9
	QCH	3 000	10,2	15	3,4	15	4,8	-1,4
oxazépam	LOQ	100	13,6	3	-3,4	3	ND	ND
	QCB	500	10,5	15	1,8	15	7,6	-0,6
	QCH	5 000	9,2	15	2,5	15	5,0	3,8
lorazépam	LOQ	50	14,5	3	-1,3	3	ND	ND
	QCB	300	10,3	15	2,0	15	7,1	6,0
	QCH	3 000	9,8	15	2,9	15	6,6	8,6

CV : coefficient de variation ; LOQ : limite basse de quantification ; QCB : contrôle qualité bas ; QCH : contrôle qualité haut ; ND : non déterminé ; n : nombre d'échantillons par benzodiazépine et par niveau de concentration

Tableau VI. Paramètres de validation du dosage des benzodiazépines dans le lait maternel.

Molécule	Valeur cible (ng/mL)	Reproductibilité				Répétabilité		Rendement d'extraction	
		Précision inter-jour		Justesse inter-jour		Précision intra-jour (CV %, n = 5)	Justesse intra-jour (biais %, n = 5)	ρ (%) \pm SD (%) (n = 4)	
		CV (%)	n	biais (%)	n				
diazépam	LOQ	50	4,6	3	1,8	3	ND	ND	
	QCB	300	8,3	15	-4,9	15	1,7	107,8 \pm 20,6	
	QCH	3 000	5,3	15	-9,7	15	5,3	111,7 \pm 15,2	
desméthyl-diazépam	LOQ	100	0,1	3	4,9	3	ND	ND	
	QCB	500	4,7	15	9,1	15	4,3	99,6 \pm 20,0	
	QCH	5 000	4,5	15	3,8	15	3,7	110,8 \pm 16,2	
bromazépam	LOQ	50	5,7	3	10,0	3	ND	ND	
	QCB	300	8,8	15	-7,0	15	8,2	-0,7	112,3 \pm 19,3
	QCH	3 000	7,9	15	-12,8	15	7,2	-6,0	115,4 \pm 15,5
oxazépam	LOQ	100	4,6	3	6,8	3	ND	ND	
	QCB	500	5,2	15	4,3	15	5,3	1,7	109,7 \pm 17,6
	QCH	5 000	7,4	15	8,8	15	5,5	3,7	106,8 \pm 16,9
lorazépam	LOQ	50	10,2	3	-0,3	3	ND	ND	ND
	QCB	300	17,4	13*	-2,2	13*	6,5	-8,8	114,1 \pm 15,1
	QCH	3 000	5,2	15	-13,9	15	3,4	-15,3	116,5 \pm 21,9
midazolam	EI	500						93,7 \pm 18,9	

CV : coefficient de variation ; LOQ : limite basse de quantification ; QCB : contrôle qualité bas ; QCH : contrôle qualité haut ; EI : étalon interne ; ρ : rendement d'extraction ; ND : non déterminé ; SD : *standard deviation* ; n : nombre d'échantillons par benzodiazépine et par niveau de concentration ; * : n = 13, car nous avons retiré deux valeurs analytiquement aberrantes. En tenant compte de celles-ci, nous obtenons un CV de 20,9 % et un biais de -2,2 %.

Les molécules apparentées aux benzodiazépines et les benzodiazépines à demi-vie courte ne semblent pas poser particulièrement de problèmes, ceci justifie notre choix sur les benzodiazépines à demi-vies d'élimination moyenne à longue (diazépam, bromazépam) ou ayant des métabolites actifs (diazépam). Ces benzodiazépines sont en théorie susceptibles d'être excrétées de façon significative dans le lait maternel [79], et donc avoir un impact clinique chez les nourrissons exposés de façon chronique. Dans ce cas, la surveillance de

l'enfant est indispensable. Par ailleurs, notre choix a également porté sur des molécules elles-mêmes métabolites actifs (desméthyl-diazépam, oxazépam et lorazépam) de benzodiazépines pharmacologiquement actives (diazépam et lormétazépam).

La méthode de dosage de ces cinq benzodiazépines (diazépam, desméthyl-diazépam, bromazépam, oxazépam et lorazépam) développée au Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie Clinique (Toulouse, France) est une technique analytique simple, spécifique et rapide, adaptée à un usage en

routine. Elle a été validée avec des essais de répétabilité et de reproductibilité respectant les critères d'acceptabilité prédéfinis, c'est-à-dire, un coefficient de variation et un biais inférieurs à 20 % pour les QC et la LOQ.

Le choix du midazolam comme étalon interne repose sur les précautions d'emploi énoncées dans le Vidal [80]. En effet, il est préférable d'éviter son utilisation au cours des césariennes de par le risque d'effets indésirables chez la mère (risque d'inhalation), le fœtus (irrégularité du rythme cardiaque, hypotonie) ou le nouveau-né (faible succion, hypothermie et détresse respiratoire).

Les techniques de chromatographie gazeuse précédemment publiées [26–28, 30] semblent plus sensibles que notre technique HPLC. Toutefois, elles restent très critiquables dans la mesure où la limite de quantification, la précision et l'exactitude ne sont pas clairement énoncées. Seule la limite de détection est rapportée pour certaines d'entre elles. Par ailleurs, elles ont principalement été utilisées dans la détection d'une seule molécule mère et non d'un pool.

Concernant les techniques HPLC publiées [24, 63], le principe évoqué par les auteurs a été similaire au nôtre : valider une méthode analytique déjà utilisée en routine pour les échantillons plasmatiques. Une des deux techniques publiées [24] présente une LOQ semblable à la nôtre (diazépam 50 ng/mL). Pour la seconde technique [63], elle concerne l'alprazolam, molécule à demi-vie courte et donc théoriquement sans intérêt pour le suivi thérapeutique des nourrissons.

Bien que nous ayons une sensibilité moindre à celle obtenue en chromatographie gazeuse, notre gamme de calibration nous permet de quantifier les concentrations pouvant induire un effet chez le nourrisson. Après une prise de 30 mg/j pendant six jours de diazépam par la mère allaitante, les taux dans le lait avaient atteint 0,08 mg/L pour le diazépam et 0,05 mg/L pour le desméthyldiazépam, entraînant des cas de léthargie, sédation et faible succion chez le bébé [34, 36], avec chez ce dernier, des concentrations plasmatiques de 0,18 et 0,24 mg/L pour le diazépam et le desméthyldiazépam [34, 36], respectivement.

Lors du recueil de lait maternel, le prélèvement peut tout aussi bien être du colostrum comme du lait mature, impliquant une forte variabilité quantitative et qualitative de la composition lipidique. De ce fait, l'utilisation du lait de vache et du lait lyophilisé pour nourrissons avait pour but d'évaluer l'impact de la teneur lipidique sur la technique analytique, en particulier la phase d'extraction des benzodiazépines, molécules fortement lipophiles. D'ailleurs, leur forte lipophilie explique le rendement d'extraction élevé. La qualité des chromatogrammes, la linéarité, la précision, la justesse et le rendement d'extraction ($\sim 100 \% \pm 15 \%$) n'ont pas été influencées par la nature de la matrice utilisée, et ceci pour toutes les benzodiazépines analysées.

Ainsi, cette méthode peut être utilisée chez les mamans allaitant et prenant un traitement benzodiazépinique dans le cadre d'un suivi thérapeutique du nouveau-né. Ceci a pour but d'éviter des complications telles que la léthargie, la perte de poids et la sédation comme cela a été rapporté pour un nouveau-né dont la mère allaitante était sous diazépam à forte dose [21]. Par ailleurs, ce suivi permettrait d'étudier la durée

d'exposition du nourrisson allaité après arrêt du traitement chez la mère.

Il est important de rappeler que ces médicaments agissent sur le système nerveux central et qu'il n'est pas possible de prédire les effets à long terme sur le neuro-développement des nourrissons exposés pendant les premiers mois après la naissance, sachant par ailleurs que leur fonction rénale et hépatique est encore immature. En général, il est essentiel d'informer les mères allaitant de la notion du risque d'exposition du nourrisson par le lait maternel et les mettre à contribution dans la surveillance des effets cliniques possibles pouvant apparaître chez le bébé, sans toutefois les inquiéter, en leur expliquant les effets indésirables déjà connus du traitement qu'elles prennent.

7 Conclusion

La plupart des médicaments sont compatibles avec l'allaitement et ses bénéfices dépassent souvent largement les risques liés au traitement. Même si leur usage est possible ponctuellement ou en traitement de courte durée, les benzodiazépines restent des médicaments à risque, surtout en prise chronique. Notre méthode de dosage des benzodiazépines dans le lait maternel, répond à l'ensemble des critères indispensables pour sa validation analytique. La robustesse et la facilité de mise en œuvre de notre technique nous permet de réaliser ces dosages en routine. Ce qui a pour intérêt de pouvoir évaluer et quantifier rapidement l'exposition du bébé nourri au sein lorsque la mère est sous traitement benzodiazépinique, de réaliser quotidiennement si nécessaire, un suivi thérapeutique du nouveau-né et par la suite fournir une donnée biologique chiffrée facilitant la décision du pédiatre quant à la poursuite ou non de l'allaitement.

Remerciements. Les auteurs remercient Audrey Villagrassa pour avoir gracieusement fourni du lait maternel (2^e mois d'allaitement).

Dalia Khachman remercie le Conseil National de la Recherche Scientifique Libanais pour la bourse doctorale qui lui a été accordée.

Références

- Malone K, Papagni K, Ramini S, Keltner NL. Antidepressants, antipsychotics, benzodiazepines, and the breastfeeding dyad. *Perspect Psychiatr Care*. 2004; 40(2): 73–85.
- Lambré C. Les risques liés aux contaminants chimiques dans le lait maternel. *J Pédiatr Puériculture*. 2002; 15: 11–16.
- Turck D. Allaitement maternel : les bénéfices pour la santé de l'enfant et de sa mère. *Arch Pédiatr*. 2005; 12: S145–S165.
- American Academy of Pediatrics. Breastfeeding and the use of human milk. Work Group on Breastfeeding. *Pediatrics*. 1997; 100: 1035–1039.
- Escobar AMU, Ogawa AR, Hiratsuka M, Kawashita MY, Teruya PY, Grisi S, Tomikawa SO. Aleitamento e condições socioeconômico-culturais: fatores que levam ao desmame precoce. *Rev Bras Saude Mater Infant*. 2002; 2: 253–261.
- Cunningham AS, Jelliffe DB, Jelliffe EF. Breast-feeding and health in the 1980s: a global epidemiologic review. *J Pediatr*. 1991; 118: 659–666.

7. Tanaka PA, Yeung DL, Anderson GH. Infant feeding practices: 1984-1985 versus 1977-1978. *Can Med Assoc J.* 1987; 136: 940-944.
8. Gremmo-Féger G, Dobrzynski M, Collet M. Allaitement maternel et médicaments. *J Gynecol Obstet Biol Reprod.* 2003; 32: 466-475.
9. Jones W, Brown D. The medication vs. breastfeeding dilemma. *Br J Midwifery.* 2003; 11: 550-555.
10. Amir LH. Medicines and breastfeeding: information is available on safe use. *Med J Aust.* 2007; 186(9): 485.
11. Beaufrère B, Bresson JL, Briend A, Ghisolfi J, Goulet O, Navarro J, Putet G, Ricour C, Rieu D, Turck D, Vidailhet M. La promotion de l'allaitement maternel : c'est aussi l'affaire des pédiatres. *Arch Pediatr.* 2000; 7: 1149-1153.
12. Newman J. What drugs can I take while breastfeeding? *Can J Diagnosis.* 1998; 15: 105-120.
13. Howard CR, Lawrence RA. Drugs and breastfeeding. *Clin Perinatol* 1999; 26: 447-478.
14. American Academy of Pediatrics Committee on Drugs. Transfer of drugs and other chemicals into human milk. *Pediatrics.* 2001; 108: 776-789.
15. Lamounier JA, Cabral CM, Oliveira BC, Oliveira AB, Júnior AMO, Silva APA. O uso de medicamentos em puérperas interfere nas recomendações ao aleitamento materno? *J Pediatr (Rio J).* 2002; 78: 57-61.
16. Lacroix I, Arrault-Olanor A, Berrebi A, Montastruc J-L, Damase-Michel C. Consommation de médicaments en période périnatale : étude comparative chez des femmes allaitant ou non leur enfant. *J Pédiatr Puériculture.* 2005; 18: 379-385.
17. Centre national d'information sur le médicament hospitalier. Médicaments et allaitement. Dossier du CNIMH. 1996; XVII(10): 5-6.
18. Matheson I, Kristensen K, Lunde PKM. Drug utilization in breast-feeding women: a survey in Oslo. *Eur J Clin Pharmacol.* 1990; 38: 453-459.
19. Ito S, Blajchman A, Stephenson M, Eliopoulos C, Koren G. Prospective follow-up of adverse reactions in breast-fed infants exposed to maternal medication. *Am J Obstet Gynecol.* 1993; 168: 1393-1399.
20. Wisner KL, Peindl KP, Hanusa BH. Relationship of psychiatric illness to childbearing status: a hospital-based epidemiologic study. *J Affect Disord.* 1993; 28: 39-50.
21. Patrick MJ, Tilstone WJ, Reavey P. Diazepam and breastfeeding. *Lancet.* 1972; 1: 542-543.
22. Erikkola R, Kanto J. Diazepam and breast-feeding. *Lancet.* 1972; 1: 1235-1236.
23. Cole AP, Hailey DM. Diazepam and active metabolite in breast milk and their transfer to the neonate. *Arch Dis Child.* 1975; 50: 741-742.
24. Dusci LJ, Good SM, Hall RW, Ilett KF. Excretion of diazepam and its metabolites in human milk during withdrawal from combination high dose diazepam and oxazepam. *Br J Clin Pharmacol.* 1990; 29: 123-126.
25. Birnbaum CS, Cohen LS, Bailey JW, Grush LR, Robertson BA, Stowe ZN. Serum concentrations of antidepressants and benzodiazepines in nursing infants: a case series. *Pediatrics.* 1999; 104(1): e11.
26. Borgatta L, Jenny RW, Gruss L, Ong C, Barad D. Clinical significance of methohexital, meperidine, and diazepam in breast milk. *J Clin Pharmacol.* 1997; 37(3): 186-192.
27. Hilbert JM, Gural RP, Symchowicz S, Zamaglione N. Excretion of quazepam into human breast milk. *J Clin Pharmacol.* 1984; 24(10): 457-462.
28. Wretling M. Excretion of oxazepam in breast milk. *Eur J Clin Pharmacol.* 1987; 33: 209-211.
29. Matheson I, Lunde PKM, Bredesen JE. Midazolam and nitrazepam in the maternity ward: milk concentrations and clinical effects. *Br J Clin Pharmacol.* 1990; 30: 787-793.
30. Lemmer P, Schneider S, Mühe A, Wennig R. Quantification of lorazepam and lormetazepam in human breast milk using GC-MS in the negative chemical ionization mode. *J Anal Toxicol.* 2007; 31: 224-226.
31. Pons G, Rey E. Passage des médicaments dans le lait. In : Brion F, Cabrol D, Moriette G, Pons G. Les médicaments en périnatalogie. Paris : Masson 2003 : 17-26.
32. Neville MC, Allen JC, Watters C. The mechanisms of milk secretion. In : Neville MC, Neifert MR. New York : Lactation editions 1983 : 50.
33. McManaman JL, Neville MC. Mammary physiology and milk secretion. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003; 55: 629-641.
34. Hale TW. Medications and mothers' milk (10th edition) Amarillo, Tx : Pharmasoft Medical Publishing. 2002 : 266-270.
35. Bavoux F, Warot D. Allaitement et médicament. In : Brion F, Cabrol D, Moriette G, Pons G. Les médicaments en périnatalogie. Paris : Masson 2003 : 347-354.
36. Damase-Michel C, Rolland M, Assouline C, Tricoire J, Lacroix I. Médicaments et allaitement maternel. EMC-Médecine. 2004; 1: 417-432.
37. Lee KG. Lactation and drugs. *J Paediatr Child Health.* 2007; 17(2): 68-71.
38. Fleishaker JC, Desai N, McNamara PJ. Factors affecting the milk-to-plasma drug concentration ratio in lactating women: physical interactions with protein and fat. *J Pharm Sci.* 1987; 76: 189-193.
39. Fleishaker JC, McNamara PJ. In vivo evaluation in the lactating rabbit of a model for xenobiotic distribution into breast milk. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988; 244: 919-924.
40. Fleishaker JC. Models and methods for predicting drug transfer into human milk. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003; 55: 643-652.
41. Rasmussen F. Mammary excretion of sulphonamides. *Acta Pharmacol Toxicol.* 1958; 15: 139-148.
42. Rasmussen F. Mammary excretion of benzylpenicillin, erythromycin, and penethamate hydroiodide. *Acta Pharmacol Toxicol.* 1959; 16: 194-200.
43. Rasmussen F. Excretion of drugs by milk, in concepts in biochemical pharmacology. In : Brodie BB, Gillette JR. Berlin : Springer 1971 : 390-402.
44. Oo CY, Kuhn RJ, Desai N, McNamara PJ. Active transport of cimetidine into human milk. *Clin Pharmacol Ther.* 1995; 58: 548-555.
45. Gerk PM, Kuhn RJ, Desai NS, McNamara PJ. Active transport of nitrofurantoin into human milk. *Pharmacotherapy.* 2001; 21: 669-675.
46. Pons G, Francoual C, Guillet Ph, Moran C, Hermann P, Bianchetti G, Thiercelin JF, Thenot JP, Olive G. Zolpidem excretion in breast milk. *Eur J Clin Pharmacol.* 1989; 37: 245-248.
47. Chaves RG, Lamounier JA. Breastfeeding and maternal medications. *J Pediatr (Rio J).* 2004; 80: S189-S198.
48. Wilson JT, Don Brown R, Cherek PR, Dailey JW, Hilman B, Jobe PC, Manno BR. Drug excretion in human breast milk. Principles, pharmacokinetics and projected consequences. *Clin Pharmacokinet.* 1980; 5: 1-66.
49. Begg EJ, Duffull SB, Hackett LP, Ilett KF. Studying drugs in human milk: Time to unify the approach. *J Hum Lact.* 2002; 18: 323-332.

50. Howard CR, Lawrence RA. Xenobiotics and breastfeeding. *Pediatr Clin North Am.* 2001; 48: 485–504.
51. Cregan MD, Hartmann PE. Computerized breast measurement from conception to weaning: clinical implications. *J Hum Lact.* 1999; 15: 89–96.
52. De Schuiteneer B, Coninck N. *Médicaments et allaitement* (2nd edn). Arnette Blackwell, 1996.
53. Belton EM, Jones RV. Haemolytic anaemia due to nalidixic acid. *Lancet.* 1965; 2: 691.
54. Varsano I, Fischl J, Shochet SB. The excretion of orally ingested nitrofurantoin in human milk. *J Pediatr.* 1973; 82: 886–887.
55. Ito S, Lee A. Drug excretion into breast milk - Overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003; 55: 617–627.
56. Ito S, Koren G. A novel index for expressing exposure of the infant to drugs in breast milk. *Br J Clin Pharmacol.* 1994; 38: 99–102.
57. Ito S. Drug therapy for breast-feeding women. *N Engl J Med.* 2000; 343: 118–126.
58. Wilson JT, Don Brown R, Hinson JL, Dailey JW. Pharmacokinetic pitfalls in the estimation of the breast milk/plasma ratio for drugs. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1985; 25: 667–689.
59. Larsen LA, Ito S, Koren G. Prediction of milk/plasma concentration ratio of drugs. *Ann Pharmacother.* 2003; 37(9): 1299–1306.
60. O'Hara MW, Swain AM. Rates and risk of postpartum depression: a meta-analysis. *Int Rev Psychiatry.* 1996; 8: 37–54.
61. Hagg S, Spigset O. Anticonvulsant use during lactation. *Drug Saf.* 2000; 22: 425–440.
62. Deglin JH, Vallerand AH. *Davis's drug guide for nurses* (8th edn). Philadelphia : Davis, 2003.
63. Oo CY, Kuhn RJ, Desai N, Wright CE, McNamara PJ. Pharmacokinetics in lactating women: Prediction of alprazolam transfer into milk. *Br J Clin Pharmacol.* 1995; 40: 231–236.
64. Suri RA, Altshuler LL, Burt VK, Hendrick VC. Managing psychiatric medications in the breast-feeding woman. *Medscape Womens Health.* 1998; 3(1).
65. Nitsun M, Szokol JW, Saleh HJ, Murphy GS, Vender JS, Luong L, Raikoff K, Avram MJ. Pharmacokinetics of midazolam, propofol, and fentanyl transfer to human breast milk. *Clin Pharmacol Ther.* 2006; 79(6): 549–557.
66. Lebedevs TH, Wojnar-Horton RE, Yapp P, Roberts MJ, Duscil LJ, Hackett LP, Ilett KF. Excretion of temazepam in breast milk. *Br J Clin Pharmacol.* 1992; 33: 204–206.
67. Humpel M, Stoppelli I, Rainer E. Pharmacokinetics and biotransformation of the new benzodiazepine, lormetazepam, in man. *Eur J Clin Pharmacol.* 1982; 21: 421–425.
68. Brandt R. Passage of diazepam and N-desmethyldiazepam into breast milk. *Arzneim Forsch.* 1976; 26: 454–457.
69. Summerfield RJ, Neilsen MS. Excretion of lorazepam into breast milk. *Br J Anaesth.* 1985; 57: 1042–1043.
70. Soderman P, Matheson I. Clonazepam in breast milk. *Eur J Pediatr.* 1988; 147: 212–213.
71. Kanto JH, Aaltonen L, Kangas L, Erkkola R, Pitkanen Y. Placental transfer and breast milk levels of flunitrazepam. *Curr Ther Res.* 1979; 26: 539–545.
72. Reider J, Wendt G. Pharmacokinetics and metabolism of the hypnotic nitrazepam. In : Garratini S, Mussini E, Randall LO. *The benzodiazepines.* New York : Raven Press 1973 : 99–127.
73. McElhatton PR. The effects of benzodiazepine use during pregnancy and lactation. *Reprod Toxicol.* 1994; 8(6): 461–475.
74. Morselli PL, Principi N, Tognoni G, Reali E, Belvedere G, Standen SM, Sereni F. Diazepam elimination in premature and full term infants and children. *J Perinat Med.* 1973; 1(2): 133–141.
75. Rane A. Drug metabolism and disposition in infants and children. In: Yaffe SJ, Aranda JV. *Neonatal and pediatric pharmacology - therapeutic principles in practice* (3rd edn). Philadelphia : Lippincott, Williams & Wilkins 2005 : 32–43.
76. Dencker SJ, Johansson G, Milsom I. Quantification of naturally occurring benzodiazepine-like substances in human breast milk. *Psychopharmacology.* 1992; 107: 69–72.
77. Burt V, Suri R, Altshuler L, Stowe Z, Hendrick VC, Muntean E. The use of psychotropic medications during breast-feeding. *Am J Psychiatry.* 2001; 158: 1001–1009.
78. Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Miller KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi A. Bioanalytical method validation - a revisit with decade of progress. *Pharm Res.* 2000; 17(12): 1551–1557.
79. Atkinson HC, Begg EJ, Darlow BA. Drugs in human milk. Clinical pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet.* 1988; 14: 217–240.
80. VIDAL (<http://srv-vidal/medicaments> ; 6 novembre 2008).