

Université de Montréal

**MÉTABOLISME HÉPATIQUE ET EXTRAHÉPATIQUE
DU DILTIAZEM CHEZ L'HUMAIN ET L'ANIMAL SUIVANT L'ADMINISTRATION
D'UNE DOSE UNIQUE ET DE DOSES RÉPÉTÉES.**

par

Marc LEFEBVRE

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Etudes Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Pharmacologie

Mars 1998

© LEFEBVRE Marc, 1998



W
4
U58
1998
v. 122

Université de Montréal

MÉTABOLISME HÉPATIQUE ET EXTRAHEPATIQUE
DU DILTAZEM CHEZ L'HUMAIN ET L'ANIMAL SUIVANT L'ADMINISTRATION
D'UNE DOSE UNIQUE ET DE DOSES RÉPÉTÉES

MARC LAFORÊTE

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

THÈSE PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ DES SCIENCES SUPPLÉMENTAIRES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DEGRÉ DE
PHARMACIEN DOCTEUR (Ph.D.)
en Pharmacologie

Mars 1998

ÉVALUATION DE LA DOSE

Université de Montréal
Faculté des Etudes Supérieures

Cette thèse intitulée:

**MÉTABOLISME HÉPATIQUE ET EXTRAHÉPATIQUE
DU DILTIAZEM CHEZ L'HUMAIN ET L'ANIMAL SUIVANT L'ADMINISTRATION
D'UNE DOSE UNIQUE ET DE DOSES RÉPÉTÉES.**

présenté par:

Marc Lefebvre

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Marielle Gascon-Barré, Ph.D. : président-rapporteur
Dr. Gilles Caillé, Ph.D. : directeur de recherche
Dr. Patrick du Souich, M.D., Ph.D. : co-directeur de recherche
Dr. Louis Dumont, Ph.D. : membre du jury
Dr. Sylvie Laganière, Ph.D. : examinateur externe

Thèse acceptée le: 29. 10. 1998

SOMMAIRE

Le diltiazem, un bloqueur des canaux calciques de la classe des benzothiazépines, est principalement utilisé dans le traitement de maladies ischémiques telle l'angine de poitrine ainsi que dans le traitement de l'hypertension légère à modérée. En raison de la pharmacocinétique du diltiazem, il est nécessaire d'administrer ce produit trois à quatre fois par jour afin d'obtenir un succès thérapeutique. Afin de pallier à ce problème, s'il en est un, des formulations à libération prolongée ont été développées afin de permettre une administration d'une ou deux fois par jour.

Environ 90% du diltiazem est absorbé suivant l'administration d'une dose orale. Cependant, sa biodisponibilité absolue suivant l'administration d'une dose unique n'est que de 30 à 40%. En fait, le diltiazem est presque entièrement métabolisé par l'organisme et sa biotransformation génère plus d'une vingtaine de métabolites, certains démontrant une activité pharmacologique. D'autre part, il a été démontré que le métabolisme du diltiazem ainsi que de certains de ses métabolites était inhibé ou réduit suivant l'administration de doses uniques croissantes et/ou suivant l'administration de doses répétées.

Il est reconnu que le foie est généralement responsable du métabolisme des médicaments. Toutefois, le métabolisme extra-hépatique semble contribuer de manière significative à l'élimination de certains produits: la présence d'isoenzymes du cytochrome P450, d'enzymes de conjugaison, d'estérase, etc. détectés au niveau de l'intestin, des poumons ainsi qu'au niveau d'autres organes confirment

cette activité enzymatique.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés au métabolisme du diltiazem chez l'humain et de manière plus explicite à son métabolisme hépatique et extrahépatique chez le lapin suivant l'administration d'une dose unique et de doses répétées. De ces travaux, il en ressort qu'*in vivo* chez le lapin, le diltiazem est principalement métabolisé au niveau intestinal et hépatique, et que, *in vitro*, la clairance réduite du diltiazem observée suivant un traitement chronique serait essentiellement reliée à une inhibition de son métabolisme hépatique.

En premier lieu, dans une étude réalisée chez l'humain, nous avons évalué la pharmacodynamie rénale et cardiovasculaire du diltiazem ainsi que sa pharmacocinétique suivant l'administration d'une dose unique et de doses répétées de la formulation à libération prolongée. Aucune relation n'a été établie entre ces paramètres puisque peu ou pas d'activités rénales ou cardiovasculaires n'ont été observées. Du point de vue pharmacocinétique, nous avons observé une accumulation du diltiazem suivant l'administration chronique de la formulation à libération prolongée. Selon les paramètres cinétiques étudiés, cette accumulation serait reliée à une inhibition de son métabolisme.

Par la suite, chez le lapin, nous avons évalué *in vivo*, la contribution de l'intestin, du foie et des poumons dans la biotransformation du diltiazem. L'analyse des échantillons plasmatiques nous a permis de constater que le diltiazem était significativement métabolisé au niveau intestinal et hépatique. La N-déméthylation

du diltiazem était particulièrement importante au niveau pré-systémique alors que sa désacétylation semblait se manifester essentiellement au niveau systémique. La contribution des poumons dans le métabolisme du diltiazem n'était pas significative quoiqu'on y a détecté une faible production de métabolites. Des réactions autres que la N-déméthylation et la désacétylation pourraient être impliquées dans l'élimination du diltiazem.

Finalement, le métabolisme du diltiazem a été comparé *in vivo* et *in vitro* chez le lapin suivant l'administration d'une dose unique et d'une perfusion jusqu'à l'état d'équilibre afin de déterminer les modifications de son métabolisme. Selon nos résultats, il a été établi *in vitro* que l'inhibition de la N-déméthylation du diltiazem au niveau hépatique était principalement responsable de la réduction de la clairance du diltiazem observée *in vivo* suivant un traitement prolongé. De plus, il a été démontré *in vitro* que l'inhibition du métabolisme du diltiazem observé à la suite d'une administration chronique du diltiazem était organe-dépendante.

Si nous nous permettons d'établir un parallèle entre le métabolisme du diltiazem chez l'humain et chez le lapin, nous pourrions conclure que le métabolisme du diltiazem est dépendant de son site d'administration et qu'il se manifeste essentiellement au niveau pré-systémique. La N-déméthylation du diltiazem serait particulièrement importante au niveau intestinal et hépatique alors que sa désacétylation serait plus importante au niveau systémique. De plus, l'accumulation du diltiazem observée suivant une perfusion prolongée serait principalement reliée à l'inhibition de sa N-déméthylation au niveau hépatique.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xiii
REMERCIEMENTS	xv
PREMIÈRE PARTIE. INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1. LE DILTIAZEM	2
1.1 Historique	3
1.2 Bloqueurs des canaux calciques	4
1.2.1 Types de bloqueurs des canaux calciques	5
1.2.2 Site d'action	7
1.3 Propriétés pharmacodynamiques du diltiazem	12
1.3.1 Actions hémodynamiques du diltiazem	13
1.3.2 Activités anti-ischémiques	16
1.3.2.1 Tolérance à l'exercice	17
1.3.2.2 Infarctus du myocarde	18
1.3.3 Cardioprotection	19
1.3.4 Effets anti-athérogènes	21
1.3.5 Hémodynamie rénale	22
1.4 Usage thérapeutique	24
1.4.1 L'angine de poitrine	24
1.4.1.1 L'angine stable	25
1.4.1.2 L'angine variante	26
1.4.1.3 L'angine instable	27
1.4.2 L'hypertension	28
1.4.3 Les arythmies	32
1.4.3.1 Tachycardie supra-ventriculaire	32
1.4.3.2 Fibrillation auriculaire	33
1.4.4 Autres utilisations	34
1.4.4.1 Infarctus du myocarde	34
1.4.4.2 Phénomène de Raynaud	35
1.4.4.3 Désordres de la motilité oesophagienne	36

1.4.4.4	Prophylaxie de la migraine	37
1.5	Effets secondaires	38
1.6	Interactions médicamenteuses	39
1.7	Surdosage	41
1.8	Pharmacocinétique	42
1.8.1	Absorption et biodisponibilité	43
1.8.2	Distribution	43
1.8.3	Métabolisme et excrétion	44
1.8.4	Demi-vie du diltiazem	46
CHAPITRE 2. LE MÉTABOLISME HÉPATIQUE ET EXTRA-HÉPATIQUE		48
2.1	Historique	49
2.2	Élimination pré-systémique	51
2.3	Distribution des systèmes enzymatiques	53
2.3.1	Réactions de phase I	53
2.3.1.1	Cytochrome P450	54
2.3.1.2	Époxyde Hydrolase	55
2.3.1.3	Hydrolyse	56
2.3.2	Réactions de Phase II	56
2.3.2.1	Glutathion S-transférases	56
2.3.2.2	UDP-glucuronosyltransférases	57
2.3.2.3	Sulfotransférases	58
2.3.2.4	Acétyltransférase	58
2.3.2.5	Autres réactions	58
2.3.3	Sélectivité des isoenzymes du cytochrome P450	59
2.4	Métabolisme extra-hépatique	62
2.4.1	Intestin	63
2.4.1.2	Lumière intestinale	63
2.4.1.1	Muqueuse intestinale	64
2.4.2	Poumons	65
2.5	Objectifs de la thèse	67
DEUXIÈME PARTIE. PRÉSENTATION DES MANUSCRITS		69
CHAPITRE 3. PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS OF A SLOW RELEASE FORMULATION OF DILTIAZEM (120 MG) AFTER THE ADMINISTRATION OF A SINGLE AND REPEATED DOSES IN HEALTHY VOLUNTEERS		71
ABSTRACT		73
INTRODUCTION		75
MATERIALS AND METHODS		76
Pharmacokinetics		77
Pharmacodynamics		77

Drug analysis	78
Pharmacokinetic analysis	78
Data and statistical analysis	79
RESULTS	79
Pharmacokinetics	79
Renal effects	81
Diuresis	81
Sodium and Potassium	81
Serum creatinine and creatinine clearance	81
Cardiovascular parameters	82
DISCUSSION	83
Pharmacokinetics	83
Pharmacodynamics	84
Renal effects	85
Cardiovascular effects	89
ACKNOWLEDGEMENT	90
REFERENCES	101
CHAPITRE 4. FIRST-PASS METABOLISM OF DILTIAZEM IN ANESTHETIZED RABBITS: ROLE OF EXTRAHEPATIC ORGANS	108
ABSTRACT	110
INTRODUCTION	111
MATERIALS AND METHODS	112
Animals	112
Experimental Protocol	112
Pharmacokinetics	115
Statistical analysis	116
RESULTS	116
DISCUSSION	118
ACKNOWLEDGMENTS	122
REFERENCES	133
CHAPITRE 5. ORGAN-SPECIFIC PATTERN OF INHIBITION OF DILTIAZEM METABOLISM AT STEADY STATE IN THE RABBIT	135
ABSTRACT	138
INTRODUCTION	139
METHODS	140
Animals	140
Experimental Design	141
In vivo studies.	141
In vitro studies.	142
Assays	143
Analysis of data	145
RESULTS	146

In vivo studies	146
In vitro studies	147
DISCUSSION	149
ACKNOWLEDGEMENTS	154
REFERENCES	166

TROISIÈME PARTIE. DISCUSSION GÉNÉRALE	171
--	------------

CHAPITRE 6. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS	172
---	------------

6.1	Pharmacocinétique et pharmacodynamie d'une formulation à libération contrôlée de diltiazem (120 mg) suivant l'administration d'une dose unique et de doses multiples chez le volontaire sain	173
6.2	Métabolisme pré-systémique du diltiazem chez le lapin anesthésié: rôle des organes extra-hépatiques	178
6.3	Inhibition organe-dépendante du métabolisme systémique du diltiazem chez le lapin suivant un traitement chronique	186
6.4	Tout est bien qui ... recommence bien	191

CHAPITRE 7. BIBLIOGRAPHIE	194
----------------------------------	------------

APPENDICE	243
------------------	------------

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1	Mean (n = 24) pharmacokinetic parameters (\pm SEM) of diltiazem SR calculated from 36-hour plasma concentration vs time profiles	91
Tableau 3.2	Mean (n = 24) effect (\pm SEM) of time and dosage regimen on sodium and potassium renal clearances	92
Tableau 3.3	Mean (n = 24) effect (\pm SEM) of time and dosage regimen on cardiovascular parameters	93
Tableau 3.4	Mean (n = 24) effect of time and dosage regimen on sodium reabsorption	94
Tableau 4.1	Mean (\pm SEM) pharmacokinetic parameters of diltiazem MA and M1 following the intravenous administration of diltiazem to anesthetized and conscious rabbits	123
Tableau 4.2	Mean (\pm SEM) area under diltiazem, MA, and M1 plasma concentrations as a function of time ($AUC_{0-\infty}$) normalized by the dose, following the administration of diltiazem through the thoracic aorta (TA), jugular vein (JV), portal vein (PV) and small intestine (SI) to anesthetized rabbits	124
Tableau 5.1	Pharmacokinetic parameters of diltiazem, MA and M1 estimated in conscious rabbits following the single iv injection of 2 mg/kg or the infusion of 1.4 mg/hr/kg for 15 hours of diltiazem	155
Tableau 5.2	Rate of metabolism (K_{met}) of diltiazem, normalized by the mg of proteins in the 10,000xg supernatant, incubated in the 10,000xg supernatant of 20% homogenates of small intestine, liver and lungs of rabbits who received a single iv injection (2 mg/kg, n = 7) or the infusion (1.4 mg/hr/kg for 15 hours, n = 6) of diltiazem.	156
Tableau 5.3	Rate of metabolism (K_{met}) of MA and M1, normalized by the mg of proteins in the 10,000xg supernatant, incubated in 20% homogenates of small intestine, liver and lungs of rabbits who received a single iv injection (2 mg/kg, n = 7) or the infusion (1.4 mg/hr/kg for 15 h, n = 6) of diltiazem, and area under the plasma concentration-time curve of M2 generated during the incubation of MA and M1	157

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Description de la sous unité α -1 du canal calcique de type L	9
Figure 2.1	Comparaison de la distribution tissulaire des protéines microsomiales et cytosoliques	52
Figure 2.2	Quantité moyenne relative d'isoenzymes du cytochrome P450 déterminée au niveau du foie d'humain	61
Figure 3.1	Mean (n = 24) plasma concentration-time profiles (\pm SEM) of diltiazem SR following the administration of (A) a single dose and (B) the last of repeated doses in healthy volunteers	95
Figure 3.2	Mean (n = 24) effect (\pm SEM) of time and dosage regimen on urine elimination rate	97
Figure 3.3	Mean (n = 24) effect (\pm SEM) of time and dosage regimen on creatinine clearance	99
Figure 4.1	Mean plasma concentrations of diltiazem, MA and M ₁ following a single dose of diltiazem (1 mg/kg) injected into the thoracic aorta of anaesthetized rabbits	125
Figure 4.2	Mean plasma concentrations of diltiazem, MA and M ₁ following a single dose of diltiazem (2 mg/kg) injected into the jugular vein of anaesthetized rabbits	127
Figure 4.3	Mean plasma concentrations of diltiazem, MA and M ₁ following a single dose of diltiazem (4 mg/kg) injected into the portal vein of anaesthetized rabbits	129
Figure 4.4	Mean plasma concentrations of diltiazem, MA and M ₁ following a single dose of diltiazem (5 mg/kg) injected into the small intestine of anaesthetized rabbits	131
Figure 5.1	Mean plasma concentration of diltiazem, N-desmethyl- diltiazem (MA) and deacetyl-diltiazem (M1) following the infusion of diltiazem (1.4 mg/kg/h for 15 hours) to conscious rabbits (n = 6)	158
Figure 5.2	Mean plasma concentrations of diltiazem, N-desmethyl- diltiazem (MA) and deacetyl-diltiazem (M1) following the single iv injection of diltiazem (2 mg/kg) to conscious conscious rabbits (n = 7)	160

Figure 5.3	Mean (\pm SEM) area under the plasma concentration-time of MA following the incubation of 50 μ M of diltiazem in the 10,000xg supernatant of intestinal, hepatic and lung homogenates of rabbits who received a single iv injection of diltiazem (n = 7) (black bars) or an infusion of diltiazem (n = 6) (hatched bars)	162
Figure 5.4	Mean (\pm SEM) area under the plasma concentration-time of M1 following the incubation of 50 μ M of diltiazem in the 10,000xg supernatant of intestinal, hepatic and lung homogenates of rabbits who received a single iv injection of diltiazem (n = 7) (black bars) or an infusion of diltiazem (n = 6) (hatched bars)	164
Figure 6.1	Voies de biotransformation du diltiazem	184

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AT:	Acétyltransférase
AUC:	Area Under plasma concentration-time Curve
AV:	Auriculo-Ventriculaire
B:	Baseline
BCC:	Bloqueur des Canaux Calciques
BP:	Blood Pressure
Cl	Clairance
C _{max} :	Concentration Maximale
COMT:	Catéchol-O-Méthyl Transférase
C _{ss}	Concentration à l'état d'équilibre
CYP:	Cytochrome P450
DAD:	Désacétyl-diltiazem
EH:	Epoxyde Hydrolase
F:	Biodisponibilité
GFR:	Glomerular Filtration Rate
GST:	Glutathion-S-Transférase
HPLC	High Performance Liquid Chromatograph
IECA:	Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine
JV:	Jugular Vein
K _{met} :	Constante de métabolisme
mm Hg:	Millimètre de mercure
MA:	N-desméthyl-diltiazem
M1:	Désacetyl-diltiazem
M2:	N-desméthyl-désacetyl-diltiazem
M4:	Désacetyl-O-desméthyl-diltiazem
MD:	Multiple Dose
NAV:	Noeud Auriculo-Ventriculaire
ND:	not detected
NSA:	Noeud Sinuso-auriculaire
PDGF:	Platelet Derived Growth Factor
PV:	Portal Vein
q.i.d.	4 fois par jour
SD:	Single Dose
SD:	Standard Deviation
SE or SEM:	Standard Error
SI:	Small Intestine
SNA:	Système Nerveux Autonome
SR:	Slow Release
SSC:	Surface sous la courbe
ST:	Sulfotransférase
TA:	Thoracic Aorta
TSV:	Tachycardie Supra-Ventriculaire
TSVP:	Tachycardie Supra-ventriculaire Paroxystique

t _{1/2}	Demi-vie d'élimination
UDPGT:	Uridine Diphosphate Glucuronosyl Transférase
UV:	Ultraviolet
V _d	Volume de Distribution
Z:	Constante de disposition terminale

REMERCIEMENTS

Dr. Gilles Caillé pour votre sens de la vie, votre personnalité et votre présence si importante,

Dr. Patrick du Souich pour votre rigueur et votre esprit scientifique,

Suzanne pour ton aide si précieuse,

Hélène et Lucie pour vos exploits techniques,

Mes parents, pour votre appui sans précédent,

François, Danielle et Kathleen pour votre soutien,

Isabelle pour ton amour,

Emilie et Nicolas... pour la joie que vous m'apportez,

Oncle Pierre pour ton intérêt,

Mes beaux-parents, pour votre compréhension,

Mes oncles, tantes, nièces et famille, pour votre fierté,

Mes amis, pour votre folie.

Merci!

A Pa et Man

A Isabelle

PREMIÈRE PARTIE

INTRODUCTION

CHAPITRE 1

LE DILTIAZEM

1.1 Historique

Le calcium est un élément essentiel dans le fonctionnement de plusieurs processus cellulaires dont la contraction, la sécrétion et la division cellulaire (Godfraind, 1993). Afin d'optimiser son action, divers mécanismes de régulation permettent de maintenir un gradient de concentration nécessaire entre le calcium extracellulaire, estimée à un niveau millimolaire, et le calcium intracellulaire qui peut varier entre 0.1 et 10 micromolaires (Hosey et Lazdunski, 1988). Ces mécanismes contrôlent les entrées et sorties du calcium de la cellule et son entreposage cellulaire.

La faible concentration intracellulaire de calcium est maintenue grâce à certains mécanismes de transport spécifiques au calcium (la pompe à calcium ATP-dépendante et via l'échangeur sodium-calcium) qui le rejettent, d'une part, à l'extérieur de la cellule ou qui, d'autre part, le transporte au niveau du réticulum endoplasmique (Godfraind, 1993). Ces systèmes de transport ont été largement étudiés et il appert qu'ils soient plus importants que ceux impliquant l'entrée de calcium: ils doivent constamment lutter contre le gradient de concentration afin de maintenir une faible concentration intracellulaire de calcium libre (Godfraind, 1993; Hosey et Lazdunski, 1988).

Les voies d'entrée du calcium dans la cellule s'effectuent principalement via les canaux calciques membranaires (Godfraind, 1993). Au cours des dernières années, des progrès considérables ont été réalisés dans ce domaine afin de déterminer les propriétés de ces canaux.

L'implication du calcium au niveau de la patho-physiologie du système cardiovasculaire fut certes une découverte fort importante (Zsoter et Church, 1983). De ce fait, l'avènement d'antagonistes du calcium ou de bloqueurs des canaux calciques (BCCs) a permis d'améliorer l'arsenal thérapeutique pour le traitement de diverses pathologies telles l'angine de poitrine et l'hypertension qui nécessitent généralement un support médicamenteux. Les principales raisons de la grande utilisation des BCCs sont leur grande sélectivité et un meilleur profil d'effets secondaires que ceux des autres catégories d'agents cardiovasculaires (Struyker-Boudier et coll., 1990).

1.2 Bloqueurs des canaux calciques

Le terme antagoniste du calcium fut utilisé pour la première fois afin de caractériser l'activité de la cinnarizine ou d'autres molécules dont l'action inhibitrice de la contraction des muscles lisses vasculaires était surmontable par une augmentation de calcium extracellulaire (Godfraind et Polster, 1968; Godfraind, 1988). Ce terme fut également utilisé pour désigner l'action du vérapamil sur le couplage excitation-contraction du coeur. Depuis, diverses terminologies ont été proposées afin de désigner la même classe de molécules: ainsi en est-il d'anticalciques, de bloqueurs de l'entrée du calcium ou de bloqueurs des canaux calciques (BCCs). Ce dernier terme fut recommandé en raison de la signification précise de leur mécanisme d'action.

Les BCCs ont été particulièrement étudiés en Europe dans les années 60 par

Fleckenstein, mais l'intérêt envers cette classe pharmacologique n'a pris de l'ampleur en Amérique du Nord que dans les années 80 (Chaffman et Brogden, 1985). Du point de vue chimique, les BCCs forment un groupe très hétérogène, mais possèdent tous la propriété d'inhiber la réponse au calcium au niveau des muscles lisses dépolarisés (Godfraind, 1993; Kendall et Luscombe, 1987; Schwartz, 1994). En raison du grand nombre de BCCs commercialisés à ce jour, il est permis d'identifier les agents pharmacologiques de la première génération (vérapamil, nifédipine, diltiazem et cinnarizine) et ceux de la deuxième génération (amlodipine, félodipine, isradipine, nisoldipine, lacidipine, etc...). Il est à noter que ce dernier groupe est principalement composé de médicaments apparentés à la nifédipine.

1.2.1 Types de bloqueurs des canaux calciques

Tel que mentionné précédemment, on retrouve plusieurs catégories de BCCs. Ces catégories sont principalement identifiées par la structure moléculaire du produit, ce qui surprend, vu leur activité pharmacologique semblable (Struyker-Boudier et coll., 1990). Toutes ces catégories de médicaments peuvent être divisées en deux groupes majeurs soit les agents non-sélectifs et les agents sélectifs (Fleckenstein, 1977; Godfraind, 1988; Godfraind, 1993; Vanhoutte et Paoletti, 1987; Kendall et Luscombe, 1987).

Parmi les agents non-sélectifs, on retrouve deux classes principales, soit celle démontrant une sélectivité pour les canaux calciques et sodiques tels le bépridil et la lidoflazine, soit celle pouvant interagir avec les canaux calciques mais dont

l'activité principale est tout autre, tels les anesthésiques locaux, les benzodiazépines, les catécholamines, les opiacés, etc. (Godfraind, 1988; Godfraind, 1993). Le mibéfradil qui peut être considéré comme un agent non-sélectif bloque les canaux calciques de type T et L, et possiblement les autres types de canaux calciques (Hermsmeyer; 1998).

Les agents sélectifs interagissent principalement avec les canaux calciques de type L situés au niveau des membranes plasmiques des muscles lisses et myocardiques. Ce groupe peut être divisé en trois catégories importantes: les phénylalkylamines dont la substance principale est le vérapamil, les dihydropyridines représentées par la nifédipine, et les benzothiazépines dont le principal représentant est le diltiazem (Struyker-Boudier et coll., 1990; Waters, 1989). Ce dernier, le plus jeune des trois prototypes précédents, est un des produits les plus utilisés en Amérique du Nord. Cependant, malgré son efficacité, peu de congénères du diltiazem ont été développés à ce jour.

Une quatrième catégorie peut être ajoutée à ce groupe, soit celle des diphénylpipérazines représentées par la cinnarizine et la flunarizine. Toutefois, contrairement aux agents des trois premières catégories, ces derniers semblent n'avoir aucune affinité pour le myocarde ce qui explique leur utilisation thérapeutique pour les problèmes vasculaires périphériques telles les migraines (Vanhoutte et Paoletti, 1987).

1.2.2 Site d'action

Il est bien établi à l'heure actuelle que les BCCs agissent sur des structures spécifiques des membranes plasmiques: les canaux calciques voltage-dépendant (Godfraind, 1993). Ces canaux calciques ont été caractérisés par la combinaison de méthodes électrophysiologiques et biochimiques.

Les méthodes électrophysiologiques avec lesquelles on a pu mesurer les flux de calcium à l'aide de la technique du voltage imposé sur fragment de membrane ("patch clamp"), ont permis de distinguer plusieurs types de canaux calciques qui diffèrent par leurs caractéristiques d'ouverture, de fermeture et d'inactivation. Dans le système cardio-vasculaire, les principaux canaux calciques identifiés sont les canaux dits de type L et T (Schwartz, 1994; Struyker-Boudier et coll., 1990; Tsien et coll., 1991). Les canaux de type N sont essentiellement situés au niveau neuronal de même que ceux de type P, Q et R qui ont également été détectés au niveau du système nerveux central (Dunlap et coll., 1995; Hosey et Lazdunski, 1988; Miller; 1992; Schwartz, 1994; Struyker-Boudier et coll., 1990; Tsien et coll., 1991; Wheeler et coll., 1994).

Les canaux de type L qui sont les plus connus sont localisés dans les tissus excitables et dans certaines cellules non-excitables. Ils constituent la voie principale d'entrée du calcium extracellulaire ou de l'activation du mécanisme de libération du calcium intracellulaire responsable de la contraction des muscles lisses et de la contraction du muscle cardiaque (Godfraind, 1993). Les canaux de type L sont

bloqués par les BCCs appartenant aux différentes structures chimiques mentionnées auparavant (Schwartz, 1994). Ces agents n'agissent pas en bloquant physiquement les canaux ouverts, mais en réduisant leur probabilité d'ouverture lors d'une dépolarisation.

Les canaux de types T se retrouvent aussi au niveau des tissus cardiaques et vasculaires et présentent une cinétique d'inactivation plus rapide que celle des canaux de type L. Le mibéfradil est principalement un bloqueur des canaux de type T qui, au même titre que les canaux de type L, sont également plus sensibles à la flunarizine qu'aux autres BCCs. Les canaux de type P détectés au niveau de plusieurs neurones (dont celles de "Purkinje") sont inhibés par l'omega-agatoxine (Spedding et Paoletti, 1992). Les canaux de type N localisés dans les terminaisons nerveuses sont impliqués dans la neurotransmission et sont sensibles au blocage par l'omégaconotoxine. (Catterall et Striessnig, 1992; Schwartz, 1994; Spedding et Paoletti, 1992; Struyker-Boudier et coll., 1990). On a également identifié des canaux de type Q qui, comme ceux de type N, sont impliqués dans la neurotransmission. Finalement, les canaux de type R également détectés au niveau du système nerveux central sont résistants à tous les antagonistes calciques présentement connus (Dunlap et coll., 1995; Miller; 1992; Wheeler et coll., 1994). Nous n'avons que peu d'information sur les canaux calciques de type Q et R.

Les canaux calciques de type L sont constitués de cinq sous-unités désignées $\alpha 1$, $\alpha 2/\beta$, γ et δ . La sous-unité $\alpha 1$ de ces canaux est le récepteur pharmacologique des BCCs (Schwartz, 1994). Constituée d'une seule chaîne peptidique, elle présente

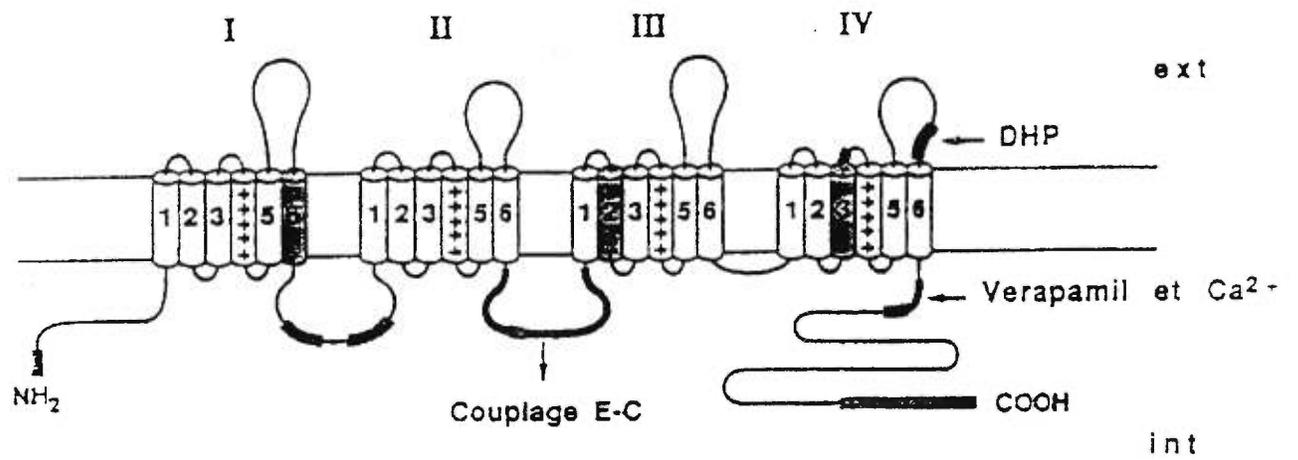


Figure 1.1: Description de la sous unité α -1 du canal calcique de type L (Godfraind, 1993)

quatre motifs identiques contenant chacun six segments transmembranaires numérotés de S1 à S6 (Figure 1.1) (Schwartz, 1994; Slish et coll., 1992). Les segments S4 contiennent des charges positives et on suppose qu'ils constituent la partie sensible au potentiel membranaire (Godfraind, 1993). Le site de liaison des BCCs est situé au niveau de la boucle des segments S5 et S6 du quatrième motif (Catterall et Striessnig, 1992; Schwartz, 1994). Chaque catégorie de BCCs aurait un site de liaison spécifique sur cette boucle, confirmant du même coup l'hypothèse selon laquelle les BCCs se lient sur les canaux calciques en des sites différents, mais ils interagissent allostériquement les uns envers les autres (Glossmann et coll., 1985). Les canaux calciques localisés au niveau des triades des muscles squelettiques présentent des différences de structure par rapport à ceux du muscle cardiaque et des muscles lisses. Toutefois, aucune application pharmacologique n'a pu en être tirée jusqu'à présent (McKenna et coll., 1990).

1.2.3 Mécanisme d'action

Les premières études réalisées avec les BCCs impliquaient principalement le vérapamil. On a démontré que les BCCs possédaient des propriétés vasodilatatrices et que leur effet cardio-dépresseur les distinguait des autres agents vasodilatateurs (Henry, 1980). Au début, les BCCs furent classifiés "agents anti-adrénergiques" en raison de leurs effets inotrope et chronotrope négatifs (Henry, 1980). Toutefois, Fleckenstein et coll. (1977) furent les premiers à reconnaître que leur activité différait de celle des antagonistes β -adrénergiques: l'action des BCCs était plutôt expliquée par leur capacité à inhiber l'influx des ions calciques dans les cellules

myocardiques.

Les BCCs, comme en témoigne leur nom, agissent principalement en diminuant ou en supprimant l'influx de calcium extracellulaire des cellules cardiaques et des muscles lisses, inhibant du même coup la cascade d'événements associée à la contraction de ces muscles.

Contrairement aux muscles striés, les muscles lisses et myocardiques sont beaucoup plus sensibles aux variations extracellulaires des concentrations de calcium. Par conséquent, le degré d'activation de contraction musculaire de ces tissus est dépendant de la disponibilité du calcium extracellulaire pour activer la contraction de ces différentes cellules (Chaffman et Brogden, 1985).

Au niveau du muscle lisse, une baisse de calcium intracellulaire entraîne une diminution de la formation du complexe calcium-calmoduline responsable de la contraction en interaction avec l'activation de la kinase des chaînes légères de la myosine (Kendall et Luscombe, 1987). Parmi les facteurs (structure des composés, récepteurs, population de canaux de type L, etc.) expliquant les différentes propriétés d'activation entre les muscles lisses et myocardiques, il semble que l'influx transmembranaire de calcium provenant du milieu extracellulaire serait plus important pour l'activité du muscle vasculaire lisse que pour celle du muscle cardiaque (Fleckenstein et coll., 1976; Zelis, 1981).

Selon les caractéristiques du potentiel d'action, le tissu cardiaque normal peut être

divisé en deux catégories: les tissus à canaux rapides (faisceau de His, fibres de Purkinje, muscles auriculaires et ventriculaires) dont la dépolarisation est tributaire du flux sodique transmembranaire et caractérisée par une montée rapide et un plateau du potentiel d'action; et les tissus à canaux lents (noeud sinusal et noeud auriculo-ventriculaire) dont le calcium est le principal activateur (Mitchell et coll., 1982; Singh et coll., 1983). Bien que le canal calcique soit activé à la suite de l'influx sodique rapide qui dépolarise la membrane jusqu'à -35 à -45 mV, sa cinétique d'activation est assez lente (Singh et coll., 1984). Le courant calcique lent contribue au maintien de la dépolarisation dans les fibres à réponse rapide et est responsable du couplage excitation-contraction (Zipes et coll., 1975).

Au niveau des fibres musculaires cardiaques, l'interférence avec l'influx calcique transmembranaire entraîne une baisse de la concentration intracellulaire de calcium, inhibant ainsi le couplage excitation-contraction (Fleckenstein et coll., 1976). Plus spécifiquement, la troponine I est libérée à mesure que le calcium décroît dans la cellule et se lie avec la tropomyosine; par conséquent, ce complexe entraîne une diminution de la contractilité via l'inhibition de l'interaction actine-myosine (Kendall et Luscombe, 1987).

1.3 Propriétés pharmacodynamiques du diltiazem

Le diltiazem, un BCC de type benzothiazépine, est utilisé dans le traitement de plusieurs pathologies cardiovasculaires telles que l'angine de poitrine et l'hypertension légère à modérée (Chaffman et Brogden, 1985). Son efficacité a

aussi été démontrée dans le traitement de la tachycardie supraventriculaire et dans le contrôle de la réponse ventriculaire due à une fibrillation ou à un "flutter" auriculaire. Le profil pharmacologique du diltiazem ressemble en partie à celui des autres BCCs puisqu'il exerce une activité vasodilatatrice périphérique semblable à celle de la nifédipine et possède des propriétés myocardiques semblables à celles du vérapamil (Reicher-Reiss, 1988).

Le diltiazem agit principalement en interférant avec les événements calcium-dépendants impliqués dans le couplage excitation-contraction des muscles lisses vasculaires et de ceux du myocarde. Il exercerait également d'autres effets liés au maintien de l'homéostasie du calcium intracellulaire (Struyker-Boudier et coll., 1990).

1.3.1 Actions hémodynamiques du diltiazem

Les actions hémodynamiques du diltiazem, chez l'animal et chez l'homme, sont la conséquence d'un phénomène complexe comportant des actions indirectes sur le système nerveux autonome (SNA) ainsi que des actions directes sur le myocarde, la circulation périphérique et la circulation coronarienne (Block et Winkle, 1983; Singh et coll., 1984; Stone et coll., 1980).

Un des effets indirects observés avec le diltiazem est l'augmentation réflexe du tonus sympathique médiée par le barorécepteur en réponse à une vasodilatation systémique (Low et coll., 1982). Cette augmentation du tonus consiste en un effet

inotrope et chronotrope positif de l'organisme afin de contrer la baisse de pressions artérielle induite par les vasodilatateurs (Henderson, 1983). Les différences observées entre les BCCs portent évidemment sur la dose, mais aussi sur la réponse tachycardique (Godfraind, 1993). En effet, contrairement à la nifédipine, la tachycardie réflexe reliée à l'administration du diltiazem est atténuée par son action chronotrope négative. Ainsi, lors d'un traitement chronique au diltiazem, l'effet anti-hypertenseur est généralement observé sans changement de la fréquence cardiaque ce qui a été attribué à une adaptation des barorécepteurs (Guidicelli et coll., 1984; Millard et coll., 1982a; Taylor et Kowalski, 1984).

Le diltiazem entraîne généralement une diminution de la pression artérielle qui est proportionnelle à la dose administrée et qui s'avère beaucoup plus importante chez l'animal et l'homme hypertendus que normotendus (Struyker-Boudier et coll., 1990). En fait, *in vivo*, le diltiazem diminue la résistance périphérique, augmente le volume d'éjection systolique et tend à augmenter le débit cardiaque sans modifier les pressions de remplissage; il peut également diminuer la contractilité myocardique (Taira, 1987; Thuillez, 1993). Il convient également de noter qu'aucune modification hémodynamique significative n'a été observée au niveau du réseau veineux (Godfraind, 1993). De plus, le diltiazem serait un vasodilatateur artériel montrant des différences substantielles d'activité sur les circulations régionales avec une action préférentielle sur la circulation coronarienne (Serruys et coll., 1985).

Suivant son administration intraveineuse (0.3 mg/kg), le diltiazem entraîne une baisse significative des pressions systoliques et diastoliques de 10 à 13% (Dash et

coll., 1985; Joyal et coll., 1986) et de la pression aortique moyenne (Foult et coll., 1986); la résistance vasculaire systémique est diminuée d'environ 20%. Quoiqu'une tachycardie réflexe ait été rapportée, elle est généralement supprimée par l'effet dépresseur du diltiazem au niveau du noeud sinuso-auriculaire (NSA), et de là son effet chronotrope négatif (7 à 9%) (Dash et coll., 1985; Foult et coll., 1986). Le double produit (fréquence cardiaque x pression systolique) est généralement diminué permettant ainsi une réduction de la demande en oxygène du myocarde (Joyal et coll., 1986; Legrand et coll., 1984).

Les effets hémodynamiques du diltiazem observés à la suite de son administration orale sont toutefois moins consistants que ceux obtenus après son administration intraveineuse. Le processus d'absorption, l'effet de premier passage et les plus faibles concentrations plasmatiques sont autant de facteurs pouvant expliquer ces différences. Dans la plupart des cas, la pression sanguine et la résistance vasculaire sont diminuées, alors que le volume d'éjection systolique n'est augmenté qu'à la suite d'une forte dose de diltiazem (210 mg) (Magometschnigg et coll., 1981).

Finalement, le diltiazem réduit significativement la pression artérielle systolique et la fréquence cardiaque au repos et à l'exercice sous-maximal produisant ainsi une baisse significative du double produit. A un niveau d'exercice maximal, ces paramètres sont toutefois comparables à ceux rencontrés avec un placebo (Buckley et coll., 1990).

1.3.2 Activités anti-ischémiques

Les propriétés antispastiques et vasodilatatrices du diltiazem assurent une augmentation de l'apport en oxygène au myocarde dans l'angine variante et l'angine d'effort (Thuillez, 1993). L'augmentation du débit sanguin coronarien se répartit de façon homogène au niveau des couches sous-épicaudiques et sous-endocardiques. Elle est également dose-dépendante jusqu'à un seuil au-delà duquel la baisse de pression de perfusion empêche toute augmentation supplémentaire du débit ou risque de provoquer un phénomène de vol coronaire aux dépens du myocarde ischémique (Wartier et coll., 1981). Au plan hémodynamique, le diltiazem diminue le travail cardiaque via une baisse de la charge d'aval ce qui permet de réduire la consommation en oxygène pour le myocarde. En raison de l'absence de tachycardie réflexe, cette réduction de la consommation en oxygène est plus prononcée avec le diltiazem qu'avec la nifédipine (Thuillez et coll., 1983).

Tel que démontré avec la nifédipine et le vérapamil, le diltiazem produit une dilatation plus puissante des artères coronaires que celle induite par la papavérine ou la nitroglycérine (Fleckenstein, 1977). Suivant l'administration intraveineuse de diltiazem (bolus de 20 mg ou 0.25 mg/kg suivi d'une infusion de 3 ug/kg/min) à des patients atteints de problèmes coronariens, le diamètre des artères coronaires fut augmenté au repos (Bonzel et coll., 1984) et à l'effort (Hossack et coll., 1984b). Une augmentation du débit sanguin du sinus coronaire ainsi qu'une diminution de l'extraction myocardique de l'oxygène ont été observées suite à l'administration intracoronarienne de 0.15 mg/kg de diltiazem, reflétant ainsi une diminution des

besoins en oxygène et d'énergie du muscle cardiaque (Bertrand et coll., 1982). Toutefois, certains auteurs indiquent que ni le flot sanguin du sinus coronarien, ni la résistance vasculaire coronarienne ne sont affectés par l'administration intraveineuse de diltiazem (Bourassa et coll., 1980; Pepine et Hill, 1987; De Servi et coll., 1986).

De manière générale, il est établi que le diltiazem inhibe la contraction des muscles lisses coronariens lorsqu'ils sont exposés à des stimuli externes (Chaffman et Brogden, 1985). En effet, il est reconnu que la constriction des artères coronaires induites par la libération de catécholamines durant un exercice peut contribuer au développement d'angine chez les patients présentant une sténose coronarienne. Or, le diltiazem permet de réduire la contraction des muscles lisses induite par les agonistes adrénergiques α_1 *in vitro* (Toda, 1986). Les changements hémodynamiques au repos et à l'exercice révèlent que le diltiazem prévient le rétrécissement des artères affectées par une sténose vasculaire (Hossack et coll., 1984a; Nonogi et coll., 1988). De plus, en présence de sténose sévère (50 à 90%), le diltiazem réduit significativement la résistance vasculaire dans la zone affectée (Hossack et coll., 1984a).

1.3.2.1 Tolérance à l'exercice

Chez le patient angineux, la tolérance à l'exercice est augmentée dans presque toutes les études impliquant le diltiazem, et ce suivant l'administration d'une dose unique (Wagner et coll., 1982) et de doses répétées (120 à 360 mg/jour pendant

deux à quatre semaines) (Subramanian, 1984; Hossack et Bruce, 1981). De plus, lors de tests à l'effort sur tapis roulant, il a été démontré que le diltiazem prolongeait de façon significative la durée totale de l'effort et retardait l'apparition d'angine ainsi que la baisse de 1 mm du segment ST (Hossack et coll., 1982b). Il a également été établi que le diltiazem est sûr et efficace à plus long terme (8 à 16 mois) (Hossack et Bruce 1981; Pool et Seagren, 1982).

1.3.2.2 Infarctus du myocarde

Dans une étude randomisée à double-insu avec placebo effectuée chez des patients avec infarctus aigu du myocarde (Ogawa et coll., 1987; Renard et coll., 1987), le diltiazem (infusion de 30 à 52 mg pendant 24 heures) a provoqué une baisse significative de la fréquence cardiaque, de la résistance vasculaire systémique, des pressions artérielles diastoliques et systoliques et du double-produit. De plus, dans la période aiguë suivant l'infarctus, l'administration orale du diltiazem a préservé la fonction ventriculaire globale et régionale (Young et coll., 1987).

Durant la période de 12 à 20 jours suivant l'infarctus, le diltiazem a été administré par voie intraveineuse (bolus de 0.2 mg/kg suivi d'une infusion de 0.005 mg/kg/min) à 14 patients ayant subi un infarctus du myocarde de nature transmurale (Ghio et coll., 1988). Comparativement au groupe contrôle, le diltiazem a réduit la pression systolique ventriculaire gauche et la tension de la paroi de 13 et 26%, respectivement.

Bien qu'une activité inotrope négative potentielle pose quelques problèmes théoriques pour la sécurité des patients avec fonction cardiaque compromise, le diltiazem peut exercer des effets bénéfiques sur la circulation coronarienne et sur la demande en oxygène chez les patients souffrant d'un infarctus du myocarde.

1.3.3 Cardioprotection

Le diltiazem peut prévenir, de manière bénéfique, les dommages ischémiques irréversibles observés après une occlusion coronarienne. Cependant, le diltiazem doit être administré avant la période ischémique ce qui permet de limiter l'accumulation intracellulaire de calcium (Struyker-Boudier et coll., 1990).

Parmi les raisons pouvant expliquer la cardioprotection exercée par le diltiazem, on remarque 1) une diminution du flux calcique transmembranaire et du dommage causé aux mitochondries dans le muscle cardiaque; 2) une diminution des concentrations d'acide lactique et d'acides gras libres dans les tissus cardiaques; 3) une diminution de l'agrégation plaquettaire; 4) une augmentation du flot sanguin régional et collatéral dans le myocarde ischémique; et 5) une diminution de l'incidence d'arythmies associée à une occlusion coronarienne et à l'ischémie myocardique (Clozel et coll., 1983; Nagao et coll., 1980; Weishaar et coll., 1979).

Bolli et coll. (1989) suggèrent également qu'un excès de calcium cytosolique serait associé à la production de radicaux oxygénés dans les tissus ischémiques. Il a été démontré que l'administration de diltiazem chez le rat avec une ischémie

myocardique protégeait les mitochondries ainsi que les dommages cellulaires (Ashraf et Rahamathulla, 1984). On suggère également que la diminution de consommation en oxygène observée avec le diltiazem permet d'améliorer la tolérance du myocarde ischémique (Klein et coll., 1984; Wallis et coll., 1986).

Un des effets observés suivant un épisode ischémique est une détérioration des mécanismes de vasodilatation subséquent à des ischémies récurrentes ou à des lésions obstructives (Bolli et coll., 1989). Il a été démontré que le diltiazem prévenait cette détérioration en augmentant le débit sanguin régional et celui des collatérales durant l'occlusion coronaire et/ou durant la reperfusion et en augmentant le débit sanguin sous-épiqueur dans le myocarde ischémique (Chaffman et Brogden, 1985). Toutefois, lors d'études plus récentes, il n'a pu être établi jusqu'à quel point le diltiazem pouvait entraîner des effets bénéfiques sur le débit coronarien et si les changements de la reperfusion étaient en partie responsables de la préservation des tissus sévèrement affectés.

Finalement, d'un point de vue expérimental, l'administration de diltiazem a permis de supprimer certains types d'arythmies (fibrillation ou tachycardie ventriculaire) associées à l'ischémie. Cette activité serait liée à une diminution de l'efflux potassique et de la dépolarisation qui sont impliqués dans la phase aiguë de ces arythmies (Blake et Clusin, 1986). Cependant, le diltiazem n'aurait aucune influence sur les arythmies ventriculaires associées à la nécrose myocardique (Thale et coll., 1986).

1.3.4 Effets anti-athérogènes

L'activation des plaquettes est impliquée dans le développement de l'athérosclérose et de la précipitation d'ischémie du myocarde via une occlusion et/ou un spasme d'une artère coronarienne. En inhibant le flux transmembranaire calcique requis pour l'agrégation plaquettaire, le diltiazem exercerait un effet cardioprotecteur indirect (Struyker-Boudier et coll., 1990).

Les effets bénéfiques potentiels observés *in vitro* consistent en une protection des cellules endothéliales altérées par une surcharge en calcium, une réduction de l'accumulation des LDL dans le tissu sous-endothélial, une diminution de la migration et de la prolifération des cellules musculaires lisses, une diminution de couplage stimulus-sécrétion conduisant à l'accumulation des protéines extracellulaires et en une diminution de l'activation plaquettaire aboutissant à l'agrégation plaquettaire et à la libération du PDGF (platelet derived growth factor), facteur de croissance d'origine plaquettaire (Kramsch et Aspen, 1986; Lechat et Hadjiisky, 1993; Thuillez, 1993; Weinstein, 1988). Il a également été rapporté que le diltiazem inhiberait la production de thromboxane A₂ (Ring et coll., 1987) et la libération de sérotonine contenu dans les plaquettes (Addonizio et coll., 1986), stimulerait la synthèse de prostacycline (Cremer et coll., 1984; Mehta et coll., 1986), et réduirait le contenu en cholestérol de la paroi aortique (Lechat et Hadjiisky, 1993).

L'agrégation plaquettaire induite par certains agonistes est inhibée par des

concentrations supratherapeutiques de diltiazem (Mehta et coll., 1986), mais cet effet serait minimal aux doses thérapeutiques usuelles (Cremer et coll., 1984). L'effet du diltiazem sur la rhéologie n'a pas été bien étudiée, mais on suggère que la viscosité sanguine serait diminuée suite à une exposition au diltiazem (Coppola et coll., 1986; Ernst et Matrai, 1988).

L'administration de doses orales de diltiazem chez l'humain ne semble pas altérer le temps de saignement ni affecter les paramètres de coagulation tels que le temps de prothrombine, le temps de thromboplastine partiel activé, la concentration plasmatique de fibrinogène et l'activité de l'anti-thrombine III (Yamauchi, 1986); la formation de thromboxane ne serait également pas affectée (Andren, 1988). Cependant, il a été démontré que le diltiazem potentialise l'effet anti-plaquettaire de l'acide acétyl-salicylique (AAS) (Altman et coll., 1988).

1.3.5 Hémodynamie rénale

Les effets du diltiazem sur la fonction rénale ont été mis en évidence lors d'études réalisées chez l'animal. On remarque principalement une hausse de la vitesse d'excrétion du sodium et du volume urinaire qui serait reliée à l'action du diltiazem sur le débit sanguin rénal et à l'inhibition de la réabsorption du sodium au niveau des tubules rénaux proximaux (Tsuchiya et coll., 1975; Yamaguchi et coll., 1974).

Cette hausse de l'excrétion sodique qui est généralement accompagnée par une hausse du débit urinaire se manifeste principalement sur une courte période de

temps (Kinoshita et coll., 1978). En effet, suivant un traitement à long terme avec le diltiazem chez le patient hypertendu (jusqu'à 24 semaines), aucun effet sur les concentrations sériques des électrolytes, le débit urinaire et la rétention d'eau n'a été observé (Inouye et coll., 1984; Trimarco et coll., 1984) et ce malgré une réduction significative de la pression artérielle de 11 à 15% (Sunderrajan et coll., 1986).

Malgré la hausse du débit rénal observée suite à l'administration du diltiazem chez les patients souffrant d'hypertension rénovasculaire (Garnic et coll., 1983; Takeda et coll., 1974), des études effectuées plus récemment chez l'homme laissent croire que cet effet se manifesterait seulement chez les individus spontanément hypertendus. Parmi les effets observés, on remarque une augmentation de l'excrétion de sodium et d'eau ainsi qu'une vasodilatation des artéioles afférentes et efférentes empêchant ainsi l'hyperfiltration glomérulaire (Isshiki et coll., 1987; Isshiki et coll., 1988). De plus, Sunderrajan et coll. (1986) ont démontré que seuls les patients hypertendus avec fonction rénale réduite maintenaient une augmentation du débit plasmatique rénal et de la filtration glomérulaire à la suite d'un traitement à long terme avec le diltiazem. En effet, chez les patients présentant une filtration glomérulaire inférieure à $80 \text{ ml/min/1.73 m}^2$, on a remarqué que le diltiazem améliorait, à court et à long terme, la filtration glomérulaire (62%) et le débit plasmatique rénal effectif (34%). La fraction filtrée est demeurée inchangée ce qui laisse croire que la hausse de la filtration glomérulaire serait liée à l'atténuation des effets vasoconstricteurs de l'angiotensine II et/ou de la norépinéphrine sur la circulation afférente et efférente. Finalement, aucun

changement de l'excrétion sodique ou urinaire n'a été observé (Sunderrajan et coll., 1987).

1.4 Usage thérapeutique

Le diltiazem ainsi que les autres BCCs représentent sans aucun doute une découverte importante dans le domaine de la pharmacologie cardiovasculaire. Une meilleure connaissance de leurs propriétés pharmacologiques a permis de déterminer leurs indications ainsi que les limites de leur utilisation. Les indications reconnues du diltiazem sont le traitement de l'angine de poitrine, de l'hypertension légère à modérée et la tachycardie supraventriculaire.

1.4.1 L'angine de poitrine

L'angine est un syndrome caractérisé par une douleur thoracique causée par une ischémie myocardique transitoire. Cet état survient lorsque les besoins métaboliques du cœur en oxygène excèdent la capacité d'apport des artères coronaires atteintes. Or, en bloquant le courant calcique transmembranaire et en s'opposant aux effets de l'élévation de calcium ionisé intracellulaire, le diltiazem améliore l'équilibre entre les apports et les besoins en oxygène du myocarde (Thuillez, 1993).

Le but d'une thérapie anti-angineuse est le soulagement des symptômes, l'amélioration de la qualité de vie, la prévention des complications telles que la mort subite, l'infarctus du myocarde et les arythmies, de même que l'augmentation de

l'espérance de vie. L'efficacité des médicaments anti-angineux se mesure par l'évaluation de paramètres objectifs d'amélioration tels que la durée d'exercice, le temps d'apparition de l'angine ou de changement du segment ST lors du début des douleurs angineuses. Des critères subjectifs tels que la fréquence des crises d'angine ou la consommation de nitroglycérine sont aussi évalués.

1.4.1.1 L'angine stable

L'athérosclérose qui se manifeste par un épaissement et un durcissement des parois vasculaires diminuant ainsi la lumière et le débit sanguin des artères coronaires est la cause la plus fréquente de l'angine stable (Hurst et coll., 1978). Malgré le durcissement et le rétrécissement de la lumière des artères, l'apport sanguin est généralement suffisant au repos et lors d'activités modérées. D'autre part, les artères sténosées ne peuvent fournir le sang oxygéné supplémentaire requis par le myocarde pendant un exercice ou autre stress.

En comparaison au placebo, le diltiazem (240 à 360 mg/jour) améliore de manière constante et significative le temps d'exercice et le temps d'apparition de la dépression du segment ST de 1 mm, et diminue significativement la fréquence des attaques angineuses et l'utilisation de nitroglycérine (Klinke et coll., 1989; McCans, 1986). Il a également été démontré que le diltiazem n'induit aucune tolérance et qu'il est efficace à long terme en monothérapie chez les patients souffrant d'angine stable (Hossack et coll., 1985; Petru et coll., 1985).

Le diltiazem (240 à 360 mg) est équivalent aux bloqueurs des récepteurs β -adrénergiques (propranolol, métoprolol, aténolol, etc.), pour l'amélioration de la durée d'exercice et du temps d'apparition des changements du segment ST; la fréquence des attaques angineuses fut aussi diminuée par tous ces agents (Hung et coll., 1983; Miller et coll., 1988; O'Hara et coll., 1987). Cependant, l'efficacité anti-angineuse du diltiazem serait augmentée par une association avec le propranolol ou l'aténolol (El-Tamini et coll., 1989; Humen et coll., 1986), quoique certains auteurs soutiennent que l'administration de doses plus élevées de chacun de ces médicaments serait plus efficace qu'une thérapie combinée (Hung et coll., 1983; Schroeder et coll., 1985).

Les comparaisons entre le diltiazem et les autres BCCs tels le vérapamil et la nifédipine dans le traitement de l'angine stable à l'exercice n'ont généralement été réalisées que sur une courte période. Tous ces BCCs ont amélioré les signes objectifs et subjectifs de l'ischémie à l'effort (Frishman et coll., 1988; Koiwaya et coll., 1981). Dans plusieurs études randomisées à double-insu, le diltiazem s'est avéré supérieur à la nifédipine pour la diminution de la fréquence de crises d'angine et fut également supérieur au vérapamil en regard de la fréquence d'attaques angineuses et de l'utilisation de la nitroglycérine (Frishman et coll., 1988; Klinke et coll., 1988; Petru et coll., 1985; Stone et coll., 1990).

1.4.1.2 L'angine variante

L'angine variante est caractérisée par un rétrécissement transitoire d'une artère

coronaire (spasme ischémique) mais qui n'est pas produite par une compression externe, une embolie, un thrombus ou une baisse de la pression artérielle. Contrairement à l'angine stable, on remarque principalement une élévation du segment ST. Le diltiazem, le vérapamil et la nifédipine ainsi que la plupart des BCCs sont sensiblement efficaces dans le traitement de l'angine variante et sont supérieurs au placebo (Chaffman et Brogden, 1985).

Dans les études randomisées à double-insu comparant le diltiazem (120 à 240 mg/jour) au placebo, il a été démontré que le diltiazem réduit la fréquence des attaques angineuses (43 vs 80%) et la consommation de comprimés de nitroglycérine (19 vs 40%) (Rosenthal et coll., 1983; Schroeder et coll., 1982). Aucune différence significative n'a été démontrée entre l'efficacité du diltiazem, de la nifédipine et du vérapamil (Pepine et coll., 1983; Waters et coll., 1981).

Dans une étude chassé-croisée à double-insu, le diltiazem et le propranolol ont été administrés à onze patients souffrant de spasmes coronariens. Lorsqu'utilisé seul, le diltiazem a aboli les épisodes ischémiques et les changements du segment ST, alors qu'avec le propranolol, une augmentation de la fréquence et de la durée des attaques angineuses a été observée. Les résultats provenant de l'administration conjointe de ces deux produits ne furent pas supérieurs à ceux obtenus avec le diltiazem seul (Tilmant et coll., 1983).

1.4.1.3 L'angine instable

L'angine instable, provoquée par une ischémie myocardique, est caractérisée par une progression de la fréquence d'apparition et de l'intensité des douleurs thoraciques. Une diminution de la réponse à la médication anti-angineuse est également propre à ce type d'angine.

Chez les patients présentant une élévation du segment ST et chez ceux n'ayant aucune douleur, il a été démontré que le diltiazem (120 à 360 mg/jour) était plus efficace à court terme que le propranolol. Cependant, chez les patients présentant une dépression du segment ST, le diltiazem s'est avéré moins ou aussi efficace que le propranolol (Andre-Fouet et coll., 1983; Bardet et coll., 1979).

1.4.2 L'hypertension

Le diltiazem ainsi que les autres BCCs possèdent de nombreux avantages pour le traitement de l'hypertension artérielle: ils abaissent la pression artérielle via une réduction de la résistance périphérique totale anormalement élevée; leur efficacité antihypertensive est comparable à celle d'autres médicaments, couramment prescrits; ils entraînent une régression de l'hypertrophie ventriculaire gauche; ils possèdent des propriétés vasodilatatrices coronariennes; ils sont généralement bien tolérés sur le plan clinique et leurs effets secondaires, le plus souvent bénins et réversibles, sont généralement liés aux caractéristiques pharmacologiques du produit. De plus, ils ont un profil biochimique neutre, en particulier en ce qui concerne la glycémie et les lipides, ils ont un potentiel anti-athéromateux et sont efficaces et bien tolérés sur le plan clinique et biologique chez le sujet âgé, le

diabétique insulino-dépendant et l'insuffisant rénal (Laurent et coll., 1993).

Contrairement à la nouvelle génération de BCCs, le diltiazem ainsi que la nifédipine et le vérapamil ont une courte demi-vie ce qui exige une administration de plusieurs doses par jour. Toutefois, le développement de formulations à libération prolongée permet aujourd'hui l'administration de doses quotidiennes ou bi-quotidiennes facilitant ainsi le traitement de l'hypertension artérielle.

Le diltiazem s'est avéré plus efficace que le placebo dans le traitement de l'hypertension. En effet, contrairement au placebo, le diltiazem maintient la pression diastolique inférieure à la pression de départ de 5 à 10% (Struyker-Boudier et coll., 1990). Le nombre de répondants au traitement (pression diastolique inférieure à 90 mmHg et/ou diminuée de plus de 10 mmHg) du diltiazem (48%) est aussi supérieur à celui du placebo (8%) (Pool et coll., 1986).

Dans les études randomisées à double-insu, le diltiazem a été comparé à l'hydrochlorothiazide, aux β -bloquants, aux inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) et aux autres BCCs. De manière générale, le diltiazem est aussi efficace que tous les agents recommandés dans le traitement de l'hypertension artérielle. En effet, dans une méta-analyse de 15 études randomisées à double-insu, aucune différence significative ne fut démontrée entre le diltiazem et les autres classes pharmacologiques de médicaments nommées précédemment (Fagan, 1991).

Il a été rapporté qu' environ 50 à 90% des patients traités avec le diltiazem ou l'hydrochlorothiazide répondent de manière efficace au traitement: la pression diastolique de départ est réduite d'au moins 10 mm Hg et/ou est diminuée à une valeur inférieure à 90 mm Hg (Ginsberg et coll., 1988; Pool et coll., 1986; Pool et coll., 1988; Weber et coll., 1988). D'autre part, il semble que l'hydrochlorothiazide ait un effet plus marqué sur la pression diastolique que le diltiazem. Finalement, chez le patient ne répondant pas ou peu au traitement du diurétique ou du diltiazem seul, on rapporte que l'association des deux traitements résulte généralement en un bon contrôle de l'hypertension (Weir et coll., 1989).

L'efficacité du diltiazem a aussi été comparée à celle de plusieurs bloqueurs β -adrénergiques tels que le propranolol, l'aténolol et le métoprolol (Lacoursière et coll., 1990; Massie et coll., 1987; Szlachcic et coll., 1987; Weir et coll., 1987). Malgré un effet similaire au niveau de la réduction de la pression artérielle, les β -bloquants entraîneraient une bradycardie plus importante que le diltiazem. En ce qui concerne l'association des deux classes de médicaments, on remarque un effet anti-hypertenseur plus marqué (Fagan, 1991) avec, cependant, une plus forte probabilité d'observer une bradycardie ou un bloc auriculo-ventriculaire (AV).

Tel que démontré avec les diurétiques et les β -bloquants, le diltiazem est aussi efficace que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECAs) dans le traitement de l'hypertension. La réduction moyenne des pressions artérielles systolique et diastolique avec le diltiazem ou les IECA (enalapril et captopril) est supérieure à 10 mm Hg (Applegate et coll., 1991; Bidville et coll., 1988; Wolfson

et coll., 1988). L'association diltiazem-captopril s'est avérée très efficace chez les patients ne répondant pas au diltiazem (360 mg/jour) ou au captopril (150 mg/jour) seuls, avec une baisse significative de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque (Wolfson et coll., 1988). D'ailleurs, il semble que cette combinaison serait plus profitable que toute autre association avec le diltiazem dans le traitement de l'hypertension.

Finalement, les BCCs exercent tous une activité antihypertensive semblable. Il a été établi dans des études à double insu comparant le diltiazem à la nifédipine et au vérapamil, respectivement que la réduction moyenne des pressions systolique/diastolique variait entre 14 et 16 mm Hg (Fishman et coll., 1985; Hollifield et coll., 1988; Schulte et coll., 1986; Simic et Jurman, 1988). L'incidence d'effets secondaires est également similaire pour chacun des BCCs.

Les études à long terme confirment également l'efficacité du diltiazem chez le patient hypertendu et ce peu importe la formulation utilisée (conventionnelle, libération contrôlée, etc.). Dans les études conduites sur une période de 12 à 20 mois, le diltiazem a maintenu la réduction des pressions systoliques et diastoliques de 10 à 18% et 14 à 32%, respectivement, sans aucune évidence de tolérance (Klein, 1987; Schulte et coll., 1987; Stallard et coll., 1988).

Des controverses sur l'utilisation des BCCs dans le traitement de patients hypertendus ont été soulevées en raison de leurs effets sur la morbidité et la mortalité. Il semble que les dihydropyridines (DHPs) à courte demi-vie (nifédipine)

ont des effets néfastes sur la mortalité ou sur les risque d'infarctus, contrairement aux produits considérés non-DHPs comme le diltiazem et le vérapamil. D'autre part, on semble également différencier les BCCs à courte et à longue demi-vie puisque les DHPs comme l'amlodipine de même que les formulations à libération prolongée de nifédipine auraient un meilleur profil d'innocuité dans le traitement à long terme de l'hypertension que ceux à courte demi-vie incluant le diltiazem et le vérapamil. Malgré toutes ces données, les résultats d'études spécifiques de BCCs envers d'autres catégories de médicaments seront nécessaires avant de prendre une position précise à ce sujet.

1.4.3 Les arythmies

Le noeud auriculo-ventriculaire (AV) normal est dépendant des canaux lents calciques. L'effet anti-arythmique du diltiazem est principalement relié à l'inhibition du courant calcique au niveau du noeud AV ce qui permet d'y prolonger les délais de conduction.

1.4.3.1 Tachycardie supra-ventriculaire

Tel que démontré avec le vérapamil, le cheminement antérograde de la conduction nodale AV est probablement la section de la tachycardie de ré-entrée la plus susceptible à l'action du diltiazem (Singh et coll., 1983). Dans les premières études réalisées avec le diltiazem, on indique qu'il est efficace pour la conversion de la tachycardie supra-ventriculaire paroxystique (TSPV) en rythme sinusal (chez 60 à

100% des patients) ou pour la diminution de la réponse ventriculaire lorsque la conversion n'a pas eu lieu (Chafman et Brogden, 1985).

Dans une étude contrôlée comparant le diltiazem (bolus de 0.25 mg/kg suivi de 0.35 mg/kg chez les non-répondeurs) au placebo chez le patient avec TSPV, on rapporte que 86% des patients ayant reçu le diltiazem avaient un rythme sinusal normal versus 19% des patients ayant reçu le placebo (Huycke et coll., 1989). En fait, 90% des patients traités avec le diltiazem ont répondu de manière bénéfique avec une conversion en un rythme sinusal normal en un temps inférieur à 2 minutes. Par conséquent, il est établi que le diltiazem est hautement efficace pour le traitement aigu de la tachycardie supra-ventriculaire (TSV) de ré-entrée impliquant le noeud AV.

1.4.3.2 Fibrillation auriculaire

L'administration intraveineuse du diltiazem (0.1 à 0.3 mg/kg) diminue la réponse ventriculaire reliée à une fibrillation auriculaire, même si quelques patients seulement sont convertis à un rythme sinusal. En effet, dans une étude à double-insu comparant le diltiazem (bolus de 0.25 mg/kg suivi d'une infusion de 0.35 mg/kg chez les non-répondants) au placebo, il a été établi que le diltiazem contrôlait la réponse ventriculaire en un temps inférieur à 4.3 minutes chez la majorité des patients présentant une fibrillation auriculaire (Salerno et coll., 1989). L'administration orale de diltiazem (60 à 90 mg quatre par jour) est également efficace pour la diminution de la fréquence ventriculaire chez ce type de patients

(Roth et coll., 1986; Steinberg et coll., 1987).

1.4.4 Autres utilisations

1.4.4.1 Infarctus du myocarde

Malgré une interaction avec le canal calcique de type L, on remarque que les BCCs peuvent soit exercer des effets cardiaques directs (allongement de la conduction AV, bradycardie, etc.) soit agir essentiellement via une vasodilatation périphérique (Lièvre et Nony, 1993). Les BCCs exerçant une action directe sur le myocarde (tels le diltiazem et le vérapamil) seraient plus efficaces que les vasodilatateurs (telle la nifédipine) dans la prévention de complications cardiovasculaires chez les patients ayant subi un infarctus du myocarde.

Malgré l'effet bénéfique du diltiazem ou du vérapamil, on remarque que chez les patients recrutés entre 3 et 15 jours suivant le début des symptômes et qui ont été traités en moyenne pendant 25 mois (3151 patients) avec le diltiazem, la mortalité ne fut pas diminué de manière significative par rapport au placebo (Gibson et coll., 1986; The multicenter diltiazem postinfarction trial research group, 1988; Zannad et coll., 1988). Les récives d'infarctus du myocarde ont diminué d'environ 21%, mais cette baisse ne fut pas significativement différente de celle observée avec le placebo (Gibson et coll., 1986; The multicenter diltiazem postinfarction trial research group (MDPIT), 1988).

Malgré les résultats quelques peu inattendus de cette dernière étude (MDPIT), il en ressort que le diltiazem est néfaste lorsqu'il est utilisé chez le patient avec défaillance cardiaque ventriculaire gauche (ou congestion pulmonaire); cet effet s'expliquerait par son effet chronotrope et inotrope négatif. Chez le patient ne présentant pas de défaillance de la fonction ventriculaire gauche, les risques ne sont pas plus élevés que ceux du placebo (The multicenter diltiazem postinfarction trial research group, 1988).

De manière générale, ces résultats sont semblables à ceux observés avec le vérapamil, mais meilleurs que ceux décrits avec la nifédipine. Contrastant avec les effets défavorables de la nifédipine, le diltiazem et le vérapamil ont diminué le risque de récurrence d'infarctus, mais au prix d'une augmentation du risque de bloc AV et d'insuffisance cardiaque (Lièvre et Nony, 1993). Ce gain sur les récurrences est du même ordre que celui observé avec les bloqueurs β -adrénergiques quoique le gain à long terme apporté par les bloqueurs β -adrénergiques est important puisqu'ils diminuent significativement la mortalité de 22% et les récurrences de 27% (Lièvre et Nony, 1993). Le diltiazem constitue malgré tout une alternative aux bloqueurs β -adrénergiques lorsque ceux-ci sont contre-indiqués sans qu'on puisse s'attendre pour autant à un gain sur la mortalité.

1.4.4.2 Phénomène de Raynaud

Puisque le diltiazem diminue le tonus vasculaire des muscles lisses et soulage le vasospasme artérielle, il a été évalué dans le traitement du phénomène de Raynaud,

un syndrome caractérisé par un vasospasme digital réversible qui peut être traumatique, idiopathique ou associé à un désordre vasculaire (Hachulla et Devulder, 1993).

Dans une étude à double-insu comparant le diltiazem au placebo, il a été démontré que le diltiazem (120 à 180 mg/jour) diminuait la fréquence et la durée des attaques vasospastiques (Kahan et coll., 1985; Rheda et coll., 1985). On rapporte également que le diltiazem, lorsque comparé au produit standard, augmente la vitesse de réchauffement des mains de 10% et 34% après 5 minutes et au nombre total, respectivement, suivant leur immersion dans l'eau froide (Matoba et Chiba, 1985; White et coll., 1986). Toutefois, aucune amélioration des paramètres objectifs n'a été observée (da Costa et coll., 1987; Vayssairat et coll., 1981). Finalement, Kahan et coll. (1985) ont noté moins de soulagement chez les patients avec un phénomène de Raynaud secondaire comparativement à ceux ayant une maladie idiopathique. Jusqu'à présent il n'a pas encore été établi si le diltiazem était efficace à long terme ou s'il pouvait prévenir les séquelles du phénomène de Raynaud telle la gangrène digitale (Struyker-Boudier, 1990).

1.4.4.3 Désordres de la motilité oesophagienne

Le désordre de la motilité oesophagienne implique un éventail de conditions cliniques caractérisées par un dysfonctionnement de l'amplitude, de la durée et/ou de la progression péristaltique de la contraction des muscles lisses oesophagiens et/ou de l'hypercontractilité du sphincter oesophagien inférieur. Quoique le diltiazem

n'ait aucun effet sur la motilité oesophagienne chez le volontaire sain, il diminue de manière significative l'amplitude et la durée de la contraction péristaltique chez les patients souffrant de problèmes de motilité oesophagienne (Allen et coll., 1987; Richter et coll., 1984).

On rapporte également que le diltiazem (240 à 360 mg/jour) soulage significativement les symptômes reliés à une augmentation de l'activité contractile de l'oesophage, mais non chez les patients souffrant d'achalasie (Chaffman et Brogden, 1985). Plus récemment, dans une étude à double-insu avec placebo, Frachtman et coll. (1986) ont démontré que le diltiazem (90 mg 4 fois par jour) n'améliorait pas la fréquence des douleurs thoraciques et la dysphagie, et n'altérait ni la pression oesophagienne du sphincter inférieur, ni l'amplitude ou la durée de contraction oesophagienne chez 14 patients symptomatiques.

Malgré des résultats peu concluants, le diltiazem peut être bénéfique comme alternative de traitement chez certains patients avec dysfonctions de la motilité oesophagienne.

1.4.4.4 Prophylaxie de la migraine

En raison de ses effets sur les muscles lisses cérébro-vasculaires, le diltiazem s'est avéré efficace pour la prophylaxie des migraines. En effet, dans une étude à double-insu chez 100 patients souffrant de différentes formes de migraines, Paterna et coll. (1985) ont démontré que le diltiazem (60 mg trois fois par jour) diminue de 98%

la fréquence mensuelle d'attaques migraineuses comparativement à 20% pour le placebo. De plus, la durée quotidienne d'une attaque fut diminuée de 99.64% avec le diltiazem *versus* seulement 7.64% avec le placebo.

1.5 Effets secondaires

Le diltiazem est un des BCCs les mieux tolérés. L'incidence d'effets secondaires notés durant les traitements avec le diltiazem est généralement très basse (Hedner, 1986; Quigley et coll., 1985). Par exemple, McGraw et coll. (1982) ont rapporté une incidence de 1.8% chez 3193 patients souffrant d'angine de poitrine et recevant le diltiazem à des doses approximatives de 90 mg/jour sur une période de 30 à 360 jours. Le taux d'abandon au traitement du diltiazem durant toutes les études était d'environ 1%.

Au cours d'études contrôlées, la fréquence des réactions secondaires était semblable à celle notée avec le placebo. Les principaux effets secondaires associés à l'utilisation du diltiazem sont l'oedème périphérique, les céphalées, la vasodilatation périphérique (flushing), les nausées, les étourdissements, l'asthénie et les éruptions cutanées (Kubota et coll., 1995; Sousa-Basto et coll., 1993; Struyker-Boudier, 1990). Les effets secondaires tels les céphalées, l'oedème, la vasodilatation périphérique et l'hypotension sont prévisibles puisqu'ils sont reliés aux propriétés pharmacologiques du diltiazem (Kubota et coll., 1995). Parmi les effets plus sérieux du diltiazem, on remarque une prolongation de l'intervalle PR pouvant amener à un bloc de la conduction auriculo-ventriculaire (AV); cet effet est

toutefois peu rapporté à moins que le diltiazem soit administré à des patients prédisposés à un bloc AV ou à ceux prenant d'autres médicaments affectant la conduction AV tels les β -bloquants (Waller et Inman, 1989). En effet, dans les études impliquant le diltiazem, on rapporte qu'environ 50% des patients souffrant d'un bloc AV (0.2% des patients) consommaient également un bloqueur β -adrénergique (Waller et Inman, 1989). Finalement, certains cas d'hyperglycémie (Ahmad, 1985) et de résistance à l'insuline (Pershad Singh et coll., 1987) ont été rapportés, mais il ne semble pas y avoir de tolérance aux carbohydrates chez la majorité des patients diabétiques ou non-diabétiques. Les cas d'hyperglycémie sont généralement rencontrés chez les patients recevant une forte dose de diltiazem.

1.6 Interactions médicamenteuses

Le diltiazem comme le vérapamil est un inhibiteur du cytochrome P450 et ce autant chez l'animal que chez l'humain (Kirch et coll., 1990). Il est établi que le diltiazem réduit la clairance et la demi-vie de l'antipyrine sans toutefois modifier son volume de distribution (Abernethy et coll., 1988; Bauer et coll., 1986); le diltiazem inhibe également le métabolisme de la débrisoquine (Sakai et coll., 1991).

Peu d'études font mention des isoenzymes du cytochrome P450 inhibés par le diltiazem. En fait, il a été récemment établi que le diltiazem est un inhibiteur du CYP3A3/4 et du CYP2D6 (Tsao et coll., 1990; Sutton et coll., 1997). D'autre part, il semble que le diltiazem n'aurait aucune influence sur l'activité du CYP1A2, CYP2C9 et du CYP2E1 (Sutton et coll., 1997).

L'inhibition de l'antipyrine se confirme entre autres avec la théophylline où le diltiazem réduit sa clairance totale et augmente son temps de demi-vie (Nafziger et coll., 1987; Sirmans et coll., 1988). La constante de formation de ses métabolites (3-méthylxanthine et 1,3-diméthyluric acid) est également réduite suggérant que le diltiazem inhibe l'hydroxylation hépatique et la déméthylation de la théophylline (Sirmans et coll., 1988).

Malgré quelques données contradictoires, il semble que la pharmacocinétique de la digoxine soit altérée par l'administration de diltiazem: on observe généralement une hausse des concentrations plasmatiques de digoxine qui serait reliée à diminution de la clairance rénale et non-rénale de la digoxine (Andrejak et coll., 1987; Klein et coll., 1982; North et coll., 1986). Même si cette interaction ne s'avère pas toujours significative, l'administration concomitante de digoxine et de diltiazem devrait être faite avec précaution en considérant le fait qu'une réduction des doses de digoxine puisse être nécessaire chez certains patients.

L'administration de bloqueurs β -adrénergiques et de diltiazem est une option thérapeutique populaire dans le traitement de l'angine de poitrine. Malgré une réponse bien tolérée des patients, cette association peut amener à une incidence plus élevée d'effets secondaires majeurs tels qu'une bradychardie ou un bloc auriculo-ventriculaire (AV) (Sagie et coll. 1991; Waller et Inman, 1989). Une des raisons pouvant expliquer ces effets serait la hausse des concentrations plasmatiques du β -bloquant. En effet, il a été démontré que le diltiazem inhibait le métabolisme du propranolol et du métoprolol (Dimmitt et coll., 1987; Tateishi,

1989), mais n'affecte pas les concentrations plasmatiques ou la demi-vie de l'aténolol qui est principalement éliminé par le rein.

Une interaction clinique significative a également été rapportée entre le diltiazem et la cyclosporine. Les taux de cyclosporine sont augmentés de 25 à 100% en deçà de 7 jours ce qui nécessite une réduction des doses de cyclosporine de 25 à 40% (Brockmoller et coll., 1990; Johnson et coll., 1988; Wagner et coll., 1989). Puisque ces deux produits sont métabolisés par le CYP3A4, on estime que l'inhibition enzymatique de cet isoenzyme serait responsable de cette interaction médicamenteuse (Pichard et coll., 1990).

Le diltiazem inhiberait également le métabolisme d'autres médicaments comme la carbamazépine (Bahls et coll., 1991; Shaughnessy et Mosley, 1992), la phénytoïne (Bahls et coll., 1991) et l'imipramine (Hermann et coll., 1992).

1.7 Surdosage

Puisque les bloqueurs des canaux calciques peuvent affecter plusieurs réactions physiologiques dont la contraction des muscles lisses et la génération des potentiels d'action du myocarde (Braunwald, 1982; Frohlich, 1988), il est, par conséquent, évident qu'un surdosage de diltiazem affectera l'électrophysiologie cardiaque, la contractilité myocardique et le tonus vasculaire.

Parmi les effets toxiques du diltiazem, on remarque une baisse du taux de

dépolarisation du noeud sinuso-auriculaire (NSA) (effet chronotrope négatif) ainsi que du temps de conduction du noeud auriculo-ventriculaire (NAV) (effet dromotrope négatif). Malgré le faible nombre de cas de surdosage rapporté avec le diltiazem, on remarque de l'hypotension et une diminution de la vitesse de conduction auriculo-ventriculaire (AV) sont généralement communs (Pearigan et Benowitz, 1991; Anthony et coll., 1986).

On rapporte également, au niveau métabolique, une hyperglycémie qui serait expliquée par une inhibition de la libération d'insuline (Enyeart et coll., 1983; Spurlock et coll., 1991). Cependant, chez l'homme et le chien, l'inhibition de la libération de l'insuline n'a pas été démontré suivant l'administration de doses thérapeutiques de diltiazem (Collins et coll., 1987; Dominic et coll., 1980).

Finalement, on rapporte qu'un surdosage au diltiazem peut entraîner des réactions cutanées telles que le syndrome de Stevens-Johnson, l'érythème multiforme et la dermatite exfoliative. Des vasculites cutanées, de l'angio-oédème et de l'urticaire généralisée ont aussi été rapportés (Sadick et coll., 1989; Sheehan-Dare et Goodfield, 1988).

1.8 Pharmacocinétique

Malgré un nombre important d'études cliniques impliquant l'administration de doses orales et intraveineuses, la pharmacocinétique du diltiazem n'est toujours pas clairement établie.

1.8.1 Absorption et biodisponibilité

Environ 90% du diltiazem est absorbé suivant son administration orale chez l'animal et l'humain (Piepho et coll., 1982). Cependant, suivant l'administration d'une dose unique, et ce incluant les formulations à libération contrôlée, la biodisponibilité absolue varie entre 30 à 40% (Ochs et Knuchel, 1984; Morselli et coll., 1979). En raison des différentes formulations utilisées, les concentrations plasmatiques maximales du diltiazem sont généralement atteintes entre 3 et 8 heures suivant son administration (Bighley et coll., 1980, Lefebvre et coll., 1994).

1.8.2 Distribution

Le diltiazem est lié à environ 80 à 90% aux protéines plasmatiques (Belpaire et Bogaert, 1990; Hung et coll., 1988; Kates, 1983), principalement à l'albumine (35 à 40%), à l'acide α 1-glycoprotéine (Belpaire et Bogaert, 1990) et à diverses gamma-globulines (Morselli et coll., 1979; Pieper, 1984). Malgré une liaison aux protéines variant entre 60 et 75% (Hung et coll., 1988), la présence du déacétyldiltiazem (M1) qui est un des principaux métabolites du diltiazem ne semble pas affecter la liaison de ce dernier (Piepho et coll., 1982).

Suivant une dose intraveineuse, le diltiazem est rapidement et largement distribué dans les tissus corporels. Il a été établi que le volume de distribution moyen du diltiazem est relativement important (environ 209 L) (Hoglund and Nilsson, 1988), i.e. de 5.3 L/kg chez le volontaire sain (Hermann et coll., 1983; Smith et coll.,

1983) et de 4 à 7 L/kg chez le patient angineux (Clozel et coll., 1984). Ce volume de distribution relativement élevé serait probablement relié à sa grande liposolubilité au pH physiologique (Ochs et Knuchel, 1984).

1.8.3 Métabolisme et excrétion

Tel que mentionné auparavant, le diltiazem est un produit fortement métabolisé. Les principales voies de biotransformation incluent la N-déméthylation, la désacétylation, l'O-déméthylation, la N-oxydation et la déamination (Sugawara et al., 1988a,b; Yeung et al., 1990); il se conjugue également avec l'acide glucuronique ou les sulfates avant son excrétion (Morselli et coll., 1979; Sugihara et coll., 1984). Son métabolisme permet de générer plus d'une vingtaine de métabolites. Moins de 4% d'une dose unique ou de doses multiples de diltiazem est excrétée sous forme inchangée dans l'urine sur une période de 24 heures (Morselli et coll., 1979). La clairance totale du diltiazem suivant une injection intraveineuse unique chez le volontaire sain (Ochs et Knuchel, 1984) et chez le patient hypertendu (Montamat et Abernethy, 1987) varie entre 0.72 et 1.26 L/kg/min.

Le métabolisme du diltiazem entraîne la formation de plusieurs métabolites acides et basiques, mais qui, pour la plupart, ont été peu étudiés. Les métabolites les plus connus sont le N-desméthyldiltiazem (MA), le désacétyldiltiazem (M1 ou DAD) et le N-desméthyl-désacétyldiltiazem (M2). Leurs concentrations plasmatiques sont de l'ordre de 30 à 50%, 10 à 30% et 10 à 20%, respectivement, de celles de la substance-mère (Andren et coll., 1988; Hoglund et Nilsson, 1989a,b,c, Montamat

et Abernethy, 1987; Morselli et coll., 1979). Certains de ses métabolites tels le MA et le M1 sont pharmacologiquement actifs: le MA et le M1 possèdent environ 20 et 50%, respectivement, de l'activité vasodilatatrice coronarienne du diltiazem et environ 33 et 100% de sa puissance hypotensive (Yabana et coll., 1985). En raison d'une accumulation de ces métabolites suivant une administration répétée du diltiazem (Montamat et Abernethy, 1987; Smith et coll., 1983; Hoglund et Nilsson, 1989a,c), il est permis de croire qu'ils pourraient influencer l'activité thérapeutique du diltiazem.

Dans une des premières études publiées sur le métabolisme du diltiazem chez l'homme (Morselli et coll., 1979), on rapportait que l'étape principale était sa désacétylation. Le M1 qui représente 15 à 30% du niveau plasmatique de diltiazem suivant l'administration d'une dose orale unique était subséquemment transformé par N- et O-déméthylation et/ou par glucuronidation. Toutefois, Sugihara et coll. (1984) ont ensuite démontré que la N-déméthylation du diltiazem était plus importante que sa désacétylation: les taux plasmatiques de MA étaient environ 30% de ceux du diltiazem. D'ailleurs, le MA est toujours reconnu comme le principal métabolite du diltiazem suivant son administration orale chez l'homme (Goebel et Kollé, 1985; Hoglund et Nilsson, 1989a,b,c; du Souich et coll., 1990; Lefebvre et coll., 1994; Montamat et Abernethy, 1987). L'isoenzyme CYP3A4 serait principalement responsable de la N-déméthylation du diltiazem (Pichard et coll., 1990).

Les études sur le métabolisme du diltiazem chez l'homme concernent principalement

les métabolites basiques incluant les N-oxides et leurs conjugués (Morselli et coll., 1979; Rovei et coll., 1980; Sugihara et coll., 1984). Au cours des dernières années, de nouveaux métabolites acides (A1-A6) et basiques (M9, MB, MC, MD) ont été isolés dans l'urine et le plasma (Sugawara et coll., 1988b). En fait, la déamination oxydative serait la principale voie métabolique du diltiazem, formant des métabolites acides.

Suivant l'administration de doses répétées de diltiazem, on remarque que la hausse des concentrations plasmatiques du diltiazem est beaucoup plus élevée que prévue. Cette accumulation pourrait d'une part être reliée à une saturation des sites enzymatiques (Bianchetti et coll., 1991) et, d'autre part, en raison de ses propriétés inhibitrices sur le cytochrome P450 (Kirch et coll., 1990; Renton, 1985), être reliée à une inhibition de son propre métabolisme: les causes de cette inhibition demeurent à être clarifiées, mais on rapporte que certains de ses métabolites (principalement le MA et le M4) pourraient inhiber le métabolisme du diltiazem (Tsao et coll., 1990; Sutton et coll., 1997).

1.8.4 Demi-vie du diltiazem

Suivant l'administration d'une dose unique de diltiazem chez le volontaire sain, il a été établi que sa demi-vie était d'environ 4.5 heures variant entre 2 et 11 heures (Ochs et Knuchel, 1984; Zelis et Kinney, 1982). Cette demi-vie est généralement stable ou quelquefois prolongée par l'administration de doses répétées de diltiazem (Hoglund et Nilsson, 1989a,c; Smith et coll., 1983). La demi-vie du diltiazem serait

prolongée chez la personne âgée (Abernethy et Montamat, 1987; Morselli et coll., 1979).

CHAPITRE 2

LE MÉTABOLISME HÉPATIQUE ET EXTRA-HÉPATIQUE

2.1 Historique

L'activation ou la désactivation de substances endogènes et exogènes de l'organisme sont des étapes essentielles pour régulariser certaines fonctions physiologiques et/ou protéger l'organisme de la présence de produits toxiques (Murray et coll., 1988). De manière générale, cette activité est non-spécifique et permet généralement la transformation de produits liposolubles en produits hydrosolubles.

La plupart des médicaments sont métabolisés avant leur excrétion (Coutts et coll., 1994; Krishna et Klotz, 1994). Le métabolisme des médicaments se divise généralement en deux phases, soit la phase I qui est principalement une voie d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse, soit la phase II qui implique la conjugaison du produit-mère ou des métabolites de la phase I (Jayyosi et coll., 1991; Pacifici et coll., 1988a). Ces phases de biotransformation entraînent généralement la formation de deux à cinq métabolites majeurs (Coutts et coll., 1994) actifs et/ou inactifs.

L'oxydation des médicaments représente la voie principale des réactions de phase I. Les enzymes du cytochrome P450 sont généralement responsables de cette activité (Guengerich, 1992) et peuvent entraîner l'hydroxylation d'une chaîne aliphatique ou d'un cycle aromatique, la désalkylation d'un substituant lié à un atome d'azote ou d'oxygène, la désamination d'une amine primaire aliphatique, l'oxydation des atomes d'azote et de soufre, etc. Les métabolites résultant de ces réactions peuvent présenter une activité pharmacologique (Coutts et coll., 1994).

Les réactions de conjugaison ou de phase II sont effectuées par des systèmes enzymatiques spécifiques. Les métabolites conjugués sont généralement polaires, hydrosolubles et dépourvus d'activité pharmacologique (Kroemer et Klotz, 1992). La glucuronidation, la sulfatation, l'acétylation et la conjugaison avec le glutathion ou les acides aminés constituent les principales voies de conjugaison des médicaments (Kroemer et Klotz, 1992).

En raison de la forte concentration d'enzymes retrouvée au niveau hépatique, le foie est responsable de la plupart des réactions de biotransformation de l'organisme (Bend et Serabjit-Singh, 1984; Pacifici et coll., 1988a; Gonzalez, 1992; Guengerich, 1992). Toutefois, en raison de certaines preuves indirectes telles qu'une clairance totale supérieure au débit sanguin hépatique ou une clairance peu ou pas modifiée en présence d'une dysfonction hépatique sévère, d'autres organes contribuent au métabolisme des médicaments.

Il a été démontré que l'intestin, les poumons, les reins, la peau, le cerveau ainsi que d'autres organes présentent une activité monooxygénase dépendante du cytochrome P450 (Bend et Serabjit-Singh, 1984; Gram, 1980; Hook et Bend, 1976; Mistry et Houston, 1985; Vainio et Hietanen, 1980). Certains enzymes impliqués dans les mécanismes d'hydrolyse et de conjugaison, tels l'époxyde hydrolase, l'UDP-glucuronosyl-transférase et le glutathion-transférase ont également été caractérisés au niveau de certains tissus extra-hépatiques (Bend et Serabjit-Singh, 1984). Tous ces enzymes se retrouvent principalement au niveau des microsomes du réticulum endoplasmique lisse, mais également au niveau cytosolique.

Le contenu en protéines microsomiales est généralement beaucoup plus élevé au niveau hépatique qu'au niveau des autres tissus de l'organisme; toutefois, les protéines cytosoliques seraient largement distribuées à travers l'organisme. Comme ces dernières seraient principalement responsables des réactions de phase II, on peut mieux comprendre que plusieurs réactions de conjugaison soient observées au niveau de certains tissus extra-hépatiques tel l'intestin (Pacifici et coll., 1988a) (Figure 2.1).

2.2 Élimination pré-systémique

Tout produit administré oralement sera généralement absorbé par l'intestin et "filtré" par le foie. Comme ce dernier possède tous les atouts nécessaires pour le métabolisme des médicaments, il est normal qu'il soit considéré comme l'obstacle majeur avant d'atteindre la circulation systémique (Murray et coll., 1988). Il est d'ailleurs bien établi que la quantité de médicament absorbée via le tractus gastro-intestinal ne correspond pas nécessairement à celle atteignant la circulation systémique. Ce phénomène désigné "*effet de premier passage*" correspond essentiellement à la quantité de médicament métabolisée lors du premier contact avec les cellules hépatiques (Routledge et Shand, 1979). Toutefois, ce rôle ne lui est plus exclusivement accordé.

Dès 1969, Harris et Riegelman démontraient que les concentrations plasmatiques réduites d'acide acétylsalicylique, suivant une administration orale, étaient dues à un "*effet de premier passage*" au niveau et du foie et de l'intestin. Puisque tout produit

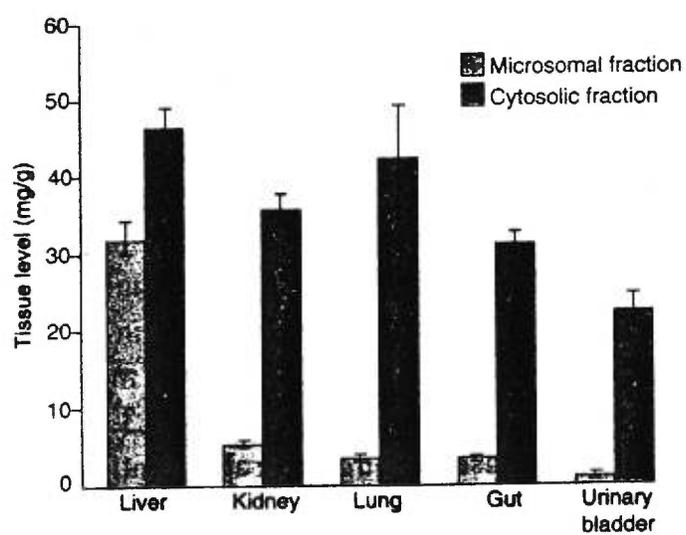


Figure 2.1 Comparaison de la distribution tissulaire des protéines microsomiales et cytosoliques (Pacifici et coll., 1988a)

administré oralement doit obligatoirement entrer en contact avec le contenu et/ou la muqueuse du tractus gastro-intestinal, l'intestin peut donc modifier et l'absorption et la biotransformation des médicaments. Reconnaisant que le foie continuera à éliminer les médicaments au moment des passages subséquents, le terme "*élimination pré-systémique*" semble plus approprié (Routledge et Shand, 1979).

L'élimination pré-systémique d'un médicament, suivant son administration orale, correspond donc à la quantité de médicament métabolisée lors du passage de la lumière intestinale jusqu'à la circulation systémique (Routledge et Shand, 1979). En plus du rôle reconnu du foie, les autres organes potentiellement impliqués dans le métabolisme pré-systémique sont l'intestin et les poumons. Malgré une faible concentration d'enzymes au niveau pulmonaire, la contribution des poumons dans le métabolisme des médicaments ne peut être sous-estimée, et ce particulièrement lors d'une administration intraveineuse. En ce qui concerne l'intestin et le foie, leur importance résulte du fait de leur position anatomique au niveau de la circulation splanchnique qui leur permettent d'agir comme filtre, non seulement vis-à-vis les médicaments mais également pour toute autre substance (Routledge et Shand, 1979).

2.3 Distribution des systèmes enzymatiques

2.3.1 Réactions de phase I

2.3.1.1 Cytochrome P450

Les réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse sont principalement catalysées par les systèmes monooxygénases dépendant du cytochrome P450 (Jayyosi et coll., 1991). La grande variété de substrats métabolisés par le cytochrome P450 s'explique par la présence d'un nombre important d'isoenzymes mais qui est étonnamment limité en raison de la multitude de réactions engendrées par ceux-ci (Jayyosi et coll., 1991). L'expression de la majorité de ces isoenzymes est sous contrôle d'hormones, de stéroïdes ou de xénobiotiques. Afin de bien différencier l'activité de chacun des isoenzymes, Nebert et coll. (1991) ont proposé une nomenclature simple fondée sur la désignation des gènes permettant ainsi de classer les protéines en familles et sous-familles.

Environ cent cinquante (150) isoenzymes du cytochrome P450 (CYPs) ont été décrits jusqu'à présent (Coutts et coll., 1994; Cholerton et coll., 1992; Coon et coll., 1992; Nelson et coll., 1993). Chez l'humain, plus d'une trentaine de CYPs ont été isolés (Gonzalez, 1990; 1992; Nelson et coll., 1993) et regroupés sous dix familles caractérisées en fonction de la séquence des acides aminés des protéines des CYPs (Coutts et coll., 1994; Gonzalez, 1992). Parmi ces familles, on distingue deux classes générales, soit celle impliquée dans les processus de biosynthèse des stéroïdes et des acides biliaires (CYP7, CYP11, CYP17, CYP19, CYP21 et CYP27), soit celle responsable du métabolisme des médicaments (CYP1, CYP2, CYP3 et CYP4) (Gonzalez, 1992).

Chaque famille peut être divisée en sous-familles désignées par une lettre majuscule (par ex.: CYP1A). Celles-ci sont de nouveau divisées en différents isoenzymes en fonction de la forme de chacun (Nebert et coll., 1991; Nelson et coll., 1993). Parmi les isoenzymes impliqués dans le métabolisme des médicaments, ceux ayant reçu le plus d'attention sont les CYP1A1, CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4 (et 3A3) et CYP2C19. On peut également ajouter d'autres isoenzymes nouvellement définis tels les CYP2C8, 2C9 et 2C10, ainsi que le CYP2E1 (Coutts et coll., 1994; Brosen, 1990; Wrighton et coll., 1992).

Outre le foie qui contient la majorité des isoenzymes du cytochrome P450, de plus faibles quantités de CYPs ont aussi été détectées au niveau des tissus extra-hépatiques (Burke et Orrenius, 1979; Gonzalez, 1992; Gram et coll., 1986; Guengerich, 1992; Watkins, 1990): l'intestin semble contenir les CYP1A1, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 et CYP3A4 (Gonzalez, 1992; Jayyosi et coll., 1991; Guengerich, 1992), alors que les CYP1A1, CYP2B7, CYP2F1 et CYP4B1 ont été détectés au niveau des poumons (Gonzalez, 1992; Jayyosi et coll., 1991; Guengerich, 1992). Les CYP1A1 et le CYP2D6 ont également été identifiés au niveau des reins (Gonzalez, 1992; Jayyosi et coll., 1991). Il est à noter que plusieurs de ces isoenzymes peuvent se retrouver au niveau d'autres tissus.

2.3.1.2 Époxyde Hydrolase

L'époxyde hydrolase (EH) catalyse l'hydrolyse des époxydes résultant de l'oxydation de molécules endogènes et exogènes effectuée par les isoenzymes du cytochrome

P450. L'EH est présente sous forme microsomiale et cytosolique (Pacifci et coll., 1989), et ce autant chez le foetus que l'adulte. Comme le cytochrome P450, on la retrouve au niveau de plusieurs organes, mais principalement au niveau du foie (De Wazier et coll., 1990; Pacifci et coll., 1988b, 1989). Toutefois, comme les isoenzymes du cytochromes P450 sont faiblement concentrés dans les tissus extra-hépatiques, la production d'époxydes y est donc limitée.

2.3.1.3 Hydrolyse

Des estérases non-spécifiques sont largement distribuées dans les différents tissus de l'organisme incluant le foie, le tractus gastro-intestinal et le sang (Leinweber, 1987; Lockridge, 1992). Chez l'humain, ces estérases ont été principalement caractérisées dans l'intestin (Dawson et Pryse-Davies, 1963; Floch et coll., 1967). D'autres enzymes ayant une activité spécifique telles la β -glucuronidase (Piper et Fenton, 1969), la déestérase (Jeffrey et coll., 1978) et les sulfatases (Dogson et coll., 1956) contribuent également à plusieurs réactions d'hydrolyse au niveau intestinal.

2.3.2 Réactions de Phase II

2.3.2.1 Glutathion S-transférases

Les glutathion S-transférases (GST) forment un groupe important impliqué dans les réactions de phase II et contribuent à la désintoxication de produits carcinogènes

et cytotoxiques (De Wazier et coll., 1990; Vincenzini et coll., 1991). Chez l'humain, on les retrouve sous trois formes, soit acide, basique et neutre. Le foie contient principalement les formes basiques et neutres alors que les formes acides et basiques sont détectées dans le petit intestin (De Waziers et coll., 1990; Peters, 1988). Le tractus gastro-intestinal contiendrait donc une plus forte concentration de GST acides que celle du foie suggérant que l'intestin puisse jouer un rôle plus important que le foie dans le métabolisme de certains produits (De Waziers et coll., 1990). Toutefois, parmi les tissus extra-hépatiques, il semble que la plus forte activité de GST se manifeste au niveau des reins (Pacifici et coll., 1988a).

2.3.2.2 UDP-glucuronosyltransférases

Les uridine diphosphate-glucuronosyltransférases (UDPGTs) sont situés au niveau du réticulum endoplasmique lisse de différents organes, incluant le foie, les poumons, le rein, l'estomac et l'intestin (Krishna et Klotz, 1994). Leur fonction est de transférer l'acide glucuronique de l'acide UDP-glucuronique à un substrat soutenant un groupement hydroxyle, carboxyle ou amine (Kroemer et Klotz, 1992); cette activité est tissu- et substrat-dépendante (Capiello et coll., 1991; Pacifici et coll., 1989; Peters et Jansen, 1988). La quantité d'UDPGTs retrouvés au niveau des tissus extra-hépatiques est inférieure à celle retrouvée au niveau du foie, mais elle est assez importante pour influencer la biodisponibilité des médicaments. Or, mis à part le foie, la plus forte concentration d'UDPGTs se retrouve au niveau des reins, de l'intestin et des poumons (Capiello et coll., 1991).

2.3.2.3 Sulfotransférases

La conjugaison aux sulfates catalysée par la sulfotransférase (ST) est un mécanisme important dans le métabolisme de produits phénoliques et de neurotransmetteurs telles les catécholamines (Sundaram et coll., 1989). Cet enzyme spécifique au groupement phénolique est identifié en fonction de ce dernier, soit P-ST (Capiello et coll., 1989; Pacifici et coll., 1988a, 1989). Toutefois, la ST peut aussi catalyser la sulfatation de groupements amines qui, par contre, est médiée par la N-ST. On remarque la présence de ST un peu partout dans l'organisme, mais la plus forte concentration se trouve au niveau hépatique. En ce qui concerne l'intestin et le côlon, on y détecte environ 50% des concentrations de ST hépatique (Capiello et coll., 1989; Pacifici et coll., 1988a, 1989).

2.3.2.4 Acétyltransférase

L'acétyltransférase (AT) est responsable de la biotransformation des amines et est bien distribuée dans les tissus hépatiques et extra-hépatiques (Pacifici et coll., 1988a). L'activité intestinale de l'AT ne représente qu'environ 50% de celle du foie, mais est environ deux fois plus grande que celle des poumons et des reins.

2.3.2.5 Autres réactions

Les méthyltransférases ainsi que la conjugaison d'acides aminés représentent d'autres voies possibles de conjugaison. La méthylation, contrairement à plusieurs

autres réactions, entraîne la formation de produits moins polaires que le produit-mère. Cette réaction nécessite la présence du groupement phénolique du groupement catéchol et est catalysée par la catéchol-O-méthyl-transférase (COMT); on les retrouve principalement au niveau cytosolique du foie et du cerveau. La N-méthylation est une réaction métabolique importante par laquelle les groupements amines sont modifiés; cependant, ces derniers peuvent également être métabolisés via d'autres voies enzymatiques telles la N-oxydation, la N-acétylation, la N-glucuronidation et la N-sulfatation (Krishna et Klotz, 1994).

Quant à la conjugaison d'acides aminés, elle est impliquée dans une variété de réactions impliquant les produits acides carboxyliques. Chez l'humain, la glycine et la glutamine sont utilisées dans ce type de conjugaison et nécessitent la présence de l'acyl-CoA synthétase et de la N-acyltransférase (Krishna et Klotz, 1994). On les retrouve principalement au niveau du foie et des reins.

2.3.3 Sélectivité des isoenzymes du cytochrome P450

Certains substrats peuvent être métabolisés par un seul CYP, mais la plupart des médicaments sont métabolisés par plusieurs isoenzymes. En fait, les CYPs catalysent un nombre surprenant de réactions chimiques toutes aussi différentes les unes des autres. Par conséquent, le même isoenzyme pourra métaboliser plusieurs types de médicaments.

Parmi les isoenzymes du cytochrome P450, on remarque que certaines sous-familles

tels les CYP1A2, CYP2C, CYP2D6 et CYP3A semblent plus impliqués dans le métabolisme des médicaments. Le CYP2D6 est celui qui a été le plus étudié en raison du polymorphisme retrouvé dans la population, suivi des CYP3A qui englobent les CYP3A3 et CYP3A4 (ainsi que les CYP3A5 et CYP3A7) puisqu'ils forment le groupe le plus abondant de CYPs retrouvés au niveau hépatique: les CYP3A représentent environ 25% des isoenzymes du cytochrome P450 quantifiés dans le foie (Figure 2.2) et sont responsables d'une grande variété de réactions d'oxydation (Kinirons et coll., 1993). On retrouve également une forte concentration de CYP3A4 au niveau intestinal.

Malgré la grande quantité de substrats métabolisés par le même isoenzyme, on ne peut clairement expliquer les raisons de la sélectivité des CYPs. Guenguerich et coll., (1986) déclaraient que les réactions chimiques de chaque CYP étaient généralement constantes et que le facteur clé de ces réactions serait l'apoprotéine impliquée; l'interaction entre le substrat et son site de liaison au niveau de l'isoenzyme jouerait aussi un rôle important. Cependant, il est admis que les caractéristiques de l'enzyme et la facilité à laquelle les différents groupes chimiques peuvent subir une réaction d'oxydation sont les principaux paramètres contrôlant le métabolisme des différents produits (Smith et Jones, 1992).

En fait, les CYP2D et CYP3A interagissent de manière très différente avec leurs substrats. La liaison des substrats avec le CYP2D s'effectue via une liaison ionique précise qui exige une forte sélectivité envers la région moléculaire qui sera métabolisée. D'autre part, le site de liaison du CYP3A est très flexible et dépend

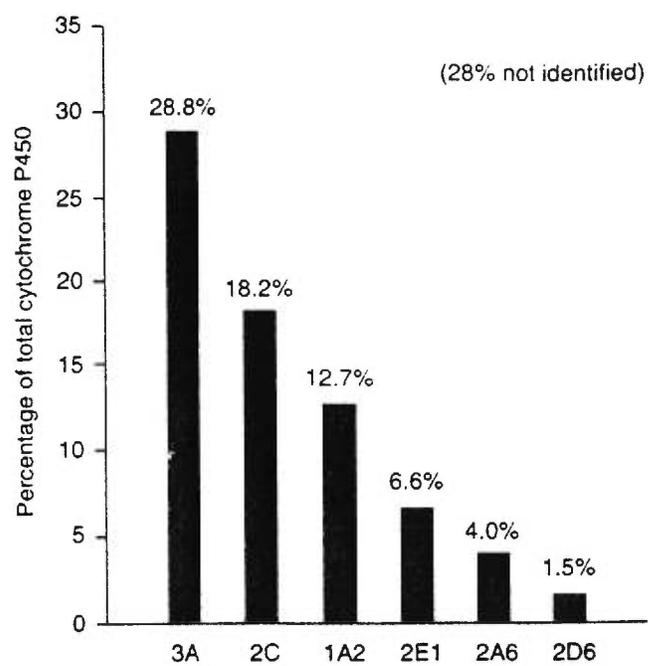


Figure 2.2 Quantité moyenne relative d'isoenzymes du cytochrome P450 déterminée au niveau du foie d'humain (von Moltke et coll., 1995)

principalement des forces hydrophobes entre ce CYP et son substrat. Par conséquent, le CYP3A entraîne le métabolisme de tous les sites vulnérables du médicament interagissant avec son site de liaison (Smith et Jones, 1992). D'ailleurs, l'analyse des différents substrats métabolisés par ces deux CYPs permet de constater l'uniformité du site moléculaire des produits métabolisés par le CYP2D, alors que la forme moléculaire des médicaments métabolisées par le CYP3A est très différente.

2.4 Métabolisme extra-hépatique

Il a été démontré que plusieurs organes ou tissus participent au métabolisme des médicaments. Toutefois, la contribution réelle de ces organes peut être parfois négligeable en raison de leur emplacement anatomique, de la perfusion de l'organe, de la présence et de la concentration d'enzymes, etc. Les principaux organes susceptibles de modifier significativement la biodisponibilité des médicaments sont l'intestin, les poumons et les reins (Krishna et Klotz, 1994; Guenguerich, 1994).

La plupart des réactions de phase I sont médiées par les isoenzymes du cytochrome P450 qui se retrouvent principalement au niveau des microsomes hépatiques alors que les réactions médiées par les enzymes cytosoliques se manifestent un peu partout dans l'organisme et sont principalement de phase II (Pacifici et coll., 1988a).

2.4.1 Intestin

En raison de son emplacement anatomique et de son contenu enzymatique, la muqueuse gastrointestinale influence de manière considérable le métabolisme pré-systémique des médicaments. En fait, tout produit administré oralement sera mis en contact avec le contenu ou la paroi gastro-intestinale et pourra subir une biotransformation pré-systémique. Les enzymes démontrant métaboliques vis-à-vis des médicaments sont principalement localisés au niveau des cellules épithéliales de l'intestin (Hoensch et co., 1976; Traber et coll., 1988); cette activité est plus grande au niveau des villosités et diminue progressivement vers l'intérieur des cryptes. Il est également établi que l'activité enzymatique de l'intestin est plus importante au niveau du duodénum et du jéjunum qu'au niveau de l'iléon et du côlon (Schwenk et Locker, 1985; Traber et coll., 1988). Finalement, les micro-organismes intestinaux peuvent aussi participer au métabolisme des médicaments.

2.4.1.2 Lumière intestinale

Les micro-organismes de la lumière intestinale peuvent métaboliser les produits administrés oralement ainsi que ceux transférés de la circulation systémique vers la lumière intestinale (excrétion biliaire ou sécrétion via les cellules épithéliales) (Ilett et coll., 1990; Goldin, 1990). Ces micro-organismes sont d'ailleurs étroitement impliqués dans la circulation entéro-hépatique des médicaments: les produits sécrétés dans l'intestin via la circulation biliaire étant généralement conjugués à des groupements polaires tels que l'acide glucuronique, la glycine, le glutathion et les

sulfates, ils peuvent être hydrolysés par la β -glucuronidase, la sulfatase et une variété de glycosidases avant d'être réabsorbés.

En raison de la plus faible concentration d'enzymes impliqués dans le métabolisme des médicaments, l'activité enzymatique de la flore intestinale est quantitativement moins importante que celle présente au niveau de la muqueuse intestinale (Ilett et coll., 1990). Toutefois, contrairement aux réactions d'oxydation et de conjugaison observées au niveau du foie et de la muqueuse intestinale, le métabolisme bactérien est essentiellement une réaction de dégradation, d'hydrolyse et de réduction avec un potentiel pour l'activation des xénobiotiques (Ilett et coll., 1990; Goldin, 1990).

2.4.1.1 Muqueuse intestinale

L'activité enzymatique du tractus gastro-intestinal réside principalement au niveau des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale (Hoensch et coll., 1976; Traber et coll., 1988). Comme tout produit administré oralement entrera en contact avec ces cellules lors de leur absorption, leur biotransformation surviendra si les enzymes requis sont présents en quantité suffisante (Klippert et coll., 1985; Koster et coll., 1985a). D'autre part, le temps de contact entre l'enzyme et le médicament qui dépend de la vitesse d'absorption du produit (Borm et coll., 1985) influencera aussi les réactions enzymatiques. En plus du métabolisme détecté au moment de l'absorption des médicaments, il est possible que certains produits puissent transférer de la circulation sanguine vers la lumière intestinale et, par conséquent, y être métabolisés (Ilett et Davis, 1982).

Parmi les réactions observées au niveau intestinal, on remarque la dé-estérification ainsi que des réactions de phase I telles la N-déméthylation, la déamination, la N-hydroxylation et la O-déalkylation, et des réactions de phase II telles que la glucuronidation, la sulfatation, la N-acétylation et la conjugaison au glutathion et à la glycine. Donc, la muqueuse intestinale est responsable d'une grande variété de réactions enzymatiques et peut influencer le métabolisme des médicaments.

2.4.2 Poumons

Les microsomes pulmonaires sont qualitativement semblables aux microsomes hépatiques (Hook et Bend, 1976; Devereux et coll., 1989). Cependant, tel qu'établit avec le rein, le cerveau ou la peau, la concentration pulmonaire de cytochromes P450 est faible lorsque comparée à celle du foie et de l'intestin. Les isoenzymes pulmonaires seraient principalement concentrés au niveau des cellules de type Clara et des pneumocytes de type II (Boyd, 1977; Domin et coll., 1986). On y retrouve également des enzymes de conjugaison tels que l'UDPGT et la ST (Pacifci et coll., 1988a; Capiello et coll., 1991). Parmi les réactions enzymatiques observées, on remarque que les composés aromatiques simples et les amines secondaires y sont plus facilement métabolisés (Anderson et coll., 1974; Junod, 1976; Wilson et coll., 1980).

Mis à part l'activité enzymatique, une variété de composés endogènes et exogènes peuvent s'accumuler au niveau pulmonaire (Junod, 1976). En effet, certains produits tels le propranolol (Geddes et coll., 1979) et la lidocaine (Jorfeldt et coll.,

1979) sont fortement séquestrés par les poumons suivant leur administration. En fait, l'accumulation des médicaments au niveau pulmonaire semble étroitement liée aux caractéristiques physico-chimiques des médicaments.

De manière générale, ces médicaments doivent être modérément ou fortement liposolubles, mais ce critère ne constitue pas à lui seul une certitude pour une accumulation pulmonaire. En fait, une substance très liposoluble comme le fentanyl devrait normalement être davantage séquestrée que le vérapamil qui est environ dix fois moins liposoluble (Roerig et coll., 1987). Cependant, le pourcentage d'accumulation pulmonaire de ces deux substances est semblable. Dans le cas contraire, le diazépam qui est fortement liposoluble devrait être séquestré par les poumons, mais il semble que son faible pKa empêche cette accumulation puisqu'il est non-ionisé au pH physiologique (Roerig et coll., 1989). Finalement, malgré un pKa élevé et une très grande liposolubilité, les substances anioniques tel le thiopental ne sont que faiblement séquestrées par les poumons (Geddes et coll., 1979). On peut donc assumer que seules les amines cationiques liposolubles ayant un pKa supérieur à 8 peuvent être significativement séquestrés par les poumons (Roerig et coll., 1989).

Les mécanismes impliqués dans l'accumulation pulmonaire des médicaments ne sont pas entièrement élucidés, mais il semble que ce processus soit principalement relié à la simple diffusion des médicaments (Junod, 1976; Wilson et coll., 1980). La dépendance de la liposolubilité indique que de tels produits se lieraient à des structures lipophiliques, probablement les lipoprotéines, et que les sites de captation

devraient inclure les cellules endothéliales vasculaires pulmonaires en raison de leur contact direct avec ces produits (Roerig et coll., 1989). L'accumulation pulmonaire des médicaments serait également dépendante de l'affinité du produit pour les sites lipophiliques puisque l'affinité du médicament pour les protéines plasmatiques influencerait cette accumulation. En fait, les médicaments liés à l'albumine seraient moins séquestrés que ceux liés à l'alpha-glycoprotéine acide (Brinkschulte et coll., 1980; Piasky et Borga, 1980).

Les poumons peuvent influencer la biodisponibilité de certains médicaments, qu'ils soient administrés oralement ou par voie intraveineuse. Cependant, son rôle demeure quantitativement limité comparativement à celui du foie ou de l'intestin. D'autres études seront nécessaires afin d'identifier les médicaments susceptibles d'être métabolisés ou séquestrés par les poumons ainsi que les mécanismes responsables de ces activités.

2.5 Objectifs de la thèse

Malgré les études pharmacocinétiques réalisées avec le diltiazem, beaucoup d'interrogations demeurent. En fait, il est établi que le métabolisme du diltiazem génère plus d'une vingtaine de métabolites, certains possédant une activité pharmacologique. Cependant, il n'a pas été démontré quels organes contribuaient à la biotransformation du diltiazem et quelles étaient les causes de l'accumulation du diltiazem observée suivant l'administration de doses répétées.

Tel que décrit dans le présent chapitre, il est évident que l'intestin, les poumons ainsi que d'autres organes contribuent au métabolisme des médicaments. Or, en raison des propriétés physico-chimiques (grande liposolubilité) et des données pharmacocinétiques connues (biodisponibilité variant entre 30 et 50%, formation de plusieurs métabolites, etc.) du diltiazem, il est permis de croire à un métabolisme hépatique et extra-hépatique. D'ailleurs, un des isoenzymes impliqués dans le métabolisme du diltiazem, le CYP3A4, se retrouve au niveau de plusieurs organes dont le foie et l'intestin. Ainsi, des études plus spécifiques sont nécessaires afin de mieux caractériser la pharmacocinétique du diltiazem.

L'objectif principal de cette thèse est donc de mieux définir la pharmacocinétique du diltiazem et d'expliquer les raisons de sa non-linéarité suivant un traitement chronique. De manière plus précise, les objectifs suivants ont été poursuivis:

- Evaluer la pharmacocinétique d'une formulation à libération prolongée du diltiazem chez l'humain suivant l'administration d'une dose unique et de doses répétées.
- Déterminer la contribution de l'intestin, du foie et des poumons dans le métabolisme du diltiazem *in vivo* chez le lapin.
- Définir et comparer le profil métabolique du diltiazem, *in vivo* et *in vitro* chez le lapin, suivant l'administration d'une dose unique et chronique de diltiazem.

DEUXIÈME PARTIE

PRÉSENTATION DES MANUSCRITS

Ce projet de recherche a été documenté et publié dans trois journaux scientifiques.

La première étude a été réalisée en collaboration avec la compagnie Marion Merrell Dow Canada Inc. et a nécessité la participation de plusieurs personnes dont les Dr. Jean Spénard, Yves Lacasse, Gilles Caillé et Patrick du Souich. Les résultats de cette étude ont été publiés en 1994 dans le journal scientifique "Biopharmaceutic and Drug Disposition".

La partie expérimentale de ce projet de recherche a été effectuée dans les laboratoires du Dr. Patrick du Souich et du Dr. Gilles Caillé. Les résultats de ces travaux ont été présentés et publiés en 1996 dans deux journaux scientifiques, soit dans le "Pharmaceutical Research" et dans le "Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics".

Ces trois articles sont présentés dans les chapitres suivants.

CHAPITRE 3

**PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS OF A SLOW RELEASE
FORMULATION OF DILTIAZEM (120 MG) AFTER THE ADMINISTRATION OF A
SINGLE AND REPEATED DOSES IN HEALTHY VOLUNTEERS.**

Publié dans: *Biopharm. Drug Dispos.*, 1994; 15(3): 227-242.

PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS OF A SLOW RELEASE
FORMULATION OF DILTIAZEM (120 MG) AFTER THE ADMINISTRATION OF A
SINGLE AND REPEATED DOSES IN HEALTHY VOLUNTEERS.

M. LEFEBVRE*, Y. LACASSE#, J. SPÉNARD+, D. GEADAH#, R. MOISAN, D.
GOSSARD#, H. LANDRIAULT+, P. DU SOUICH* AND G. CAILLÉ*

Département de Pharmacologie, Université de Montréal (*), Hôpital
Maisonneuve-Rosemont (#) and Nordic Merrel Dow Recherche (+).

Reprint requests should be addressed to:

Marc Lefebvre
Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine
Université de Montréal
C.P. 6128 Succ. A
Montréal, Québec
Canada, H3C 3J7
Telephone: (514)-343-7904
Fax: (514)-343-6120

Key words : Diltiazem, pharmacokinetics, pharmacodynamics, slow-release

ABSTRACT

Diltiazem is a calcium antagonist used in angina pectoris and hypertension, but only few informations concern the slow release (SR) formulation. Pharmacokinetics of diltiazem SR (120 mg) have been assessed on a 36-hour period in healthy volunteers after single (SD) and multiple dose (MD) administrations. C_{max} , AUC_{0-36} and $AUC_{0-\infty}$ were significantly increased at steady-state compared to the extrapolated single dose values, suggesting accumulation of the drug.

Renal and cardiovascular parameters have also been assessed at intervals of 3-6 h during baseline (B) and following SD and MD of diltiazem SR. Diuresis was increased, but not significantly, by the administration of diltiazem SR on a 24-h period (1782 mL (MD) and 1915 mL (SD), vs 1626 mL (B)); it was especially related to the sharp increase of the urine excretion noted at the intervals 6-9 h (147 mL/h) (MD) and 12-18 h (115 mL/h) (SD). Natriuresis and creatinine clearance were slightly decreased by diltiazem SR, compared to B values, which could be explained by the short period of time at steady-state (5 days), the effects of norepinephrine and angiotensine II on renal vasculature and the pharmacokinetics of diltiazem SR. No increase in the systolic blood pressure occurred with the administration of diltiazem SR; diastolic blood pressure and PR interval were decreased and increased respectively by diltiazem SR. These results do not appear to be clinically significant.

Finally, no relation has been found between pharmacokinetics and pharmacodynamics of diltiazem. It may be attributed to the absence of clinically

significant effect in healthy volunteers, the presence of active metabolites, the pharmacokinetics of the SR formulation and/or the accumulation of the drug at steady state.

INTRODUCTION

Diltiazem, a benzothiazepine-like derivative, is a calcium channel blocker useful in the treatment of hypertension and angina pectoris (1-4). The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of the conventional formulation of diltiazem have been studied extensively, but little is known about those of the slow release (SR) formulation.

Approximately 90% of an orally administered dose of diltiazem is absorbed (4,5). The mean absolute bioavailability, after administration of a single oral dose, including the SR formulation, is about 30 to 40% largely due to a substantial first-pass effect (6,7). Accumulation occurs after multiple dosing of the conventional formulation of diltiazem (4).

Calcium channel blockers exert tubular and vascular effects on the kidneys (8,9). Some studies have demonstrated that diltiazem and calcium antagonists do not affect renal parameters (10-12), but other reports indicated that they have the potential to maintain or improve glomerular filtration, increase urine output and sodium excretion (13,14). There is also some controversy about the effect of diltiazem on atrioventricular conduction. In some studies, the PR-interval was not changed by the administration of diltiazem (15-17), but prolongation has also been reported (18-20). These differences may be attributed to acute vs chronic treatment with diltiazem, variable pharmacokinetics or the administration of different doses. The formulation may also affect the response to the drug (18).

The objectives of the present study were then to assess and compare the renal and the cardiovascular activities related to the pharmacokinetics of a slow release formulation of diltiazem (Cardizem SR 120 mg, Marion Merrell Dow Inc., Québec, Canada), after single and multiple dose administrations to healthy volunteers.

MATERIALS AND METHODS

Twenty-four (24) healthy male Caucasian volunteers consented to take part in this study. They were aged between 21 and 33 (26.8 ± 3.9 years; means \pm SD) with a mean body weight of 77.3 ± 6.5 kg. It was an open-label trial conducted in one center. All subjects had normal medical, biochemical and hematological profiles. The participants were non-smokers or ex-smokers for at least one year and within 15% of their average body weight. Finally, all individuals had pulse rates over 50 bpm, systolic blood pressure (BP) over 90 and under 160 mm Hg, diastolic BP under 95 mm Hg, and no presence of AV block (any grade). In this study, the lower limit considered for a first degree AV block was 225 msec. The protocol was approved by the ethics committee.

The study was divided into four periods: pre-baseline (days 0 to 4), baseline (day 5), single dose (days 6 and 7) and multiple dose administrations (days 8 to 14). The baseline period started at 7:00 hours on day 5; the single doses of diltiazem SR (120 mg) were administered at 7:00 hours on day 6. During the repeated administration period, diltiazem SR 120 mg was taken every 12 hours (7:00 and 19:00 hours) and the last dose was ingested at 7:00 hours on day 13. All

participants were required to follow a no-salt diet during the pre-baseline period; they were also required to be in the metabolic unit 24 hours before the baseline period (days 4 to 7) and before the last of the multiple doses administration of diltiazem SR (days 12 to 14) to standardize their diet containing 150 mmols of sodium and 100 mmols of potassium per day.

Pharmacokinetics

Blood samples were collected over a 36-hour (h) period beginning on the morning prior to and at 0.75, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5, 9, 10.5, 12, 15, 18, 21, 24, 30 and 36 h after the single dose (day 6 morning), and beginning after the last of the multiple doses (day 13 morning) of diltiazem SR.

Pharmacodynamics

Blood samples were collected on the morning prior to and at 1.5, 4.5, 7.5, 10.5, 15, 21 and 30 h after baseline, single and multiple dose administrations of diltiazem SR to measure sodium, potassium and creatinine in serum. Urine was also collected over 7 consecutive periods (0 to 3, 3 to 6, 6 to 9, 9 to 12, 12 to 18, 18 to 24, and 24 to 36 h) after baseline, single and the last of the multiple dose administrations of diltiazem SR to measure sodium, potassium, creatinine and diuresis. Sodium and potassium were measured by flame photometry, and creatinine, by spectrophotometry.

Systolic and diastolic blood pressure, pulse rate and PR interval were measured and compared at 0, 3 and 9 h after baseline, single and the last of the multiple dose administrations of diltiazem SR.

Drug analysis

Plasma concentrations of diltiazem and of its two major metabolites, N-desmethyldiltiazem (MA) and desacetyldiltiazem (DAD), were measured by HPLC (21); the limit of detection is 2.5 ng/mL. Plasma was separated by centrifugation and kept frozen (-20°C) until analysed one or two weeks later.

Pharmacokinetic analysis

Pharmacokinetic parameters of diltiazem SR (C_{max} , t_{max} , k_{el} or β , $t_{1/2}$, AUC_{0-36} and $AUC_{0-\infty}$) were compared after single and multiple dose administrations. The maximum plasma concentration (C_{max}) and the time to reach maximum plasma concentration (t_{max}) were observed values. Using the JANA software (Statistical Consultants Inc., Lexington, Kentucky 40508, 1987), each individual plasma concentration-time curve was stripped in order to determine the appropriate model. The apparent $t_{1/2}$ was calculated by $\ln 2 / \beta$. The area under the plasma concentration versus time curve was estimated by the trapezoidal method (22). The accumulation index for diltiazem was calculated as: $1/(1-e^{-k_{el}T})$ (22) where T corresponds to the interval of administration of diltiazem.

Data and statistical analysis

Pharmacokinetic parameters were submitted to a one-way analysis of variance using the dose as a repeated factor. Drug accumulation was evaluated by comparing the AUC_{0-36} , $AUC_{0-\infty}$ and C_{max} extrapolated from the single dose profile to steady-state with the values observed after the last of the multiple doses.

Pharmacodynamic parameters were compared with the corresponding time values in baseline, single dose and multiple dose regimens. The level of significance was fixed at 5% (two-sided). The hypothesis (pharmacodynamic response versus dosage regimens at each time) was submitted to a one-way analysis of variance using the dose as a repeated factor to determine differences over time. When the overall F-test was found to be significant, contrasts using the Bonferroni method were applied to determine which individual regimen is different from the others.

RESULTS

Pharmacokinetics

Mean plasma concentrations of diltiazem after single and multiple dose administrations are shown in Figure 3.1. The coefficients of variation for all these values were around 35%, but were higher for the 30 and 36-h mean plasma concentrations (57 to 80%). No model gave a good fit for the pharmacokinetic data derived from the 36-h concentration-time profile. The usual multi-compartment open

model was not well suited because the β -phase was either faster or slower than the α one.

Statistically significant differences were observed between some pharmacokinetic parameters of diltiazem SR after single and multiple dose administrations (Table 3.1). The mean C_{max} increased significantly from 72.6 to 132.8 ng/mL at steady-state; the mean $t_{1/2}$ decreased from 6.4 to 5.8 h, but it was not significant. The AUC_{0-36} and the $AUC_{0-\infty}$ were also significantly higher following the multiple doses treatment (Table 3.1). According to the normal accumulation index, the observed terminal AUC_{0-36} and $AUC_{0-\infty}$ at steady-state were much higher than the extrapolated ones (1026 and 1080 ng.h/mL) respectively. Furthermore, the expected C_{max} (87.5 ng/mL) was far below than the observed one. This suggests that diltiazem accumulates after multiple doses administration (120 mg twice a day).

The pharmacokinetics of its metabolites were also evaluated. Few DAD was detected in plasma samples and, as consequence, no pharmacokinetic model could be applied. The pharmacokinetic characteristics of MA were comparable to those of diltiazem. The C_{max} , the AUC_{0-36} and the $AUC_{0-\infty}$ (mean \pm SEM) were significantly greater at steady-state (49.6 ± 2.2 ng/mL, 964 ± 50 ng.h/mL and 1036 ± 60 ng.h/mL), respectively, than after single dose administrations (26.1 ± 1.1 ng/mL, 385 ± 15 ng.h/mL and 446 ± 16 ng.h/mL). The $t_{1/2}$ and the t_{max} values for MA were greater than those for diltiazem; the multiple dose values (8.2 ± 0.3 h and 8.5 ± 0.5 h) respectively, were less than those calculated from the single dose data (9.0 ± 0.4 h and 9.9 ± 0.4 h).

Renal effects

Diuresis

The urine elimination rate, compared to the baseline values, was significantly higher during the 6 to 9-h interval of the multiple dose regimen and during the 12 to 18-h interval of the single dose administration of diltiazem SR (Figure 3.2). The cumulative urinary volume profiles were similar for each of the three regimens. The 24-h diuresis, relative to the baseline value (1626 ± 78 mL) (mean \pm SEM), was higher, but not significantly, during the steady-state regimen (1782 ± 52 mL); it was significantly higher after the single dose administration of diltiazem SR (1915 ± 76 mL).

Sodium and Potassium

Although many inter-regimen differences were statistically significant, all sodium levels in serum were between 137.0 and 140.9 mmols/L. However, almost all single and multiple doses sodium renal clearances were significantly lower than the baseline values (Table 3.2). The potassium renal clearance was the parameter least affected by the administration of diltiazem SR (Table 3.2).

Serum creatinine and creatinine clearance

The serum creatinine levels throughout the three regimens were close (105 to 119

$\mu\text{moL/L}$). The peak levels for all regimens occurred between 7.5 and 15 h (112 to 119 $\mu\text{moL/L}$).

The comparisons of each regimen, between 7.5 and 21 h, indicated that the baseline creatinine clearance was significantly higher than the multiple dose values. The single dose creatinine clearance was also significantly higher, between 15 and 21 h, than the corresponding multiple dose treatment (Figure 3.3).

Cardiovascular parameters

The systolic blood pressure remained steady following the single and the multiple dose administrations of diltiazem SR. However, the baseline systolic blood pressure increased significantly at 9 h post-dose to a point where it was significantly higher than the single and the steady-state values (Table 3.3).

The multiple dose diastolic blood pressure was consistently lower than the baseline and the single dose values. This difference was significant at 3 and 9 h respectively for the single and the baseline data (Table 3.3).

No significant inter-regimen differences, in heart rate, was found between baseline, single dose and multiple dose regimens (Table 3.3).

The multiple doses PR interval was significantly longer than those measured during the baseline and the single dose regimens. The single dose value was significantly

longer than the baseline one at 9 h (Table 3.3).

DISCUSSION

Pharmacokinetics

It has been reported that diltiazem obeys a multicompartment model (4), but in this study, the assumptions for applying such a model were inappropriate. In cases where a two-compartment open model might, at first, have appeared to fit the data, the terminal elimination rate constant (β) would be larger than the distribution rate constant (α).

The greater β may be attributed to the wide variation (57 to 80%) in the 30 and 36 h concentrations of diltiazem in plasma; a flip-flop kinetic may also explain this result. On the other hand, the SR formulation may surely affect the elimination slope and explain the variation of the β -phase. In fact, this situation has not been reported in previously studies with the conventional formulation of diltiazem (4).

The pharmacokinetics of diltiazem SR after single and multiple dose administrations were assessed previously, but on the basis of a 24-h plasma concentration profile (23). No variation in the β -phase was reported since the protocol was evaluated on a 24-h profile. In the present study, the pharmacokinetic parameters of diltiazem would not be influenced by a 24-h evaluation of the data; however, a $t_{1/2}$ of 6.5 instead of 5.8 h would be obtained at steady-state.

Accumulation of diltiazem occurs after the repeated doses of diltiazem SR, as evidenced by the significant increases in the AUCs and the C_{max} of diltiazem. It would be attributed to a first-pass metabolism decrease with multiple dosing of diltiazem (4). Accumulation of diltiazem SR was also reported (23), and the mean C_{max}, AUC₀₋₂₄ and t_{1/2} were increased significantly (93, 43 and 19% respectively) following multiple doses administration of diltiazem SR (23). Then, accumulation of diltiazem is noted with the conventional and the SR formulations.

The pharmacokinetics of DAD were not determined because few was detected in plasma samples: its presence would be related to the degradation and the metabolism of diltiazem (21). The pharmacokinetics of MA, calculated from 36-h data, were similar in many ways to those of the parent drug. The accumulation observed with diltiazem was also observed in the MA pharmacokinetic model: the accumulation index was about of 2 to 2.5 in both cases. Since this metabolite is active, it may influence the relation between the pharmacokinetics and the pharmacodynamics of diltiazem.

Pharmacodynamics

Although similar t_{max} were showed between single and multiple dose treatments, the maximum effects of the single dose regimen occurred occasionally later than the steady-state ones. These differences may be attributed to the presence of active metabolites, a delay in the hemodynamic response following the first dose of a SR formulation, the lower plasma concentrations, the pharmacokinetics of

diltiazem SR, the tolerance to the drug and/or the accumulation of diltiazem at steady-state.

Relation between plasma levels and pharmacodynamic activities would be better made with multiple dose data since plasma concentrations were at steady state and were high enough to favour some effects.

Renal effects

The sharp increase in the urinary excretion rate noted within the day may contribute to the hypotensive activity of diltiazem SR: the multiple dose urinary excretion rate was increased significantly during the 6 to 9-h interval and would be related to the C_{max} of diltiazem SR. The standardized dinner, served at 6 h post-dose, is unlikely to have contribute to this elevated urine output because this effect was not observed during the single dose regimen. In fact, the maximum urine excretion rate, after the single dose administration, occurred between 12 and 18 h (Figure 3.2). On the other hand, the SR formulation of diltiazem does not appear to affect the 24-h diuresis in healthy volunteers.

An increase in urine flow rate was expected because that was generally shown after an acute treatment with the conventional formulation of diltiazem (oral and intravenous infusion) (24,25). This activity was related to an increased renal plasma flow, to a diminution of the renal vasculature resistance, to a direct tubular action and/or to a combination of hemodynamic effects (26-28). On the other hand, long-

term treatments (up to 24 weeks) with diltiazem (up to 480 mg/day) usually had no effect on urine flow rate or fluid retention (11,12,28,29). Then, the urine excretion appears to be less affected by the SR formulation than the conventional one.

In contrast to the urine flow rate, the sodium excretion rate was lower during the administration of diltiazem SR, but the difference did not appear to be clinically significant. This effect was not expected because it has been reported that the sodium excretion was increased after acute administration of oral conventional formulations of diltiazem (24,30). However, it is reported that diltiazem has no effect on serum electrolyte levels over longer treatment periods (3,11,12,26-28).

The lower natriuresis noted with diltiazem SR may be related to the creatinine clearance. As sodium is filtered and mainly reabsorbed by the kidneys, a lower creatinine clearance would show a lower sodium excretion. As noted in Table 3.4, the amount of sodium filtered by the kidneys at steady-state was significantly lower ($p < 0.05$) than the baseline values. Sodium reabsorption may also be influenced by the administration of calcium channel blockers (13,27,31,32), but it was not observed in the present study. In fact, the percentages of sodium reabsorption were over 98.8% for all intervals and they were not statistically different. On the other hand, the two lowest values were noted during the baseline regimen between 9 and 18 h (Table 3.4). This small difference, compared to the single dose and the multiple dose values (0.4% which corresponds to 3.7 mmol/h), would account for the highest natriuresis observed during the baseline period and would explain the

statistical difference in sodium renal clearance.

The reasons for the small decrease in creatinine clearance are not clear. Generally, calcium antagonists have a preferential blocking effect on alpha₂-adrenergic receptor-mediated vasoconstriction which are mainly present in the afferent vascular region (13,26,33,34,38,39). However, the possibility of a reversal direct Angio II-mediated efferent arteriolar vasoconstriction is likely to occur (13,26,27,33,34). Since glomerular filtration rate is function of the pressure created by afferent arteriolar dilation and efferent arteriolar constriction, either constriction of the afferent arteriole or dilation of the efferent arteriole would result in a loss of glomerular pressure and a decrease in glomerular filtration rate (9).

In fact, acute renal failure has been observed with the administration of diltiazem (40). It has also been shown that the administration of diltiazem induced a vasodilation of 38 and 67% on the afferent and the efferent arterioles respectively (41). It may also be the case in the present study.

Furthermore, it appears that the effects on creatinine clearance may be different in healthy volunteers than in patients. It was reported that diltiazem, nifedipine and nicardipine increased the glomerular filtration rate and/or the renal plasma flow, especially in patients with renal impairment ($GFR < 80 \text{ mL/min/1.73 m}^2$) (27). Bauer and his colleagues (12,27,36) showed that diltiazem and dihydropyridines have the potential to enhance renal plasma flow, to maintain or improve the glomerular filtration rate, and to lower renal vasculature resistance. The glomerular filtration

rate was also improved by diltiazem, nifedipine and verapamil in hypertensive patients where renal vasoconstriction was established (27,36). However, these effects were not detected consistently: there have been studies by other investigators where none of these actions were observed (32,37). Chelingsworth et al do not find any increase in glomerular filtration rate in healthy volunteers (37). In addition, long-term treatments with calcium channel blockers usually do not alter renal functions in hypertensive patients and in healthy volunteers (12). Then, the slight diminution of the creatinine clearance may also be related to healthy volunteers.

Finally, it would have been interesting to verify these results after a longer treatment period. In fact, long-term treatment (generally several weeks in other studies) do not alter renal functions (8,11,12,26). It may be possible that some inter-regimen differences would have showed no statistical significance with baseline data after a few weeks.

Although some statistical differences have been noted, no renal effect which is likely to have clinical significance was observed after the administration of diltiazem SR in healthy volunteers on a short-term period (5 days); this stability may be an advantage over the conventional formulation of diltiazem.

In addition, no clear relation could be established between diuresis natremia, natriuresis, kalemia, kaliuresis, creatinine clearance, and the pharmacokinetics of diltiazem SR. The absence of relation may be due to the SR formulation since no

effect on renal functions which is likely to be clinically significant was observed with diltiazem, to the accumulation of the drug after multiple dose treatment and to the presence of active metabolites.

Cardiovascular effects

It is well recognized that diltiazem and other calcium channel blockers are more effective in reducing blood pressure of hypertensive patients than healthy volunteers (4,42). It was established that the hypotensive activity of calcium channel blockers was enhanced in the presence of vasoconstriction. In fact, the efficacy of calcium channel blockers in producing renal vasodilation was largely determined by the pre-existing vascular tone (32).

In the present study, the hypotensive activity of diltiazem SR was evident in that the increase in the baseline systolic blood pressure at 9 h post-dose did not occur after treatment with diltiazem SR. It may be related to the efficacy of diltiazem to block the elevation of the systolic blood pressure, to a relation with the t_{max} of diltiazem SR (around 8.5 h), and to the elevated diuretic effect observed at this time. The effects on diastolic blood pressure are in accord with those on the systolic blood pressure.

As it has been shown in many studies, a lengthening of the PR interval occurs after the administration of diltiazem (8,9). In the present study, the PR interval was significantly longer at each time in the multiple dose regimen compared to baseline

values; it may be directly related to the blood levels of diltiazem. On the other hand, this extent is probably not sufficient to be clinically significant.

AV block has also been reported to be a consequence of the administration of diltiazem (43). The comparison of a conventional formulation vs a SR one revealed that the PQ interval was extended by the administration of both formulations (18). However, it was shown that the extension of the PQ interval was longer by the conventional formulation than the SR one, respectively, after single (187 vs 163 msec) and multiple dose administrations of diltiazem (197 vs 174 msec) (18). Thus, the formulation of diltiazem may have different influences on the PQ interval and probably on the other parameters.

This last study was important because very few compared the conventional and the SR formulations, and showed that the formulation may alter differentially the pharmacodynamic parameters of diltiazem.

Then, systolic and diastolic blood pressure, and PR interval appear to be affected by the slow release formulation of diltiazem in healthy volunteers, and it corresponds well to that reported with the conventional formulation (4).

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank Marion Merrell Dow Inc. for providing the diltiazem products and for the financial contribution to this study.

Table 3.1 Mean (n = 24) pharmacokinetic parameters (\pm SEM) of diltiazem SR calculated from 36-hour plasma concentration vs time profiles

Parameters	Single dose	Multiple doses	p
C _{max} (ng/mL)	72.6 \pm 4.7	132.8 \pm 9.4	0,0001
t _{max} (h)	8.5 \pm 0.2	7.8 \pm 0.5	N.S. *
t _{1/2} (h)	6.4 \pm 0.3	5.8 \pm 0.2	N.S. *
AUC ₀₋₃₆ (ng.h/mL)	746 \pm 43	1924 \pm 143	0,0001
AUC _{∞} (ng.h/mL)	787 \pm 43	1973 \pm 148	0,0001

* Non-significative

Table 3.2 Mean (n = 24) effect (± SEM) of time and dosage regimen on sodium and potassium renal clearances

Interval (h)#	Sodium				Potassium			
	Baseline (mL/sec)	Single dose (mL/sec)	Multiple doses (mL/sec)	Diff* (p < 0.05)	Baseline (mL/sec)	Single dose (mL/sec)	Multiple doses (mL/sec)	Diff* (p < 0.05)
0-3	8.7 ± 0.8	11.9 ± 1.2	9.1 ± 0.7	1-3	0.25 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.02	---
3-6	13.6 ± 2.2	11.8 ± 0.9	8.1 ± 0.8	-2-	0.41 ± 0.06	0.35 ± 0.01	0.34 ± 0.02	---
6-9	11.6 ± 0.9	9.5 ± 0.7	8.0 ± 0.7	-2-	0.31 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.28 ± 0.02	---
9-12	20.5 ± 1.3	14.1 ± 1.1	12.0 ± 1.1	12-	0.41 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.03	---
12-18	22.1 ± 0.9	15.2 ± 1.0	12.6 ± 0.9	12-	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.28 ± 0.01	---
18-24	11.2 ± 1.3	8.1 ± 0.8	10.0 ± 0.9	1-3	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	12-
24-36	---	13.3 ± 0.6	15.0 ± 0.6	---	----	0.36 ± 0.01	0.39 ± 0.01	---

* 1 = significant difference between baseline and single dose
 2 = significant difference between baseline and multiple dose
 3 = significant difference between single dose and multiple dose
 # time = 0 corresponds to 7h00 in the morning

Table 3.3 Mean (n = 24) effect (\pm SEM) of time and dosage regimen on cardiovascular parameters

Time (h)#	Systolic blood pressure				Diastolic blood pressure			
	Baseline (mm Hg)	Single dose (mm Hg)	Multiple doses (mm Hg)	Diff* (p < 0.05)	Baseline (mm Hg)	Single dose (mm Hg)	Multiple doses (mm Hg)	Diff* (p < 0.05)
0	105 \pm 2	106 \pm 3	105 \pm 2	---	63 \pm 2	65 \pm 2	61 \pm 2	---
3	105 \pm 2	105 \pm 2	104 \pm 2	---	62 \pm 1	65 \pm 2	59 \pm 2	-3
9	112 \pm 2	107 \pm 2	105 \pm 2	12-	63 \pm 1	60 \pm 1	58 \pm 1	-2-

(h)#	Heart Rate			PR Interval		
	(beats/min)	(beats/min)	(beats/min)	(msec)	(msec)	(msec)
0	53 \pm 1	53 \pm 1	54 \pm 1	155 \pm 4	152 \pm 4	165 \pm 4
3	53 \pm 1	53 \pm 1	54 \pm 1	152 \pm 4	155 \pm 4	160 \pm 4
9	59 \pm 2	61 \pm 2	58 \pm 1	147 \pm 3	156 \pm 4	162 \pm 4

* 1 = significant difference between baseline and single dose
 2 = significant difference between baseline and multiple dose
 3 = significant difference between single dose and multiple dose
 # time = 0 corresponds to 7h00 in the morning

Table 3.4 Mean (n = 24) effect of time and dosage regimen on sodium reabsorption

Interval (h)#	Baseline Na*			Single dose Na*			Multiple doses Na*		
	filt (mmols/h)	excr	reab (%)	filt (mmols/h)	excr	reab (%)	filt (mmols/h)	excr	reab (%)
0-3	864	4,4	99,5	790	6	99,2	768	4,5	99,4
3-6	825	6,8	99,2	802	5,9	99,3	779	4	99,5
6-9	922	5,8	99,4	845	4,8	99,4	831	4	99,5
9-12	953	10,3	98,9	874	7	99,2	825	6	99,3
12-18	928	11,2	98,8	856	7,6	99,1	787	6,2	99,2
18-24	790	5,6	99,3	772	4,1	99,5	711	5	99,3
24-36	---	---	---	758	6,7	99,1	771	7,5	99

* Na = sodium; filt = filtered; excr = excreted; reab = percentage reabsorbed
time = 0 corresponds to 7h00 in the morning

Figure 3.1. Mean (n=24) plasma concentration-time profiles (\pm SEM) of diltiazem SR following the administration of (A) a single dose and (B) the last of repeated doses in healthy volunteers.

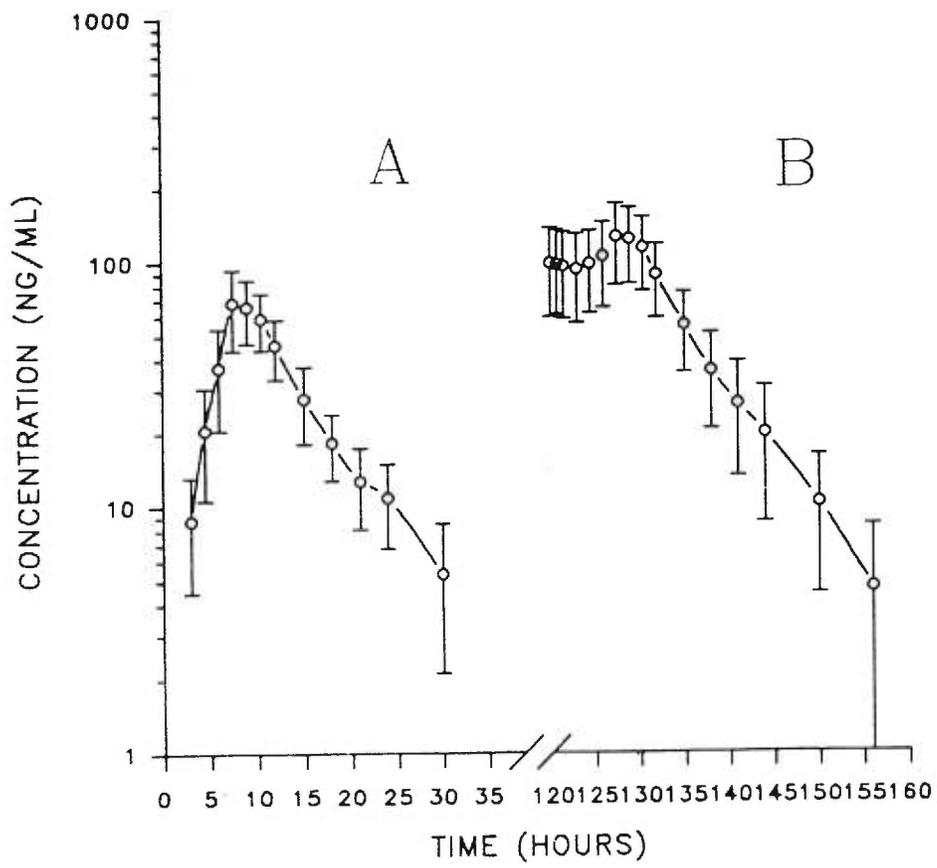


Figure 3.2. Mean (n = 24) effect (\pm SEM) of time and dosage regimen on urine elimination rate.

* significantly different ($p < 0.05$) than other regimen data

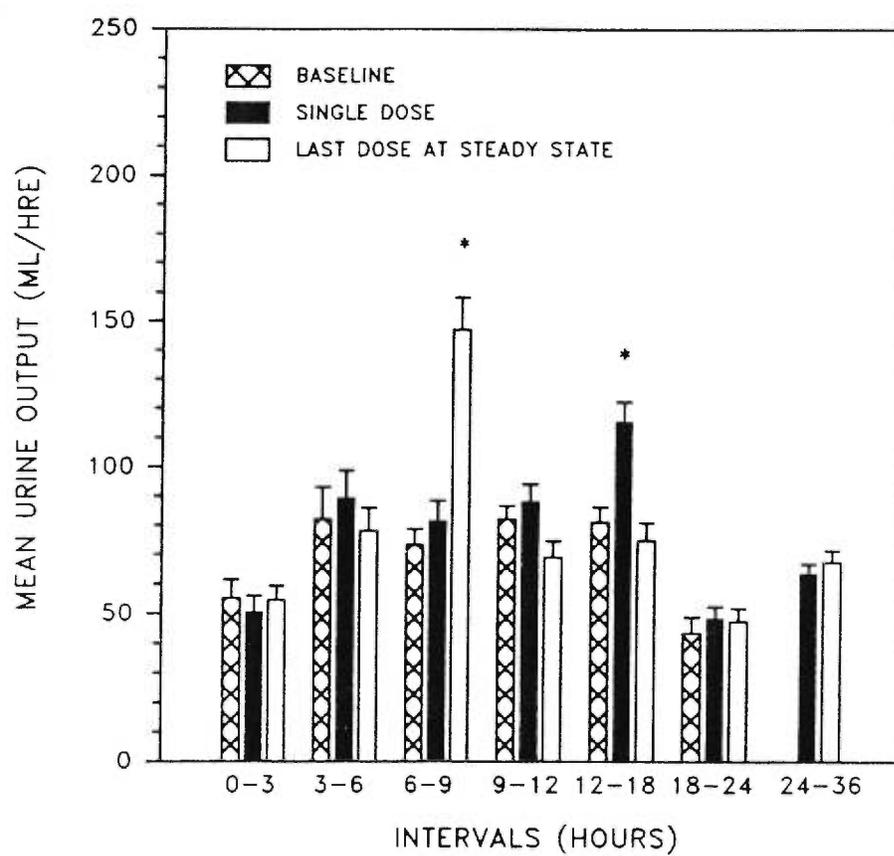
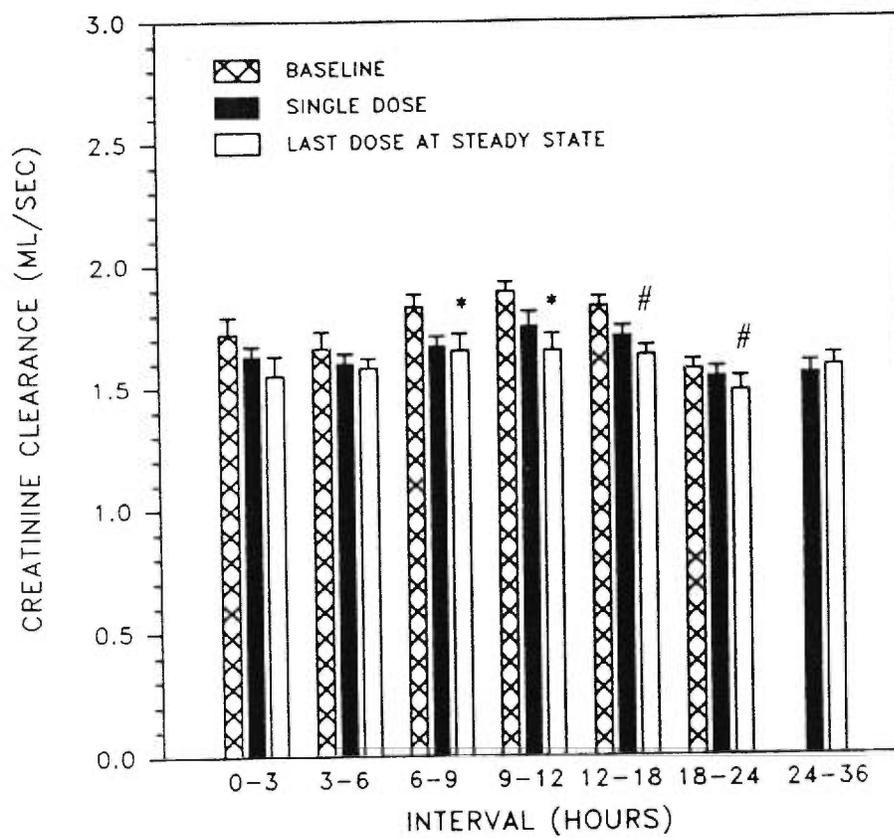


Figure 3.3. Mean (n = 24) effect (\pm SEM) of time and dosage regimen on creatinine clearance.

* significantly different ($p < 0.05$) than baseline data

significantly different ($p < 0.05$) than baseline and single dose data



REFERENCES

- 1) M Sato, T Nagao, I Yamaguchi, H Nakajima, A Kiyomoto. Pharmacological studies on a new 1,5-benzothiazepine derivative (CRD-401). *Arzneim.-Forsch.* 1971; 21: 1338-43.
- 2) T Nagao, M Sato, H Nakajima, A Kiyomoto. Studies on a new 1,5-benzothiazepine derivative (CRD-401): Vasodilators actions. *Jap J. Pharmacol.* 1972; 22: 1-10.
- 3) HAJ Struyker-Boudier, JFM Smits, JGR De Mey. The pharmacology of calcium antagonists: a review. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990; 15 (suppl. 4): S1-S10.
- 4) MMT Buckley, SM Grant, KL Goa, D McTavish, EM Sorkin. Diltiazem: a reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs.* 1990; 39 (5): 757-806.
- 5) RW Piepho, DC Bloedow, JP Lacz, DJ Runser, DC Dimmitt, RK Browne. Pharmacokinetics of diltiazem in selected animal species and human beings. *Am J Cardiol.* 1982; 49: 525-8.
- 6) HR Ochs, M Knuchel. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of diltiazem in humans. *Klin Wochenschr.* 1984; 62: 303-6.

- 7) MS Smith, CP Verghese, DG Shand, ELC Pritchett. Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of diltiazem. *Am J Cardiol.* 1983; 51: 1369-74.
- 8) HAJ Struyker-Boudier, JFM Smits, JGR De Mey. The pharmacology of calcium antagonists: a review. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990; 15 (suppl. 4): S1-S10.
- 9) L Chan, RW Schrier. Effects of calcium channel blockers on renal function. *Annu Rev Med.* 1990; 41: 289-302.
- 10) GG Krishna, LJ Riley, G Deuter, SC Kapoor, RG Narins. Natriuretic effect of calcium channel blockers in hypertensives. *Am J Kidney Dis.* 1991; 18(5): 566-72.
- 11) S Sunderrajan, G Reams, JH Bauer. Renal effects of diltiazem in primary hypertension. *Hypertension.* 1986; 8: 238-42.
- 12) JH Bauer, G Reams. Short- and long-term effects of calcium entry blockers on the kidney. *Am J Cardiol.* 1987; 59: 66A-71A.
- 13) S Sunderrajan, G Reams, JH Bauer. Long-term renal effects of diltiazem in essential hypertension. *Am Heart J.* 1987; 114: 383-88.

- 14) G Leonetti, C Cuspid, L Sampieri, L Terzoli, A Zanchetti. Comparison of cardiovascular, renal and humoral effects of acute administration of two calcium channel blockers in normotensive and hypertensive subjects. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1982; 4: S319-24.
- 15) K Aoki, K Sato, S Kondo, M Yamamoto. Hypotensive effects of diltiazem to normals and essential hypertensives. *Eur J Clin Pharmacol.* 1983; 25: 475-80.
- 16) P Hermann, SD Rodger, G Remones, JP Thenot, DR London, PL Morselli. Pharmacokinetics of diltiazem after intravenous and oral administration. *Eur J Clin Pharmacol.* 1983; 24: 349-52.
- 17) WE Strauss, KM McIntyre, AF Parisi, W Shapiro. Safety and efficacy of diltiazem hydrochloride for the treatment of stable angina pectoris: report of a cooperative clinical trial. *Am J Cardiol.* 1982; 49: 560-6.
- 18) A Gordin, P Pohto, S Sundberg, S Nykanen, H Haataja, P Mannisto. Pharmacokinetics of slow-release diltiazem and its effect on atrioventricular conduction in healthy volunteers. *Eur J Clin. Pharmacol.* 1986; 31: 423-6.
- 19) C Kawai, T Konishi, E Matsuyama, H Okazaki. Comparative effects of three calcium antagonists, diltiazem, verapamil and nifedipine, on the

- sinoatrial and atrioventricular nodes. *Circulation*. 1981; 63: 1035-42.
- 20) ME Safar, Ach Simon, JA Levenson, JL Cazor. Hemodynamic effects of diltiazem in hypertension. *Circ Res*. 1983; 51: 1369-74 .
- 21) G Caillé, L Dubé, Y Théorêt, F Varin, N Mousseau, I McGilveray. Stability study of diltiazem and two of its metabolites using a high performance liquid chromatographic method. *Biopharm Drug Disposit*. 1989; 10: 107-14.
- 22) M Rowland and TN Towser. *Clinical pharmacokinetics; concepts and applications*. Lea and Febiger eds. 2nd ed; Philadelphia, 1989.
- 23) AMM Sheppard, C Leforce, GD Park, RS Hoop, S Weir. The determinants of response to diltiazem in hypertension. *Clin Pharmacol Ther*. 1991; 50: 338-49.
- 24) M Kinoshita, R Kusukawa, Y Shimono, M Moromura, G Tomonaga, T Hoshino. Effects of diltiazem hydrochloride on renal hemodynamics and urinary electrolyte excretion. *Jap Circ J*. 1978; 42: 553-60.
- 25) GP Reams, A Lau, C Messina, D Villarreal, JH Bauer. Efficacy, electrocardiographic and renal effects of intravenous diltiazem for essential hypertension. *Am J Cardiol*. 1987; 60: 781-841.

- 26) T Steele, L Challoner-Hue. Renal interactions between norepinephrine and calcium antagonists. *Kidney Int.* 1984; 26: 79-84.
- 27) S Sunderrajan, G Reams, JH Bauer. Long-term renal effects of diltiazem in essential hypertension. *Am Heart J.* 1987; 114: 383-8.
- 27) JH Bauer, S Sunderrajan, G Reams. Effects of calcium entry blockers on renin-angiotensin-aldosterone system, renal function and hemodynamics, salt and water excretion and body fluid composition. *Am J Cardiol.*, 1985; 56: 62H-67H.
- 28) IK Inouye, BM Massie, N Benowitz, P Simpson, D Loge. Antihypertensive therapy with diltiazem and comparison with hydrochlorothiazide. *Am J. Cardiol.* 1984; 53: 1588-92.
- 29) M Kinoshita, R Kusukawa, Y Shimono, M Motomura, G Tomonaga, T Hoshino. The effect of diltiazem hydrochloride upon sodium diuresis and renal function in chronic congestive heart failure. *Arzneim-Forsch.* 1979; 29 (1): 676-81.
- 30) I Yamaguchi, K Ikezawa, T Takada, A Kiyomoto. Studies on a new 1,5-benzothiazepine derivative: effects on renal blood flow and renal function. *Jpn J Pharmacol.* 1974; 24: 511-22.

- 31) JC Romero, LR Raij, JP Granger, LM Ruilope, JL Rodicio. Multiple effects of calcium entry blockers on renal function in hypertension. *Hypertension*. 1987;10:140-51.
- 32) R Loutzenhiser, M Epstein. Effects of calcium antagonists on renal hemodynamics. *Am J Physiol*. 1985; 249: F616-29.
- 34) R Loutzenhiser, M Epstein. Renal hemodynamic effects of calcium antagonists. *Am J Med*. 1982; 82 (suppl 3): 23-8.
- 35) RJ Barrett, KF Wright, DR Taylor, AG Proakis. Cardiovascular and renal action of calcium channel blocker chemical subgroup: a search for renal specificity. *J Pharm Pharmacol*. 1988; 40: 408-14.
- 36) G Reams, A Hamory, A Lau, JH Bauer. Effect of nifedipine on renal function in patients with essential hypertension. *Hypertension*. 1988;11:425-56.
- 37) MC Chellingsworth, MJ Kendall. Effects of nifedipine, verapamil and diltiazem on renal function. *Br J Clin Pharmacol*. 1988; 25: 599-602.
- 38) PA Van Zwieten, JCA Van Meel, PBMWM Timmermans. Functional interaction between calcium antagonists and the vasoconstriction induced by the stimulation of post-synaptic alpha2-adrenoceptors.

- Circ Res. 1983; 52 (suppl 1): 77-80.
- 39) R Pedrinelli, RC Tarazi. Interference of calcium entry blockade in vivo with pressor responses to alpha-adrenergic stimulation: effects of two unrelated blockers on responses to both exogenous and endogenously released norepinephrine. *Circulation*. 1984; 69: 1171-6.
- 40) PM Ter Wee, JB Rosman, S Van Der Geest. Acute renal failure due to diltiazem. *Lancet*. 1984; 2: 1337-8.
- 41) T Isshike, C Amodeo, FH Messerli, BL Pegram, ED Frohlich. Diltiazem maintains renal vasodilatation without hyperfiltration in hypertension: studies on essential hypertensive man and the spontaneous hypertensive rat. *Cardiovasc Drug Ther*. 1987; 1: 359-66.
- 42) AMM Shepperd, C Leforce, GD Park, RS Hoop, S Weir. The determinants of response to diltiazem in hypertension. *Clin Pharmacol Ther*. 1991; 50: 338-49.
- 43) PC Waller, WHW Inman. Diltiazem and heart block. *Lancet*. 1989; 1: 617.

CHAPITRE 4

**FIRST-PASS METABOLISM OF DILTIAZEM IN ANESTHETIZED RABBITS: ROLE
OF EXTRAHEPATIC ORGANS**

Publié dans: *Pharm. Res.*, 1996; **13(1)**: 124-128.

**FIRST-PASS METABOLISM OF DILTIAZEM IN ANESTHETIZED RABBITS:
ROLE OF EXTRAHEPATIC ORGANS¹**

Marc Lefebvre, Walid Homsy, Gilles Caillé and Patrick du Souich.

Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine,
Université de Montréal, Montréal, Québec.

1. Supported by the Medical Research Council of Canada (Grant # MA-10874)

Reprint requests should be addressed to:

Patrick du Souich M.D., Ph.D.
Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine
Université de Montréal
C.P. 6128, Succ. Centre-ville
Montréal, Québec
H3C 3J7, Canada
Telephone: (514)-343-6335
Facsimile: (514)-343-2204

ABSTRACT

Purpose. The aim of this study was to assess *in vivo* which organs contribute to the first-pass metabolism of diltiazem. **Methods.** Anaesthetized rabbits received diltiazem into the thoracic aorta (TA) (1 mg/kg), jugular vein (JV) (2 mg/kg), portal vein (PV) (4 mg/kg) or small intestine (SI) (5 mg/kg). Serial blood samples were withdrawn from the abdominal aorta to assay diltiazem, N-demethyldiltiazem (MA) and deacetyldiltiazem (M₁). **Results.** The area under diltiazem plasma concentration curve/time (AUC_{0-∞}) normalized by the dose was $AUC_{TA} \approx AUC_{JV} > AUC_{PV} > AUC_{SI}$. Intestinal and hepatic diltiazem availability was 43 and 33%, respectively. The systemic availability of oral diltiazem was 12%. Diltiazem given into the SI and PV generated primarily MA, and injected into the JV and TA produced mainly M₁. **Conclusions.** In rabbits, the intestine and the liver contribute to the first-pass metabolism of diltiazem, and the amount and species of metabolites generated depend upon the route of administration of diltiazem.

KEY WORDS: Diltiazem, first-pass metabolism, intestine, liver, lungs

INTRODUCTION

Diltiazem is a calcium channel blocker used in angina pectoris and hypertension (1). Diltiazem undergoes substantial first-pass metabolism (1), resulting in a systemic bioavailability of around 30 to 40% (2,3). Diltiazem is extensively metabolized in the organism (4), with a systemic clearance ranging from 11.5 to 21.3 mL/min/kg by virtue of an elevated intrinsic clearance (2). Several metabolites are generated through O-deacetylation, N-demethylation and O-demethylation, which may be further metabolized by conjugation with glucuronides or sulphates (1,5).

Over the last decade, the ability of extrahepatic tissues to metabolize endogenous and exogenous substrates has attracted much interest. This is because cytochrome P-450-dependant mono-oxygenase activity has been reported in virtually every mammalian organ (6,7), specially in the liver, the intestinal mucosa, the lungs and the kidneys (8,9).

It has always been assumed that diltiazem metabolism takes place in the liver (1). However, since N-demethylation of diltiazem, the major metabolic pathway in man, is carried out by a form of the CYP3A subfamily (10), and this isozyme is widely distributed in the organism, essentially in the small intestine, pancreas, kidneys, skin, testis, and ovaries (11), it raises the possibility that several organs could contribute to the metabolism of diltiazem. Therefore, it appeared of interest to document the contribution of the small intestine and the lungs, relative to the liver, to the first-pass metabolism of diltiazem.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The experiment was carried out in 31 New Zealand male rabbits (Ferme Cunicole, Québec, Canada) with a mean body weight of 2.4 ± 0.1 kg (mean \pm SEM). The animals were housed in metabolic cages with access to water and food *ad libitum* for at least one week prior to the study to be acclimatized to the environment. The rabbits were fasted for 24 hours, and before the experiment the animals were anaesthetized with intravenous pentobarbital (30 mg/kg) (Nembutal Sodium, Abbott Laboratories Ltd., Toronto, Ontario); additional doses (5 mg/kg) of pentobarbital were injected during the experiment as needed. A tracheotomy was performed and the rabbits were ventilated with oxygen-enriched air (21 mL/cycle, 50 cycles/min) (Harvard Apparatus, Boston, MA). A catheter PE 50 (Intramedic Becton Dickinson and Co., Parsippany, NJ) was introduced through the femoral artery via the right leg into the abdominal aorta, until approximately the renal arteries. A solution of heparinized saline was kept in the arterial catheter to ensure permeability. Finally, a laparotomy was done to each rabbit to inject diltiazem into the portal vein, the small intestine, or as sham intervention.

Experimental Protocol

To ensure that the doses of diltiazem used generated first-order kinetics, and to document the effect of anaesthesia, the pharmacokinetics of diltiazem (Marion

Merrell Dow Research, Laval, Québec) were assessed following the intravenous injection of 1, 2, 4 and 8 mg/kg diluted in NaCl 0.9% in 2 min to non-anaesthetized rabbits (4 groups of 2 rabbits each). Blood samples (2 mL) were drawn from the central artery of the ear prior to and at 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 and 360 min following the administration of diltiazem. Blood samples were centrifuged (4°C, 4000 rpm, 10 minutes), plasma was separated and stored at (-20°C) until diltiazem was assayed in always less than 2 weeks.

To assess the contribution of the small intestine, liver and lungs to the first-pass metabolism of diltiazem, the drug was injected prior to and after the organ for study. To this purpose, rabbits were divided into four groups, one for each route of administration, and diltiazem was injected into the thoracic aorta (TA) (1 mg/kg), the jugular vein (JV) (2 mg/kg), the portal vein (PV) (4 mg/kg), or into the first 30 cm of the small intestine (SI) (5 mg/kg). The dose of drug injected was corrected for the salt, i.e. 1 mg of diltiazem = 1.088 mg of diltiazem.HCl. The dose selected for each site of administration was such as to obtain first-order kinetics and in addition, plasma concentrations of diltiazem in the range of those observed in humans. The injection of diltiazem into the TA was carried out through a catheter inserted into the left carotid artery with the tip placed into the TA. When diltiazem was administered prior to the lungs, liver or into the intestine, the right JV, the PV or the first part of the SI, respectively, were isolated and the drug was directly injected using a 26 gauge needle (Becton Dickinson and Co, Parsippany, NJ). Each animal received by infusion a solution of NaCl 0.9%, containing NaHCO₃ (4.2 g/L), at a rate of 50 ml/h, to maintain blood pH and to compensate for losses of water

and blood during the experimental procedure. Arterial partial pressure of O₂ (PaO₂) and CO₂ (PaCO₂) and pH were controlled prior to and at 5, 15, 30, 60, 120, 180 and 240 min following the administration of diltiazem using a BGM, model 1312 pH/blood Gas Analyzer (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA). Arterial blood pressure was monitored continuously through the catheter located into the abdominal aorta, using a pressure transducer (P-1000A, E&M Instrument Co. Inc., Houston, Texas) coupled to a chart recorder (Physiograph Four-A, E&M Instrument Co., Inc., Houston, Texas).

To assay diltiazem and metabolites, 1.5 to 2 mL of blood was drawn from the abdominal aorta prior to and at 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 and 360 minutes after the administration of diltiazem. Plasma concentrations of diltiazem, N-demethyldiltiazem (MA) and deacetyldiltiazem (M₁) were determined by HPLC (12). Other metabolites could not be assayed after the administration of a single dose of diltiazem. The assay limit for diltiazem and its metabolites was 2.5 ng/mL.

To assess the amount of diltiazem absorbed, six hours after the intestinal administration of diltiazem the first part (0 to 60 cm) of the small intestine was cut and washed with 20 mL of a solution of NaCl 0.9%, and the recovered solution was frozen (-20°C) until analysis. Preliminary studies demonstrated that beyond 60 cm, diltiazem was not found in measurable concentrations.

Pharmacokinetics

The following pharmacokinetic parameters of diltiazem were determined and compared between each group: the area under the plasma concentration-time curve ($AUC_{0-\infty}$), estimated by the trapezoidal method, the apparent half-life ($t_{1/2}$), obtained from the ratio of $\ln 2/Z$, where the disposition rate constant (Z) is the slope of the terminal phase of the logarithm of the concentration-time profile of the drug times 2.303.

The organ (org) bioavailability (F) of diltiazem, i.e. intestine, liver and lungs, was calculated dividing the $AUC_{0-\infty}$ estimated when the drug was administered before the organ (AUC_{aff}) by that computed when it was administered after the organ (AUC_{eff}) (7):

$$F_{org} = AUC_{aff} / AUC_{eff} \times 100$$

The systemic availability of diltiazem (F) after oral administration was estimated using the following equation: $F = F_{intestine} \cdot F_{liver} \cdot F_{lungs}$ (9). The extraction (E) of diltiazem by an organ was estimated using the equation: $E_{org} = 1 - F_{org}$. For all calculations, the $AUC_{0-\infty}$ was corrected by the dose.

To assess the relative amount of MA and M_1 generated by diltiazem biotransformation when administered by the various routes, the $AUC_{0-\infty}$ of each metabolite was calculated by the trapezoidal method, and the ratio of the

metabolite's $AUC_{0-\infty}$ over the dose or diltiazem $AUC_{0-\infty}$ were estimated.

Statistical analysis

Differences of diltiazem and metabolites kinetic parameters between each group were estimated using one-way analysis of variance for parallel groups. The value of p was determined using Dunnett's distribution table and the threshold of significance was established at $p < 0.05$.

RESULTS

Arterial gases and pH remained rather stable throughout the experiment in all groups of rabbits. Mean (\pm S.D.) values of PaO_2 , $PaCO_2$ and pH at the beginning and the end of the experiment were 115 ± 16 mm Hg, 19 ± 5 mm Hg and 7.537 ± 0.106 vs. 95 ± 22 mm Hg, 20 ± 5 mm Hg and 7.503 ± 0.098 , respectively. Mean arterial pressure was 82 ± 11 mm Hg at the outset vs. 63 ± 15 mm Hg, 6 hours after diltiazem administration.

When diltiazem was injected to conscious rabbits, the $AUC_{0-\infty}$ increased proportionally to the dose up to 4 mg/kg. The clearance of diltiazem was similar for the 1, 2 and 4 mg/kg doses, i.e. 65 to 75 mL/min/kg, but was smaller for the 8 mg/kg dose (54 mL/min/kg). The $t_{1/2}$ of diltiazem was not modified by the dosage (around 100 min). Based on these preliminary studies, we have assumed that the clearance of diltiazem for each individual organ was concentration independent at

the doses used. Following diltiazem injection into the JV of anaesthetized rabbits, the kinetic parameters of diltiazem, as well as the $AUC_{0-\infty}$ of the generated MA and M_1 , closely resembled those assessed in conscious animals (Table 4.1). These results indicate that anaesthesia and surgical procedures did not modify the pharmacokinetics of diltiazem.

Six hours after the intestinal administration of diltiazem, the recovery of the drug from the intestine averaged 0.005% of the dose administered. Small amounts of MA and M_1 , i.e. approximately 400 and 200 ng (0.0033% and 0.0017% of the dose) respectively, were detected in the small intestine.

The decay of plasma concentrations of diltiazem and its metabolites was not affected by the dose or the route of administration (Figures 4.1 to 4.4). The correction of diltiazem $AUC_{0-\infty}$ by the dose demonstrates that the normalized $AUC_{0-\infty}$ of diltiazem injected into the intestine or the PV were smaller than those calculated following diltiazem administration through the PV, JV and TA, or the JV and TA, respectively (Table 4.2). The normalized $AUC_{0-\infty}$ of diltiazem injected into the JV was 16% smaller than that calculated when diltiazem was given into the TA, but this difference did not reach statistical significance (Table 4.2).

The percentage of the dose of diltiazem extracted by the intestine or the liver was 57% and 67%, respectively. Therefore, the availability of diltiazem injected prior the intestine or the liver was 43 and 33%, respectively. Following oral administration of diltiazem, the systemic bioavailability was 12%.

The dose-normalized $AUC_{0-\infty}$ of MA generated by diltiazem injected into the SI, the PV and the JV were similar, but greater than that estimated after the injection of diltiazem into the TA. On the other hand, when diltiazem was injected into the SI, the ratio of MA over diltiazem $AUC_{0-\infty}$ was almost three times greater than the ratio estimated when diltiazem was injected into the PV, difference that was even greater when compared with the JV and TA routes of administration (Table 4.2).

The dose-corrected $AUC_{0-\infty}$ of M_1 generated by diltiazem injected into the JV was similar to that computed when diltiazem was injected into the TA, and both these values were higher than the dose-normalized $AUC_{0-\infty}$ of M_1 for the PV and SI routes. On the other hand, the ratio of M_1 $AUC_{0-\infty}$ over diltiazem $AUC_{0-\infty}$ after diltiazem administration into the SI, the PV and the JV routes were similar, although twice that calculated when diltiazem was injected into the TA (Table 4.2).

DISCUSSION

The minute amounts of diltiazem, MA and M_1 detected in the intestine, six hours after the intestinal administration of diltiazem, suggest that the absorption of the drug was almost complete. The presence of MA and M_1 in the intestine may be explained by several mechanisms, such as intraluminal oxidation of diltiazem, secretion of the metabolites into the lumen from the intestine following the oxidation of diltiazem into the intestinal mucosa (13), or by secretion of the metabolites into the lumen of the intestine from the mesenteric circulation, following the metabolism of diltiazem by the liver and other organs.

Dose-corrected $AUC_{0-\infty}$ of diltiazem decreased progressively as diltiazem was injected into the PV or the SI (Table 4.2), indicating that the small intestine and the liver did contribute to diltiazem first-pass metabolism. The injection of diltiazem into the SI, the PV and the JV generated similar dose-corrected $AUC_{0-\infty}$ of MA, but higher than when administered into the TA, suggesting that all pre-systemic organs contributed to the production of MA. The dose-corrected $AUC_{0-\infty}$ of M_1 was smaller when diltiazem was administered into the SI or the PV than into the JV or TA; this observation could be explained by a combination of factors, i.e. systemic organs contribute to the formation of M_1 , in the intestine and liver, N-demethylation is the predominant route of metabolism of diltiazem, and after its formation in the intestine and the liver, M_1 is rapidly degraded in these organs.

The intestine is able to conjugate certain compounds, such as fenoterol, phenol, naphthol, morphine-like analgesics and salbutamol (6,14,15). Intestinal decarboxylation, ester hydrolysis, O-deethylation and N-demethylation have also been demonstrated (7,9,16). CYP3A subfamily of cytochrome P-450 is found in large amounts in the small intestine (11), and this subfamily of enzymes appears to carry out diltiazem N-demethylation in human and rabbit, i.e. generating MA (10). For the first-pass metabolism of a drug administered orally, the intestine may play a relatively important role, due to its strategic position. For instance, 57% of the 5 mg/kg oral dose of diltiazem is extracted by the intestine, i.e. 2.85 mg/kg, compared with the liver who extracted 67% of the remaining 43% of the oral dose, i.e. 1.44 mg/kg.

The liver extracted diltiazem more efficiently than other organs, which is in agreement with *in vitro* studies (17). The greater amount of CYP3A in the liver compared with that found in other organs (11) explains the predominant role of the liver in the metabolism of diltiazem. Following diltiazem injection into the SI or the PV, the ratios of MA and M₁ AUC_{0-∞} over diltiazem AUC_{0-∞} were greater than those estimated when diltiazem was injected into the TA (Table 4.2). Since following the SI and PV routes, dose-normalized MA and M₁ AUC_{0-∞} were equal, the present results suggest that in the intestine and the liver, diltiazem generates metabolites other than MA and M₁ or alternatively, the metabolism of diltiazem in the intestine does produce primarily MA and M₁, but these metabolites are further metabolized. The latter alternative is supported by *in vitro* studies showing that intestinal homogenates generate MA and M₁, and liver homogenates MA, but both tissues can biotransform MA and M₁ (17). Therefore, we postulate that the intestinal mucosa and the liver are able to metabolize diltiazem to MA and M₁, and possibly to other non-detected metabolites, which may be further biotransformed in the intestine and/or in the liver.

In vivo first-pass uptake of diltiazem by the rabbit's lungs was of lesser importance than reported for other lipophilic drugs, such as propranolol, fentanyl, meperidine and morphine (18,19). Most compounds removed by the lungs are basic amines with a pKa greater than 8, carry a charged group at physiological pH, which is frequently cationic, have a moderate-to-high lipophilic nature, and present a hydrophobic moiety (19-21). We may speculate that both, the low pKa of diltiazem (around 7.5) and as a consequence, a small cationic charge at physiological pH, and

the fact that the lungs contain small amounts of CYP3A (11), determine the low pulmonary first-pass uptake of diltiazem.

Flow dependency of drug clearance is assumed when its intrinsic clearance is higher than the blood flow to the organ; however, when several organs contribute to the metabolism of the drug, the estimated intrinsic clearance will be the sum of the intrinsic clearances for each organ. As a consequence, the intrinsic clearance of a specific organ contributing to the metabolism of diltiazem may be equal to or lower than the blood flow to the organ, in which case the clearance will be affected not only by changes in blood flow, but also by changes in intrinsic clearance, and hence protein binding.

In conclusion, in the rabbit, the intestine and the liver account for most of the first-pass metabolism of an oral dose of diltiazem yielding mainly MA by N-demethylation. The lungs appear to have a reduced contribution to the first-pass metabolism of diltiazem. These results indicate that the pharmacokinetic profile of diltiazem and its metabolites depend upon the route of administration of diltiazem. Finally, the dependence of diltiazem clearance upon blood flow to an organ may be less important than assumed in the literature, and as consequence, diltiazem clearance could also be influenced by changes in the intrinsic clearance and in the protein binding.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Nordic Merrell-Dow Recherche for the studentship given to M. Marc Lefebvre and for the gracious gift of MA and M₁, and to Mrs Lucie Héroux for her technical assistance.

Table 4.1 Mean (\pm SEM) pharmacokinetic parameters of diltiazem, MA and M1 following the intravenous administration of diltiazem to anesthetized and conscious rabbits

Pharmacokinetics	Anesthetized rabbits	Conscious rabbits
Dose (mg/kg)	2	2
AUC _{0-∞} Dilt (μ g.min/mL)	25.2 \pm 2.5	29.0 \pm 5.3
Cl Dilt (mL/min/kg) ^a	84 \pm 9	73 \pm 12
t _{1/2} Dilt (min)	115 \pm 9	94 \pm 1
AUC _{0-∞} MA (μ g.min/mL)	3.4 \pm 0.9	5.0 \pm 1.7
AUC _{0-∞} M1 (μ g.min/mL)	5.5 \pm 1.1	6.2 \pm 2.2

a: Clearance of diltiazem : Dose/AUC_{0-∞}

Table 4.2 Mean (\pm SEM) area under diltiazem, MA, and M1 plasma concentrations as a function of time ($AUC_{0-\infty}$) normalized by the dose, following the administration of diltiazem through the thoracic aorta (TA), jugular vein (JV), portal vein (PV) and small intestine (SI) to anesthetized rabbits

Route of Injection	TA (n = 8)	JV (n = 8)	PV (n = 8)	SI (n = 8)
Dose (mg/kg)	1	2	4	5
DILTIAZEM				
$AUC_{0-\infty}$ (μ g min/mL)	15.1 \pm 1.4	25.2 \pm 2.5 ^a	16.8 \pm 2.0	9.2 \pm 1.5 ^b
$AUC_{0-\infty}$ /Dose $\times 10^{-3}$ (kg.min/mL)	15.1 \pm 1.4	12.6 \pm 0.5	4.2 \pm 0.5 ^{a,b}	1.8 \pm 0.3 ^{a,b,c}
MA				
$AUC_{0-\infty}$ /Dose $\times 10^{-3}$ (kg.min/mL)	0.2 \pm 0.1	1.7 \pm 0.5 ^a	2.6 \pm 0.2 ^a	2.9 \pm 0.5 ^a
Ratio ^d (%)	1.2 \pm 0.1	15 \pm 5 ^a	66 \pm 7 ^{a,b}	165 \pm 24 ^{a,b,c}
M1				
$AUC_{0-\infty}$ /Dose $\times 10^{-3}$ (kg.min/mL)	2.0 \pm 0.6	2.7 \pm 0.6	0.8 \pm 0.2 ^b	0.4 \pm 0.1 ^{a,b}
Ratio ^d (%)	12 \pm 3	25 \pm 7 ^a	21 \pm 2 ^a	25 \pm 5 ^a

a $p < 0.05$ compared to TA value
b $p < 0.05$ compared to JV value
c $p < 0.05$ compared to PV value
d $AUC_{0-\infty}$ of MA or M1 / $AUC_{0-\infty}$ of diltiazem

Figure 4.1: Mean plasma concentrations of diltiazem, MA and M₁ following a single dose of diltiazem (1 mg/kg) injected into the thoracic aorta of anaesthetized rabbits.

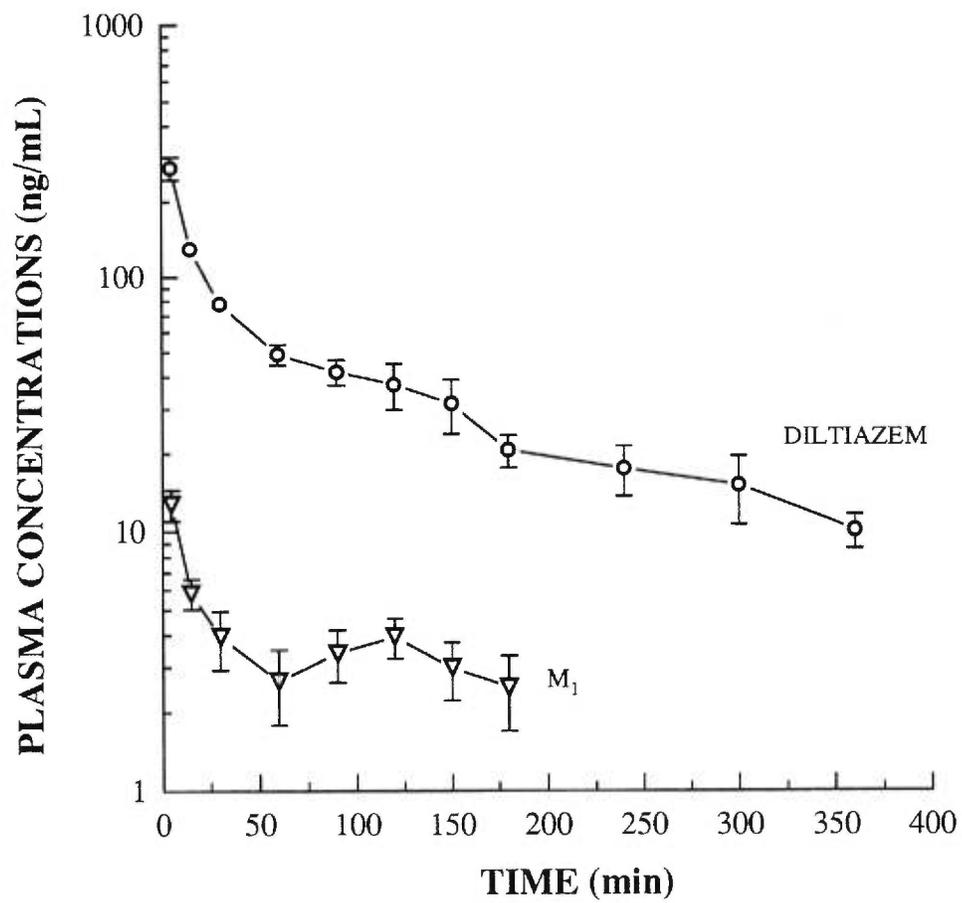


Figure 4.2: Mean plasma concentrations of diltiazem, MA and M₁ following a single dose of diltiazem (2 mg/kg) injected into the jugular vein of anaesthetized rabbits.

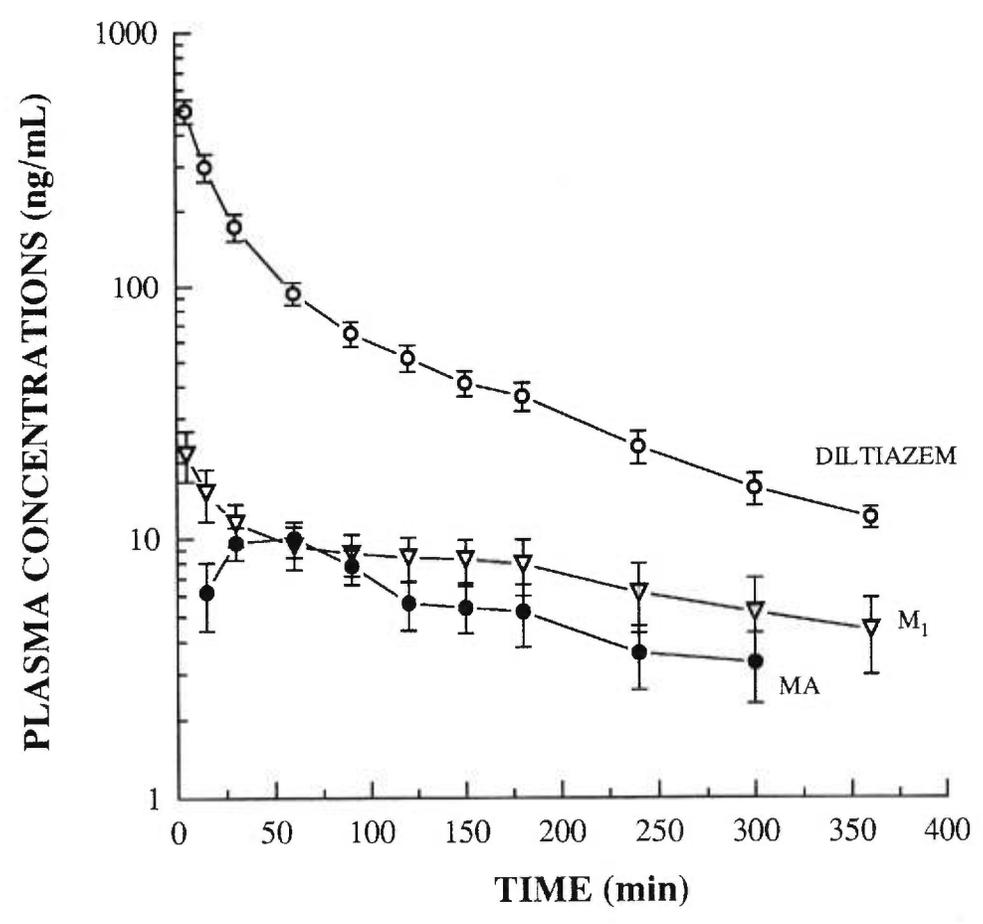


Figure 4.3: Mean plasma concentrations of diltiazem, MA and M₁ following a single dose of diltiazem (4 mg/kg) injected into the portal vein of anaesthetized rabbits.

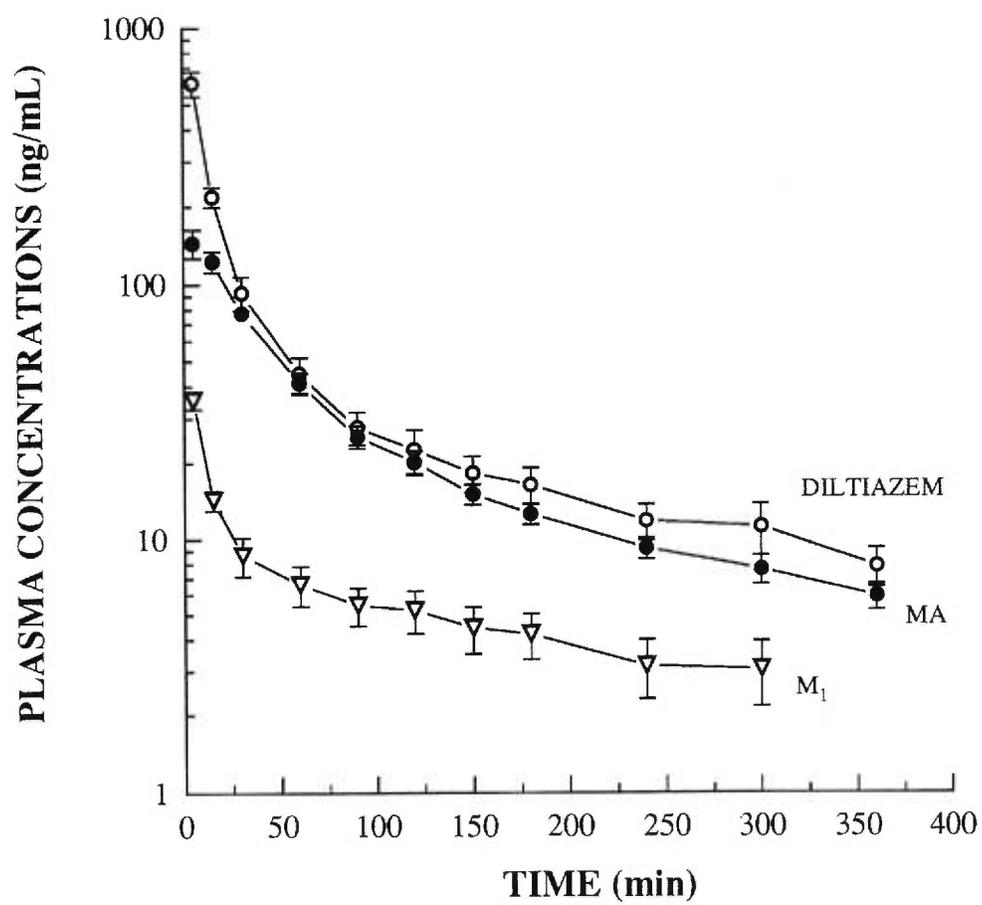
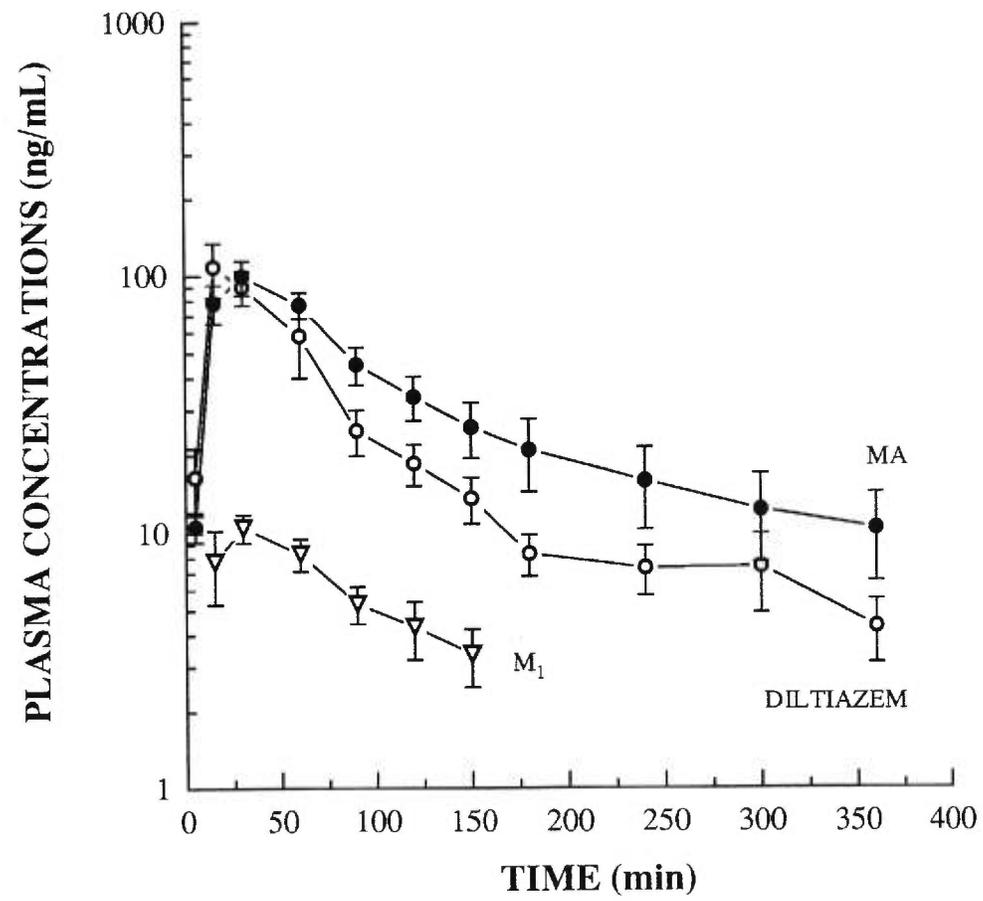


Figure 4.4: Mean plasma concentrations of diltiazem, MA and M₁ following a single dose of diltiazem (5 mg/kg) injected into the small intestine of anaesthetized rabbits.



REFERENCES

1. M.M.T. Buckley, S. Grant, K.L. Goa, D. McTavish and E.M. Sorkin. Diltiazem; a reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs* **39**:757-806 (1990).
2. M.S. Smith, C.P. Verghese, D.G. Shand and E.L.C. Pritchett. Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of diltiazem. *Am. J. Cardiol.* **51**:1369-1374 (1983).
3. P.K.F. Yeung, S.J. Mosher, M.A. Quillam and T.J. Montague. Species comparison of pharmacokinetics and metabolism of diltiazem in humans, dogs, rabbits and rats. *Drug Metab. Dispos.* **18**:1055-1059 (1990).
4. P.K.F. Yeung, S.J. Mosher and P.T. Pollak. Pharmacokinetics and metabolism of diltiazem in rabbits after a single intravenous or single oral administration. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.* **16**:69-74 (1991).
5. J. Sugihara, Y. Sugawara, H. Ando, S. Harigaya, A. Etoh and K. Kohno. Studies on the metabolism of diltiazem in man. *J. Pharmacobiodyn.* **7**:24-32 (1984).
6. J.R. Bend and C.J. Serabjit-Singh. Xenobiotic metabolism by extrahepatic tissues: relationship to target organ and cell toxicity, In JR. Mitchell and MG. Horning (eds.), *Drug Metabolism and Drug Toxicity*, Raven Press, New York, 1984, pp. 99-136.
7. M. Mistry and J.B. Houston. Quantitation of extrahepatic metabolism. *Drug Metab. Dispos.* **13**:740-745 (1985).
8. H. Vainio and E. Hietanen. Role of extrahepatic metabolism in drug disposition and toxicity. In P. Jenner and B. Testa (eds.), *Concepts in Drug Metabolism*, part A, Marcel Dekker, New York, 1980, pp. 251-284.
9. M.K. Cassidy and J.B. Houston. In vivo capacity of hepatic and extrahepatic enzymes to conjugate phenol. *Drug Metab. Dispos.* **12**:619-624 (1984).
10. L. Pichard, G. Gillet, I. Fabre, I. Dalet-Beluche, C. Bonfils, J.P. Thenot and P. Maurel. Identification of the rabbit and human cytochromes P-450III_A as the major enzymes involved in the N-demethylation of diltiazem. *Drug Metab. Dispos.* **18**:711-719 (1990).
11. D.R. Krishna and U. Klotz. Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin. Pharmacokin.* **26**:144-160 (1994).

12. G. Caillé, L. Dubé, Y. Théorêt, F. Varin, N. Mousseau and I. McGilveray. Stability study of diltiazem and two of its metabolites using a high performance liquid chromatographic method. *Biopharm. Drug Dispos.* **10**:107-114 (1989).
13. K.F. Ilett, L.B.G. Tee, .PT. Reeves and R.F. Minchin. Metabolism of drugs and other xenobiotics in the gut lumen and wall. *Pharmac. Ther.* **46**:67-93 (1990).
14. A.S.J. Koster, G.A. Hofman, A.C. Frankhuijzen-Sierevogel and J. Noordhoek. Presystemic and systemic intestinal metabolism of fenoterol in the conscious rat. *Drug Metab. Dispos.* **13**:464-470 (1985).
15. S. Perreault, L. Dumont, V. Villière, H. Ong, A. Adam and P. du Souich. Hepatic and extrahepatic metabolism of salbutamol in anesthetized rabbits. *Drug Metab. Dispos.* **21**:485-491 (1993).
16. G.M. Pacifici, M. Franchi, P.G. Gervasi, V. Longo, P. di Simplicio, A. Temellini, and L. Giuliani. Profile of drug-metabolizing enzymes in human ileum and colon. *Pharmacology* **38**:137-145 (1989).
17. W. Homsy, M. Lefebvre, G. Caillé and P. du Souich. Metabolism of diltiazem in hepatic and extrahepatic tissues of rabbits: in vitro studies. *Pharmac. Res.* **12**:609-614 (1995).
18. D.M. Geddes, K. Nesbitt, T. Trail and J.P. Blackburn. First-pass uptake of ¹⁴C propranolol by the lung. *Thorax* **34**:810-813 (1979).
19. D.L. Roerig, K.J. Kotrly, E.J.Vucins, S.B. Ahlf, C.A. Dawson, and J.P. Kampine. First-pass uptake of fentanyl, meperidine and morphine in the human lung. *Anesthesiology* **67**:466-472 (1987).
20. A.G.E. Wilson, R.D. Pickett, T.E. Eling and M.W. Anderson. Studies on the persistence of basic amines in the rabbit lung. *Drug Metab. Dispos.* **7**:420-424 (1979).
21. U.S. Ryan and C.J. Grantham. Metabolism of endogenous and xenobiotic substances by pulmonary vascular endothelial cells. *Pharmac. Ther.* **42**:235-250 (1989).

CHAPITRE 5

**ORGAN-SPECIFIC PATTERN OF INHIBITION OF DILTIAZEM METABOLISM AT
STEADY STATE IN THE RABBIT**

Publié dans: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996; 279(2): 902-907

**ORGAN-SPECIFIC PATTERN OF INHIBITION OF DILTIAZEM METABOLISM
AT STEADY STATE IN THE RABBIT¹**

Marc Lefebvre, Gilles Caillé and Patrick du Souich.

Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine,
Université de Montréal, Montréal, Québec.

¹ Supported by the Medical Research Council of Canada (Grant MT-10874)

Running title: ORGAN-SPECIFIC METABOLISM OF DILTIAZEM

Reprint requests should be addressed to: Patrick du Souich M.D., Ph. D.
Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine
Université de Montréal
2900 Edouard-Montpetit
C.P. 6128, Succ. Centre-ville
Montréal, Québec
H3C 3J7, Canada
Telephone: (514)-343-6335
Facsimile: (514)-343-2204
E-mail: dusouicp@ere.umontreal.ca

Abbreviations:

AUC _{0-∞}	area under the plasma concentration-time curve
Cl	systemic clearance
C _{ss}	steady state plasma levels
HPLC	High Performance Liquid Chromatograph
iv	intravenous
K _{met}	<i>in vitro</i> rate constant of metabolism
MA	N-desmethyl-diltiazem
M1	desacetyl-diltiazem
M2	N-desmethyl-desacetyl-diltiazem
M4	desacetyl-O-desmethyl-diltiazem
ND	not detected
P450	cytochrome P450
q.i.d.	4 times a day
SE	standard error
t _{1/2}	half-life of the terminal phase
UV	ultraviolet
V _d	apparent volume of distribution
Z	terminal disposition rate constant

ABSTRACT

Plasma levels of diltiazem, following its chronic administration, are usually higher than predicted. Since several organs contribute to diltiazem metabolism, this study aimed to determine the effect of an infusion of diltiazem to steady state on the ability of the intestine, liver and lungs to metabolize diltiazem and its metabolites, N-desmethyldiltiazem (MA) and desacetyldiltiazem (M1). The kinetics of diltiazem were assessed after a single iv injection (2 mg/kg) and following an infusion (1.4 mg/kg/h over 15 hours) of diltiazem. After serial blood sampling, the rabbits were sacrificed, and diltiazem, MA and M1 constant rates of metabolism (K_{met}) were estimated in the 10,000xg supernatant of the intestinal mucosa, liver and lungs. *In vivo*, the systemic clearance of infused diltiazem was lower than that estimated after its iv injection, i.e. 54.4 ± 2.4 vs 70.3 ± 5.8 ml/min/kg ($p < 0.05$). *In vitro*, diltiazem K_{met} was reduced in liver homogenates from rabbits that received the infusion of diltiazem, but not in the intestine or lungs. Moreover, the production of MA was reduced in liver homogenates, and that of M1 in intestinal and lung homogenates. The K_{met} of MA was not affected by the infusion of diltiazem in any tissue studied; however, the K_{met} of M1 was reduced by the infusion in the three tissues tested. It is concluded that, in the rabbit, long-term administration of diltiazem leads to an accumulation of diltiazem primarily because its N-demethylation is decreased in the liver, in addition the demethylation of M1 is reduced in the small intestine, liver and lungs.

INTRODUCTION

Diltiazem, a benzothiazepine-like derivative, is a calcium channel blocker used in angina pectoris and hypertension (Buckley et al., 1990). Diltiazem is eliminated by biotransformation, i.e. O-deacetylation, N-demethylation, O-demethylation, N-oxidation and oxidative deamination, yielding multiple basic and acidic metabolites, which can be further biotransformed by glucurono- or sulpho-conjugation (Sugawara et al., 1988; Yeung et al., 1990). Some of the metabolites are pharmacologically active, for instance N-desmethyl-diltiazem (MA) and desacetyl-diltiazem (M1) are coronary vasodilators with 20 and 50% the potency of diltiazem, respectively (Yabana et al., 1985). Although the liver is considered to be the major organ for diltiazem biotransformation, extrahepatic organs, such as intestine and lungs, contribute to the first-pass uptake and systemic elimination of diltiazem (Murata et al., 1993; Homsy et al., 1995; Lefebvre et al., 1996).

During chronic administration, the kinetics of diltiazem show a nonlinear pattern, i.e. there is an unexpected increase in plasma concentrations (Smith et al., 1983; Abernethy and Montamat, 1987; Hoglund and Nilsson, 1994; Lefebvre et al., 1994). For instance, after the administration of 60 mg q.i.d. of diltiazem for 16 days, the calculated accumulation factor was 2.39; however, the predicted accumulation factor following a single dose was 1.49. Chronic administration of diltiazem also induces the accumulation of both MA and M1 (Smith et al., 1983; Montamat and Abernethy, 1987). Since diltiazem and metabolites are biotransformed in several organs (Homsy et al., 1995; Lefebvre et al., 1996), it was

of interest to assess in which organs the metabolism of diltiazem, MA and M1 is affected by diltiazem chronic administration. The aims of the present study were to characterize *in vivo*, in rabbits, the effect of an infusion of diltiazem on the disposition of diltiazem, MA and M1 at steady state, and to assess *in vitro* the repercussion of the long term infusion of diltiazem on the ability of the intestine, liver and lungs to metabolize diltiazem, MA and M1.

METHODS

Animals

The experiment was carried out in 13 New Zealand male rabbits (Ferme Cunicole, Mirabel, Québec) with a mean body weight of 2.2 ± 0.1 kg (mean \pm SE). The animals were housed in steel metabolic cages for at least one week prior to the study in order to be acclimatized to the environment, and had access to water and food *ad libitum*. The rabbits were fasted for 24 hours, and before the experiment, a lateral vein of an ear was cannulated with a Butterfly-25 (Venisystem Abbott Ireland, Sligo, Ireland) to infuse a solution of NaCl 0.9%-dextrose 5% at the rate of 20 ml/h to compensate for fluid and blood losses. New Zealand rabbits were used because the metabolism of diltiazem in this animal model is similar to that of humans (Yeung et al., 1991).

Experimental Design

In vivo studies.

To determine the metabolic profile of diltiazem, two groups of conscious rabbits were used. The rabbits of the first group (n = 7) received a single intravenous (iv) injection of 2 mg/kg of diltiazem diluted in a solution of NaCl 0.9% using a Butterfly-25 inserted into a vein of the ear. Thereafter, the catheter was flushed with 3 ml of a saline solution to ensure that the entire dose was injected. The rabbits of the second group (n = 6) received diltiazem by infusion via a polyethylene PE-25 tubing (Intramedic Becton, Dickinson and Company, Parsippany, NJ) introduced in a vein of the ear. Diltiazem was diluted in a solution of NaCl 0.9% and administered at a rate of 1.4 mg/kg/h over a period of 15 hours (Syringe pump, model 355, Sage Instrument, Cambridge, Mass.). The dose of drug injected was corrected for the salt, i.e. 1 mg of diltiazem = 1.088 mg of diltiazem.HCl. The single iv dose and the infusion rate of diltiazem were selected to generate peak plasma concentrations comparable to the steady state levels of diltiazem, and in addition, to obtain plasma concentrations in the range of those observed in humans (Smith *et al.*, 1983).

Blood samples were always drawn from the central artery of an ear through a Butterfly-21 (Venisystem Abbott Ireland, Sligo, Ireland) prior to (-5) and at 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 and 360 minutes after the single iv injection, and once the infusion of diltiazem was completed. To ensure that steady state of

diltiazem was effectively attained, an additional blood sample was drawn 60 minutes prior to the end of the infusion. Plasma was immediately separated by centrifugation (4°C, 2000xg, 10 min) and stored at -20°C until analysis. Heparinized saline solution was kept in the arterial canula to maintain patency.

In vitro studies.

Once the *in vivo* studies ended, the rabbits were sacrificed by cervical dislocation, and the first part of the small intestine (0-30 cm) was cut and washed twice with 20 ml of a Tris-buffer solution (KH₂PO₄ 50 mM, Na₂PO₄ 50 mM, KCl 150 mM) at pH 7.4. Thereafter, the epithelial cells of the intestine (\approx 3 g), a fragment of the liver (\approx 5 g), and the lungs (\approx 5 g) were collected, placed in Tris-buffer solution, and homogenized with a polytron (Brinkman, Rexdale, Sweden) to obtain a 20% homogenate. An aliquot of each homogenate was centrifuged for 20 minutes at 10,000xg (Beckman 13-40, rotor 50.2, Beckman, Palo Alto, CA) at 4°C. The pellets were discarded and the supernatant of the homogenates were immediately stored at -80°C until diltiazem and metabolites were assayed. All these procedures were performed at a temperature of 4°C.

To assess the ability of the 10,000xg homogenates of the small intestine, liver and lungs to metabolize diltiazem, MA or M1, the tissues were incubated for 10 minutes at 37°C in a shaking water bath (60 cycles/min). Thereafter, an aliquot (1 ml) of each tissue homogenate was mixed with 1 ml of a generating system solution (NADP 0.26 mM, glucose-6-PO₄ 4 mM, nicotinamide 20 mM and MgCl₂-6 H₂O 10

mM diluted in the Tris-buffer solution). The concentration of diltiazem in tissue homogenates was 50 μ M. This concentration was selected on the basis of predicted levels in human tissues following the intake of 60 mg of diltiazem three times daily, after reaching plasma steady state levels of 300 to 400 ng/ml (Smith et al., 1983), and assuming an accumulation in the tissues (Piepho et al., 1982). *In vitro* studies performed by other investigators used diltiazem concentrations ranging from 20 to 1000 μ M (Tsao et al., 1990; Pichard et al., 1990). The concentration of the metabolites in the tissue homogenates was also 50 μ M, to allow the comparison between the decay of the concentrations of the metabolites and the parent compound. Aliquots of 0.1 ml of the incubating system were drawn at 0, 5, 10, 20, 40 and 60 min following the addition of diltiazem, MA or M1, and the reaction was stopped by adding 0.5 ml of acetonitrile. The resultant precipitate was immediately centrifuged at 2,000xg for 10 min at 4°C, and the supernatants (65 to 75 μ l) were injected into the chromatographic system. To determine whether the small intestine, liver and lungs contained residual amounts of diltiazem and metabolites, blank homogenates of these tissues were processed as described above. Protein content was measured in the 20% homogenate of each tissue by the method described by Lowry et al. (1951).

Assays

In the *in vivo* studies, diltiazem, MA and M1 were assayed by HPLC according to a method published elsewhere (Caillé et al., 1989). Other metabolites were not assayed since they were not detected, or their plasma concentrations were under

the limit of quantitation fixed at 2.5 ng/ml. Briefly, the assays were performed on a high-performance liquid chromatograph (HPLC) (Waters model 501, solvent delivery system, Millipore Corp., MA, USA), equipped with a UV detector (Waters model 441, absorbance detector, Millipore Corp., MA, USA) set at 229 nm. The separation system was a 10 cm x 4.9 mm stainless steel, 5 μ m C8 Spherisorb reversed-phase column. The flow rate of the mobile phase, 5 mM phosphate buffer (pH 3)-acetonitrile (57-43%, v/v) containing 1.25 μ M of dibutylamine, was set at 1.4 ml/min.

To assay diltiazem, MA and M1 from blood samples drawn during the *in vivo* studies, 1 ml of plasma was transferred to a screw-capped culture tube. One hundred μ l of the solution containing the internal standard (100 ng of loxapine) was added, and the tube was vortexed for 10 s. Thereafter, 3 ml of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.5) and 6 ml of methyl t-butyl ether were added, and the solution agitated for 10 minutes on a reciprocating shaker, and centrifuged for another 10 minutes at 800xg. The organic layer was transferred to a conical tube and back-extracted in 150 μ l of 0.05 N sulphuric acid. This solution was vortexed for 45 s, and centrifuged for 4 minutes at 800xg. Finally, the organic phase was discarded and 50 μ l of the acidic solution was injected directly into the loop. Standard samples were prepared by spiking blank plasma of rabbits with increasing concentrations of diltiazem, MA and M1 (2.5 to 500 ng/mL). The sensitivity of the method was 2.5 ng/ml for diltiazem, MA and M1, respectively. The intra-day and inter-day variability was between 1.7 and 9.8% for diltiazem, MA and M1. Standards were kindly provided by Nordic Merrell Dow Research Inc. (Laval,

Québec, Canada).

In the *in vitro* studies, diltiazem, MA, and M1 were measured in the supernatant of the homogenates. Since M2 is the main metabolite resulting from MA and M1 metabolism, it was measured in all the *in vitro* assays. Compared with the previous procedure, no solvent extraction was required. Acetonitrile (0.5 ml) was added to the incubation media to stop the reaction and to extract diltiazem, MA, M1 and M2. Following the centrifugation of the homogenate-acetonitrile solution, a volume of 65 to 75 μ l of the acetonitrile solution was injected directly into the loop. Standard samples were prepared by spiking homogenates of the intestine, liver and lungs with increasing concentrations of diltiazem, MA, M1 and M2 (2.5 to 50 μ M).

Analysis of data

The *in vivo* studies allowed to estimate the following pharmacokinetic parameters: the area under the plasma concentration-time curve ($AUC_{0-\infty}$) was estimated by the trapezoidal method; in all cases, the percentage of AUC extrapolated ($AUC_{6h-\infty}$) accounted for less than 10% of the $AUC_{0-\infty}$. The terminal half-life ($t_{1/2}$) was calculated from the ratio of $\ln 2/Z$, where Z corresponds to the slope of the terminal phase of diltiazem concentration-time profile, i.e. between 1 and 6 hours, as determined by visual inspection of the semilog plot. The systemic clearance (Cl) of diltiazem, following the single iv injection and the infusion of the drug, was estimated by the following equations: $Cl = \text{Dose}/AUC_{0-\infty}$ and $Cl_{SS} = \text{Infusion rate}/C_{ss}$, respectively, where C_{ss} corresponded to the plasma levels of diltiazem at

steady state. Finally, diltiazem volume of distribution (V_d) was calculated from the equations $V_d = \text{Dose}/(\text{AUC}_{0-\infty} \cdot Z)$ and $V_{d_{ss}} = \text{Infusion rate}/(\text{C}_{ss} \cdot Z_{ss})$, respectively. The relative amounts of MA and M1 generated by diltiazem were assessed estimating the $\text{AUC}_{0-\infty}$. All comparisons were carried out after the normalization of the values of $\text{AUC}_{0-\infty}$ by the dose of diltiazem (Gibaldi and Perrier, 1982).

In the *in vitro* studies, the decay of diltiazem, MA and M1 was assessed as the rate constant of metabolism (K_{met}), estimated from the slope of the logarithm of the concentration-time profile. To allow comparisons between tissues, the K_{met} was normalized by the amount of proteins measured in the 20% homogenates. The relative amount of MA, M1 and M2 produced was estimated by calculating their AUC_{0-60} .

The results are expressed as mean \pm SEM. Differences between the kinetic parameters estimated following the single iv injection of diltiazem and the parameters estimated following the 15 hours infusion of diltiazem (*in vivo* and *in vitro*) were assessed using a one-way ANOVA test (Winer, 1971). The threshold of significance was $p < 0.05$.

RESULTS

In vivo studies

Once the infusion of diltiazem was discontinued, diltiazem plasma concentrations

decreased with an average half-life of almost 2 hours, similar to that estimated after the administration of the single iv injection (Table 5.1). Since diltiazem was infused for 15 hours, i.e. around 7 half-lives, plasma concentrations reached over 99% of steady state. At steady state, plasma levels of diltiazem (Figure 5.1) were similar to the peak plasma concentrations generated by the single iv injection of 2 mg/kg (Figure 5.2). According to the pharmacokinetic parameters of diltiazem estimated after its single iv injection, and assuming first order kinetics, the predicted plasma concentrations of diltiazem at steady state should be approximately 330 ng/ml at the infusion rate of 1.4 mg/hr/kg. However, steady state diltiazem levels reached a mean concentration of 430 ng/ml ($p < 0.05$ compared with predicted levels). This increase in steady state level was due to a decrease in diltiazem clearance (Table 5.1). By reference to the single iv injection, the infusion of diltiazem did not modify its apparent volume of distribution (V_d) (Table 5.1).

Compared with the $AUC_{0-\infty}$ of MA and M1 estimated after the single iv injection of diltiazem, MA and M1 $AUC_{0-\infty}$ were significantly increased by the infusion of diltiazem. However, when the $AUC_{0-\infty}$ were corrected by the dose of diltiazem infused over 15 hours, the normalized $AUC_{0-\infty}$ of MA and M1 did not differ from those estimated after the single iv injection of diltiazem (Table 5.1).

In vitro studies

Diltiazem, MA, M1 and M2 were not detected in blank aliquots of homogenates of the small intestine, liver and lungs of rabbits who received the single iv injection or

the infusion of diltiazem. Following 60 minutes of incubation of diltiazem, MA or M1 in the tissue homogenates coming from rabbits having received a single iv injection, the initial concentrations decreased by 87, 64 and 74% in the liver, respectively, by 63, 24 and 26% in the small intestine, respectively, and by 10, 4 and 2% in the lungs, following the same order. In homogenates of rabbits having received the infusion of diltiazem, the initial concentrations of diltiazem, MA or M1 decreased by 65, 54 and 46% in the liver, respectively, by 60, 23 and 19% in the small intestine, respectively, and by 5, 2 and 1% in the lungs, following the same order. These results demonstrate that diltiazem, MA and M1 were more actively biotransformed in the liver than in the intestine or the lungs (Tables 5.2 and 5.3).

In liver tissues from animals who received the infusion, diltiazem K_{met} corrected by the amount of proteins was smaller than that estimated in liver homogenates of animals who received the single iv injection (Table 5.2). In the same hepatic tissues, the amount of MA generated was smaller in rabbits receiving the infusion than in those given the single iv injection of diltiazem (Figure 5.3). M1 was not detected in liver homogenates following the incubation of diltiazem. On the other hand, the infusion did not affect the corrected K_{met} of diltiazem in intestinal or lungs tissues (Table 5.2). Compared with the single iv injection, the infusion of diltiazem did not reduce the production of MA in intestinal homogenates (Figure 5.3), but decreased the amounts of M1 recovered in homogenates of intestine and lungs (Figure 5.4). Following the incubation of diltiazem in intestinal, liver or lungs homogenates, M2 was not detected.

The corrected K_{met} of MA in the small intestine, liver or lungs homogenates of rabbits receiving the infusion was similar to that estimated in tissues of animals given the single iv injection of diltiazem (Table 5.3). The incubation of MA in intestine and lungs generated M2, metabolite that was not detected in the liver. The production of M2 from MA in the intestine and lungs was not affected by the infusion of diltiazem.

The corrected K_{met} of M1 was reduced in all three tissue homogenates of rabbits who received the infusion of diltiazem (Table 5.3). M1 generated M2 only in intestinal and liver tissues, and by comparison with tissues of animals who received the single iv injection of diltiazem, the infusion of diltiazem decreased the amount of M2 generated in both the intestine and the liver (Table 5.3).

DISCUSSION

The present study demonstrates that *in vivo*, compared to rabbits who received the single iv injection of diltiazem, the infusion to steady state reduces diltiazem systemic clearance, without affecting dose-normalized $AUC_{0-\infty}$ of MA and M1. *In vitro*, in tissues of rabbits who received the infusion of diltiazem, the N-demethylation of diltiazem was reduced in the liver, and that of M1 was decreased in the small intestine, liver and lungs. On the other hand, the deacetylation of diltiazem diminished in the intestine and the lungs by the infusion of diltiazem, although it was not affected in the liver. Moreover, the deacetylation of MA was not affected in any tissue tested. These results indicate that the infusion of

diltiazem has organ-specific repercussions on the metabolism of diltiazem and its metabolites.

The results of the present study confirm that diltiazem can be biotransformed at least in three organs: the intestine, the liver and the lungs. The intestine can generate MA and M1, and further biotransform these metabolites to M2, i.e. it can N-demethylate and deacetylate. The liver can N-demethylate diltiazem to MA, and M1 to M2. It is difficult to conclude on the ability of the liver to deacetylate diltiazem to M1, and MA to M2, because both metabolites (M1 and M2) may have been rapidly metabolized. The lungs generate little or no MA which can be transformed to M2; in addition, the lungs produce substantial amounts of M1 which are not N-demethylated to M2.

The corrected rate of metabolism of diltiazem estimated in livers of rabbits that received a single i.v. injection of diltiazem was 30% greater than that calculated in the small intestine, and almost 20 fold greater than that estimated in the lungs. When corrected by mg of proteins in the homogenate, the ability of the small intestine to generate MA was similar to that of the liver, i.e. 155 vs 144 μM min/mg of protein. On the other hand, the production of M1 by the intestinal homogenate was similar to that observed in lung homogenates, i.e. 12 vs 14 μM min/mg of protein. The ability of the liver to metabolize MA and M1 was considerably greater than that of the small intestine and the lungs.

Epithelial cells of the intestinal mucosa contain rather important amounts of

CYP1A1, CYP2B6, CYP2C8-9, CYP2D6, CYP2E1 and CYP3A4 (Guengerich, 1992; Gonzalez, 1992; Krishna and Klotz, 1994). The presence of CYP3A4 may explain the ability of the intestinal mucosa to N-demethylate both diltiazem and M1. On the other hand, intestinal mucosa was also able to deacetylate diltiazem and MA, but the rate of deacetylation was much slower than that of N-demethylation. The ability of the intestine to N-demethylate and deacetylate diltiazem is not exclusive of the rabbit, since *in vivo*, the intestine of the dog contributes to the formation of MA and M1 (Murata et al., 1993).

The lungs had the ability to deacetylate diltiazem and MA but not to N-demethylate diltiazem or M1. The nature of the isozyme deacetylating diltiazem or MA has not been identified, but it may be a cytochrome P450 dependent isoform, since the lungs do contain enzymatic systems able to biotransform xenobiotics, such as CYP1A1, CYP2B7, CYP2F1, CYP4B1, epoxide hydrolases, etc. (de Waziers et al., 1990; Gonzalez, 1992; Krishna and Klotz, 1994). The incapacity of the lungs to N-demethylate diltiazem is not a surprise, since it has been reported that the lungs do not contain CYP3A4 (Murray et al., 1988).

In preliminary studies, following a dosage of 4 mg/kg, it was determined that plasma concentrations of diltiazem of 800 ng/mL or lower generated first order kinetics of diltiazem. The present results show that at steady state (mean $C_{ss} \approx 430$ ng/mL), the clearance of diltiazem is already reduced. This observation suggests that saturation of diltiazem metabolism can be discarded as mechanism underlying the decrease in diltiazem clearance.

It has been proposed that diltiazem biotransformation can be inhibited by the presence of its metabolites, specially by MA and by desacetyl-O-desmethyldiltiazem (M4) (Tsao et al., 1990). Even if following the infusion of diltiazem, plasma concentrations of MA and M1 were around five and two fold higher, respectively, than their peak concentrations measured after diltiazem single iv injection, it is improbable that MA and M1 could have inhibited competitively the deacetylation or the N-demethylation of diltiazem, respectively. This is because following the infusion of diltiazem and the 360 minute-period allowed to estimate diltiazem kinetics, i.e. at the end of the *in vivo* experiment, neither diltiazem or its metabolites could be detected in the homogenates of intestine, liver, and lungs. Therefore, when these tissues were used for the *in vitro* studies, N-demethylation and deacetylation were depressed in absence of detectable concentrations of MA and M1.

Drugs with tertiary amino groups can inactivate selected isoforms of cytochrome P450 by forming stable metabolic intermediates (Bast et al., 1984; Bast et al., 1990), as appears to happen with lidocaine (Saville et al., 1989) and with verapamil (Schwartz et al., 1985). In humans as well as in rabbits, the N-dealkylation of diltiazem may be a source of intermediate metabolites able to inactivate cytochrome P450 isoforms. Supporting this possibility, it has been reported that diltiazem and/or its metabolites bind tightly to liver proteins, and possibly a small fraction may bind irreversibly (Hussain et al., 1994). This irreversible binding could be responsible for the enzyme inactivation of both the N-demethylation and the deacetylation observed *in vitro*. Further studies are required to demonstrate the validity of such hypothesis.

In vivo, compared with the single i.v. injection, the infusion of diltiazem reduced its systemic clearance, although the $AUC_{0-\infty}$ normalized by the dose of MA and M1 were not reduced. The present results are comparable to those reported in humans receiving diltiazem chronically, i.e. there is a decrease in diltiazem clearance and an accumulation of MA and M1 (Abernethy and Montamat, 1987; Montamat and Abernethy, 1987). These results may be explained by two mechanisms not mutually exclusive; firstly, the metabolic routes affected by the infusion of diltiazem are other than the demethylation or the deacetylation of diltiazem. Secondly, the formation of the metabolites is impaired to the same degree as are their elimination. *In vitro*, the incubation of diltiazem in homogenates of liver, small intestine and lungs of rabbits who received the infusion of diltiazem, prove that the production of MA was diminished in the liver, and the formation of M1 was reduced in the small intestine and lungs. On the other hand, the infusion of diltiazem reduced M1 rate of metabolism as well as the amount of M2 formed in small intestine, liver and lungs (Table 5.3). MA rate of elimination was not affected in the small intestine or the lungs, nor was the formation of M2; in the liver, MA rate of metabolism was decreased by 25% but this difference was not statistically significant. We are tempted to postulate that *in vivo*, the infusion of diltiazem affects both the formation and the elimination of MA and M1, reason why despite a decrease in diltiazem clearance MA and M1 plasma levels were not reduced.

In summary, the combination of *in vivo* and *in vitro* studies demonstrate that the decrease in clearance of diltiazem following its prolonged administration is secondary to a decrease in both its N-demethylation and its deacetylation. The

prolonged administration of diltiazem reduced the N-demethylation of diltiazem in the liver and the N-demethylation of M1 in the intestine, liver and lungs. The infusion of diltiazem reduced the deacetylation of diltiazem in the intestine and lungs, although the deacetylation of MA was not affected. These results show that the inhibition of diltiazem and metabolites metabolism by long term infusion of diltiazem is organ specific. Being the metabolism of diltiazem in the rabbit rather similar to that observed in humans (Abernethy and Montamat, 1987; Montamat and Abernethy, 1987; Yeung et al., 1990), we may speculate that both N-demethylation and deacetylation of the parent compound and of MA and M1 are reduced following the chronic administration of diltiazem to humans.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Marion Merrell Dow who donated the standards of diltiazem, MA, M1 and M2, and to Mrs H el ene Maurice and Lucie H eroux for their skilful technical assistance.

TABLE 5.1 Pharmacokinetic parameters of diltiazem, MA and M1 estimated in conscious rabbits following the single iv injection of 2 mg/kg or the infusion of 1.4 mg/hr/kg for 15 hours of diltiazem

	iv injection (n = 7)	infusion (n = 6)
DILTIAZEM		
AUC _{0-∞} /dose (x10 ⁻³ min/mL)	6.799 ± 0.457 ^a	4.602 ± 0.442
Cl (mL/min/kg)	70.3 ± 5.8	54.4 ± 2.4 ^b
Vd (L/kg)	11.6 ± 1.4	9.5 ± 2.4
Z (min ⁻¹)	0.0064 ± 0.0006	0.0058 ± 0.0004
t _{1/2} (min)	108 ± 10	119 ± 9
MA		
AUC _{0-∞} /dose (x10 ⁻³ min/mL)	0.469 ± 0.119	0.629 ± 0.086
M1		
AUC _{0-∞} /dose (x10 ⁻³ min/mL)	1.005 ± 0.108	0.701 ± 0.102

a values are mean ± SE

b *p* < 0.05 compared with iv injection

TABLE 5.2 Rate of metabolism (K_{met}) of diltiazem, normalized by mg of proteins in the 10,000xg supernatant, incubated in the 10,000xg supernatant of 20% homogenates of small intestine, liver and lungs of rabbits who received a single iv injection (2 mg/kg, n = 7) or the infusion (1.4 mg/hr/kg for 15 hours, n = 6) of diltiazem.

	iv injection	infusion
DILTIAZEM K_{met} ($\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)		
Small intestine	0.450 \pm 0.045 ^a	0.494 \pm 0.059
Liver	0.585 \pm 0.033	0.322 \pm 0.039 ^b
Lungs	0.034 \pm 0.007	0.030 \pm 0.005

a values are mean \pm SE

b $p < 0.05$ compared with iv injection

TABLE 5.3 Rate of metabolism (K_{met}) of MA and M1, normalized by mg of proteins in the 10,000xg supernatant, incubated in 20% homogenates of small intestine, liver and lungs of rabbits who received a single iv injection (2 mg/kg, n = 7) or the infusion (1.4 mg/hr/kg for 15 h, n = 6) of diltiazem, and area under the plasma concentration-time curve of M2 generated during the incubation of MA and M1.

	iv injection	infusion
MA K_{met} ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)		
Small intestine	0.125 ± 0.011 ^a	0.138 ± 0.011
Liver	0.314 ± 0.034	0.236 ± 0.033
Lungs	0.014 ± 0.003	0.069 ± 0.066
M2 AUC_{0-∞} ($\mu\text{M min}$)		
Small intestine	24.4 ± 4.1	39.5 ± 8.9
Liver	ND ^b	ND ^b
Lungs	54.5 ± 15.6	55.6 ± 8.9
M1 K_{met} ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)		
Small intestine	0.135 ± 0.004	0.101 ± 0.005 ^c
Liver	0.404 ± 0.047	0.201 ± 0.046 ^c
Lungs	0.014 ± 0.006	0.001 ± 0.000 ^c
M2 AUC_{0-∞} ($\mu\text{M min}$)		
Small intestine	263 ± 17	173 ± 20 ^c
Liver	512 ± 49	210 ± 34 ^c
Lungs	ND ^b	ND ^b

a values are mean ± SE

b not detected

c $p < 0.05$ compared with iv injection

Figure 5.1 Mean plasma concentration of diltiazem, N-desmethyl-diltiazem (MA) and deacetyl-diltiazem (M1) following the infusion of diltiazem (1.4 mg/kg/h for 15 hours) to conscious rabbits (n = 6). *Vertical bars are SEM.*

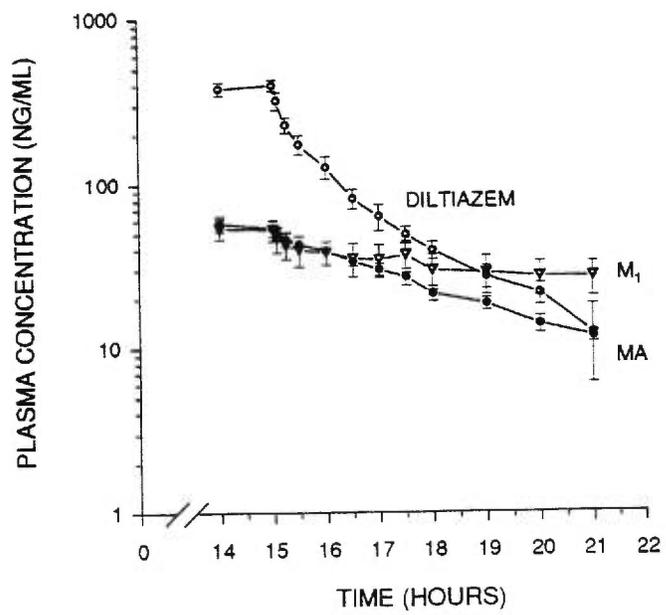


Figure 5.2 Mean plasma concentrations of diltiazem, N-desmethyldiltiazem (MA) and deacetyl-diltiazem (M1) following the single iv injection of diltiazem (2 mg/kg) to conscious rabbits (n = 7). *Vertical bars are SEM.*

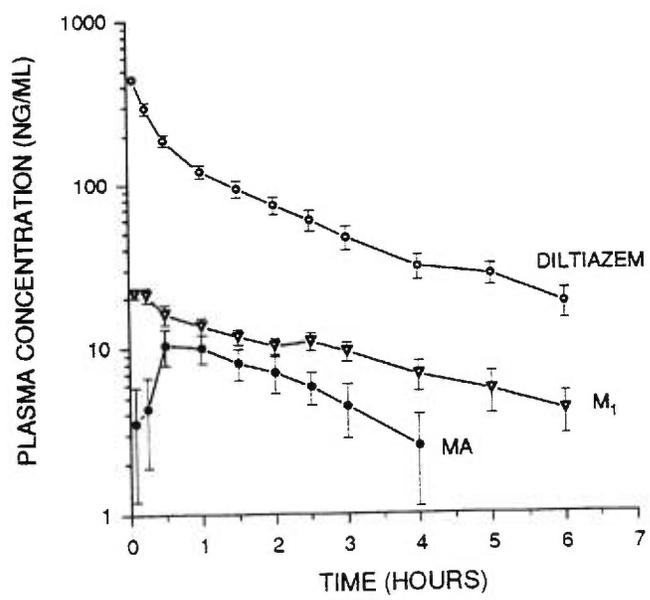


Figure 5.3. Mean (\pm SEM) area under the plasma concentration-time of MA following the incubation of 50 μ M of diltiazem in the 10,000xg supernatant of intestinal, hepatic and lung homogenates of rabbits who received a single iv injection of diltiazem (n = 7) (black bars) or an infusion of diltiazem (n = 6) (hatched bars). *ND not detected.*

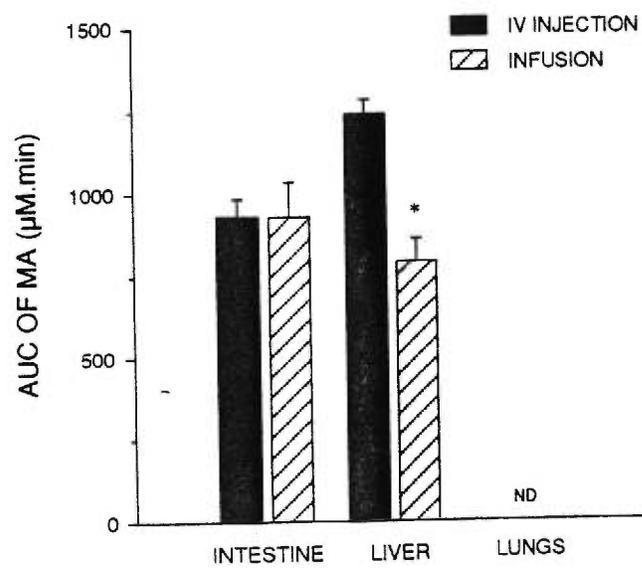
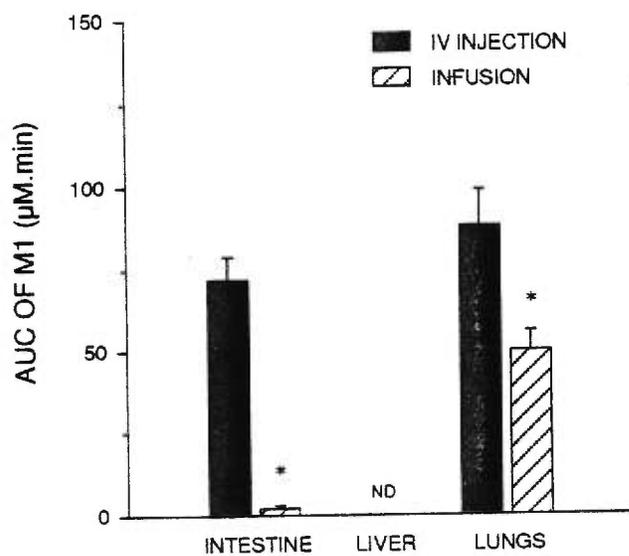


Figure 5.4 Mean (\pm SEM) area under the plasma concentration-time of M1 following the incubation of 50 μ M of diltiazem in the 10,000xg supernatant of intestinal, hepatic and lung homogenates of rabbits who received a single iv injection of diltiazem (n = 7) (black bars) or an infusion of diltiazem (n = 6) (hatched bars). *ND not detected.*



REFERENCES

ABERNETHY, D.R., AND MONTAMAT, S.C. Acute and chronic studies of diltiazem in elderly versus young hypertensive patients. *Am. J. Cardiol.* **60**: 1161-1201, 1987.

BAST, A., SAVENJIE-CHAPEL, E.M., AND NOORDHOEK, J. Relationship between molecular structure and cytochrome P-450 metabolite intermediate complex formation, studied with orphenadrine analogues. *J. Pharm. Sci.* **73**: 953-956, 1984.

BAST, A., VALK, A.J., AND TIMMERMAN, H. Cytochrome P-450 metabolic-intermediate complex formation with a series of diphenhydramine analogs. *Agents and Action* **30**: 161-165, 1990.

BUCKLEY, M.M.T., Grant, S., Goa, K.L., McTAVISH, D., AND SORKIN, E.M. Diltiazem: a reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs.* **39**: 757-806, 1990.

CAILLÉ, G., DUBÉ, L., THÉORÊT, F., MOUSSEAU, N., AND McGILVERAY, I. Stability study of diltiazem and two of its metabolites using a high performance liquid chromatographic method. *Biopharm. Drug Dispos.* **10**: 107-114, 1989.

GIBALDI, M., AND PERRIER, D. Multicompartment models. In J. Swarbrick (ed.)

Pharmacokinetics, Marcel Dekker Inc., New York, 1982, pp. 45-112.

GONZALEZ, F.J. Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**: 346-352, 1992.

GUENGERICH, F.P. Human cytochrome P-450 enzymes. *Life Sci.* **50**: 1471-1478, 1992.

HOGLUND, P., AND NILSSON, L.G. Pharmacokinetics of diltiazem and its metabolites after single and multiple dosing in healthy volunteers. *Ther. Drug Monit.* **11**: 558-566, (1994).

HOMSY, W., LEFEBVRE, M., CAILLÉ, G., AND DU SOUICH, P. Metabolism of diltiazem in hepatic and extrahepatic tissues of rabbits: *in vitro* studies. *Pharmac. Res.* **12**: 609-614, 1995.

HUSSAIN, M.D., TAM, Y.K., GRAY, M.R., AND COUTTS, R.T. Mechanisms of time-dependent kinetics of diltiazem in the isolated perfused rat liver. *Drug Metab. Dispos.* **22**: 36-42, 1994.

KRISHNA, D.R., AND KLOTZ, U. Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin. Pharmacokinet.* **26**: 144-160, 1994.

LEFEBVRE, M., HOMSY, W., CAILLÉ, G., DU SOUICH, P. First-pass uptake of diltiazem in anaesthetized rabbits: role of extrahepatic organs. *Pharmac. Res.* **13**: 124-128, 1996.

LEFEBVRE, M., LACASSE, Y., SPÉNARD, J., GEADAH, D., GOSSARD, D., MOISAN, R., LANDRIAULT, H., DU SOUICH, P., AND CAILLÉ, G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a slow release formulation of diltiazem after the administration of a single and repeated doses to healthy volunteers. *Biopharm. Drug Dispos.* **15**: 227-42, 1994.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., AND RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275, 1951.

MONTAMAT, S.C., AND ABERNETHY, D.R. N-Monodemethyldiltiazem is the predominant metabolite of diltiazem. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **24**: 185-189, 1987.

MURATA, K., YAMAHARA, H., AND NODA, K. Pharmacokinetics of diltiazem and its metabolites in dogs after oral administration of a multiparticulate sustained-release preparation. *Pharmac. Res.* **10**: 1165-1168, 1993.

MURRAY, G.I., BARNES, T.S., SEWELL, H.F., EWEN, S.W.B., MELVIN, W.T., AND BURKE, M.D. The immunocytochemical localisation and distribution of cytochrome P-450 in normal hepatic and extrahepatic tissues with a monoclonal antibody to human cytochrome P-450. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **25**: 465-475, 1988.

PICHARD, L., GILLET, G., FABRE, I., DALLET-BELUCHE, I., BONFILS, C., THÉNOT, J.P., AND MAUREL, P. Identification of the rabbit and human cytochromes P-450III_A as the major enzymes involved in the N-demethylation of diltiazem. *Drug Metab. Dispos.* **18**: 711-719, 1990.

PIEPHO, R.W., BLOEDOW, D.C., LACZ, J.P., RUNSER, D.J., DIMMIT, D.C., AND BROWNE, R.K. Pharmacokinetics of diltiazem in selected animal species and human beings. *Am. J. Cardiol.* **49**: 525-537, 1982.

SAVILLE, B.A., GRAY, M.R., AND TAM, Y.K. Evidence for lidocaine-induced enzyme inactivation. *J. Pharm. Sci.* **78**: 1003-1008, 1989.

SCHWARTZ, J.B., ABERNETHY, D.R., TAYLOR, A.A., AND MITCHELL, J.R. An investigation of the cause of accumulation of verapamil during regular dosing in patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **19**: 512-516, 1985.

SMITH, M.S., VERGHESE, C.P., SHAND, D.G., AND PRITCHETT, E.L.C. Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of diltiazem. *Am. J. Cardiol.* **51**: 1369-1374, 1983.

SUGAWARA, Y., OHASHI, M., NAKAMURA, S., USUKI, S., SUZUKI, T., ITO, Y., KUME, T., HARIGAYA, S., NAKAO, A., GAINO, M., AND INOUE, H. Metabolism of diltiazem. I. Structures of new acidic and basic metabolites in rat, dog and man. *J. Pharmacobiodyn.* **11**: 211-223, 1988.

TSAO, S.C., DICKINSON, T.H., AND ABERNETHY, D.R. Metabolite inhibition of parent drug biotransformation. Studies of diltiazem. *Drug Metab. Dispos.* **18**: 180-182, 1990.

WAZIERS, I. DE, CUGNENC, P.H., YANG, C.S., LEROUX, J.P., AND BEAUNE, P.H. Cytochrome P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253**: 387-394, 1990.

WINER, B.J. *Statistical principles in experimental design*, pp. 149-257. McGraw-Hill, New York, 1971.

YABANA, H., NAGAO, T., AND SATO, M. Cardiovascular effects of the metabolites of diltiazem in dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **7**: 152-157, 1985.

YEUNG, P.K.F., MOSHER, S.J., AND POLLAK, P.T. Pharmacokinetics and metabolism of diltiazem in rabbits after a single intravenous or single oral administration. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.* **16**: 69-74, 1991.

YEUNG, P.F.K., MOSHER, S.J., QUILLIAM, M.A., AND MONTAGUE, T.J. Species comparison of pharmacokinetics and metabolism of diltiazem in humans, dogs, rabbits, and rats. *Drug Metab. Dispos.* **18**: 1055-1059, 1990.

TROISIÈME PARTIE

DISCUSSION GÉNÉRALE

CHAPITRE 6

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

6.1 Pharmacocinétique et pharmacodynamie d'une formulation à libération contrôlée de diltiazem (120 mg) suivant l'administration d'une dose unique et de doses multiples chez le volontaire sain

La réussite d'un traitement médicamenteux repose principalement sur la fidélité du patient envers sa médication. Cette fidélité au traitement est d'autant plus difficile à maintenir chez le patient souffrant d'une maladie chronique puisqu'il ne ressent pas toujours les effets bénéfiques de sa médication. Comme ces traitements sont généralement prescrits à long terme, il est donc important d'avoir une posologie simple et efficace.

En raison du profil pharmacocinétique des premiers bloqueurs des canaux calciques (BCCs) utilisés dans le traitement de l'angine et de l'hypertension, e.g. le diltiazem, la nifédipine et le vérapamil, il était nécessaire de les administrer trois à quatre fois par jour afin d'obtenir une efficacité thérapeutique quotidienne. Dans le but d'améliorer la fidélité au traitement, des formulations à libération prolongée (LP) ont été développées afin de permettre de réduire le nombre d'administration à un ou deux fois par jour.

Plusieurs critères sont généralement requis pour le développement d'une formulation à LP. Les médicaments doivent généralement avoir une courte demi-vie, un index thérapeutique étroit, une très grande facilité d'absorption via le tractus gastro-intestinal et qui n'est pas limitée à un endroit précis ainsi qu'un métabolisme pré-systémique faible (Yacobi et Halperin-Walega, 1989). Le diltiazem comme plusieurs

autres médicaments ne répond pas à tous ces critères, mais le facteur économique ("question de profit pour la compagnie pharmaceutique") joue également un rôle important dans la décision de développer ces nouvelles formulations.

Le rôle d'une formulation à LP est d'atteindre et de maintenir une concentration plasmatique efficace mais non toxique. En fait, la formulation idéale libérera le produit actif à une vitesse constante ce qui permettra d'obtenir une concentration plasmatique stable durant une longue période de temps. Du point de vue pharmacocinétique, les paramètres affectés sont principalement les concentrations plasmatiques maximales (C_{max}) et minimales (C_{min}) durant un intervalle posologique (Buxebaum, 1984; Yacobi et Halperin-Walega, 1989). En effet, la diminution de la vitesse d'absorption du médicament devrait se refléter par une diminution du C_{max} et/ou une augmentation du C_{min} . Par conséquent, les fluctuations des concentrations plasmatiques en seraient réduites (Buxebaum, 1984; Yacobi et Halperin-Walega, 1989).

Comme l'efficacité et l'innocuité des médicaments à LP sont généralement comparées à celles établies avec les formulations à libération immédiate (LI), il est admis que les différences cinétiques puissent influencer la pharmacodynamie du produit. Toutefois, elles ne doivent pas modifier l'intensité de l'effet pharmacologique ou augmenter l'incidence d'effets secondaires.

Il semble que pour les médicaments produisant une réponse simple, c'est-à-dire lorsque la réponse au médicament est immédiate et directement dépendante de sa

présence dans le compartiment sanguin, la vitesse d'absorption n'aurait peu ou pas d'influence sur sa pharmacodynamie (Castaneda-Hernandez et coll., 1994). D'autre part, la vitesse d'absorption serait un facteur non négligeable dans la pharmacodynamie de médicaments pouvant induire certains mécanismes compensatoires telle une tachycardie réflexe ou pouvant créer une tolérance (Castaneda-Hernandez et coll., 1994).

Les effets des BCCs au niveau de la fonction rénale ont été analysés plusieurs fois chez le patient hypertendu de même que chez le volontaire sain. En ce qui concerne le diltiazem, il a été établi que l'administration d'une dose unique intraveineuse ou d'une dose orale de la formulation à LI entraînait une hausse du débit rénal, de la diurèse et de la natriurèse (Kinoshita et coll., 1978; Reams et coll., 1987). Cependant, aucune modification significative de la fonction rénale n'a été observée chez ces mêmes individus suivant un traitement chronique avec la formulation à LI (Bauer et Reams, 1987; Sunderrajan et coll., 1986).

Dans la présente étude, l'objectif principal était de déterminer et de comparer la pharmacocinétique d'une formulation à libération prolongée de diltiazem suivant l'administration d'une dose unique et de doses répétées chez le volontaire sain. Nous avons également mesurer certains paramètres pharmacodynamiques (diurèse, natriurèse, kaliurie, clairance à la créatinine, pression artérielle, fréquence cardiaque et intervalle PR) du diltiazem suivant ces deux régimes d'administration.

Du point de vue pharmacocinétique, on a observé une hausse significative des

concentrations plasmatiques de diltiazem suivant l'administration de doses répétées par rapport à celles observées suivant l'administration d'une dose unique. En fait, sur la base des paramètres pharmacocinétiques de la formulation à LP de diltiazem calculés suivant l'administration de la dose unique, l'accumulation observée était significativement supérieure à l'accumulation théorique. Ce changement s'explique par une diminution de la clairance du diltiazem, mais sans aucune modification de sa demi-vie d'élimination ou de son volume de distribution. Par conséquent, ces résultats laissent croire à une inhibition ou une réduction de la biotransformation pré-systémique du diltiazem. Toutefois, nous ne pouvons affirmer de manière précise que l'activité enzymatique du foie est seule responsable de l'accumulation du diltiazem suivant un traitement chronique.

La hausse significative des concentrations de diltiazem suivant l'administration de doses répétées de la formulation à LP confirment celle démontrée avec la formulation à LI. Cette accumulation peut certes influencer l'activité pharmacologique du diltiazem, considérant que ses principaux métabolites (qui sont également actifs) s'accumulent également suivant un traitement chronique du diltiazem (Hoglund et Nilsson, 1989a, b, c).

Considérant l'accumulation du diltiazem suivant l'administration de formulations à LI et à LP, il aurait été intéressant de comparer leur profil cinétique suivant l'administration de doses répétées. En fait, puisque ces deux formulations libèrent le diltiazem à des vitesses différentes et en des endroits différents dans l'intestin, et que l'intestin contribuerait au métabolisme du diltiazem (voir sections 6.2 et 6.3),

l'accumulation du diltiazem pourrait varier selon le type de formulations employées.

Du point de vue pharmacodynamique, malgré une légère hausse de la diurèse sur une période de 24 heures suivant l'administration d'une dose unique de la formulation à LP de diltiazem, aucun changement significatif de la natriurèse, de la kaliurie et de la clairance à la créatinine n'a été observé. D'autre part, aucun changement des paramètres rénaux n'a été observé suivant l'administration de doses répétées de la formulation à LP de diltiazem. Ces résultats démontrent que la formulation à LP n'affecte pas la réponse rénale du diltiazem tel qu'il avait été démontré avec des traitements à long terme avec le diltiazem administré sous une formulation conventionnelle (Bauer et Reams, 1987; Sunderrajan et coll., 1986).

Contrairement aux effets diurétiques et natriurétiques du diltiazem observés après l'administration d'une dose unique d'une formulation à libération immédiate (Kinoshita et coll., 1978; Reams et coll., 1987), aucun effet significatif n'a été observé avec l'administration de la formulation à libération prolongée. Puisque les effets rénaux du diltiazem se manifestent particulièrement chez les patients avec fonction rénale réduite (Sunderrajan et coll., 1987), l'absence d'effets rénaux pourrait être reliée aux fonctions rénales normales des volontaires sains. D'autre part, l'absence d'effets rénaux pourrait aussi s'expliquer par le manque de réactions homéostatiques reliées à l'administration de la formulation à LP. En fait, tel que démontré avec d'autres produits comme la nifédipine et le furosémide (Kleinbloesem et coll., 1984; Sjostrom et coll., 1988), un changement de la vitesse d'absorption peut modifier l'activité pharmacologique de certains médicaments: une plus faible

vitesse d'absorption aurait moins d'impact ou de conséquences sur les changements homéostatiques engendrés par la réponse à certains produits. Ainsi, contrairement à la formulation à LI de diltiazem, la formulation à LP ne modifierait pas la fonction rénale suivant l'administration d'une dose unique. D'autre part, on remarque qu'une tolérance au niveau rénal s'installe après seulement quelques jours de traitement avec le diltiazem, et ce peu importe la formulation utilisée.

Finalement, aucun des paramètres cardiovasculaires n'a été modifié par l'administration et de la dose unique et des doses répétées de la formulation de diltiazem à LP.

En raison de l'accumulation du diltiazem et probablement de certains de ses métabolites dont quelques-uns sont actifs, et en raison de l'absence quasi totale d'effets significatifs au niveau rénal et cardiovasculaire, aucune relation n'a été démontrée entre la pharmacocinétique et la pharmacodynamie du diltiazem.

6.2 Métabolisme pré-systémique du diltiazem chez le lapin anesthésié: rôle des organes extra-hépatiques

A la lumière des données retrouvées dans la littérature, il est clairement établi que plusieurs organes peuvent contribuer à la biotransformation des médicaments. L'intestin et les poumons sont probablement les principaux organes extra-hépatiques pouvant exercer une activité significative sur la biotransformation des médicaments (Pacifici et coll., 1988a). D'autres organes contribuent également au

métabolisme des médicaments, mais leur participation n'est généralement pas significative.

Tout produit ayant une faible biodisponibilité est susceptible d'être métabolisé au niveau extra-hépatique. En raison des caractéristiques physico-chimiques et pharmacocinétiques du diltiazem (grande liposolubilité, biodisponibilité variant entre 30 et 50%, formation de plusieurs métabolites, etc.), celui-ci s'avérait un candidat propice au métabolisme extra-hépatique.

Notre étude visait donc à documenter, chez le lapin, la contribution des trois principaux organes, e.g. les poumons, le foie et l'intestin, dans le métabolisme du diltiazem. Afin d'évaluer leurs activités enzymatiques, le diltiazem a été administré avant et après chacun des trois organes respectifs, soit au niveau de l'aorte, de la veine jugulaire, de la veine porte et dans le premier segment de l'intestin. Ainsi, les différences cinétiques observées entre ces sites d'administration doivent être attribuées au métabolisme propre à chacun de ces organes (Mistry et Houston, 1985).

Afin de faciliter le déroulement de ce projet de recherche, nous avons opté pour l'utilisation du lapin. Cet animal nous a semblé intéressant puisque, d'une part, la pharmacocinétique du diltiazem a été documentée chez cette espèce et, d'autre part, le profil cinétique du diltiazem chez le lapin est semblable à celui observé chez l'homme (Yeung et coll., 1990).

En raison d'une saturation possible des sites enzymatiques responsables du métabolisme du diltiazem (Bianchetti et coll., 1991), il était nécessaire d'évaluer la contribution des différents organes non en fonction de la dose administrée mais en fonction des concentrations plasmatiques obtenues. Afin d'éviter la saturation des sites enzymatiques, les doses de diltiazem devaient être ajustées afin d'obtenir des concentrations plasmatiques semblables pour chacun des sites d'administration mais inférieures à la limite de saturation. En fonction des tests préliminaires, il a été établi que la pharmacocinétique du diltiazem était linéaire lorsque les concentrations plasmatiques étaient inférieures à environ 800 ng/mL. Tel que démontré chez l'humain (Bianchetti et coll., 1991), l'administration de différentes doses uniques de diltiazem affecte son profil pharmacocinétique: on remarque une hausse des concentrations plasmatiques de diltiazem qui est significativement plus importante que l'augmentation de la dose administrée.

Les résultats obtenus *in vivo* chez le lapin ont confirmé le rôle prépondérant du foie dans le métabolisme du diltiazem. Cependant, il a été démontré que l'intestin contribue également de manière significative au métabolisme du diltiazem alors que les poumons n'ont pas ou peu d'influence sur son métabolisme.

Sur la base de nos résultats, nous confirmons également que le profil pharmacocinétique du diltiazem observé chez le lapin s'apparente à celui de l'homme. En effet, suivant l'administration de diltiazem au niveau du petit intestin, le MA fut le principal métabolite du diltiazem à être observé. D'autre part, le M1 était le principal métabolite détecté dans le plasma suivant l'administration du

diltiazem au niveau de la veine jugulaire et de l'aorte.

Ces observations confirment celles rapportées par Yeung et coll. (1991) qui démontrent que le M1 est aussi le principal métabolite du diltiazem chez le lapin suivant une dose intraveineuse. Cependant, Yeung et coll. (1991) rapportent que les concentrations de M1 et de MA sont semblables suivant l'administration d'une dose orale de diltiazem, ce qui n'est pas le cas dans notre étude. Cette différence pourrait être reliée au mode d'administration du produit puisque, dans notre étude, le diltiazem a été injecté directement dans la lumière intestinale alors que dans l'étude de Yeung et coll. (1991), le diltiazem semble avoir été administré par gavage oral. Puisqu'il a été démontré que le diltiazem était un produit instable en solution et qu'il pouvait se transformer en M1 (Caillé et coll., 1989), il est possible qu'une certaine quantité de M1 ait été produite en solution avant même son métabolisme. Malgré tout, il est intéressant de noter que, dans les deux cas, les concentrations de MA sont plus élevées suivant l'administration d'une dose orale ou intra-intestinale de diltiazem.

Selon Pichard et coll. (1990), la N-déméthylation du diltiazem serait dépendante de l'activité enzymatique du CYP3A4. Cet isoenzyme qui est le plus abondant des isoenzymes de l'organisme (Kinirons et coll., 1993), se retrouve au niveau de plusieurs organes dont principalement le foie et l'intestin (Murray et coll., 1988). Par conséquent, la présence du CYP3A4 expliquerait la forte N-déméthylation du diltiazem observée au niveau de ces deux organes.

La contribution de l'intestin au métabolisme du diltiazem n'est pas étonnante en raison de la présence du CYP3A4, mais aussi parce qu'il contient plusieurs autres enzymes responsables du métabolisme des médicaments tels les CYP1A1, CYP2C8, CYP2C9 et CYP2E1 ainsi que plusieurs enzymes de conjugaison (Gonzales, 1992; Jayyosi et coll., 1991). D'ailleurs, tel que démontré avec d'autres produits comme le propranolol, la morphine et le salbutamol (Abdallah et coll., 1995; du Souich et coll., 1995; Perreault et coll., 1993), il serait logique de considérer d'emblée l'intestin comme un organe ayant une influence beaucoup plus importante sur la biotransformation des médicaments. En fait, malgré une activité enzymatique généralement plus faible que celle du foie, l'épithélium intestinal qui est exposé à la plus forte concentration de médicaments administrés oralement peut influencer de manière significative la biodisponibilité des médicaments. D'ailleurs, dans la présente étude, malgré un pourcentage d'extraction (57%) plus faible que le foie (67%), la quantité absolue de diltiazem métabolisée après l'administration d'une dose orale est supérieure à celle du foie: une extraction de 57% d'une dose de 5 mg/kg (2.85 mg/kg) ne laisse qu'une extraction hépatique de 67% d'une quantité résiduelle de 2.15 mg/kg, soit 1.44 mg/kg.

En plus de la N-déméthylation, il a été démontré que l'intestin peut désacétyler le diltiazem et qu'il serait probablement impliqué dans d'autres réactions enzymatiques. En effet, puisque le diltiazem est métabolisé dans l'intestin (Homsy et coll., 1995a), que le MA et le M1 empruntent les mêmes voies enzymatiques que celles du diltiazem (Figure 6.1), et que les concentrations plasmatiques de MA et du M1 corrigées en fonction de la dose de diltiazem administrée au niveau de

l'intestin et de la veine porte sont semblables (voir tableau 4.2), le diltiazem doit générer d'autres métabolites: le diltiazem pourrait être métabolisé directement en d'autres métabolites et/ou métabolisé en MA et M1 mais qui sont à leur tour transformés via d'autres réactions enzymatiques. Cette dernière hypothèse est très plausible puisqu'il est établi que l'intestin génère le MA et le M1 (Homsy et coll., 1995a,b).

Malgré la contribution significative de l'intestin dans le métabolisme du diltiazem, il est étonnant de constater que les concentrations de M1 soient plus élevées suivant l'administration du diltiazem au niveau de la veine jugulaire ou de l'aorte que lorsqu'il est administrée au niveau du petit intestin et de la veine porte. Une des hypothèses pouvant expliquer ce profil serait une faible désacétylation au niveau de l'intestin et du foie. En fait, si le M1 est essentiellement produit au niveau pulmonaire et/ou systémique, cela expliquerait la faible concentration de M1 produite suivant l'administration d'une dose de diltiazem au niveau intestinal: le diltiazem étant largement métabolisé au niveau de l'intestin et du foie, cela ne laisserait qu'une faible quantité de diltiazem atteignant les poumons et la circulation systémique et, par conséquent, ne générerait qu'une faible quantité de M1.

D'autre part, comme le M1 peut être N-déméthylé ou biotransformé via d'autres voies enzymatiques (voir figure 6.1), une faible production de M1 serait presque automatiquement transformé en M2 ou d'autres métabolites.

Tel que démontré avec le propranolol (du Souich et coll, 1995) et le diltiazem

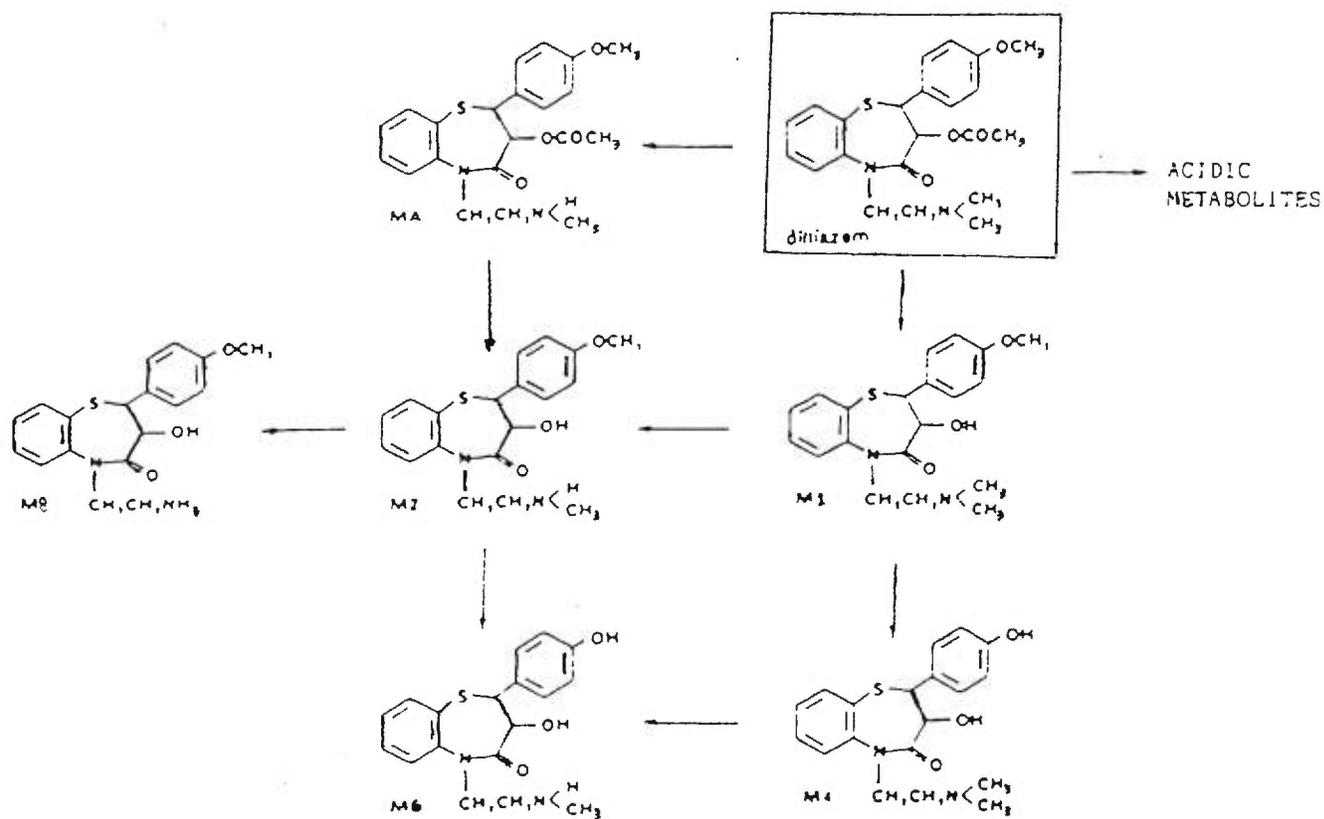


Figure 6.1: Voies de biotransformation du diltiazem (Pichard et coll., 1990)

(Homsy et coll., 1995b), le métabolisme intestinal des médicaments est généralement plus important au niveau des cellules épithéliales du duodénum et du jéjunum qu'au niveau de l'iléon et du côlon. Malgré cette baisse d'activité suivant son administration dans la première partie de l'intestin (0-30 cm) est plus faible que lorsqu'il est administré dans une partie plus distale (150-180 cm) (Homsy et coll., 1995b). Puisque nous avons administré le diltiazem dans la première partie de l'intestin (0-30 cm), il est probable que la plus faible quantité de M1 générée par le métabolisme intestinal du diltiazem soit en partie reliée au site d'injection.

Finalement, une autre raison pouvant expliquer les différences qualitatives et quantitatives de production de M1, et probablement d'autres métabolites, entre les sites d'administration serait la voie d'entrée du produit au niveau hépatique. Tel que démontré par Pang et coll. (1988, 1991), les taux de sulfatation, de dééthylation ou d'hydrolyse sont différents au niveau de la région périportale versus la région de l'artère péri-hépatique. Il est donc concevable que, selon que le produit vienne de l'intestin (veine porte) ou de la circulation systémique (artère hépatique), le métabolisme du diltiazem ainsi que d'autres médicaments soit différent.

Bien que les poumons ne contribuent pas de manière significative au métabolisme du diltiazem, nous avons tout de même observé une faible participation des poumons dans l'extraction du diltiazem (12%). Cette faible activité peut s'expliquer par l'absence de CYP3A4 au niveau pulmonaire (Murray et coll., 1988), mais aussi par les propriétés physico-chimiques du diltiazem. En fait, tel que rapporté dans une autre étude avec la morphine (Abdallah et coll., 1995) et qui a été effectuée dans

des conditions semblables à notre projet, il a été démontré que le métabolisme intestinal (65%) et hépatique (52%) de la morphine avait un profil similaire à celui du diltiazem. D'autre part, l'extraction pulmonaire de la morphine était de 33% ce qui est environ trois fois plus élevée que celle observée avec le diltiazem. Cette différence entre l'extraction pulmonaire de la morphine et du diltiazem pourrait être reliée à leur pKa qui est d'environ 7.9 et 7, respectivement. D'ailleurs, selon Roerig et coll. (1989), les produits captés par le système pulmonaire doivent être cationiques au pH physiologique, liposolubles et avoir un pKa supérieur à 8.

Sur la base de ces résultats, nous pouvons conclure que, chez le lapin, la production de métabolites du diltiazem varient en fonction du site d'administration et ce autant du point de vue quantitatif que qualitatif. Le foie préserve son rôle prédominant dans le métabolisme du diltiazem, quoique l'intestin y contribue également de manière significative. La formation de MA est particulièrement importante au niveau de l'intestin et du foie alors que celle du M1 serait essentiellement effectuée au niveau systémique.

6.3 Inhibition organe-dépendante du métabolisme systémique du diltiazem chez le lapin suivant un traitement chronique

Tel que démontré chez l'humain (Lefebvre et coll., 1994), on remarque une baisse significative de la clairance totale du diltiazem chez le lapin suivant un traitement chronique. L'accumulation ainsi observée serait reliée à une inhibition du métabolisme du diltiazem considérant que la dose de diltiazem administrée fut choisie afin

d'éviter la saturation des sites enzymatiques et qu'aucun changement de l'élimination ou du volume de distribution du diltiazem n'a été observé.

Tel que rapporté par plusieurs auteurs (Abernethy et coll., 1988; Bauer et coll., 1986; Kirch et coll., 1990), le diltiazem est doté de propriétés inhibitrices pour le cytochrome P450 et il peut inhiber le métabolisme de plusieurs médicaments. Il semble, entre autres, que le diltiazem inhibe l'activité du CYP3A4 (Sutton et coll., 1997) ce qui pourrait expliquer l'inhibition de son propre métabolisme. D'autre part, certains de ses métabolites (principalement le MA et le M4) inhibent également le métabolisme du diltiazem (Tsao et coll., 1990; Sutton et coll., 1997) via le CYP3A4. Le MA et le M4 ont d'ailleurs une plus grande affinité que le diltiazem pour cet isoenzyme (Sutton et coll., 1997).

En raison de la contribution de l'intestin, du foie et des poumons (quoique les poumons ne semblent pas jouer un rôle significatif) dans le métabolisme du diltiazem, il était donc intéressant d'identifier les sites enzymatiques possiblement inhibées par un traitement prolongé au diltiazem.

Dans la présente étude, la pharmacocinétique du diltiazem a été premièrement comparée *in vivo* chez le lapin suivant l'administration d'une dose unique intraveineuse et suivant une perfusion jusqu'à l'atteinte de l'état d'équilibre. Les doses administrées ont été choisies afin d'obtenir des concentrations plasmatiques semblables pour les deux traitements. Par la suite, l'épithélium intestinal, le foie et les poumons de chaque lapin analysé *in vivo* ont été isolés afin de vérifier *in vitro*

l'activité enzymatique de chacun en présence, respectivement, du diltiazem, du MA et du M1.

Tel que démontré chez l'humain, la clairance du diltiazem observée *in vivo* à la fin de la perfusion (54.4 mL/min/kg) était significativement inférieure à celle obtenue après l'administration du bolus (70.3 mL/min/kg). Les concentrations plasmatiques des deux principaux métabolites du diltiazem (MA et M1) étaient également plus élevées suivant la perfusion du diltiazem quoique leur surface sous la courbe (SSC) corrigée en fonction de la dose de diltiazem n'ait pas été modifiée de manière significative.

Il est intéressant d'observer que les concentrations plasmatiques de MA étaient légèrement supérieures à celles du M1 à la fin de la perfusion de diltiazem alors qu'elles étaient nettement inférieures suivant l'administration du bolus. En fait, puisque le foie génère particulièrement le MA, il n'est donc pas étonnant que les concentrations plasmatiques de MA augmentent beaucoup plus que celles du M1 suivant une perfusion continue du diltiazem.

Toutefois, lorsqu'on compare le profil du diltiazem, du MA et du M1 suivant la perfusion de diltiazem avec celui observé lors de son administration intestinale (voir section 6.2), on remarque, dans ce dernier cas, que les concentrations plasmatiques de MA étaient supérieures à celles du diltiazem et du M1. Cette observation démontre donc l'importance de la N-déméthylation du diltiazem au niveau pré-systémique.

Suivant l'incubation du diltiazem dans les homogénats de l'épithélium intestinal, du foie et des poumons de lapin ayant reçu une dose unique, nous avons de nouveau démontré l'importante contribution du foie par rapport à celle de l'intestin ou des poumons dans le métabolisme du diltiazem. D'autre part, suivant l'incubation du diltiazem dans les homogénats de lapin ayant reçu une perfusion de diltiazem, la constante de métabolisme (K_{met}) de ce dernier observée au niveau de l'intestin ($0.494 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) était plus grande que celle du foie ($0.322 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). En fait, puisque seul le métabolisme hépatique du diltiazem fut réduit dans les homogénats de lapin ayant reçu la perfusion de diltiazem, il n'était donc pas étonnant d'observer cette situation. Ainsi, l'intestin jouerait un rôle plus important que le foie dans le métabolisme du diltiazem lors d'un traitement chronique.

Sur la base de ces résultats, il semble que l'accumulation du diltiazem observée à la suite d'un traitement prolongée s'expliquerait par l'inhibition du métabolisme hépatique du diltiazem. Cette baisse d'activité serait principalement reliée à l'inhibition de la N-déméthylation du diltiazem puisque la production de MA y fut nettement diminuée. Bien que la biotransformation du diltiazem au niveau pulmonaire et intestinal n'ait pas été significativement affectée par la perfusion de diltiazem, on remarque que la production de M1 y fut significativement réduite. Ainsi, la désacétylation réduite du diltiazem au niveau de ces deux organes contribuerait également à la plus faible clairance du diltiazem suivant un traitement chronique.

Tel que décrit auparavant, le diltiazem et le MA inhibe l'activité enzymatique du

CYP3A4 (Sutton et coll., 1997; Tsao et coll., 1990). Puisque les concentrations plasmatiques de diltiazem et de MA sont significativement augmentées par l'administration de doses répétées de diltiazem, ces deux produits auraient ainsi une plus grande facilité pour inhiber cet isoenzyme. D'autre part, nous ne pouvons ignorer la possibilité d'une inhibition non-compétitive du métabolisme du diltiazem puisqu'aucune trace de diltiazem ou de métabolites n'a été détectée dans les homogénats des tissus étudiés *in vitro*: l'activité enzymatique y était donc déjà réduite lors de l'incubation du diltiazem et de ses métabolites. Il a d'ailleurs été rapporté que le diltiazem et ses métabolites se lieraient fermement aux protéines tissulaires hépatiques et qu'une faible proportion s'y lierait de manière irréversible (Hussain et coll., 1994). Par conséquent, la baisse de la clairance totale de diltiazem observée suivant un traitement chronique pourrait aussi être reliée à une inhibition non-compétitive du métabolisme du diltiazem.

Contrairement au métabolisme du diltiazem qui a été essentiellement diminuée au niveau hépatique par la perfusion du diltiazem, la biotransformation du M1 a été significativement réduite au niveau des trois homogénats étudiés alors que la biotransformation du MA n'y fut pas modifiée de manière significative mais fut tout de même réduite au niveau hépatique. De plus, la N-déméthylation du M1 fut significativement réduite au niveau et du petit intestin et du foie. Donc, bien que le diltiazem, le MA et le M1 empruntent les mêmes voies enzymatiques, on remarque des différences qualitatives et quantitatives entre les profils cinétiques de chacun.

Finalement, les questions soulevées quant à la production de M1 au niveau

hépatique dans l'article précédent (voir section 6.2) ont de nouveau été soulevées dans le présent article. En effet, nous n'avons pas détecté de M1 suivant l'incubation de diltiazem dans les homogénats de foie. Tel que décrit auparavant, ces résultats suggèrent que les cellules hépatiques ne peuvent désacétyler le diltiazem ou que le M1 généré est rapidement métabolisé en d'autres métabolites. Ces résultats ont d'ailleurs été corroborés par l'incubation de MA dans les homogénats du foie puisque sa désacétylation en M2 n'y a pas été détectée.

De manière générale, il semble que l'inhibition de la N-déméthylation du diltiazem est principalement responsable de son accumulation suivant un traitement chronique, et que l'inhibition du métabolisme du diltiazem et de ses métabolites est spécifique à chaque organe.

6.4 Tout est bien qui ... recommence bien

Les résultats obtenus dans le présent projet de recherche ne font que consolider l'importance de mieux définir la contribution du métabolisme extra-hépatique dans la biotransformation des médicaments. Etant donné que l'intestin peut jouer un rôle significatif dans plusieurs cas, son implication peut être d'autant plus importante vis-à-vis l'utilisation de formulations à libération prolongée.

Les présents résultats ont permis de déterminer la contribution de quelques organes dans le métabolisme du diltiazem et d'expliquer, en partie, la pharmacocinétique non-linéaire du diltiazem suivant un traitement prolongé. Il est certain que nous ne

pouvons d'emblée appliquer ces résultats à l'humain, mais je crois que ce modèle peut s'avérer fort utile pour une meilleure compréhension du métabolisme extra-hépatique des médicaments.

Ces résultats soulèvent d'autres questions sur la pharmacocinétique du diltiazem. Parmi les futurs projets possibles, il serait intéressant de mieux décrire la pharmacocinétique des principaux métabolites du diltiazem et de définir le rôle des différents enzymes impliqués dans la biotransformation du diltiazem.

Sutton et coll., (1997) ont d'ailleurs répondu à plusieurs questions et confirmé certains résultats sur la pharmacocinétique du diltiazem en mettant en évidence que le CYP3A4 est principalement responsable de la N-déméthylation du diltiazem; que le MA et le N-N-diméthyl-diltiazem possèdent des propriétés inhibitrices beaucoup plus puissantes que le diltiazem sur l'activité enzymatique du CYP3A4 ce qui expliquerait en partie l'accumulation du diltiazem et de certains de ses métabolites suivant un traitement prolongé; et que les isoenzymes CYP1A2, 2C9 et 2E1 ne sont pas ou peu impliqués dans le métabolisme du diltiazem.

Cette dernière approche est donc essentielle pour une meilleure compréhension de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamie des médicaments et est d'autant plus importante vis-à-vis des médicaments hautement toxiques ou ayant un index thérapeutique étroit. Grâce à une meilleure connaissance de la distribution des enzymes chez l'humain et de leur implication au niveau du métabolisme de chacun des médicaments, nous pourrions ainsi mieux utiliser les médicaments selon les

différentes situations cliniques.

CHAPITRE 7

BIBLIOGRAPHIE

Abernethy, D.R., Egan, J.M., Dickinson, T.H., et Carrum, G. (1988). Substrate-selective inhibition by verapamil and diltiazem: differential disposition of antipyrine and theophylline in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **244**: 994-999.

Abernethy, D.R., et Montamat, S.C. (1987). Acute and chronic studies of diltiazem in elderly versus young hypertensive patients. *Am. J. Cardiol.*, **60**: 1161-1201.

Addonizio, V.P., Fisher, C.A., Strauss III, J.F. Wachtfogel, Y.T., Colman, R.W., et coll. (1986). Effects of verapamil and diltiazem on human platelet function. *Am. J. Physiol.*, **250**: H366-H371.

Abdallah, C., Besner, J.G., du Souich, P. (1995). Presystemic elimination of morphine in anesthetized rabbits; contribution of the intestine, liver and lungs. *Drug Metab. Dispos.*, **23**: 584-589.

Ahmad, S. (1985). Diltiazem and hyperglycaemic coma. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **6**: 494.

Allen, M., Mellow, M., Robinson, M.G., et Orr, W.C. (1987). Comparison of calcium channel blocking agents and an anticholinergic agent on oesophageal function. *Alimentary Pharmacol. Ther.*, **1**: 153-159.

Altman, R., Scazziotto, A., et Dujovne, C. (1988). Diltiazem potentiates the effect of aspirin on platelet aggregation. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **3**: 320-325.

Anderson, M.W., Orton, T.C., Pickett, R.D., Eling, T.E. (1974). Accumulation of amines in the isolated perfused rabbit lung. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **189**: 456-466.

Andre-Fouet, X., Usdin, J.P., Gayet, C., Wilner, C., Thizy, J.F., Vaillet, M., Apoil, E., Vernant, P., et Pont, M., (1983). Comparison of short-term efficacy of diltiazem and propranolol in unstable angina at rest - a randomized trial in 70 patients. *Eur. Heart J.*, **4**: 691-698.

Andrejak, M., Andrejak, H.L., et Lesbre, J.Ph. (1987). Diltiazem increases steady state digoxin serum levels in patients with cardiac disease. *J. Clin. Pharmacol.*, **27**: 967-970.

Andren, L., Hoglund, P., Dotevall, A., Eggertsen, R., Svensson, A., et coll. (1988). Diltiazem in hypertensive patients with type II diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.*, **62**: 114G-120G.

Anthony, T., Jastremski, M., Elliott, W., Morris, G., et Prasad, H. (1986). Charcoal hemoperfusion for the treatment of a combined diltiazem and metoprolol overdose. *Ann Emerg. Med.*, **15**: 1344-1347.

Applegate, W.B., Phillips, H.L., Schnaper, H., et coll. (1991). A randomized controlled trial of the effects of three antihypertensive agents on blood pressure control and quality of life in older females. *Arch. Int. Med.*, **151**: 1817-1823.

Ashraf, M., et Rahamathylla, P.M. (1984). Cardiac injury in short duration anoxia and modification by diltiazem, a calcium channel blocking agent. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **3**: 1237-1244.

Bahls, F.H., Ozuna, J., et Ritchie, D.E. Interactions between calcium channel blockers and the anticonvulsivants carbamazepine and phenytoin. *Neurol.*, **41**: 740-742.

Bardet, J., Baudet, M., Rigaud, M., Farcet, J.C., Gueret, P., et Bourdarias, J.P. (1979). Diltiazem, a new calcium antagonist, versus propranolol in treatment of spontaneous angina pectoris. *Am. J. Cardiol.*, **43**: 416.

Bauer, L.A., Stenwall, M., Horn, J.R., Davis, R., Opheim, K., et coll. (1986). Changes in antipyrine and indocyanine green kinetics during nifedipine, verapamil, and diltiazem therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **40**: 239-242.

Belpaire, F.M. et Bogaert, M.G. (1990). Binding of diltiazem to albumin, α 1-acid glycoprotein and to serum in man. *J. Clin. Pharmacol.*, **30**: 311-317.

Bend, J.R., et Serabjit-Singh, C.J. (1984). Xenobiotic metabolism by extrahepatic tissues: relationship to target organ and cell toxicity. Dans Mitchell, J.R., et horning, M.G. (Eds.). *Drug Metabolism Drug Toxicity*, Raven Press, New York, 99-136.

Bertrand, M.E., Dupuis, B.A., Lablanche, J.M., Tilmant, P.Y., et Thieuleux, F.A. (1982). Coronary hemodynamics following intravenous or intracoronary injection of diltiazem in man. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **4**: 695-699.

Bianchetti, G., Regazzi, M., Rondanelli, R., Ascalone, V., et Morselli, P.L. (1991). Bioavailability of diltiazem as a function of the administered dose. *Biopharm. Drug Dispos.*, **12**: 391-401.

Bidiville, J., Nussberger, J., Waeber, G., et coll. (1988). Individual responses to converting enzyme inhibitors and calcium antagonists. *Hypertension*, **11**: 166-173.

Bighley, L.D., Dimmitt, D.C., et McGraw, B.F. (1980). Bioavailability of diltiazem hydrochloride formulations. *Clin. Res.*, **28**: 587A.

Blake, K., et Clusin, W.T. (1986). Effect of diltiazem on ischemic myocardial depolarization and extracellular K⁺ accumulation. *Eur. J. Pharmacol.*, **127**: 261-265.

Block, P.J., et Winkle, R.A. (1983). Hemodynamic effects of antiarrhythmic drugs. *Am. J. Cardiol.*, **52**: 14C-23C.

Bolli, R., Triana, F., et Jeroudi, M.O. (1989). Postischemic mechanical and vascular dysfunction (myocardial stunning and microvascular stunning) and the effects of calcium-channel blockers of ischemia/reperfusion injury. *Clin. Cardiol.*, **12**: III16-III25.

Bonzel, T., Wollschlager, H., Lollgen, H., Munzel, T., Wehrle, B., et Just, H. Effect of intravenous diltiazem on coronary artery diameter in patients with coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **3 (suppl. 5)**: 578.

Borm, P.J., Frankhuyzen-Sierevogel, A.C., Weller, E.B.C., et Noordhoek, J. (1985). Absorption and metabolism of hexamethylamine and pentamethylmelamine in rat everted perfused gut segments: correlation with in vitro data. *J. Pharm. Pharmac.* **37**: 629-636.

Bourassa, M.G., Coté, P., Thérooux, P., Tubau, J.F., Genain, C., et Waters, D.D. (1980). Hemodynamics and coronary flow following diltiazem administration in anaesthetized dogs and humans. *Chest*, **78**: 224-230.

Boyd, M.R. (1977). Evidence for the Clara cells as a site of cytochrome P450 dependent mixed-function oxidase activity in lung. *Nature*, **269**: 713-715.

Braunwald, E. (1982). Mechanism of action of calcium-channel-blocking agents. *New. Eng. J. Med.*, **307**: 1618-1627.

Brinkschulte, B., Breyer-Pfaff, U. (1980). The contribution of alpha-1 acid glycoprotein lipoproteins and albumin to the plasma binding of perazine, amitriptyline and nortriptyline in healthy man. *Nauny Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **314**: 61-66.

Brockmoller, J., Wagner, K., Neumayer, H.H., et Heinemeyer, G. (1988). Interaction of ciclosporin and diltiazem. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **337**: 503.

Buckley, M.M.T., Grant, S., Goa, K.L., McTavish, D., et Sorkin, E.M. (1990). Diltiazem: a reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs*, **39**: 757-806.

Burke, M.D., et Orrenius, S. (1979). Isolation and comparison of endoplasmic reticulum membranes and their mixed function oxidase activities from mammalian extrahepatic tissues. *Pharmacol. Ther.*, **7**: 549-599.

Buxenbaum, H. (1984). Pharmacokinetic determinants in the design and evaluation of sustained release dosage forms. *Pharm. Res.*, **2**: 82-88.

Caillé, G., Dubé, L., Théorêt, Y., Varin, F., Mousseau, N., et McGilveray, M. (1989). Stability study of diltiazem and two of its metabolites using a high performance liquid chromatographic method. *Biopharm. Drug Dispos.*, **10**: 107-114.

Cappiello, M., Franchi, M., Giuliani, L., et Pacifici, G.M. (1989). Distribution of 2-naphthol sulphotransferase and its endogenous substrate adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulphate in human tissues. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **37**: 317-320.

Cappiello, M., Giuliani, L., et Pacifici, G.M. (1991). Distribution of UDP-glucuronosyltransferase and its endogenous substrate uridine 5'-diphospho-

glucuronic acid in human tissues. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **41**: 345-350.

Catterall, W.A., et Striessnig, J. (1992). Receptor sites for calcium channel antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.*, **13**: 256-262.

Chaffman, M., et Brogden, R.N. (1985). Diltiazem: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, **29**: 387-454.

Cholerton, S., Daly, A.K., Idle, J.R. (1992). The role of individual human cytochromes P450 in drug metabolism and clinical response. *Trends Pharmacol. Sci.*, **13**: 434-439.

Clozel, J.P., Théroux, P., et Bourassa, M.G. (1983). Effects of diltiazem on experimental myocardial ischemia and on left ventricular performance. *Circulation Res.*, **52**: 120-128.

Clozel, J-P., Caille, G., Taeymans, Y., Theroux, P., Biron, P., et coll. (1984). Improved gas determination of diltiazem and deacetyldiltiazem in human plasma. *J. Pharmac. Sci.*, **73**: 207-209.

Collins, W.C.J., Cullen, M.J., et Feely, J. (1987). Calcium channel blocker drugs and diabetic control. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **42**: 420-423.

Coon, M.J., Ding, X., Pernecky, S.J., et Vaz, A.D.N. (1992). Cytochrome P450:

progress and predictions. *FASEB, J.*, **6**:669-673.

Coppola, L., Grassia, A., Giunta, R., Verrazzo, G., et Tirelli, A. (1986). Effect of diltiazem on platelet aggregability, Erythrocyte filtrability, and thromboelastographic pattern in normal and atherosclerotic subjects. *Curr. Ther. Res.*, **40**: 1090-109.

Coutts, R.T., Su, P., et Baker, G.B. (1994). Involvement of CYP2D6, CYP3A4, and other cytochrome P-450 isozymes in N-dealkylation reactions. *J. Pharmacol. Toxicol. Method*, **31**: 177-186.

Cremer, K.F., Pieper, J.A., Joyal, M., et Mehta, J. (1984). Effects of diltiazem, dipyridamole, and their combination on hemostasis. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **36**: 641-644.

Da Costa, J.T., Melo Gomez, J.A., Espirito Santo, J., et Viana Queiros, M. (1987). Inefficacy of diltiazem in the treatment of Raynaud's phenomenon with associated connective tissue disease: a double-blind placebo controlled study. *J. Rheum.*, **14**: 858-859.

Dash, H., Copenhaver, G.L., et Ensminger, S. (1985). Improvement in regional wall motion and left ventricular relaxation after administration of diltiazem in patients with coronary artery disease. *Circulation*, **72**: 353-363.

De Servi, S., Ferrario, M., Ghio, S., Bartoli, A., Mussini, A., et coll. (1986). Effects

of diltiazem on regional coronary hemodynamics during atrial pacing in patients with stable exertional angina: implications for mechanism of action. *Circulation*, **73**: 1248-1253.

De Waziers, I., Cugnenc, P.H., Yang, C.S., Leroux, J.P., et Beaune, P.H. (1990). Cytochrome P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **253**: 387-394.

Dimmitt, D.C., Yu, D.K., Elvin, A.T., et Giesing, D.H. Pharmacokinetics of cardizem and propranolol when administered alone and in combination. *Pharmac. Res.*, **4 (suppl.)**: 82.

Domin, B.A., Devereux, T.R., et Philpot, R.M. (1986). The cytochrome P450 monooxygenase system of rabbit lung: enzyme components, activities and induction in the nonciliated bronciolar epithelial (Clara) cell, alveolar type II cell and alveolar macrophage. *Molec. Pharmacol.*, **30**: 296-303.

Dominic, J.A., Miller, R.E., Anderson, J., et McAllister, R.G. (1980). Pharmacology of verapamil II: impairment of glucose tolerance by verapamil in the conscious dog. *Pharmacol.*, **20**: 196-202.

Dunlap, K, Luebke, J.I., et Turner, T.J. (1995). Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.*, **18**: 89-98.

Du Souich, P., Lery, N., Lery, L., Varin, F., Boucher, S., Vezina, M., Pilon, D., Spenard, J., et Caille, G. (1990). Influence of food on the bioavailability of diltiazem and two of its metabolites following the administration of conventional tablets and slow-release capsules. *Biopharm. Drug Dispos.*, **11**: 137-147.

Du Souich, P., Maurice, H., et Héroux, L. (1995). Contribution of the small intestine to the first-pass uptake and systemic clearance of propranolol in rabbits. *Drug Metab. Dispos.*, **23**: 279-284.

El-Tamini, H., Davies, G.J., Kaski, J-C., Vejar, M., Galassi, A.R., et coll. (1989). Effects of diltiazem alone or with isosorbide dinitrate or with atenolol both acutely and chronically for stable angina pectoris. *Am. J. Cardiol.*, **64**: 717-724.

Enyeart, J.J., Price, W.A., Hoffman, D.A., et Woods, L. (1983). Profound hyperglycemia and metabolic acidosis after verapamil overdose. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2**: 1228-1231.

Ernst, E., et Matrai, A. (1988). Diltiazem alters blood rheology. *Pharmatherapeutica*, **5**: 213.

Etoh, A., Kohno, K., et Shimizu, T. (1983). Studies on the drug interaction of diltiazem. Effect of co-administered diltiazem on the bioavailability of propranolol. *J. Pharmac. Soc. Jpn.* **103**: 434-441.

Fagan, T.C. (1991). Diltiazem: its place in the antihypertensive armamentarium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **19 (suppl. 9)**: S26-S31.

Fleckenstein, A., Nakayama, K., Fleckenstein-Grun, G. (1976). Interaction of H ions, Ca-antagonistic drugs and cardiac glycosides with excitation-contraction coupling of vascular smooth muscle. Dans Betz E. (Ed.). *Ionic actions on vascular smooth muscle*, Berlin, Springer-Verlag, 117-123.

Fleckenstein, A. (1977). Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **17**: 149-166.

Foult, J-M., Itenberg, A., Blanchet, F., et Zouioueche, S. (1986). Effect of diltiazem on coronary reaction hyperemia in patients with flow-limiting coronary artery stenosis. *Am. Heart J.*, **112**: 1232-1237.

Frachtman, R.L., Botoman, V.A., et Pope II, C.E. (1986). A double-blind crossover trial of diltiazem shows no benefit in patients with dysphagia and/or chest pain of esophageal origin. *Gastroenterology*, **90**: 1420.

Frishman, W.H., Charlap, S., Goldberger, J., et coll. (1985). Comparison of diltiazem and nifedipine for both angina pectoris and systemic hypertension. *Am. J. Cardiol.*, **56 (suppl. H)**: 41H-46H.

Frishman, W.H., Zawada, E.T., Smith, L.K., et coll. (1987). Comparison of hydrochlorothiazide and sustained-release diltiazem for mild-to-moderate systemic hypertension. *Am. J. Cardiol.*, **59**: 615-623.

Frishman, W., Charlap, S., Goldberger, J., Kimmel, B., et Stroh, J. (1988). Diltiazem, nifedipine, and their combination in patients with stable angina pectoris: effects on angina, exercise tolerance, and the ambulatory electrocardiographic ST segment. *Circulation*, **77**: 774-786.

Frohlich, E.D. (1988). Clinical pharmacology of calcium antagonists. *Hypertension*, **11 (suppl. I)**: I222-I224.

Garnic, J.D., Blackshear, J.L., Harrington, D.P., et Hollenberg, N.K. (1983). Calcium channel blockade and renal blood supply. Enhanced vascular responses to diltiazem in normotensive offspring of hypertensive patients. *Circulation*, **68**: 45.

Geddes, D.M., Nesbitt, K., Trail, T., Blackburn, J.P. (1979). First-pass uptake of ¹⁴C-propranolol by the lung. *Thorax*, **34**: 810-813.

Ghio, S., De Servi, S., Ferrario, M., Poma, E., Bramucci, E., et coll. (1988). Acute hemodynamic effects of diltiazem in patients with recent Q-wave myocardial infarction. *Eur. Heart J.*, **9**: 740-745.

Gibson, R.S., Boden, W.E., Theroux P., Strauss, H.D., et Pratt, C.M. (1986).

Diltiazem and reinfarction in patients with non-Q-wave myocardial infarction. *New Engl. J. Med.*, **315**: 423.

Ginsberg, D., Pappas, J.E., Rofman, B.A., Gutsell, T.L., Schumer, B., et coll. (1988). Once-daily dosing of sustained-released diltiazem capsules in mild-to-moderate hypertension. *J. Am. Osteopathic Assoc.*, **88**: 1489-1492.

Glossmann, H., Ferry, D.R., Goll, A., et coll. (1985). Calcium channels: introduction into their molecular pharmacology. Dans Fleckenstein A., van Breemen C., Gross R., Hoffmeister A. (Ed). *Cardiovascular effects of dihydropyridines-type calcium antagonists and agonists*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 113-139.

Godfraind, T. (1988). Pharmacological basis of the classification of calcium antagonists. *Acta Otolaryngol.*, **suppl. 460**: 33-41.

Godfraind, T. (1993). Pharmacologie expérimentale des antagonistes du calcium. *Thérapie*, **48**: 637-649.

Godfraind, T., et Polster, P. (1968). Etudes comparative de médicaments inhibant la réponse contractile de vaisseaux isolés d'origine humaine ou animale. *Thérapie*, **23**: 1209-1220.

Goebel, K-J., et Kollé, E.U. (1985). High-performance liquid chromatographic determination of diltiazem and four of its metabolites in plasma: application of

pharmacokinetics. *J. Chromatog.*, **345**: 355-363.

Goldin, B.R. (1990). Intestinal microflora: metabolism of drugs and carcinogens. *Ann. Med.*, **22**: 43-48.

Gonzalez, F.J. (1990). Molecular genetics of the P-450 superfamily. *Pharmacol. Ther.*, **45**: 1-38.

Gonzalez, F.J. (1992). Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol. Sci.*, **13**: 346-352.

Gram, T.E. (1980). The metabolism of xenobiotics by mammalian lung. Dans *Extrahepatic metabolism of drugs and other foreign compounds*. Gram, T.E., (Ed.). S.P. Medical and Scientific Books, New-York, 159-209.

Gram, T.E., Okine, L.K., et Gram, R.A. (1986). The metabolism of xenobiotics by certain extrahepatic organs and its relation to toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **26**: 259-292.

Guengerich, F.P. (1992). Human cytochrome P-450 enzymes. *Life Sci.*, **50**: 1471-1478.

Guengerich, F.P., Distlerath, L.M., Reilly, P.E.B., Wolff, T., Shimada, T., Umbenhauer, D.R., Martin, M.V. (1986). Human-liver cytochrome P-450 involved

in polymorphism of drug oxidation. *Xenobiotica*, **16**: 367-378.

Guidicelli, J.F., Berdeaux, A., Edouard, A., Lhoste, F., Richer, C., Thuillez, C., et Jacolot, A. (1984). Attenuation by diltiazem of arterial baroreflex sensitivity in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **26**: 675-679.

Hachulla, E., et Devulder, B. (1993). Antagonistes calciques et phenomene de Raynaud. *Therapie*, **48**: 707-711

Harris, P.A., et Riegelman, S. (1969). Influence of the route of administration on the area under the plasma concentration-time curve. *J. Pharm. Sci.*, **58**: 71-75.

Hedner, T. (1986). Calcium channel blockers: spectrum of side effects and drug interactions. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **58 (suppl. 2)**: 119-130.

Henderson, A.H. (1983). Calcium antagonist in the treatment of ischaemic heart disease. I. *Postgraduate Med. J.*, **59 (suppl. 2)**: 7-10.

Henry, P.D. Comparative pharmacology of calcium antagonists: nifedipine, verapamil and diltiazem. *Am. J. Cardiol.*, 1980; **46**: 1047-1058.

Hermann, D.J., Krol, T.F., Dukes, G.E., Hussey, E.K., Danis, M., et coll. Comparison of verapamil, diltiazem and labetolol on the bioavailability and metabolism of imipramine. *J. Clin. Pharmacol.*, **32**: 176-183.

Hermann, Ph., Rodger, S.D., Remones, G., Thenot, J.P., London, D.R., et coll. (1983). Pharmacokinetics of diltiazem after intravenous and oral administration. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **24**: 349-352.

Hermesmeyer, K. (1998). Role of T channels in cardiovascular function. *Cardiology*, **89** (Suppl. 1): 2-9.

Hoensch, H., Woo, C.H., Raffin, S.B., et Schmid, R. (1976). Oxidative metabolism of foreign compounds in rat small intestine; cellular localization and dependence on dietary iron. *Gastroenterol.*, **70**: 1063-1070.

Hoglund, P. et Nilsson, L-G. (1988). Physiological disposition of intravenous administered ¹⁴C-labeled diltiazem in healthy volunteers. *Ther. Drug Monit.*, **10**: 401-409.

Hoglund, P. et Nilsson, L-G. (1989a). Pharmacokinetics of diltiazem and its metabolites after repeated multiple-dose treatments in healthy volunteers. *Ther. Drug Monit.*, **11**: 543-550.

Hoglund, P. et Nilsson, L-G. (1989b). Pharmacokinetics of diltiazem and its metabolites after repeated single dosing in healthy volunteers. *Ther. Drug Monit.*, **11**: 551-557.

Hoglund, P. et Nilsson, L-G. (1989c). Pharmacokinetics of diltiazem and its

metabolites after single and multiple dosing in healthy volunteers. *Ther. Drug Monit.*, **11**: 558-566.

Hollifield, J.W., Heusner, J.J., DesChamps, M., et coll. (1988). Comparison of equal-weight oral dosages of verapamil hydrochlorothiazide and diltiazem hydrochlorothiazide in patients with mild-to-moderate hypertension. *Clin. Pharmacol.*, **7**: 129-134.

Homsy, W., Lefebvre, M., Caillé, G., et du Souich, P. (1995a). Metabolism of diltiazem in hepatic and extrahepatic tissues of rabbits: "In vitro" studies. *Pharm. Res.*, **12(4)**: 609-614.

Homsy, W., Caillé, G., et du Souich, P. (1995b). The site of absorption in the small intestine determines diltiazem bioavailability in the rabbit. *Pharm. Res.*, **12(11)**: 1722-1726.

Hook, G.E.R., et Bend, J. (1976). Pulmonary metabolism of xenobiotics. *Life Sci.*, **18**: 279-290.

Hosey, M.M., et Lazdunski, M. (1988). Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. *J. Membr. Biol.*, **104**: 81-105.

Hossack, K.F., et Bruce, R.A. (1981). Improved exercise performance in persons with stable angina pectoris receiving diltiazem. *Am. J. Cardiol.*, **47**: 95-101.

Hossack, K.F., Pool, P.E., Steele, P., Crawford, M.H., DeMaria, A.N., Cohen, L.S., et Ports, T.A. (1982b). Efficacy of diltiazem in angina on effort: a multicenter trial. *Am. J. Cardiol.*, **49**: 567-572.

Hossack, K.F., Brown, B.G., Stewart, D.K., et Dodge, H.T. (1984a). Diltiazem-induced blockade of sympathetically mediated constriction of normal and diseased coronary arteries: lack of epicardial coronary dilatory effect in humans. *Circulation*, **70**: 465-471.

Hossack, K.F., Day, B., et Bruce, R.A. (1984b). Diltiazem provides sustained symptomatic improvement in patients with exertional angina. *Aust. New Zealand J. Med.*, **14 (suppl. 2)**: 562-563.

Hossack, K.F., Pool, P.E., Seagren, S.C., Day, B., Bruce, R.A. (1985). Long-term monotherapy of angina pectoris with diltiazem. *Austr. New Zeal. J. Med.*, **15**: 221-225.

Humen, D.P., O'Brien, P., Purves, P., Johnson, D., et Kostuk, W.J. (1986). Effort angina with adequate beta-blockade: comparison with diltiazem alone and in combination. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **7**: 329-335.

Hung, J., Lamb, I.H., Connolly, S.J., Jutzy, K.R., Goris, M.L., et coll. (1983). The effect of diltiazem and propranolol, alone and in combination on exercise performance and left ventricular function in patients with stable effort angina: a

double-blind, randomized, and placebo-controlled study. *Circulation*, **68**: 560-567.

Hung, J., Hackett, P.L., Gordon, S.P.F., et Ilett, K.F. (1988). Pharmacokinetics of diltiazem in patients with unstable angina pectoris. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **43**: 466-470.

Hurst, J.W., et Spencer, B.K. (1978). Definitions and classification of coronary atherosclerotic heart diseases. Dans Hurst, J.W., McGraw-Hill Book Co. (Ed.). *The Heart*, New York, 1984.

Hussain, M.D., Tam, Y.K., Gray, M.R., et Coutts, R.T. (1994). Mechanisms of time-dependant kinetics of diltiazem in the isolated perfused rat liver. *Drug Metab. Dispos.*, **22**: 36-42.

Huycke, E.C., Sung, R.J., Dias, V.C., Milstein, S., Hariman, R.J., et coll. (1989). Intravenous diltiazem for termination of reentrant supraventricular tachycardia: a placebo-controlled, randomized, double-blind, multicenter study. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **13**: 538-544.

Ilett, K.F., Tee, L.B.G., Reeves, P.T., et Minchin, R.F. (1990). Metabolism of drugs and other xenobiotics in the gut lumen and wall. *Pharmac. Ther.*, **46**: 67-93.

Inouye, I.K., Massie, M., Benowitz, N., Simpson, P., et Loge, D. (1984). Antihypertensive therapy with diltiazem and comparison with hydrochlorothiazide.

Am. J. Cardiol., **53**: 1588-1592.

Isshiki, T., Amodeo, C., Messerli, F.H., Pegram, B.L., et Frohlich, E.D. (1987). Diltiazem maintains renal vasodilatation without hyperfiltration in hypertension: studies in essential hypertensive man and the spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **1**: 359-366.

Isshiki, T., Pegram, B.L., et Frohlich, E.D. (1988). Hemodynamic comparison of diltiazem and TA-3090 in spontaneously hypertensive and normal Wistar-Kyoto rats. *Am. J. Cardiol.*, **62**: 79G-84G.

Jayyosi, Z., Livertoux, M.H., Batt, A.M., et Siest, G. (1991). Inhibition des cytochromes P-450. Mécanismes biochimiques et conséquences thérapeutiques éventuelle. I- Inactivation par complexation réversible. *J. Toxicol. Clin. Exp.*, **11**: 9-30.

Johnson, G.J., Power, D.A., D'Apice, A.F.J., Bury, R.W., et Moulds, R.F.W. (1988). The effect of diltiazem on cyclosporin-A blood levels. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, Abstract 136, (suppl. 12).

Jorfeldt, L., Lewis, D.H., Lofstrom, J.B., et Post, C. (1979). Lung uptake of lidocaine in healthy volunteers. *Acta Anesth. Scand.*, **23**: 567-584.

Joyal, M., Pieper, J., Creer, K., Feldman, R.L., et Pepine, C.J. (1986).

Pharmacodynamic aspects of intravenous diltiazem administration. *Am. Heart J.*, **111**: 54-61.

Junod, A.F. (1976). Uptake, release and metabolism drugs in the lungs. *Pharmacol. Ther.*, **32**: 511-521.

Kahan, A., Amor, B., et Menkes, C.J. (1985). A randomized double-blind trial of diltiazem in the treatment of Raynaud's phenomenon. *Ann. Rheum. Dis.*, **44**: 30-33.

Kates, R.E. (1983). Calcium antagonist: pharmacokinetic properties. *Drugs*, **25**: 113-124.

Kendall, H.E., et Luscombe, D.K. (1987). 7 calcium channel blocking drugs. *Prog. Med. Chem.*, **24**: 249-297.

Kinirons, M.T., O'Shea, M.B., Downing, T.E., Fitzwilliam, B.S., Joellenbeck, L., Groopman, J.D., Wilkinson, G.R., et Wood, A.J.J. (1993). Absence of correlations among three putative in vivo probes of human cytochrome P4503A activity in young healthy men. *Clin Pharmacol. Ther.*, **54**: 621-629.

Kinoshita, M., Kusukawa, R., Shimono, Y., Motomura, M., Tomonaga, G., et coll. (1978). Effects of diltiazem hydrochloride on renal hemodynamics and urinary electrolyte excretion. *Jap. Circulation J.*, **42**: 553-560.

- Kirch, W., Kleinbloesem, C.H., et Belz, G.G. (1990). Drug interactions with calcium antagonist. *Pharmacol. Ther.*, **45**: 109-136.
- Klein, H.O., Lang, R., Weiss, E., DiSegni, E., Libhaber, C., et coll. (1982). The influence of verapamil on serum digoxin concentration. *Circulation*, **65**: 998-1003.
- Klein, H.H., Schubothe, M., Nebendahl, K., et Kreuser, H. (1984). The effect of two different diltiazem treatments on infarct size in ischemic, reperfused porcine hearts. *Circulation*, **69**: 1000-1005.
- Klein, W. (1987). Long-term treatment of hypertension with the calcium channel blocker diltiazem. *Clin. Cardiol.*, **10**: 358-360.
- Kleinbloesem, C.H., van Brummelen, P., van de Linde, J.A., Voogd, P.J., et Breimer, D.D. (1984). Nifedipine kinetics and dynamics in healthy volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **35**: 742-749.
- Klinke, W.P., Kvill, L., Dempsey, E.E., et Grace, M. (1988). A randomized double-blind comparison of diltiazem and nifedipine in stable angina. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **12**: 1562-1567.
- Klinke, W.P., Juneau, M., Grace, M., Kostuk, W.J., Pflugfelder, P., et coll. (1989). Usefulness of sustained-release diltiazem for stable angina pectoris. *Am. J. Cardiol.*, **64**: 1249-1252.

Klippert, P.J.M., Hulshoff, A., Hoffman, G.A., et Noordhoek, J. (1985). First-pass metabolism of pentamethylamine in the rat liver. *Cancer Res.*, **45**: 983-986.

Koiwaya, Y., Nakamura, M., Mitsutake, A., et coll. (1981). Increased exercise tolerance after oral diltiazem, a calcium antagonist, in angina pectoris. *Am. Heart J.*, **101**: 143-149.

Koster, A.S., Frankhuijzen-Sierevogel, C., et Noordhoek, J. (1985a). Glucuronidation of morphine and six beta 2-sympathomimetics in isolated rat intestinal epithelial cells. *Drug Metab. Dispos.*, **13**: 232-238.

Kramsch, D.M., et Aspen, A.J. (1986). Calcium antagonist and atherosclerosis suppression of plaque formation and reversal of established lesions: an overview. Dans Bader, Herman (Ed.). *Intra cellular calcium regulation*. Manchester: Manchester University Press, 253.

Krishna, D.R. et Klotz, U. (1994). Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin. Pharmacokinet.*, **26**: 144-160.

Kroemer, H., et Klotz, U. (1992). Glucuronidation of drugs: a re-evaluation of the pharmacological significance of the conjugates and modulating factors. *Clin. Pharmacokin.*, **23**: 292-310.

Kubota, K., Pearce, G.L. et Inman, W.H.W. (1995). Vasodilation-related adverse

events in diltiazem and dihydropyridine calcium antagonists studied by prescription-even monitoring. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **48**: 1-7.

Lacoursiere, Y., Poirier, L., Boucher, S., et Spenard, J. (1990). Comparative effects of diltiazem sustained-release formulation and metoprolol on ambulatory blood pressure and plasma lipoproteins. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **48**: 318-324.

Laurent, S., Billaud, E., et Kreft-Jais, C. (1993). Antagonistes calciques et hypertension artérielle. *Thérapie*, **48**: 659-664.

Lechat, Ph., et Hadjiisky, P. (1993). Athérome et antagonistes calciques. *Thérapie*, **48**: 665-670.

Leehey, D.J., et Hartman, E. (1988). Comparison of diltiazem and hydrochlorothiazide for treatment of patients 60 years of age or older with systemic hypertension. *Am. J. Cardiol.*, **62**: 1218-1223.

Lefebvre, M., Lacasse, Y., Spenard, J., Geadah, D., Moisan, R., Gossard, D., Landriault, H., du Souich, P., et Caille, G. (1994). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a slow-release formulation of diltiazem after the administration of a single and repeated doses to healthy volunteers. *Biopharm. Drug Dispos.*, **15**: 227-242.

Legrand, V., Hastir, F., Vandormael, M., Collignon, P., et Kulbertus, H.E. (1984)

Haemodynamic effects of intravenous diltiazem at rest and exercise in patients with coronary artery disease. *Eur. Heart J.*, **5**: 456-463.

Leinweber, F-J. (1987). Possible physiological roles of carboxylic ester hydrolases. *Drug Metab. rev.*, **18**: 379-439.

Lièvre, M., et Nony, P. (1993). Antagonistes calciques en prévention secondaire de l'infarctus du myocarde. *Thérapie*, **48**: 677-683.

Lockridge, O. (1992). Genetic variants of human serum butyrylcholinesterase influence the metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. Dans Kalow (Ed.). *Pharmacogenetics in drug metabolism*. Pergamon Press, New York, Oxford, 15-50.

Low, R.I., Takeda, P., Mason, D.T., et DeMaria, A.N. (1982). The effects of calcium channel blocking agents on cardiovascular function. *Am. J. Cardiol.*, **49**: 547-553.

Magometschnigg, D., Bonelli, J., Gassner, A., Kaik, G., et Hitzenberger, G. (1981). Cardiovascular effects of diltiazem in healthy volunteers at rest, supine, and erect, and during physical and mental stress. *Intern. J. Clin. Pharmacol. Therapy Toxicol.*, **19**: 14-518.

Massie, B., MacCarthy, E.P., Ramanathan, K.B., et coll. (1987). Diltiazem and propranolol in mild to moderate essential hypertension as monotherapy or with

hydrochlorothiazide. *Ann. Intern. Med.*, **107**: 150-157.

Masubuchi, Y., narimatsu, S., Hosokawa, S., et Suzuki, T. (1994). Role of the CYP2D subfamily in metabolism-dependent covalent binding of propranolol to liver microsomal protein in rats. *Bioch. Pharmacol.*, **48**: 1891-1898.

Matoba, T., et Chiba, M. (1985). Effects of diltiazem on occupational Raynaud's syndrome (vibration disease). *Angiology*, **36**: 850-855.

McCans, J.L. (1986). Diltiazem dose responses in sustained therapy for stable angina pectoris. *Can. J. Cardiol.*, **2**: 332-337.

McGraw, B.F., Walker, S.D., Hemberger, J.A., Gitomer, S.L., et Nakama, M. (1982). Clinical experience with diltiazem in Japan. *Pharmacotherapy*, **2**: 156-161.

McKenna, E., Koch, W.J., Sligh, D.F., et Schwartz, A. (1990). Toward an understanding of the dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Biochem. Pharmacol.*, **39**: 1145-1150.

Mehta, J., Mehta, P., Ostrowski, N. (1986). Calcium blockers diltiazem inhibits platelet activation and stimulates vascular prostacyclin synthesis. *Am. J. Med. Sci.*, **291**: 20-24.

Millard, R.W., Gabel, M., Fowler, N.O., et Schwartz, A. (1982a). Baroreceptor

reflex sensitivity reduced by diltiazem and verapamil. *Fed. Proc.*, **41**: 1632.

Miller, R.J. Voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *J. Biol. Chem.*, **267**: 1403-1406.

Miller, W-E., Vittitoe, J., O'Rourke, R.A., et Crawford, M.H. (1988). Nadolol versus diltiazem and combination for preventing exercise-induced ischemia in severe angina pectoris. *Am. J. Cardiol.*, **62**: 372-376.

Mistry, M., et Houston, J.B. (1985). Quantification of extrahepatic metabolism. *Drug Metab. Disposit.*, **13**: 740-745.

Mitchell, L.B., Schroeder, J.S., et Mason, J.W. (1982). Comparative clinical electrophysiological effects of diltiazem, verapamil and nifedipine: a review. *Am J. Cardiol.*, **49**: 629-635.

Montamat, S.C., et Abernethy, D.R. (1987). N-monodesmethyldiltiazem is the predominant metabolite of diltiazem in the plasma of young and elderly hypertensives. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **24**: 185-189.

Morselli, P.L., Rovei, V., Mitchard, M., Durand, A., Gomeni, R., et coll. (1979). Pharmacokinetics and metabolism of diltiazem in man (observations on healthy volunteers and angina pectoris patients). Dans Bing, R.J. (Ed). *New drug therapy with a calcium antagonist*. Excerpta Medica, Amsterdam, Princeton, 152-168.

Murray, G.I., Barnes, T.S., Sewell, H.F., Ewen, S.W.B., Melvin, W.T. et Burke, D. (1988). The immunocytochemical localisation and distribution of cytochrome P-450 in normal hepatic and extrahepatic tissues with a monoclonal antibody to human cytochrome P-450. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **25**: 465-475.

Nafziger, A.N., May, J.J., et Bertino, J.S. Inhibition of theophylline elimination by diltiazem therapy. *J. Clin. Pharmacol.*, **27**: 862-865.

Nagao, T., Matlib, M.A., Franklin, D., Millard, R.W., et Schwartz, A. (1980). Effects of diltiazem, a calcium antagonist, on regional myocardial function and mitochondria after brief coronary occlusion. *J. Molec. Cell. Cardiol.*, **12**: 29-43.

Nebert, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Loper, J.C., Sato, R., Waterman, M.R., et Waxman, D.J. (1991). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell. Biol.*, **10**: 1-14.

Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., Okuda, K., et Nebert, D.W. (1993). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell. Biol.*, **12**: 1-51.

Nonogi, H., Hess, O.M., Ritter, M., Bortone, A., Corin, W.J., et coll. (1988). Prevention of coronary vasoconstriction by diltiazem during dynamic exercise in patients with coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **12**: 892-899.

North, D.S., mattern, A.L., et Hiser, W.W. (1986). The influence of diltiazem hydrochloride on trough serum digoxin concentrations. *Drug Intell. Clin. Pharmacol.*, **20**: 500-503.

Ochs, H.R., et Knuchel, M. (1984). Pharmacokinetics and absolute bioavailability of diltiazem in humans. *Klinische Wochenschrift*, **62**: 303-306.

Osterle, S.N., Alderman, E.L., Beier-Scott, L., Baim, D.S., Rothman, M.T., et coll. (1986). Diltiazem and propranolol in combination: hemodynamic effects following acute intravenous administration. *Am. Heart J.*, **111**: 489-497.

Ogawa, H., Yasue, H., Nakamura, N., Obata, K., et Sonoda, R. (1987). Hemodynamic effects of intravenous diltiazem in patients with acute myocardial infarction. *Clin. Cardiol.*, **10**: 323-328.

O'Hara, M.J., Khurmi, N.S., Bowles, M.J., et Raftery, E.B. (1987). Diltiazem and propranolol combination for the treatment of chronic stable angina pectoris. *Clin. Cardiol.*, **10**: 115-123.

Pacifici, G.M., Franchi, M., Bencini, C., Repetti, F., DiLascio, N., et Muraro, G.B.

(1988a). Tissue distribution of drug-metabolizing enzymes in humans. *Xenobiotica*, **18**: 849-856.

Pacifici, G.M., Franchi, M., Gervasi, P.G., Longo, V., Disimplicio, P., et coll. (1989). Profile of drug-metabolizing enzymes in humans. *Xenobiotica*, **18**: 849-856.

Pacifici, G.M., Temellini, A., Giuliani, L., Rane, A., Thomas, H., et coll. (1988b). Cytosolic epoxide hydrolase in humans: development and tissue distribution. *Arch. Toxicol.*, **62**: 254-257.

Pang, S.K., Barker, F. III, Cherry, W.F. et Goresky, C.A (1991). Esterases for enalapril hydrolysis are concentrated in the perihepatic venous region of the rat liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **257**: 294-301.

Pang, S.K., Cherry, W.F., Accaputo, J., Schwab, A.J., et Goresky, C.A (1988). Combined hepatic arterial-portal venous and hepatic arterial-hepatic venous perfusions to probe the abundance of drug metabolizing activities: perihepatic venous O-deethylation activity for phenacetin and periportal sulphation for acetaminophen in the once-through rat liver preparation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **247**: 690-700.

Paterna, S., Campisi, D., Davi, A., Conti, A., Montaina, G., et coll. (1985). Diltiazem in migraine prophylaxis double-blind control study. *Eur. Rev. med. Pharmacol. Sci.*, **7**: 427-436.

Pearigen, P.D., et Benowitz, N.L. (1991). Poisoning due to calcium antagonists: experience with verapamil, diltiazem and nifedipine. *Drug Safety*, **6**: 408-430.

Pepine, C.J., Feldman, R.L., Hill, J.A., Conti, C.R., Mehta, J., Hill, C., et Scott, E. (1983). Clinical outcome after treatment of rest angina with calcium blockers: comparative experience during the initial year of therapy with diltiazem, nifedipine and verapamil. *Am. Heart J.*, **106**: 1341-1346.

Pepine, C.J., et Hill, H.A. (1987). Management of the total ischemic burden in angina pectoris. *Am. J. Cardiol.*, **59**: 7C-12C.

Perreault, S., Dumont, L., Villiere, V., Ong, H., Adam, A., et du Souich, P. (1993). Hepatic and extrahepatic metabolism of salbutamol in anesthetized rabbits. *Drug Metab. Dispos.*, **21**: 485-491.

Pershadsingh, H.A., Grant, N., et McDonald, J.M. (1987). Association of diltiazem therapy with increased insulin resistance in a patient with type I diabetes mellitus. *J Am. Med. Assoc.*, **257**: 930-931.

Peters, W.H.M. (1988). Purification and partial characterisation of human intestinal glutathione S-transferases. *Biochem. Pharmacol.*, **38**: 1535-1538.

Peters W.H.M., et Jansen, P.L.M. (1988). Immunocharacterisation of UDP-glucuronyltransferase isoenzymes in human liver, intestine and kidney. *Biochem.*

Pharmacol., **37**: 564-567.

Petru, M.A., Crawford, M.H., Kennedy, G.T., Amon, K.W., et O'Rourke, R.A. (1985). Long-term efficacy of high-dose diltiazem for chronic stable angina pectoris: 16-month serial studies with placebo controls. *Am. Heart J.*, **109**: 99-103.

Piafsky, K.M. et Borga, O. (1977). Plasma protein binding of basic drugs. II. Importance of alpha-1 acid glycoprotein for individual variation. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **22**: 545-549.

Pichard, L., Gillet, G., Fabre, I., Dalet-Deluche, I., Bonfils, C., Thenot, J.P. et Maurel, P. (1990). Identification of the rabbit and human cytochrome P450III_A as the major enzymes involved in the N-demethylation of diltiazem. *Drug Metab. Dispos.*, **18**: 711-719.

Pieper, J.A. (1984). Diltiazem binding to human serum proteins. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **35**: 266.

Piepho, R.W., Bloedow, D.C., Lacz, J.P., Runser, D.J., Dimmit, D.C., et coll. (1982). Pharmacokinetics of diltiazem in selected animal species and human beings. *Am. J. Cardiol.*, **49**: 525-528.

Pool, P.E., et Seagren, S.C. (1982). Long-term efficacy of diltiazem in chronic stable angina associated with atherosclerosis: effect on treadmill exercise. *Am. J.*

Cardiol., **49**: 573-577.

Pool, P.E., Massie, B.M., Venkataraman, K., Hirsch, A.T., Samant, D.M., et coll. (1986). Diltiazem as monotherapy for systemic hypertension: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial. *Am. J. Cardiol.*, **57**: 212-217.

Pool, P.E., Herron, J.M., Rosenblatt, S., Reeves, R.L., Nappi, J.M., et coll. (1988). Metabolic effects of antihypertensive therapy with a calcium antagonist. *Am. J. Cardiol.*, **62**: 109G-113G.

Quigley, M.A., White, K.L., et McGraw, B.F. (1985). Interpretation and application of world-wide safety data on diltiazem. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **57** (suppl. 2): 61-73.

Reicher-Reiss, H. (1988). Calcium antagonist in heart failure. *Eur. Heart J.*, **9** (suppl. H): 101-104.

Renton, K. (1985). Inhibition of hepatic microsomal drug metabolism by the calcium channel blockers diltiazem and verapamil. *Biochem. Pharmacol.*, **34**: 2549-2553.

Renard, M., Sterling, I., van Camp, G., Coupez, R., Bernard, R. (1987). Comparaison des effets du diltiazem intraveineux et d'un placebo sur l'hémodynamie et les gaz sanguins a la phase aigue de l'infarctus myocardique. *Ann. Cardiol. Angeiol.* **36**: 509-512.

Rhedda, A., McCans, J., Willan, A.R., et Ford, P.M. (1985). A double-blind placebo controlled crossover randomized trial of diltiazem in Raynaud's phenomenon. *J. Rheum.* , **12**: 724-727.

Richter, J.E., Spuling, T.J., Cordova, C.M., et Castell, D.O. (1984). Effects of oral calcium blocker, diltiazem, on esophageal contractions. Studies in volunteers and patients with nutcracker esophagus. *Dig. Dis. Sci.*, **29**: 649-656.

Ring, M.E., Corrigan, J.J., et Fenster, P.E. (1987). Antiplatelet effects of oral diltiazem, propranolol and their combination. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **24**: 615-620.

Roerig, D.L., Kotrly, K.J., Vucins, E.J., et coll., (1987). First-pass uptake of fentanyl, meperidine and morphine in the human lung. *Anesth.*, **67**: 466-472.

Roerig, D.L., Kotrly, K.J., Dawson, C.A., et coll., (1989). First-pass uptake of verapamil, diazepam, and thiopental in the human lung. *Anesth. Analg.*, **69**: 461-466.

Rosenthal S.J., Lamb, I.H., Shroeder, J.S., et Grinsberg, R. (1983). Long-term efficacy of diltiazem for control of systems of coronary artery spasm. *Circulation Res.*, **52**: 153-157.

Roth, A., Harrison, E., Mitani, G., Cohen, J., Rahimtoola, S.H., et coll. (1986). Efficacy and safety of medium- and high-dose diltiazem alone and in combination

with digoxin for control of heart rate at rest and during exercise in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation*, **73**: 316-324.

Routledge, P.A., et Shand, D.G. (1979). Presystemic drug elimination. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **19**: 447-468.

Rovei, V., Gomeni, R., Mitchard, M., Larribaud, J., Blatrix, Ch., et coll. (1980). Pharmacokinetics and metabolism of diltiazem in man. *Acta Cardiol.*, **35**: 35-45.

Sadick, N.S., Katz, A.S., et Schreiber, T.L. (1989). Angioedema from calcium channel blockers. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **21**: 132-133.

Sagie, A., Strasberg, B., Kusnieck, J., et Sclarovsky, S. Symptomatic bradycardia induced by the combination of oral diltiazem and beta blockers. *Clin. Cardiol.*, **14**: 314-316.

Sakai, H., Kobayashi, S., Hamada, K., Iida, S., Akita, H., Tanaka, E., Uchida, E., et Yasuhara, H. (1991). The effects of diltiazem on hepatic drug metabolizing enzymes in man using antipyrine, trimethadione and debrisoquine as model substrates. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **31**: 353-355.

Salerno, D.M., Dias, V.C., Kleiger, R.E., Tschida, V.H., Sung, R.J., et coll. (1989). Efficacy and safety of intravenous diltiazem for treatment of atrial fibrillation and atrial flutter. *Am. J. Cardiol.*, **63**: 1046-1051.

Schroeder, J.S., Lamb, I.H., Grinsburg, R., Bristow, M.R., et Hung, J. (1982). Diltiazem for long-term therapy of coronary arterial spasm. *Am. J. Cardiol.*, **49**: 533-537.

Schroeder, J.S., Jung, J., Lamb, I.H., Connolly, S.J., Jutzy, K.R., et coll. (1985). Diltiazem and propranolol, alone and in combination, on exercise performance and left-ventricular function in patients with stable effort angina: a double-blind, randomized, and placebo-controlled study. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **57 (suppl. II)**: 55-60.

Schulte, K.L., Meyer-Sabellek, W.A., Haetenberger, A., et coll. (1986). Antihypertensive and metabolic effects of diltiazem and nifedipine. *Hypertension*, **8**: 859-865.

Schulte, K.L., Meyer-Sabellek, W.A., Rucker, L., Gotzen, R., Distler, A., et coll. (1987). Effects of diltiazem alone and combined with mefruside on cardiovascular response at rest and during exercise, carbohydrate metabolism and serum lipoproteins in patients with systemic hypertension. *Am. J. Cardiol.*, **60**: 826-831.

Schwartz, A. (1994). Molecular studies of the calcium antagonist binding site on calcium channels. *Am. J. Cardiol.*, **73**: 12B-14B.

Schwenk, M., et Locher, M. (1985). I-Naphtol conjugaison in isolated cells from liver, jejunum, ileum, colon and kidney of the guinea pig. *Biochem. Pharmacol.*, **34**:

697-701.

Serruys, P.W., Syryapranata, H., Planellas, J., Wijns, W, Vanhalewey, G., et coll. (1985). Effects of short-term intravenous administration of diltiazem on left ventricular function and coronary hemodynamics i patients with coronary artery disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **7**: 1138-1148.

Shaughnessy, A.F. et Mosley, M.R. (1992). Elevated carbamazepine levels associated with diltiazem use. *Neurol.*, **42**: 937.

Sheehan-Dare, R.A., et Goodfield, M.J.D. (1988). Widespread cutaneous vasculitis associated with diltiazem. *Postgraduate Med. J.*, **64**: 467-468.

Simic, D., et Jurman, V. (1988). Effects of diltiazem and nifedipine on blood pressure. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **12 (suppl. 6)**: S220-S221.

Singh, B.N., Nademane, K., et Baky, S.H. (1983). Calcium antagonists: clinical use in treatment of arrhythmias. *Drugs*, **25**: 125-153.

Singh, B.N., Ellrodt, G., et Nademane, K. (1984). Calcium antagonist: cardiocirculatory effects and therapeutic applications. Dans Hurst J.W. (Ed.). *Clinical essays on the heart*, **2**: 65-97.

Sirmans, S.M., Pieper, J.A., Lalonde, R.L., Smith, D.G., Self, T.H. (1988). Effect

of calcium channel blockers on theophylline disposition. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **44**: 29-34.

Sjostrom, P.A., Odland, B.G., Beermann, B.A., et Hammarlund-Udenaes, M. (1988). On the mechanism of acute tolerance to furosemide diuresis. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, **22**: 133-140.

Sligh, D.F., Schultz, D., et Schwartz, A. Molecular biology of the calcium antagonist receptor. *Hypertension*, **19**: 19-24.

Smith, D.A., et Jones, B.C. (1992). Speculations on the substrate structure-activity relationship (SSAR) of cytochrome P450 enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, **44**: 2089-2098.

Smith, M.S., Verghese, C.P., Shand, D.G., et Pritchett, E.L.C. (1983). Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of diltiazem. *Am. J. Cardiol.*, **51**: 1369-1374.

Sousa-Basto, A., Azenha, A., Duarte, M.L., et Ardal-Oliveira, F. (1993). Generalized cutaneous reaction to diltiazem. *Contact Dermatitis*, **28**: 44-45.

Spedding, M., et Paoletti, R. (1992). Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacol. Rev.*, **44**: 363-376.

Spurlock, B.W., Virani, N.A., et Henry, C.A. (1991). Verapamil overdose. *West. J. Med.*, **154**: 208-211.

Stallard, M.P., Park, G.D., Stewart, W.H., Waller, E.S., et Covinsky, J.O. (1988). Systolic blood pressure response in three subgroups of hypertensives treated with sustained-release diltiazem. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **12 (suppl. 6)**: S117-S119.

Steinberg, J.S., Katz, R.J., Bren, G.B., Buff, L.A., et Varghese, P.J. (1987). Efficacy of oral diltiazem to control ventricular response in chronic atrial fibrillation at rest and during exercise. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **9**: 405-411.

Stone, P.H., Antman, E.M., Muller, J.E., et Braunwald, E. (1980). Calcium channel blocking agents in the treatment of cardiovascular disorders: Part II. Hemodynamic effects and clinical applications. *Ann. Internal Medic.*, **93**: 886-904.

Stone, P.H., Gibson, R.S., Glasser, S.P., et coll. (1990). Comparison of propranolol, diltiazem and nifedipine in the treatment of ambulatory ischemia in patients with stable angina. Differential effects on ambulatory ischemia, exercise performance, and anginal symptoms. *Circulation*, **82**: 1962-1972.

Struyker-Boudier, H.A.J., Smits, J.F.M., et De Mey, J.G.R. (1990). The pharmacology of calcium antagonists: a review. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **15**: S1-S10.

Subramanian, V.B. (1984). Comparative evaluation of seven calcium ion antagonists with placebo and propranolol in patients with chronic stable angina. In althaus, V. et coll. (Ed.). International symposium on calcium antagonism, Interlachen, 162-180.

Sugawara, Y., Nakamura, S., Usuki, S., Ito, Y., Suzuki, T., et coll. (1988a). Metabolism of diltiazem. II. Metabolic profile in rat, dog, and man. *J. Pharmacobio-Dynamics*, **11**: 224-233.

Sugawara, Y., Ohashi, M., Nakamura, S., Usuki, S., Suzuki, T., et coll. (1988b). Metabolism of diltiazem. I. Structure of new acidic and basic metabolites in rat, dog, and man. *J. Pharmacobio-Dynamics*, **11**: 211-223.

Sugihara, J., Sugawara, Y., Ando, H., Harigaya, S., Etoh, A., et coll. (1984). Studies on the metabolism of diltiazem in man. *J. Pharmacobio-Dynamics*, **7**: 24-32.

Sundaram, R.S., van Loon, J.A., Tucker, R., Weinshilbaum, R.M. (1989). Sulfation pharmacogenetics: correlation of human platelet and small intestinal phenol sulfotransferases. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **46**: 501-509.

Sunderrajan, S., Reams, G., et Bauer, J.H. (1986). Renal effects of diltiazem in primary hypertension. *Hypertension*, **8**: 238-242.

Sunderrajan, S., Reams, G., et Bauer, J.H. (1987). Long-term renal effects of

diltiazem in essential hypertension. *Am. Heart J.*, **114**: 383-388.

Sutton, D., Butler, M., Nadin, L., et Murray, M. (1997). Role of CYP3A4 in human hepatic diltiazem N-demethylation: inhibition of CYP3A4 activity by oxidized diltiazem metabolites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**: 294-300.

Szlachcic, J., Hirsch, A.T., Tubau, J.F., et coll., Diltiazem versus propranolol in essential hypertension: responses of rest and exercise blood pressure and effects on exercise capacity. *Am. J. Cardiol.*, **59**: 393-399.

Taira, N. (1987). Differences in cardiovascular profile among calcium antagonists. *Am. J. Cardiol.*, **59**: 24B-29B.

Takeda, T., Ishii, A., Ohna, K., Ikeda, H., Nakamura, Y., et Matsuoka, H. (1974). Effects of intravenous diltiazem hydrochloride (CRD-401) on the renal circulatory dynamic and renal function. 17th Annual Meeting of the Japanese Society of Nephrology.

Tateishi, T., Nakashima, H., Shitou, T., Kumagai, Y., Ohashi, K., et coll. (1989). Effect of diltiazem on the pharmacokinetics of propranolol, metoprolol and atenolol. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **36**: 67-70.

Taylor, D.G., et Kowalski, T.E. (1984). Comparison of calcium channel inhibitors on vagal heart rate responses elicited by arterial baroreceptor reflexes in

anaesthetized dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **228**: 491-499.

Thale, J., Gulker, H., Olbing, B., Rose, D., et Bender, F. (1986). Antiarrhythmic and antifibrillatory action of diltiazem on early and late phase ventricular arrhythmias following coronary artery occlusion and on reperfusion ventricular arrhythmias. *Pharmacol.*, **33**: 1-13.

The multicenter diltiazem postinfarction trial research group (1988). The effect of diltiazem on mortality and reinfarction after myocardial infarction. *New Eng. J. Med.*, **319**: 385-392.

Thuillez, C. (1993). Inhibiteurs calciques et ischémie myocardique. *Thérapie*, **48**: 671-676.

Tilmant, P.Y., Lablanche, J.M., Thieuleux, F.A., Dupuis, B.A., et Bertrand, M.E. (1983). Detrimental effect of propranolol in patients with coronary arterial countered by combination with diltiazem. *Am. J. Cardiol.*, **52**: 230-233.

Toda, N. (1986). α -adrenoceptor subtypes and diltiazem actions in isolated human coronary arteries. *Am. J. Physiol.*, **250** (part II): H718-H724.

Traber, P.G., Chianale, J.C., Florence, R., Kim, K., Wojcik, E., et Gumcio, J.J. (1988). Expression of cytochrome P450b and P450c genes in small intestine mucosa of rats following treatment with phenobarbital, polyhalogenated biphenyls

and organochloride pesticides. *J. Biol. Chem.*, **263**: 9449-9455.

Trimarco, B., DeLuca, N., Ricciardelli, B., Volpe, M., Veniero, A., et coll. (1984). Diltiazem in the treatment of mild or moderate essential hypertension. Comparison with metoprolol in a crossover double-blind trial. *J. Clin. Pharmacol.*, **24**: 216-227.

Tsao, S.C., Dickinson, T.H. et Abernethy, D.R. (1990). Metabolite inhibition of parent drug biotransformation. *Drug Metab. Dispos.*, **18**: 180-182.

Tsien, R.W., Ellinor, P.T., et Horne, W.A. (1991). Molecular diversity of voltage-dependent calcium channels. *Trends Pharmacol Sci.*, **12**: 349-354.

Tsuchiya, N., Watarnabe, K., Ajiro, H., et Tojo, S. (1975). Action of diltiazem hydrochloride (CRD 7401) on diseased kidney. *Jap. J. Clin. Exper. Med.*, **52**: 611.

Vainio, H., et Hietanen, E. Role of extrahepatic metabolism in drug disposition and toxicity. Dans Jenner, P., et Testa, B. (Eds.). *Concept in drug metabolism, part A*. Marcel Dekke, New York, 251-284.

Vayssairat, M., Capron, L., Fiessinger, J-N., Mathieu, J-F., et Housset, E. (1981). Calcium channel blockers and Raynaud's disease. *Ann. Int. Med.*, **95**: 243.

Vanhoutte P.M., et Paoletti (1987). The WHO classification of calcium antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.*, **8**: 4-5.

Vincezini, M.T., Favilli, F., Stio, M., et Iantomasi, T. (1991). Intestinal glutathione transport system: a possible detoxification role. *Biochimica Biophysica Acta*, **1073**: 571-579.

Von Moltke, L.L., Greenblatt, D.J., Schmider, J., Harmatz, J.S., et Shader, R.I. (1995). Metabolism of drugs by cytochrome P450 3A isoforms. *Clin. Pharmacokinetic*, **29**: 33-44.

Wagner, J.M., Anderson, J.L., Bray, B.E., Datz, F.L., Christian, P.E., et Taylor, A.T. (1982). Comparative effects of diltiazem, propranolol and placebo using exercise radionuclide ventriculography. *Circulation*, **66**: 11-21.

Wagner, K., Phillip, T., Heinemeyer, G., Brockmuller, F., Roots, I., et coll. (1989). Interaction of cyclosporin and calcium antagonists. *Transplantation Proc.*, **21**: 1453-1456.

Waller, P.C., et Inman, W.H.W. (1989). Diltiazem and heart block. *Lancet*, **1**: 617.

Wallis, D.E., Gierke, L.W., Scanlon, P.J., Wolfson, P.M., et Kopp, S.J. (1986). Sustained postischemic cardiodepression following magnesium-diltiazem cardioplegia (42355). *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **182**: 375-385.

Warltier, D.C., Meils, C.M., Gross, G.J., et Brooks, H.L. (1981). Blood flow in normal and acutely ischemic myocardium after verapamil, diltiazem and nisoldipine,

a new dihydropyridine calcium antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **218**: 296-302.

Waters, D.D., Th  roux, P., Szlachic, J., et Dauwe, F. (1981). Provocative testing with ergonovine to assess the efficacy of treatment with nifedipine, diltiazem and verapamil in variant angina. *Am. J. Cardiol.*, **48**: 123-130.

Waters, D. (1989). The future of calcium channel blockade. *Can. J. Cardiol.*, **5**: 181-186.

Watkins, P.B. (1990). The cytochrome P450. *Gastroenterology Int.*, **3**: 184-188.

Weber, M.A., Cheung, D.G., Graettinger, W.F., Lipson, J.L. (1988). Characterization of antihypertensive therapy by whole-day blood pressure monitoring. *J. Am. Med. Assoc.*, **259**: 3281-3285.

Weinstein, D.B. (1988). The antiatherogenic potential of calcium antagonist. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **12 (suppl. 6)**: S29-S35.

Weir, M.R., Burris, J.F., Oparil, S., Weber, M.A., et Cady, W.J. (1989). A multifactorial evaluation of the antihypertensive efficacy of the combination of diltiazem and hydrochlorothiazide. *Am. J. Hypert.*, (Abstract 1081), **2 (Part 2)**: 21A.

Weir, M.R., Josselson, J., Giard, M.J., et coll. (1987). Sustained-release diltiazem compared with atenolol monotherapy for mild to moderate systemic hypertension.

Am. J. Cardiol., **60** (suppl. 1): 36I-41I.

Weishaar, R., Ashikawa, K., et Bing, R.J. (1979). Effect of diltiazem, a calcium antagonist, on myocardial ischemia. Am. J. Cardiol., **43**: 1137-1143.

Wheeler, D.B., Randall, A., et Tsien, R.W. (1994). Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. Science, 264: 107-111.

White, C.J., Abrahams, L.A., Overton-Keary, P., et Singleton, P.R. (1986). A double-blind trial of diltiazem in the treatment of Raynaud's phenomenon. J. Am. Coll. Cardiol., **7**: 177A.

Wilson, A.G.E., Pickett, R.D., Eling, T.E. et Anderson, M.W. (1980). Studies on the persistence of basic amines in the rabbit lung. Drug Metab. Dispos., **7**: 402-424.

Wolfson, P., Abernethy, D., DiPette, D.J., et Zusman, R. (1988). Diltiazem and captopril alone or in combination for treatment of mild to moderate systemic hypertension. Am. J. Cardiol., **62** (suppl. G): 103G-108G.

Yabana, H., Nagao, T., et Sato, M. (1985). Cardiovascular effects of the metabolites of diltiazem in dogs. J. Cardiovasc. Pharmacol., **7**: 152-157.

Yacobi, A, et halperin-Walega, E. (1989). Oral sustained release formulations:

Practice, **16**: 49-56.

Zelis, R., et Kinney, E.L. (1982). The pharmacokinetics of diltiazem in healthy American men. *Am. J. Cardiol.*, **49**: 529-532.

Zipes, D.P., Besch, H.P., et Watanabe, A.M. (1975). Role of the slow current in cardiac electrophysiology. *Circulation*, **51**: 761-766.

Zsoter, T.T., et Church, J.G. (1983). Calcium antagonists: Pharmacodynamic effects and mechanism of action. *Drugs*, **25**: 93-112.

APPENDICE

Curriculum Vitae

Nom : Marc Lefebvre

Adresse : 147 Crestwood
Rosemère, Québec, J7A 2J4

Langues : Français et Anglais

Etudes et Formation

1991 - 1998 : **Ph. D., Département de Pharmacologie
UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**

1988 - 1991 : **M. Sc., Département de Pharmacologie
UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**

1984 - 1988 : **B. Pharm., Faculté de Pharmacie
UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**

Formation Professionnelle

1995 - 1998 **ALGORITHME PHARMA INC. / MONTREAL**

Vice-Président

Responsabilités: Responsable de tous les aspects pharmacologiques des projets de recherche

1995 **GLAXO-WELLCOME INC / KIRKLAND**

Assistant de Recherche Clinique

Responsabilités: Responsable de la supervision de toutes les étapes du déroulement des études cliniques (nouvelle médication anti-épileptique)

1994 **MARION MERRELL DOW CANADA (Division : NORDIC
MERRELL DOW RECHERCHES INC.) / LAVAL**

Assistant de Recherche Clinique

Responsabilités: Responsable de projets de recherches biopharmaceutiques.

1993 **GLAXO CANADA INC. (BUREAU D'AFFAIRES DU QUÉBEC) / MONTRÉAL**

Réalisations: Rédige et consolide, sur une période de 2 mois, la mise à jour de quelques médicaments (agents β -agonistes, corticostéroïdes, etc...) pour l'approbation de nouveaux médicaments sur le formulaire provincial

1988 - 1994 **PHARMACIE B. MAYRAND INC. / MONTRÉAL**

Pharmacien en milieu communautaire

1987 **SCHERING CANADA INC. / POINTE-CLAIRE**

Boursier de l'ACIM (Association Canadienne de l'Industrie du Médicament)

Responsabilités: Participation aux différentes étapes du développement d'un médicament (production, contrôle de qualité, études cliniques, administration, "marketing", ventes)

Enseignement Universitaire

1994 - 1998 **Chargé de cours, Pharmacologie (PHL 1951)**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL, FACULTÉ DES SCIENCES INFIRMIÈRES, DÉPARTEMENT DE PHARMACOLOGIE

- Anesthésiques et Analgésiques
- Anti-épileptiques
- Système Nerveux Autonome
- Pharmacocinétique des médicaments

1996 - 1997 **Chargé de cours, Pharmacologie Cardiovasculaire (MAR 3010)**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL, FACULTÉ DE L'EDUCATION PERMANENTE, DÉPARTEMENT D'INHALOTHERAPIE

Communications

- *In vivo* and *in vitro* metabolism of diltiazem following a single dose and at steady state. 1994 (Juillet), 12^e Congrès International de Pharmacologie (IUPHAR), Montréal, Québec, Canada.
- Relation entre la pharmacocinétique et la pharmacodynamie rénale suivant l'administration d'une dose unique et de doses répétées d'une formulation à libération prolongée de diltiazem chez le volontaire sain. 1992 (Novembre), Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal.
- La pharmacocinétique du TA-3090 et ses problèmes. 1990 (Septembre). Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal.
- High-performance liquid chromatographic method for the assay of TA-3090 and its pharmacokinetic parameters in healthy volunteers. 1989 (Mai), 3^e Symposium International sur l'Analyse des Médicaments, Anvers, Belgique.

Publications

- Keung, A.C., Landriault, H., **Lefebvre, M.**, Gossard, D., Dempsey, E.E., Juneau, M., Dimmitt, D., Castles, M., Roberts, L., and Spénard, J. Pharmacokinetics and safety of single intravenous and oral doses of dolasetron mesylate in healthy women. *Biopharm. Drug Dispos.*, 1997; **4**: 361-369.
- **Lefebvre, M.**, Caillé, G. and du Souich, P. Organ-specific pattern of inhibition of diltiazem metabolism at steady state in rabbits. *J. Pharmac. Experim. Ther.*, 1996; **279 (2)**: 902-907.
- **Lefebvre, M.**, Homsy, W., Caillé, G. and du Souich, P. First-pass uptake of diltiazem in anaesthetized rabbits: role of extrahepatic organs. *Pharmaceut. Res.*, 1996; **13**: 124-128.
- Homsy, W., **Lefebvre, M.**, Caillé, G. and du Souich, P. Metabolism of diltiazem in hepatic and extrahepatic tissues of rabbits: in vitro studies. *Pharmaceut. Res.* 1995; **12**: 609-614.
- Lebel, M., Landriault, H., Allard, S., Spénard, J., Giard, J., **Lefebvre, M.**, Marcoux, M.J., Paquet, J., Bisson, C., Vallée, F. and Labrecque, G. Chronopharmacodynamics of a single 30 mg dose of deflazacort. *Pharmaceut. Res.* (Abst). 1994; **11 (10)**: S387 (PPDM8217).

- **Lefebvre, M., du Souich, P. and Caillé, G.** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of diltiazem *in vivo* and *in vitro* following a single dose and at steady state. *Pharmaceut. Res. (Abst)*. 1994; **11 (10)**: S358 (PPDM8103).
- **Lefebvre, M., Caillé, G. and du Souich, P.** *In vivo* and *in vitro* metabolism of diltiazem following a single dose and at steady state. *Can J Physiol Pharmacol*. 1994; **72 (suppl. 1)**: P12.1.14., p. 292.
- **Lefebvre, M., Lacasse, Y., Spénard, J., Geadah, D., Gossard, D., Moisan, R., Landriault, H., du Souich, P. and Caillé, G.** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a slow release formulation of diltiazem after the administration of a single and repeated doses to healthy volunteers. *Biopharm Drug Dispos*. 1994; **15**: 227-42.
- **Lefebvre, M., Lacasse, Y., Spénard, J., Geadah, D., Gossard, D., Moisan, R., Landriault, H., du Souich, P. and Caillé, G.** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a slow-release formulation of diltiazem (120 mg) in healthy volunteers. *Pharmac. Res. (Abst)*. 1993; **10 (8038)**: S308.
- **Lefebvre, M., Caillé, G. and du Souich, P.** Pulmonary, hepatic and intestinal first-pass metabolism of diltiazem. *The Pharmacologist (Abst)*. 1993; **35 (3)**: 175 (248).
- **Houle, J.-M., Major, P., McCans, J., Landriault, H., Lefebvre, M., Caillé, G. and Spénard, J.** Tolerability of increasing single oral doses of Clentiazem in healthy volunteers. *Drug Invest*. 1992; **4 (3)**: 276-82.
- **Lefebvre, M.** Mise au point d'une méthode analytique du TA-3090 et de ses principaux métabolites, et détermination du profil pharmacocinétique de ces substances chez le volontaire sain. Thèse (M. Sc.); Université de Montréal. 1991. (Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences en sciences cliniques).
- **Villière, V., Dumont, L., Lefebvre, M., Garceau, D., Chartrand, C. and Caillé, G.** Relationship between the cardiovascular effects and both plasma and myocardial levels of clentiazem, a new benzothiazepine calcium antagonist in anesthetized dogs. *Cardiovasc Drug Ther*. 1991; **5 (6)**: 997-1003.
- **Lefebvre, M., Garceau, D., Spénard, J., Houle, J.-M., Major, P. and Caillé, G.** High-performance liquid chromatographic method for the assay of TA-3090 and its pharmacokinetic parameters in healthy volunteers. *J Pharmaceutical Biomed Anal*. 1989; **7 (12)**: 1919-24.