



Université de Montréal

**Études pharmacocinétiques exploratoires de certains  
médicaments utilisés en analgésie post-opératoire**

par

Mohamad-Samer Mouksassi, Pharm.D.

Sciences pharmaceutiques, Université de Montréal  
Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en Sciences Pharmaceutiques  
option Pharmacologie

Décembre, 2012

© Mohamad-Samer Mouksassi, 2012

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

# **Études pharmacocinétiques exploratoires de certains médicaments utilisés en analgésie post-opératoire**

Présentée par :

Mohamad-Samer Mouksassi, Pharm.D.

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Patrice Hildgen, Ph.D.

Président-rapporteur

Line Labbé, B.Pharm. Ph.D.

Directrice de recherche, Faculté de pharmacie, Université de Montréal

France Varin, B.Pharm. Ph.D.

Co-directrice, Faculté de pharmacie, Université de Montréal

Patrick du Souich, M.D. Ph.D.

Membre du jury

Caroline Nadeau, M.D. FRCPC B.Pharm.

Examineur externe

Sylvie Le May, Ph.D.

Représentant du doyen de la FES

## Résumé

La douleur post-opératoire chez les patients constitue un défi thérapeutique important pour les cliniciens. Le traitement de la douleur post-opératoire n'est pas accessoire ni optionnel, puisqu'il permet de donner un congé de l'hôpital plus rapide aux patients et ainsi, il contribue à des économies importantes pour notre système de santé. Parmi les approches thérapeutiques utilisées pour la prise en charge de la douleur post-opératoire, cette thèse s'intéresse particulièrement aux blocs de nerfs périphériques par les anesthésiques locaux et à l'administration de la néostigmine par voie épidurale. Ces médicaments sont utilisés en clinique sans avoir préalablement établi, en se basant sur leur propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques spécifiques, leurs doses optimales. Ces doses devraient également tenir en considération les particularités anatomiques du site d'injection par rapport au site d'action.

Cette thèse inclut des études exploratoires qui ont contribué à caractériser la pharmacocinétique de la ropivacaïne et de la bupivacaïne ainsi que la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de la néostigmine.

La première étude portait sur seize patients subissant une chirurgie orthopédique avec un bloc combiné des nerfs fémoral et sciatique par la ropivacaïne (n=8) ou la bupivacaïne (n=8). C'était la première étude qui a inclu des temps d'échantillons pharmacocinétiques allant jusqu'à 32 h après le bloc et ces résultats ont démontré une variabilité interindividuelle considérable. La modélisation par approche de population a aidé à expliquer les sources de la variabilité et démontré que l'absorption systémique des anesthésiques locaux était très lente. De plus, les concentrations plasmatiques demeuraient mesurables, et dans certains cas présentaient un plateau, 32 h après le bloc. Dans les prochaines études, un échantillonnage allant jusqu'à 4 ou 5 jours sera nécessaire afin d'atteindre la fin de l'absorption.

La deuxième étude a établi le développement d'un modèle animal en étudiant la pharmacocinétique de la ropivacaïne après administration intraveineuse ainsi que son degré

de liaison aux protéines plasmatiques chez le lapin (n=6). Les résultats ont démontré que, chez le lapin la ropivacaïne est beaucoup moins liée aux protéines plasmatiques comparativement à l'humain. Ce résultat important sera utile pour planifier les prochaines études précliniques.

La troisième étude a exploré, pour la première fois, la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de la néostigmine administrée par voie épidurale et a essayé de caractériser la courbe dose-réponse en utilisant trois doses différentes : 0.5, 1 et 1.5 mg. Bien que les concentrations de la néostigmine dans le liquide céphalo-rachidien fussent très variables une relation inverse entre la consommation de mépéridine et la dose de néostigmine a été démontrée. La dose de 1.5 mg a donné une meilleure réponse pharmacodynamique sur la douleur, mais elle a été considérée comme dangereuse puisqu'elle a résulté en deux cas d'hypertension. Nous avons conclu que des doses plus faibles que 1.5 mg devront être utilisées lors de l'utilisation de la néostigmine par voie épidurale.

En conclusion, les études rapportées dans cette thèse ont exploré les propriétés pharmacocinétiques et/ou pharmacodynamiques de certains médicaments utilisés pour le traitement de la douleur post-opératoire. Ceci mènera au but ultime qui est la meilleure prise en charge de la douleur post-opératoire chez les patients.

**Mots-clés:** Douleur post-opératoire, anesthésiques locaux, pharmacocinétique, néostigmine

## Abstract

Post-operative pain in surgical patients remains a challenging problem for the clinicians. The treatment of post-operative pain is no longer an accessory or nice to have, since it can significantly shorten hospital stays and lead to important savings for our health system. Amongst the therapeutic approaches used in the management of post-operative pain, we will focus on peripheral nerve blocks with local anesthetics and epidural neostigmine. These drugs are currently used in the clinic, without the prior characterization of an optimal dose that took into consideration their specific pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. Optimal doses will need to consider the specific regional anatomy of the site of drug administration with respect to the site of action.

This thesis included exploratory studies that helped to characterize the pharmacokinetics of ropivacaine and bupivacaine as well as the pharmacokinetics and pharmacodynamics of neostigmine.

The first study included sixteen patients undergoing orthopedic surgeries with a combined femoral and sciatic nerve blocks technique using ropivacaine (n=8) or bupivacaine (n=8). The study was the first to include pharmacokinetic sampling up to 32 h after the block and results have shown that large between subject variability was present. Population modeling helped to explain and separate the various sources of variability and showed that systemic absorption was very slow. In addition, plasma concentrations were still measurable, and in some cases, plateaued at 32 h after the block. Future studies should extend sampling times to 4 or 5 days after the block in order to wait for the completion of the absorption.

The second study attempted to establish an animal model by studying the intravenous pharmacokinetics and protein binding of ropivacaine in the rabbit (n=6). Results have shown that ropivacaine is much less bound to plasma protein in rabbits as compared to humans. This important information will be useful in future preclinical and clinical research.

The third study explored, for the first time, the pharmacokinetics and the pharmacodynamics of epidural neostigmine (n=15) and attempted to characterize the dose-effect relationship by testing the following doses: 0.5, 1 and 1.5 mg. Although the CSF pharmacokinetics of neostigmine were variable, a relationship between dose and meperidine consumption could be shown. The dose of 1.5 mg resulted in a better pharmacodynamic response on pain but it was deemed unsafe since it led to hypertension in two patients. We conclude that doses below 1.5 mg should be used for an epidural block with neostigmine.

In conclusion, this research work investigated the pharmacokinetic and/or the pharmacodynamic characteristics of some drugs used for the treatment of post-operative pain. The gathered information will be essential to be able to reliably characterize the pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships. This will help in achieving the ultimate goal which is a better management of post-operative pain in surgical patients.

**Keywords:** Post-operative pain, local anesthetics, pharmacokinetics, neostigmine

## Table des matières

1	Introduction.....	14
1.1	Vue d'ensemble sur la douleur post-opératoire .....	14
1.2	Neurophysiologie de la douleur .....	17
1.2.1	Nocicepteurs.....	19
1.2.2	Fibres nerveuses .....	20
1.2.3	Nerfs périphériques et leur distribution.....	21
1.3	Conduction nerveuse.....	25
1.3.1	Mécanismes endogènes de modulation de la douleur .....	28
1.3.2	Mécanismes spinaux et théorie du portillon .....	29
1.3.3	Voies inhibitrices descendantes .....	31
1.3.4	Options thérapeutiques pour le traitement de la douleur .....	32
1.4	Pharmacocinétique.....	34
1.5	Pharmacodynamie.....	40
1.6	Les anesthésiques locaux .....	43
1.6.1	Aperçu historique.....	43
1.6.2	Structures chimiques des anesthésiques locaux .....	43
1.6.3	Mécanisme d'action .....	44
1.6.4	Propriétés physico-chimiques des anesthésiques locaux .....	46
1.6.5	Pharmacocinétique de la ropivacaïne et la bupivacaïne.....	48
1.7	La néostigmine.....	58
1.7.1	Structure chimique et propriétés physico-chimiques .....	58
1.7.2	Mécanisme d'action .....	58
1.7.3	Pharmacocinétique .....	59
1.7.4	Absorption à partir des voies intrathécale et épidurale .....	59
1.7.5	Utilisation de la néostigmine comme adjuvant analgésique post-opératoire ...	60
1.8	Pharmacométrie: modélisation pharmacocinétique et pharmacodynamique.....	62
1.8.1	Développement du médicament.....	62



1.8.2	Modélisation pharmacocinétique et pharmacodynamique (PK/PD).....	64
1.8.3	La modélisation pharmacocinétique de population.....	64
1.8.4	Objectifs et orientation globale de la thèse .....	75
2	Articles de Recherche .....	76
2.1	Manuscrit #1: Pharmacokinetics of Bupivacaine and Ropivacaine up to 32 h after Combined Femoral-Sciatic Nerve block.....	77
2.1.1	Introduction du Manuscrit #1.....	78
2.1.2	Page Titre .....	79
2.1.3	Abstract .....	80
2.1.4	Materials and Methods.....	82
2.1.5	Results.....	85
2.1.6	Discussion .....	87
2.1.7	Conclusion .....	91
2.2	Manuscrit #2 Pharmacokinetics of Intravenous Ropivacaine in Rabbits .....	105
2.2.1	Introduction du Manuscrit #2.....	106
2.2.2	Page Titre .....	107
2.2.3	Abstract .....	108
2.2.4	Introduction.....	109
2.2.5	Materials and Methods.....	110
2.2.6	Results.....	114
2.2.7	Discussion .....	115
2.2.8	Conclusions.....	117
2.3	Manuscrit #3 Pharmacokinetic and pharmacodynamics of three different doses of epidural neostigmine.....	125
2.3.1	Introduction du Manuscrit #3.....	126
2.3.2	Page Titre .....	127
2.3.3	Abstract .....	128
2.3.4	Introduction.....	130
2.3.5	Methods.....	132

2.3.6	Results.....	137
2.3.7	Discussion.....	140
3	Discussion et Conclusion.....	154
4	Bibliographie.....	i
Annexe I	.....	xxvi

## Liste des tableaux

Tableau 1-1 Principales fibres nerveuses sensibles .....	20
Tableau 1-2 Propriétés physico-chimiques et pharmacodynamiques des principaux anesthésiques locaux .....	47
Tableau 1-3 Pharmacocinétique clinique de la ropivacaïne et la bupivacaïne après administration intraveineuse .....	54
Tableau 1-4 Pharmacocinétique clinique de la ropivacaïne et la bupivacaïne après différents types de blocs de nerfs du membre inférieur .....	56

## Liste des figures

Figure 1-1 Cheminement général d'un stimulus nociceptif de la périphérie au cortex .....	18
Figure 1-2 Anatomie d'un nerf périphérique .....	22
Figure 1-3 Dermatomes cutanés antérieurs et postérieurs .....	23
Figure 1-4 Dermatomes du membre inférieur.....	24
Figure 1-5 Membrane axonale .....	25
Figure 1-6 Potentiel d'action du nerf .....	26
Figure 1-7 Principaux états d'un canal sodique .....	27
Figure 1-8 Propagation du potentiel d'action.....	28
Figure 1-9 La théorie du portillon.....	30
Figure 1-10 Les sites d'administration des anesthésiques locaux.....	33
Figure 1-11 Les principales étapes de la pharmacocinétique.....	34
Figure 1-12 Profil pharmacocinétique typique après administration orale en coordonnées semi-logarithmiques.....	39
Figure 1-13 Profil pharmacodynamique d'un médicament avec un effet direct.....	41
Figure 1-14 Structures chimiques des principaux anesthésiques locaux .....	44
Figure 1-15 Mécanisme d'action des anesthésiques locaux .....	45
Figure 1-16 Importance de la pharmacocinétique régionale et systémique des anesthésiques locaux .....	48
Figure 1-17 Déconvolution des concentrations après administration extravasculaire.....	50
Figure 1-18 Structures chimiques de la néostigmine et de l'acétylcholine.....	58
Figure 1-19 Modèle pharmacocinétique d'un médicament donné par voie orale.....	67
Figure 1-20 Modèle pharmacocinétique à deux compartiments après administration intraveineuse .....	68
Figure 1-21 Variabilité interindividuelle d'un paramètre pharmacocinétique.....	70
Figure 1-22 Variabilité résiduelle mixte d'un modèle pharmacocinétique.....	72

## Liste des Abréviations

ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion
AGA	$\alpha_1$ -glycoprotéine acide
AL	anesthésique local ou anesthésiques locaux
ASA	classification de l'“American Society of Anesthesiology”
ASC	aire sous la courbe
AINS	anti-inflammatoires non-stéroïdiens
ATP	adénosine triphosphate
BCFS	bloc combiné des nerfs fémoral et sciatique
BUP	bupivacaïne
CL	clairance
CLd	clairance de distribution
CL/F	clairance apparente après administration extravasculaire où F est la biodisponibilité
$C_{\max}$	concentration maximale
CV	coefficient de variation
$E_0$	effet pharmacodynamique de base
$EC_{50}$	concentration associée à 50 % de l'effet pharmacodynamique maximal
$E_{\max}$	effet pharmacodynamique maximal
EPI	épinéphrine
F	biodisponibilité
Flibre (ou fu)	fraction libre
FEM	nerf fémoral
GABA	acide gamma aminobutyrique
HPLC	“high performance liquid chromatography”
IT	intrathécal, ou rachidien
IV	intraveineux

Ka	constant d'absorption de premier ordre
LCR	liquide céphalo-rachidien
PD	pharmacodynamie
PK	pharmacocinétique
PK/PD	pharmacocinétique pharmacodynamique
Q	clairance de distribution (parfois notée par CLd)
ROP	ropivacaïne
SCI	nerf sciatique
SGPA	substance grise périaqueducule
$T_{1/2}$	demi-vie
$T_{1/2\alpha}$	demi-vie de distribution
$T_{1/2\beta}$	demi-vie d'élimination
$T_{max}$	temps associé à la concentration maximale
V1 ou Vc ou Vd	volume de distribution central
V1/F ou Vc/F ou Vd/F	volume de distribution central apparent
V2 ou Vp	volume de distribution périphérique
V2/F ou Vp/F	volume de distribution périphérique apparent
Vss	volume de distribution à l'état de pseudo-équilibre

*À mes parents qui ont beaucoup sacrifié pour  
que je puisse réaliser mes rêves.*

## Remerciements

Mon cheminement à me spécialiser en pharmacocinétique a commencé en 2004. Pendant ces années, beaucoup de personnes ont contribué à la réalisation de cette thèse et il serait impossible de les nommer toutes et je tiens à les remercier sincèrement de tout mon cœur.

Je remercie ma Directrice de recherche : Dr Line Labbé qui m'a fait confiance et qui m'a ouvert la possibilité de traverser l'océan et venir au Québec pour compléter mes études. Merci !!

Je remercie ma Co-Directrice de recherche : Dr France Varin qui m'a généreusement encadré et accueilli dans son laboratoire. Son vaste expérience, était un trésor qui a beaucoup contribué à l'élargissement de ma vision de recherche.

Je remercie Dr Jacques Turgeon, Dr Catherine Litalien et Dr Yves Théorêt qui m'ont permis de contribuer à des travaux de recherche qui ont mené à des publications dont je suis fier. Je tiens également à remercier le Pr. Jean-Louis Brazier qui m'a transmis sa passion de grand pédagogue et qui m'a donné la chance d'enseigner la pharmacocinétique au sein de la faculté de pharmacie avec mon amie et ma collègue Frédérique Fenneteau.

Je remercie les membres du jury qui ont accepté de donner de leur temps pour évaluer mon travail. Avec leurs conseils très judicieux ils m'ont permis d'améliorer la qualité de ma thèse.

Je remercie Nastya Kassir mon amie, ma collègue au labo et au travail pour les moments innombrables et inoubliables qu'on a partagés au fil de ces années que ça soit angoisse ou sérénité, joie ou tristesse, échec ou réussite.

Enfin, je remercie ma blonde Nadia qui m'a soutenu pour traverser la dernière ligne droite de la fin et mes parents (Salim et Nabila), ma sœur Samar et mon frère Rami qui m'ont toujours supporté et aidé à accomplir mes rêves.



# 1 Introduction

## 1.1 Vue d'ensemble sur la douleur post-opératoire

La douleur a été reconnue par l'organisation mondiale de la santé (OMS) comme étant un problème d'ampleur globale et mondiale [1]. Elle constitue un fardeau socio-économique très important [2]. La douleur post-opératoire est le type de douleur le plus répandu [3, 4]. C'est un défi que les cliniciens essaient de résoudre depuis plus de 50 ans [5]. Malgré les percées thérapeutiques et pathophysiologiques récentes, un nombre important de patients continuent à souffrir à cause du sous-traitement et d'un contrôle inadéquat de la douleur post-opératoire [6, 7]. La douleur post-opératoire aiguë non contrôlée peut engendrer, à long terme, une sensibilisation des mécanismes neuronaux associés à la douleur et à sa modulation. Il est estimé que 30 % des patients peuvent développer une douleur post-opératoire chronique et persistante après une chirurgie et cela avec plusieurs types de chirurgie incluant les chirurgies orthopédiques [8-11] et abdominales [12]. La douleur chronique rend l'impact économique dévastateur [13] et devra inciter les gouvernements ainsi que tous les intervenants de la santé à produire une vision stratégique pour gérer ce problème qui pourrait monopoliser beaucoup de ressources du système de soins de la santé. Ce problème est d'autant plus important que des lignes directrices ont été émises par plusieurs sociétés dont la Société américaine des anesthésistes «American Society of Anesthesiologists» [14, 15] et la Société américaine de la douleur «American Pain Society» [16]. De plus, la «Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations (JCAHO)» a publié des normes de soins [17] afin d'essayer de standardiser et d'optimiser le traitement de la douleur.

D'autre part, avec le vieillissement de la population, le nombre de patients subissant des chirurgies pour indications multiples et variables ne cesse d'augmenter. Particulièrement, la dégénération des articulations avec l'âge est une cause majeure des chirurgies d'arthroplastie et principalement celles du genou et de la hanche. Ces chirurgies permettent un retour à une vie active, autonome et sans douleur.

Au Canada, entre 1996-1997 et 2006-2007, les procédures de remplacement de la hanche et du genou ont augmenté de 59% et 140%, respectivement [18]. L'ensemble des procédures s'élève à plus de 70 000 interventions par année [18]. De plus, la majorité des patients qui ont subi une arthroplastie entre 2006–2007 avaient 65 ans ou plus. Aux États-Unis, un million de chirurgies arthroplastiques sont performées annuellement et les arthroplasties du genou et de la hanche en constituent plus de 95 % [19]. L'importance des chirurgies arthroplastiques fut particulièrement signalée après avoir été retenues comme un des cinq champs de priorités fédérales à améliorer dans le système de santé Canadien; le but étant de réduire le temps d'attente avant la procédure chirurgicale [20]. Un traitement rapide, efficace et sécuritaire est critique pour la santé de ces patients ainsi que pour la viabilité de notre système de santé puisque un séjour prolongé à l'hôpital monopolise des ressources très importantes dans notre système de santé débordé.

Parmi les options thérapeutiques disponibles, on distingue l'utilisation de l'anesthésie régionale qui s'est beaucoup répandue et s'est avérée essentielle pour faciliter et accélérer la guérison suite aux chirurgies majeures [21]. De plus, l'anesthésie régionale, comparée aux autres formes et techniques d'anesthésie ou d'analgésie, présente un excellent rapport coût-efficacité, surtout chez les patients subissant une arthroplastie du genou ou de la hanche [22]. Une stratégie thérapeutique efficace doit viser à bloquer simultanément plusieurs mécanismes de nociception centraux et périphériques ce qui facilitera le déroulement de la chirurgie, réduira la durée de l'hospitalisation et les complications potentielles chez le patient [23-26]. Cette approche dite multimodale [14, 27] qui combine plusieurs classes et méthodes thérapeutiques (opiacés, anesthésiques locaux (AL), anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), adjuvants comme la néostigmine ou clonidine, techniques de traitement au besoin, bloc régional épidural ou d'un nerf spécifique) est reconnue comme la norme optimale et accélère le rétablissement tout en réduisant les effets secondaires [28]. Le sujet de cette thèse porte principalement sur l'anesthésie régionale par blocs de nerfs périphériques ainsi que sur l'utilisation de la néostigmine comme adjuvant thérapeutique pour la douleur post-opératoire.

Le but ultime d'une analgésie après une chirurgie est d'optimiser le bloc sensoriel, tout en évitant un bloc moteur prolongé, pour permettre un rétablissement et une mobilisation rapide du patient. Les études cliniques antérieures portant sur l'utilisation et le dosage des AL pour le bloc de nerfs périphériques avaient comme objectif principal la prévention d'une toxicité potentielle et n'ont pas généré de données scientifiques probantes pour déterminer une dose optimale [29]. Plusieurs études cliniques pharmacodynamiques ont démontré que le temps d'installation de l'anesthésie dépend du site anatomique du nerf périphérique bloqué ainsi que du médicament utilisé [30-33]. Les doses recommandées des AL devraient être spécifiques au site anatomique et type de bloc et varier selon l'intensité de la douleur produite par différents types de chirurgies. Cependant, les recommandations actuelles d'utilisation des AL sont très générales et ne s'appliquent pas dans les situations cliniques spécifiques puisqu'elles ne tiennent pas compte des variations de la vitesse de l'absorption en fonction du site d'injection. La dose optimale pour obtenir une durée d'action désirée pour un bloc spécifique reste encore à déterminer. Au lieu d'avoir seulement la sécurité et la toxicité en ligne de mire, il faut y ajouter l'efficacité. Pour caractériser l'efficacité, il est important de comprendre la pharmacocinétique locorégionale et sa relation avec la pharmacodynamie. Ceci permettra non seulement d'inclure des facteurs généraux tels que le site anatomique et les concentrations locales, mais également des variables spécifiques au patient comme l'âge et le sexe. Ainsi, une fois la variabilité caractérisée, des recommandations spécifiques, pour un patient et un site anatomique donnés, peuvent être établies. Il a déjà été démontré qu'une technique d'anesthésie régionale optimisée couplée à une analgésie post-opératoire individualisée diminueront l'incidence des complications péri- et post-opératoires [34, 35].

Dans les sections suivantes, afin de mieux comprendre le rôle de l'anesthésie régionale et de la néostigmine épidurale dans la prise en charge de la douleur post-opératoire je vais présenter un bref aperçu de la neurophysiologie de la douleur, l'anatomie des nerfs, ainsi que la contribution de différents phénomènes pathophysiologiques. Ensuite, le rôle des blocs de nerfs périphériques et de la néostigmine épidurale dans l'arsenal thérapeutique actuel seront présentés, respectivement. Avant de

présenter les objectifs généraux de la thèse, les techniques de modélisation utilisées dans les différents articles de recherche seront également introduites.

## 1.2 Neurophysiologie de la douleur

La douleur est définie comme une « *expérience* » sensorielle et émotionnelle déplaisante associée à un dommage tissulaire actuel ou potentiel [36]. La douleur n'est pas un simple réflexe, beaucoup de mécanismes endogènes complexes sont impliqués par la traduction d'un stimulus nociceptif en une expérience douloureuse, et ce à tous les niveaux de la chaîne d'événements neurologiques. Une fois consciemment ressentie, la douleur consiste en un système d'alarme qui prévient l'aggravation de dommages tissulaires en éloignant la zone touchée du stimulus nociceptif. Ainsi, ce système vise à garder l'intégrité physique en localisant et en mesurant l'intensité du stimulus alors que les composantes affective et cognitive cherchent à modifier l'attention, ainsi qu'à mémoriser les expériences déplaisantes pour les prévenir dans le futur. Cependant, la douleur n'est pas toujours d'ordre physiologique et une douleur chronique ou pathologique peut se manifester suite à des désordres de transmission ou de sensibilisation.

Pour comprendre la chronologie des événements associés à la douleur, le parcours simplifié d'un stimulus électrique nociceptif sera suivi tel que illustré dans la Figure 1-1. Une stimulation nociceptive peut être mécanique, thermique ou chimique et déclenche un recrutement de nocicepteurs qui transmettront l'information par le premier neurone jusqu'aux cornes postérieures de la moelle où un premier contact synaptique est établi avec le deuxième neurone. Le neurone secondaire se croise sous le canal de l'épendyme et forme la voie spinothalamique dans la portion ventrolatérale de la moelle. Ce neurone chemine l'information jusqu'aux complexes ventrobasal et centromédian du thalamus somatosensoriel où un autre contact synaptique est établi avec le troisième neurone. Le contact avec le neurone tertiaire n'est pas exclusif. En effet, le neurone secondaire établit des contacts synaptiques dans le tronc cérébral aux niveaux de la substance grise périaqueducale (SGPA) et les noyaux du raphé (nucleus raphe magnus (NRM)). Ces

derniers jouent un rôle important dans la modulation de la douleur. Le troisième neurone conduit le stimulus vers les régions somatosensorielles et limbiques. Au niveau de chaque contact synaptique, il y a une intégration de l'information qui dépend de plusieurs phénomènes qui peuvent être inhibiteurs ou excitateurs. Ces zones d'intégration constituent une cible stratégique pour l'arsenal thérapeutique.

En résumé, le stimulus douloureux implique des neurones afférents primaires, une traduction du signal au niveau de neurones secondaires, une modulation supraspinale et des mécanismes de sensibilisation possibles aux niveaux central et périphérique. De plus, la douleur peut s'adapter avec l'environnement en changeant les contacts synaptiques; un phénomène connu sous le nom de « plasticité » [37].

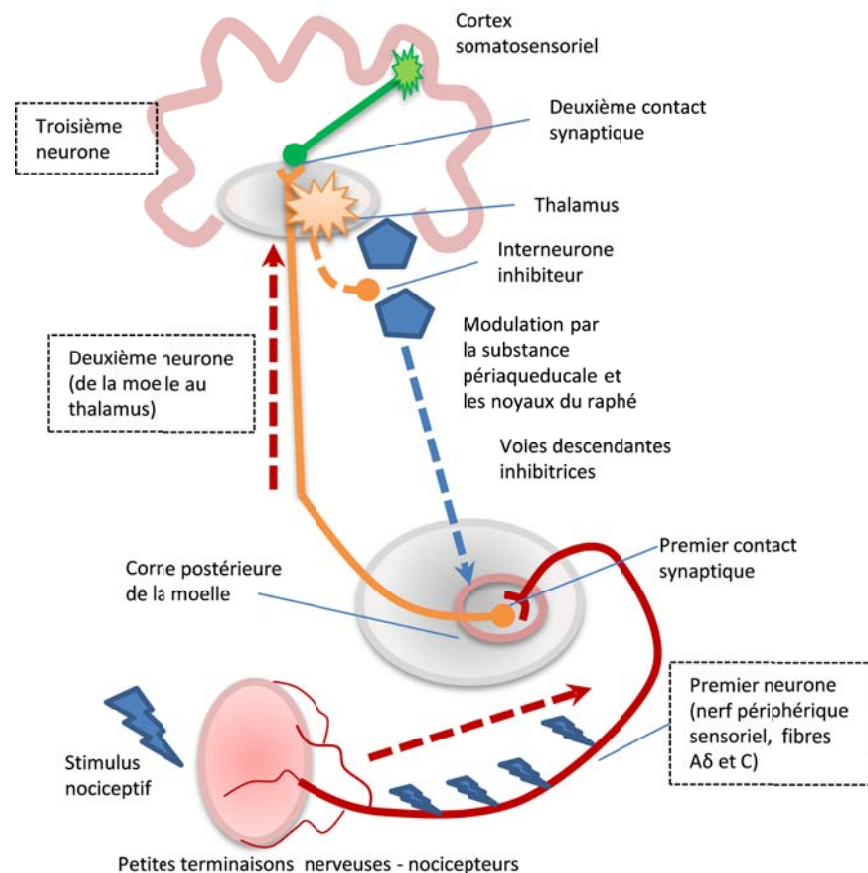


Figure 1-1 Cheminement général d'un stimulus nociceptif de la périphérie au cortex

### 1.2.1 Nocicepteurs

Il n'existe pas un seul récepteur ni une cellule spécifique pour la douleur. Ce sont des terminaisons nerveuses libres amyéliniques qui vont détecter un stimulus nociceptif qui peut être déclenché par une blessure mécanique, thermique ou chimique. Ces terminaisons nerveuses libres sont parsemées sur toute la surface corporelle ainsi que sur les viscères et les muscles. Par exemple, des structures spécialisées (disque de Merkel (tension), corpuscule de Pacini (pression)) permettent la traduction d'un signal mécanique en générant un potentiel d'action électrique. Chaque type de stimulus recrute la structure spécialisée appropriée, ainsi, un stimulus chimique ou mécanique n'affectera pas les structures traduisant les stimuli thermiques. En plus, le stimulus doit dépasser un seuil d'activation pour générer un potentiel d'action.

Une fois les stimuli nociceptifs transmis, la douleur peut être modulée en impliquant des récepteurs qui sont de plus en plus identifiés comme les récepteurs vanilloïdes, récepteurs de bradykinine et récepteurs de neurotrophines [38-41]. Un stimulus nociceptif engendre beaucoup d'événements libérant une panoplie de substances inflammatoires très variées et qui agissent par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques [41], en voici une liste non exhaustive: bradykinine, prostaglandine, histamine, différentes interleukines, interféron, facteur de croissance tumoral, le peptide lié à la calcitonine et la substance P. Ces substances ont des origines multiples (macrophages, plaquettes, terminaisons nerveuses, etc.), périphériques et centrales.

En chirurgie, le stimulus nociceptif est surtout de nature mécanique. Ce qui rend la douleur difficile à caractériser en recherche est qu'elle va au-delà de l'étude de la nociception en tant que telle puisqu'elle a une composante émotionnelle et varie énormément d'un individu à l'autre. C'est aussi pour la même raison que c'est difficile de trouver des modèles animaux qui peuvent être extrapolés chez l'homme.

Les terminaisons nerveuses de nociception sont le prolongement de fibres nerveuses sensibles à conduction rapide ou lente.

## 1.2.2 Fibres nerveuses

Les fibres nerveuses sensibles se divisent en trois grandes classes telles que présentées dans le Tableau 1-1 adapté de Beaulieu *et al.* 2005 [42].

**Tableau 1-1 Principales fibres nerveuses sensibles**

	A $\beta$	A $\delta$	C
Diamètre	6-12 $\mu\text{m}$	1-5 $\mu\text{m}$	0.2-1.5 $\mu\text{m}$
Myélinisation	Oui	Oui	Non
Vitesse de conduction	35-75 m/s	5 à 30 m/s	0.5-2 m/s
Rôle principal	-Toucher léger et proprioception	-Température normale -Nociception (mécanique et thermique)	-Nociception (mécanique, thermique et chimique)

### 1.2.2.1 Fibres A $\beta$

Les fibres A $\beta$ , sont les plus grosses, myélinisées et à conduction rapide. Elles transmettent normalement des informations non-nociceptives comme le toucher léger et la proprioception. Un bloc sélectif des fibres de gros calibre pourra augmenter la perception de la douleur suite à un stimulus nociceptif [42]. Donc, ces fibres participent à la modulation de la douleur.

### 1.2.2.2 Fibres A $\delta$

Les fibres A $\delta$ , sont plus petites, myélinisées, à conduction plus lente que les fibres A $\beta$  et transmettent la première douleur qui est brève, aiguë et précise. Cette première douleur est la base du réflexe mécanique. Les fibres A $\delta$  existent sous plusieurs types [43]: fibres liées à des mécanonocicepteurs qui répondent à des stimulations mécaniques et d'autres liées à des récepteurs polymodaux qui répondent à des stimulations mécaniques ou

thermiques. Ces deux types ne sont pas indépendants puisque la stimulation d'un sous-type pourra influencer le seuil d'activation de l'autre. Ceci amplifiera le signal douloureux ressenti; un phénomène connu sous le nom d'hyperalgésie.

### **1.2.2.3 Fibres C**

Les fibres C sont des fibres amyéliniques, de petit diamètre et à conduction lente. Elles peuvent former jusqu'à trois quart d'un nerf périphérique. Elles sont principalement nociceptives. Des données récentes suggèrent que les fibres C peuvent avoir un rôle dans le prurit [44, 45] ou la composante émotive d'une sensation [46]. Les fibres C propagent une douleur diffuse et prolongée dite seconde douleur.

### **1.2.2.4 Fibres motrices**

Les principales fibres motrices sont les fibres A $\alpha$  avec un diamètre de 12-22  $\mu\text{m}$  et les fibres A $\gamma$  avec un diamètre de 2-8  $\mu\text{m}$ . Elles sont aussi responsables de la proprioception [47].

## **1.2.3 Nerfs périphériques et leur distribution**

Un nerf périphérique peut comporter une combinaison de fibres sensorielles primaires, motrices et autonomes. Chaque nerf possède un arrangement anatomique particulier et c'est la proportion et le nombre de chaque type de fibres qui va dicter sa fonction principale. Les fibres nerveuses s'associent en fascicules par le biais d'un tissu conjonctif nommé endonèvre. Plusieurs fascicules s'associent à l'intérieur du périnèvre, formant ainsi un "groupe de fascicules" ou faisceau. Enfin, plusieurs faisceaux s'associent par le biais de l'épinèvre (tissu conjonctif dense contenant des vaisseaux sanguins), donnant un nerf. Ceci est représenté dans la Figure 1-2.



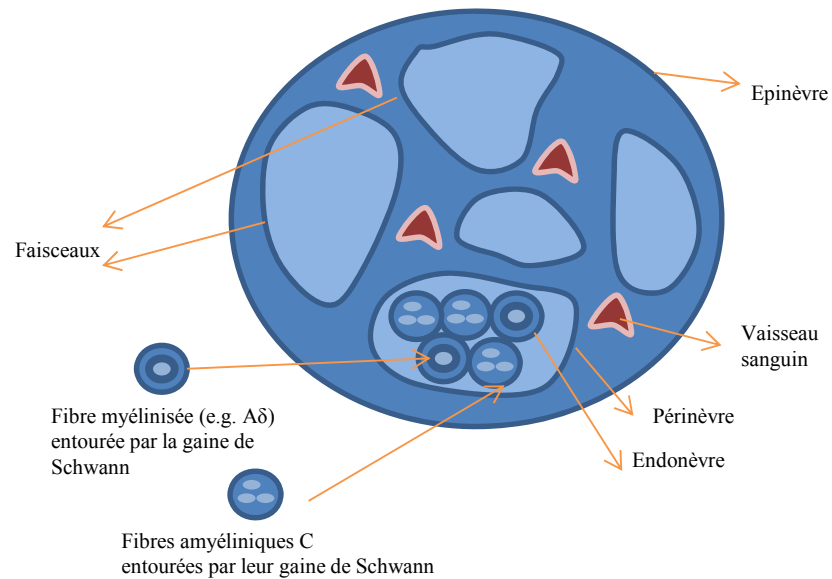


Figure 1-2 Anatomie d'un nerf périphérique

Un nerf périphérique se forme dans le canal vertébral par la jonction de la corne dorsale sensorielle et la corne ventrale motrice. Il sort de la colonne vertébrale et pour atteindre la périphérie, il suit un chemin prédéterminé au cours du développement grâce à des facteurs de croissance [48]. La distribution des neurones sensoriels est spécifique et chaque nerf radiculaire innerve une partie spécifique de la peau désignée par dermatome. Des variations inter-individuelles peuvent exister de même que des chevauchements entre les zones. La Figure 1-3 présente les dermatomes cutanés [49, 50] et la Figure 1-4 présente plus en détails les dermatomes du membre inférieur [51].

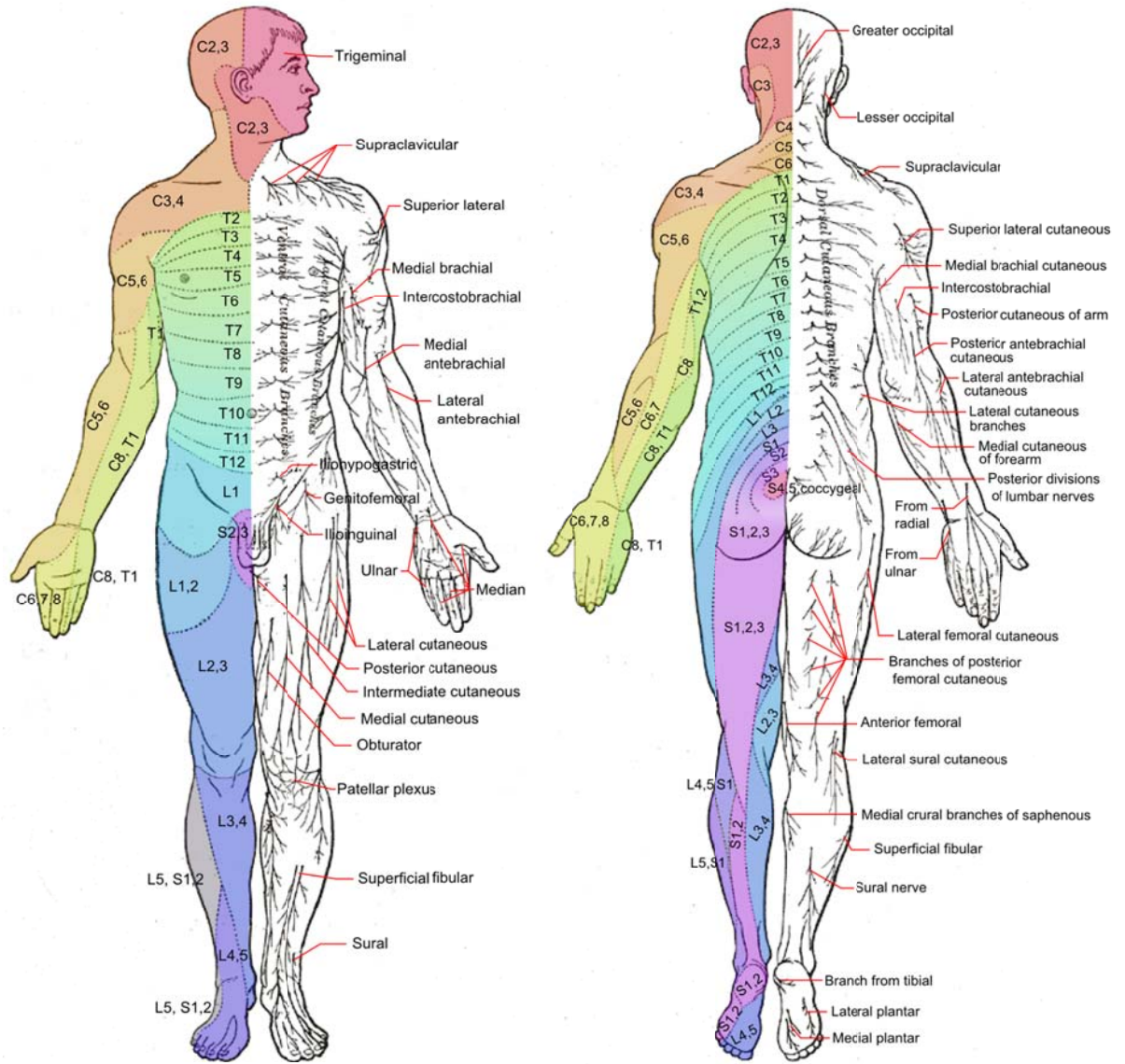


Figure 1-3 Dermatomes cutanés antérieurs et postérieurs

(source: wikimedia [48,49])

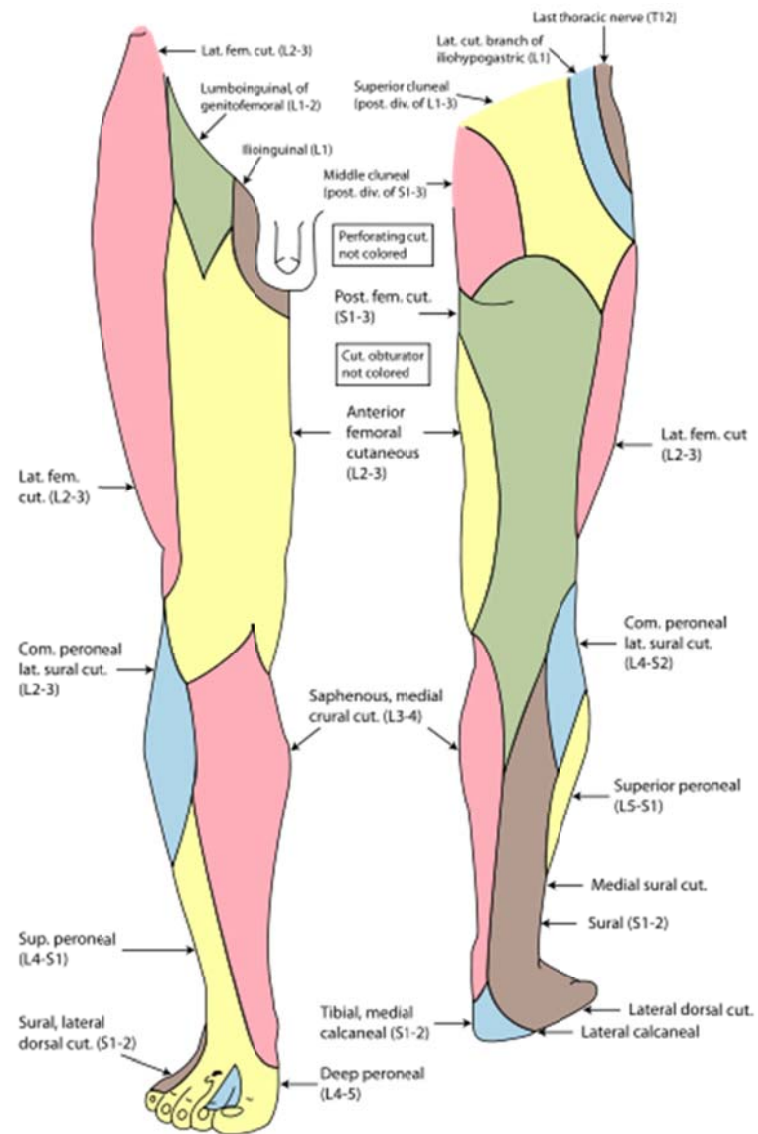


Figure 1-4 Dermatomes du membre inférieur

(source : wikimedia [50])

### 1.3 Conduction nerveuse

La membrane plasmatique axonale constitue une structure très importante parce qu'elle gère la conduction du stimulus nerveux par l'axone. Comme toute autre membrane cytoplasmique, elle est formée par une bicouche phospholipidique. Elle contient des protéines qui peuvent servir comme enzyme, récepteur, pompe de transport actif ou comme un canal ionique. La Figure 1-5, adaptée de Berde et Strichartz [52], illustre les principales structures de la membrane axonale. Ce sont surtout les canaux qui gèrent et contrôlent le passage des cations à travers la membrane qui nous intéressent pour la conduction nerveuse. Ils sont munis de pores laissant passer seulement un type spécifique d'ions (ex. canal pour  $\text{Na}^+$ , canal pour  $\text{K}^+$ ).

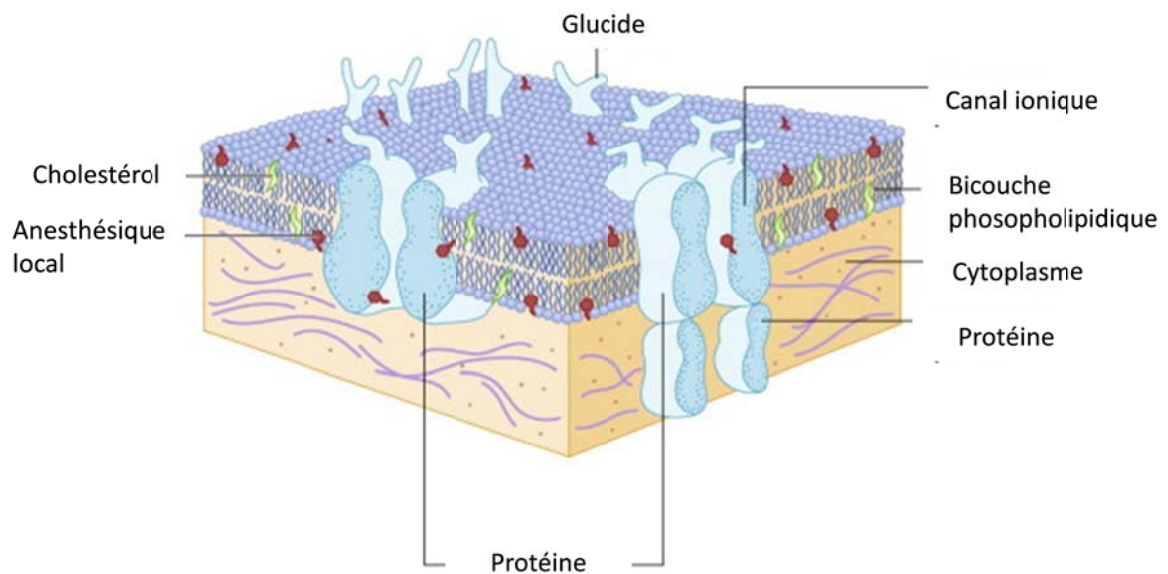


Figure 1-5 Membrane axonale

(adaptée de Berde et Strichartz. [52])

Parmi les canaux ioniques, on distingue la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase qui, couplée à d'autres facteurs, est responsable du maintien du potentiel électrique transmembranaire au repos. Ce potentiel est possible grâce à la perméabilité sélective de la membrane qui laisse passer les cations  $\text{K}^+$  selon le gradient de concentration mais pas les cations  $\text{Na}^+$ . La pompe

$\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase fait de sorte que pour deux ions  $\text{K}^+$  qui passent à l'intérieur de la cellule trois ions  $\text{Na}^+$  en sortent résultant en une différence de potentiel entre les deux côtés de la membrane aux alentours de  $-90 \text{ mV}$ . En stade de repos, ces canaux sodiques et potassiques voltage dépendants sont fermés et en attente. Quand un nerf est stimulé, on remarque une dépolarisation suivie d'une repolarisation rapide ramenant la membrane au potentiel de repos dans un laps de temps très rapide (1-2 ms). La dépolarisation est possible grâce aux changements de la structure en trois dimensions du canal sodique ce qui modifiera la perméabilité au  $\text{Na}^+$ . Après un stimulus et lorsque le potentiel de membrane atteint une valeur aux alentours de  $-35 \text{ mV}$ , le canal sodique s'ouvre très rapidement ce qui augmentera le potentiel à environ  $+35 \text{ mV}$ . Le canal sodique entre alors dans une période d'inactivation où aucun nouveau stimulus ne peut l'ouvrir jusqu'à ce qu'on retrouve le potentiel du repos. Le potentiel d'action est illustré dans la Figure 1-6.

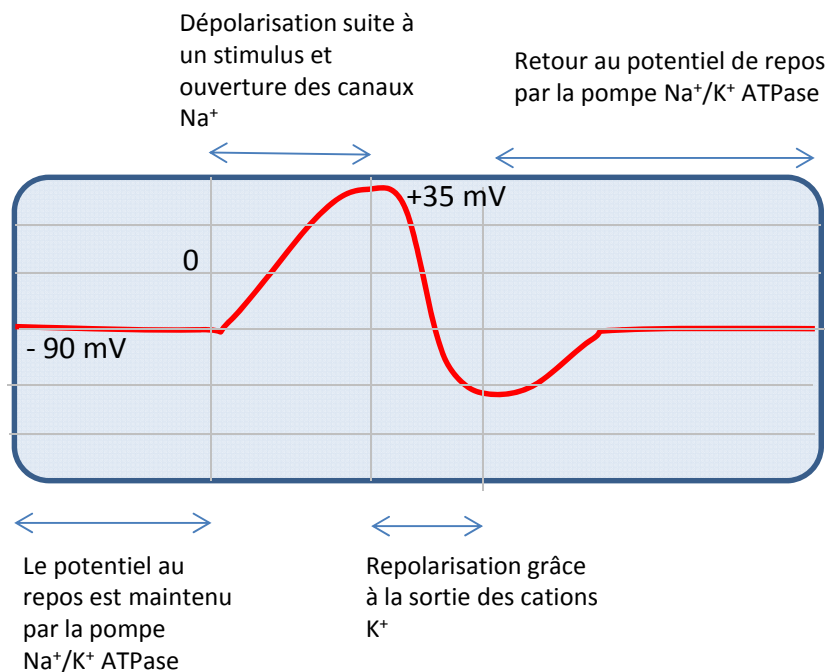


Figure 1-6 Potentiel d'action du nerf

Les canaux potassiques s'ouvrent en même temps que les canaux sodiques mais ils sont de nature plus lente et restent ouverts après la fermeture des canaux sodiques où ils jouent leur rôle dans la repolarisation. L'affinité des agents pharmacologiques comme les AL aux canaux ouverts ou inactivés explique le phénomène du bloc « usage-dépendant » [53] : une stimulation répétée du nerf potentialise l'effet de l'agent pharmacologique puisqu'une plus grande proportion des canaux sodiques restent ouverts ou inactifs. La Figure 1-7 symbolise les principaux états d'un canal sodique voltage-dépendant après un stimulus nerveux.

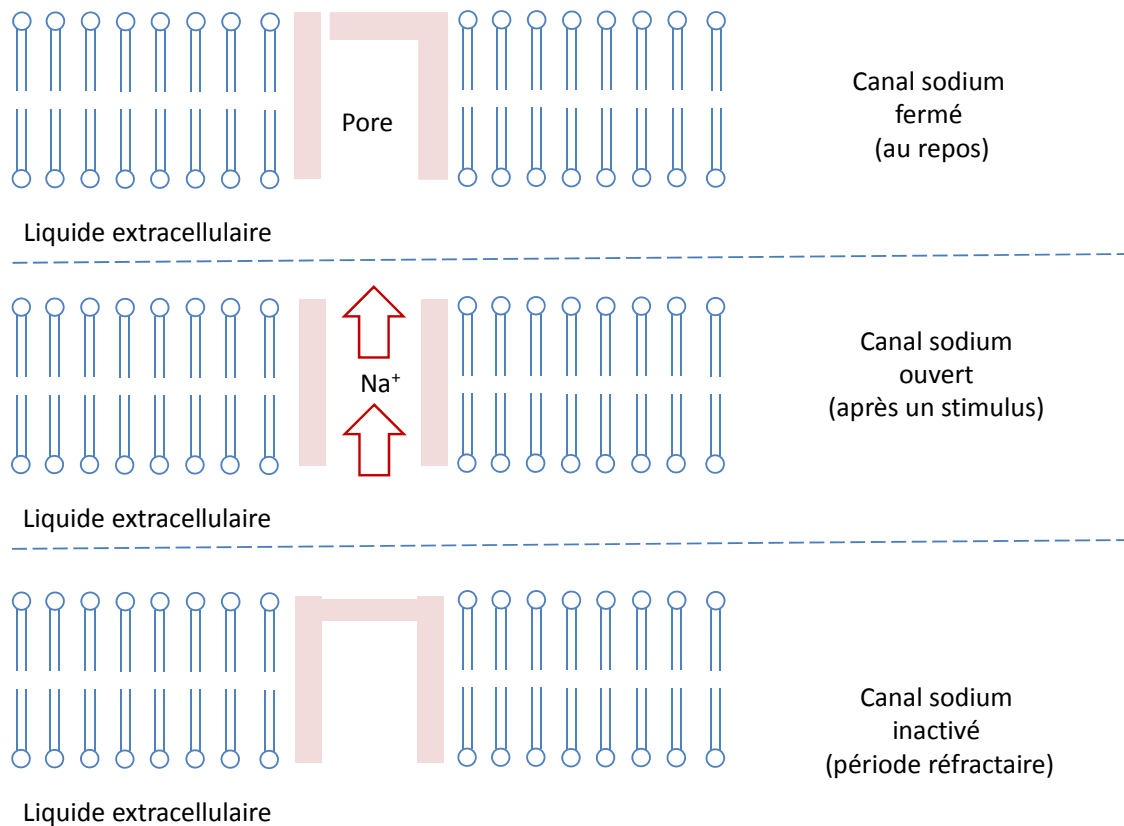


Figure 1-7 Principaux états d'un canal sodique

Quand un segment d'un axone est dépolarisé, il y aura une différence de potentiel avec le segment avoisinant. Ceci crée un circuit électrique suffisant pour perturber le potentiel de repos et déclenche l'ouverture des canaux sodiques [54]. Après son ouverture, le canal sodique rentre dans un état fermé et inactivé ce qui rend la propagation

unidirectionnelle (Figure 1-8 adaptée de Matthews 2009 [55]). La conduction est continue dans les fibres amyéliniques tandis qu'elle est dite « saltatoire » c.à.d. elle saute d'un nœud de Ranvier à un autre dans les fibres myélinisées ce qui expliquera la rapidité de la transmission dans les fibres larges myélinisées. La conduction peut « sauter » deux ou trois nœuds de Ranvier consécutifs.

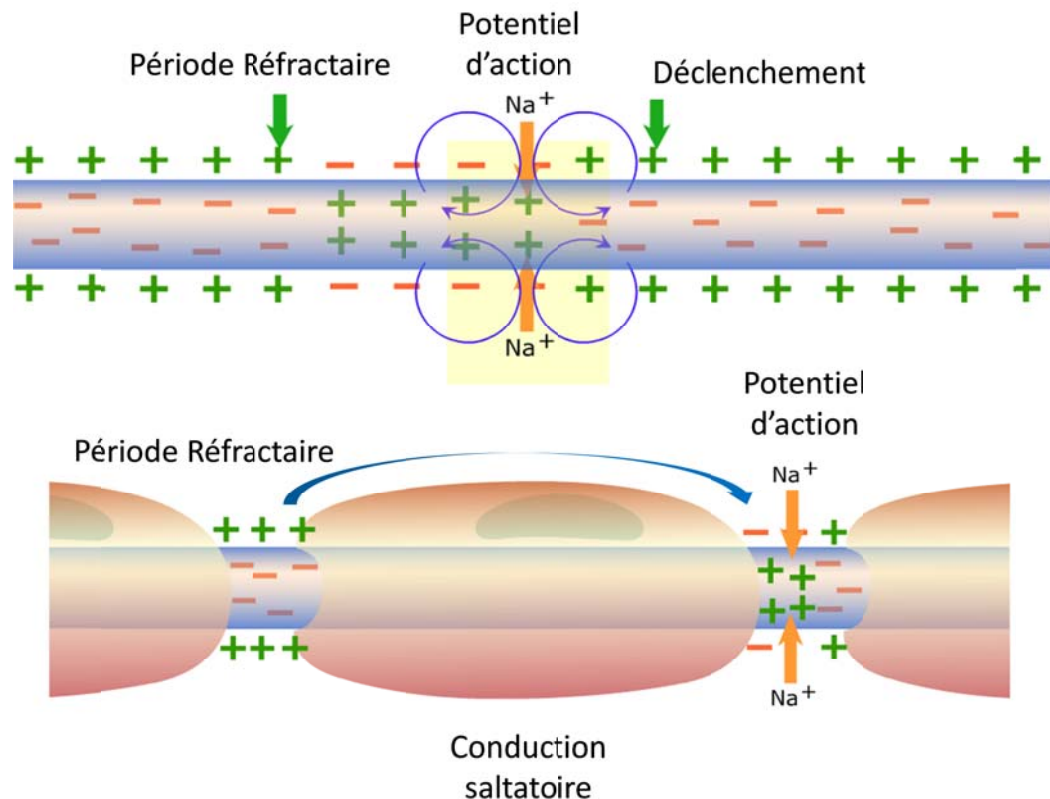


Figure 1-8 Propagation du potentiel d'action

(Matthews 2011 [54])

### 1.3.1 Mécanismes endogènes de modulation de la douleur

Il y a eu beaucoup de progrès dans notre compréhension de la douleur en élucidant des mécanismes endogènes ayant pour rôle de contrôler et moduler la douleur. Depuis longtemps, la théorie du portillon « Gate Control Theory » [56] a proposé que la voie nerveuse ascendante n'est pas directe mais plutôt complexe et modulée dès l'arrivée dans la

moelle épinière. Cette théorie stipule que la stimulation sélective des fibres A $\beta$  recrute des interneurons inhibiteurs dans la substance gélatineuse des cornes postérieures de la moelle ce qui produira une analgésie. Ceci expliquera l'analgésie locale produite lors d'une stimulation à basse intensité comme le massage léger. Des études plus récentes ont montré que l'information est modulée à tous les niveaux centraux. La modulation peut être excitatrice et amplificatrice de la réponse nociceptive ou inhibitrice et analgésique [57]. Il est à noter que les systèmes centraux de modulation peuvent baisser l'inhibition ou diminuer l'excitation centrale. Les mécanismes impliqués sont nombreux et utilisent plusieurs substances et neurotransmetteurs comme la sérotonine et l'adrénaline. Le rôle joué peut être double non seulement au niveau cellulaire comme les cellules rostro-ventrales du bulbe rachidien qui peuvent être inhibitrices ou excitatrices [58-60], mais également au niveau du neurotransmetteur. C'est le cas avec l'acide gamma aminobutyrique (GABA) qui a une réponse normalement inhibitrice des stimuli nociceptifs mais qui devient excitatrice dans certaines circonstances [61, 62]. La perception de la douleur est donc un processus dynamique complexe qui dépend de la psychologie du patient et de ses expériences douloureuses antérieures [63].

Pour comprendre la relation entre les mécanismes endogènes et les différents traitements pharmacologiques de la douleur, ces mécanismes seront présentés par niveau anatomique :

1. Mécanismes spinaux (effets locaux)
2. Voies inhibitrices descendantes (effets diffus)
3. Mécanismes des centres supérieurs (effets diffus ou locaux)

### **1.3.2 Mécanismes spinaux et théorie du portillon**

Dans cette section, la théorie du portillon [56] sera présentée en plus de détails afin de mieux comprendre les mécanismes spinaux impliqués [57, 64]. Cette théorie qui résiste au temps [65], a stipulé que certains mécanismes dans la moelle épinière agissent comme un portillon, qui peut être ouvert, fermé ou à moitié ouvert. La stimulation des fibres C



active des neurones intermédiaires qui excitent des cellules modulatrices dont l'activité est contrôlée par l'équilibre entre l'activation des fibres A $\beta$  inhibitrices et l'influence inhibitrice des voies descendantes centrales. De plus, ces stimuli peuvent ne pas être seulement liés à un stimulus momentané mais également à un souvenir ou une émotion lointaine. Ceci pourrait expliquer comment des soldats revenant avec un sentiment puissant d'avoir survécu auraient ignoré la sensation de douleur en fermant le portillon. Les branchements des neurones dans la corne dorsale de la moelle épinière sont complexes, avec beaucoup de divergences et convergences synaptiques. La modulation pourrait être spinale ou supra-spinale telle qu'illustrée dans la Figure 1-9.

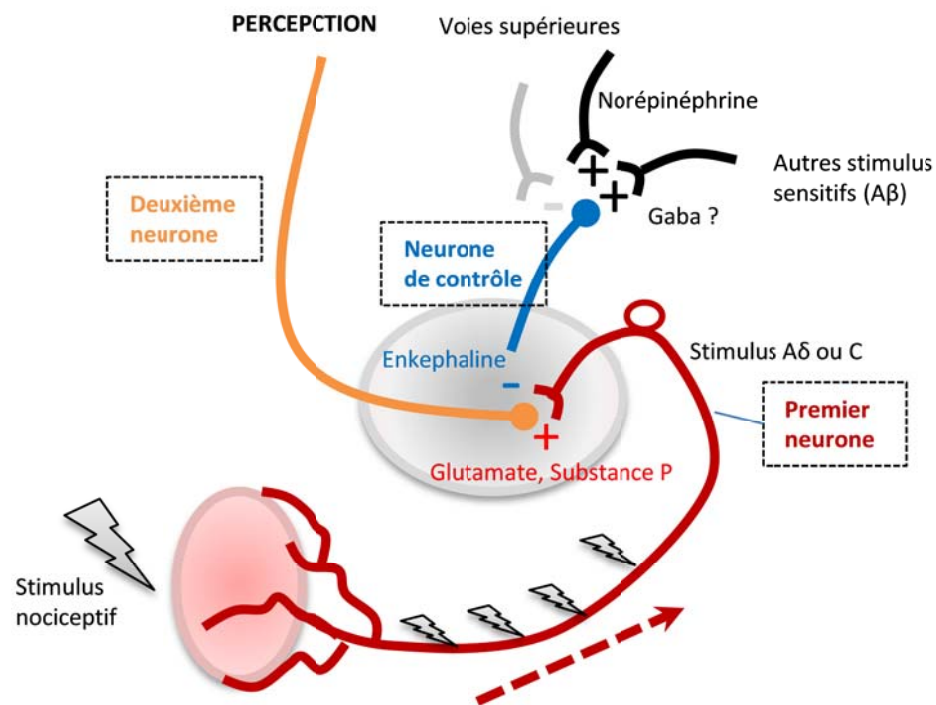


Figure 1-9 La théorie du portillon

Dans des conditions neuropathiques, les neurones non nociceptifs peuvent stimuler les neurones secondaires de la moelle produisant une perception de la douleur suite à un stimulus qui ne l'est pas normalement; ce phénomène est appelé allodynie.

Beaucoup de neurotransmetteurs et leurs récepteurs respectifs sont localisés dans la corne dorsale de la moelle épinière. Les complications des différents systèmes impliqués

sont en dehors du champ d'intérêt de cette thèse. Ainsi, seuls les neurotransmetteurs majeurs de la transmission nociceptive spinale seront décrits.

### **1.3.2.1 Acides aminés**

Ce sont les neurotransmetteurs classiques à libération, recapture et métabolisme rapides. Ils peuvent être excitateurs (glutamate, aspartate) ou inhibiteurs (GABA, glycine) [66]. Ils ont une action rapide locale au niveau de leur site d'action : la fente synaptique. Ils peuvent agir sur plusieurs sous-types de récepteurs [67].

### **1.3.2.2 Neuropeptides**

Les neuropeptides sont synthétisés par les neurones afférents primaires impliqués dans la nociception. De plus, ils sont présents dans les voies descendantes modulatrices. Les neuropeptides ne possèdent pas de système de recapture, d'où la possibilité d'une action prolongée après diffusion dans les zones avoisinantes. Le neuropeptide le plus connu pour la douleur est la substance P qui joue un rôle très important dans la transmission du stimulus douloureux [68-70]. La substance P est excitatrice du récepteur NK-1 [69] tandis que les peptides opioïdes (enképhalines, endorphines et dynorphines) sont inhibiteurs et agissent comme analgésiques naturels [71]. Ces derniers existent en abondance dans la corne dorsale de la moelle et font également partie des voies descendantes inhibitrices. Les récepteurs opioïdes comportent les récepteurs DOP ( $\delta$ ), KOP ( $\kappa$ ), MOP ( $\mu$ ) et NOP (ORL1, récepteur de la nociceptine). Le rôle de la nociceptine (anciennement connue sous orphanine FQ) n'est pas encore très bien caractérisé [72]. Il est possible qu'un neurone emmagasine et libère plusieurs types de neurotransmetteurs et de neuropeptides simultanément [73].

### **1.3.3 Voies inhibitrices descendantes**

Parmi les structures importantes dans le contrôle inhibiteur descendant, on distingue la substance grise périaqueducule (SGPA) et le bulbe rostro-ventral (RVM). Une analgésie provoquée par une stimulation de la SGPA, assez puissante pour permettre une chirurgie

chez le rat, a initialement été décrite par Reynolds *et al.* en 1969 [74]. Depuis, beaucoup d'études essaient de répondre à des questions importantes comme la spécificité du contrôle descendant sur le type de stimulus : nociceptif ou non, type de stimulus (pression, chaleur, froid, etc.) [75]. Le rôle modulateur du RVM est maintenant bien connu [76, 77]. Le concept du contrôle inhibiteur diffus [78, 79] explique comment une stimulation localisée peut générer une inhibition plus générale des stimulations nociceptives. Parmi les neurotransmetteurs impliqués dans ces phénomènes, on distingue la sérotonine et la norépinéphrine [80]; ce qui expliquerait l'utilisation des antidépresseurs inhibant la récapture de la sérotonine et/ou la norépinéphrine pour la douleur. En effet, la capacité de la duloxétine à réduire l'utilisation de la morphine après la chirurgie de remplacement du genou a été récemment décrite [81]. Le système SGPA-RVM est au centre des structures supraspinales gérant le contrôle inhibiteur diffus, celles-ci incluent, entre autres, l'hypothalamus et les amygdales [82]. Il faut également souligner le rôle de l'acétylcholine qui a un effet spinal direct contribuant à une analgésie [83]. Ceci expliquera la possibilité d'utiliser la néostigmine, un inhibiteur de l'acétylcholine estérase, en analgésie post-opératoire.

### **1.3.4 Options thérapeutiques pour le traitement de la douleur**

Le stimulus douloureux peut être intercepté et interrompu à plusieurs niveaux de la voie ascendante. La douleur post-opératoire est aiguë, inflammatoire et causée par la lésion tissulaire. Ainsi les approches thérapeutiques possibles seront les opioïdes qui bloquent la transmission synaptique de la douleur, les anti-inflammatoires qui peuvent réduire l'inflammation tissulaire et l'hyperalgésie qui en résulte, la néostigmine qui, par l'intermédiaire de l'acétylcholine, a un effet spinal direct et surtout les anesthésiques locaux qui ont l'avantage de bloquer complètement la transmission nerveuse. En effet, les anesthésiques locaux ont l'avantage de pouvoir être utilisés à plusieurs endroits du parcours nociceptif avec des voies d'administration variées : topique (crème appliquée sur la peau ou la muqueuse), infiltration du site chirurgical, à proximité du nerf périphérique, à proximité d'un plexus de nerfs, voie épidurale, voie rachidienne et en administration intraveineuse

(lidocaïne pour l'analgésie post-opératoire, hypertension intracânienne, prévention de la toux et traitement d'arythmie maligne). La Figure 1-10 adaptée de Colvin et McClure 2002 [84], résume les différentes utilisations possibles des anesthésiques locaux. La néostigmine quant à elle, peut être administrée par voie épidurale ou rachidienne (intrathécale).

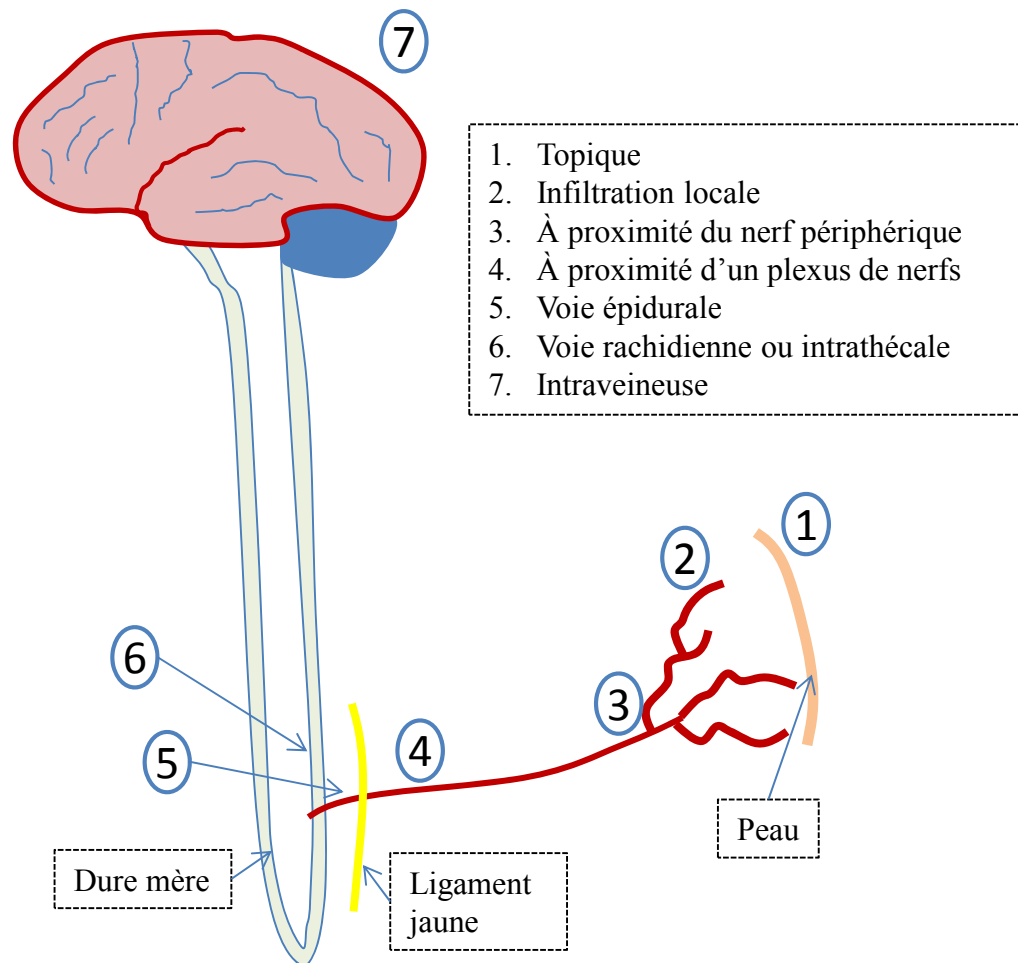


Figure 1-10 Les sites d'administration des anesthésiques locaux

(adaptée de Colvin et McClure 2002)

## 1.4 Pharmacocinétique

La pharmacocinétique est la science qui s'intéresse à l'évolution des concentrations du médicament dans les fluides biologiques en fonction du temps. Les principales étapes qui contribuent aux caractéristiques pharmacocinétiques d'un médicament sont: Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion (ADME). La Figure 1-11 illustre le devenir du médicament dans l'organisme ainsi que les principales voies d'administration, de métabolisme et d'élimination. Plusieurs voies d'administration sont possibles, dont les principales sont: intraveineuse, intra-musculaire, pulmonaire par inhalation, sous-cutanée, intra-rectale et orale.

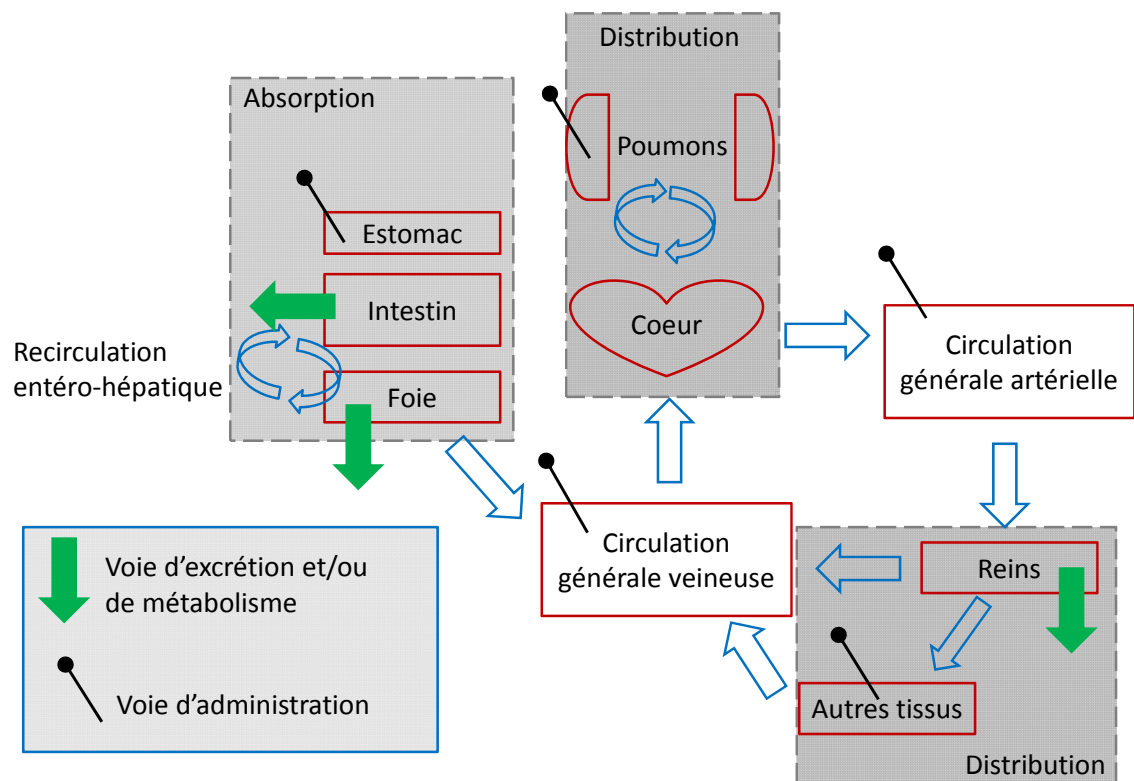


Figure 1-11 Les principales étapes de la pharmacocinétique

#### **1.4.1.1 Biodisponibilité et absorption**

La biodisponibilité comprend toutes les étapes et phénomènes nécessaires pour qu'un médicament quitte son site d'administration avant d'atteindre la circulation générale et par la suite sa cible thérapeutique. L'absorption requiert le passage au travers de plusieurs membranes biologiques ce qui est influencé par la solubilité, la perméabilité du médicament ainsi que le flux sanguin. La fraction de la dose qui rejoint la circulation artérielle systémique est connue sous le terme biodisponibilité (F). La biodisponibilité d'un médicament après administration orale dépend de plusieurs facteurs : degré de dissolution dans les fluides intestinaux, dégradation par les sucs digestifs, métabolisme pré-systémique intestinal et hépatique, et de l'action de transporteurs. En fait, les protéines membranaires intestinales peuvent agir comme transporteurs actifs qui aident à l'absorption du médicament (influx) ou au contraire comme un mécanisme de protection et d'efflux comme la P-glycoprotéine (PGP). L'ensemble des phénomènes contribuant à influencer la biodisponibilité du médicament est connu sous l'effet de premier passage présystémique. Après le passage hépatique, on peut observer une excrétion biliaire de certains médicaments (forme inchangée ou métabolites) et surtout après avoir été conjugués à un groupe hydrophile. Une fois dans l'intestin de nouveau, les médicaments conjugués peuvent s'hydrolyser pour être réabsorbés. Ce phénomène appelé recirculation entéro-hépatique peut se répéter plusieurs fois ce qui augmentera la biodisponibilité. Les considérations spéciales de l'absorption des anesthésiques locaux administrés par voie locorégionale à proximité des nerfs périphériques et de la néostigmine en administration épidurale seront traitées dans les sections spécifiques pour chaque médicament.

#### **1.4.1.2 Distribution**

Une fois le médicament dans la circulation générale, la distribution dans les différents tissus dépend du degré de perfusion sanguine et des propriétés physico-chimiques du médicament (coefficient de partage, perméabilité membranaire, liaison et affinité aux tissus). Dans la circulation générale, une partie du médicament se lie aux protéines plasmatiques et elle est en équilibre avec la partie libre non liée. Le pH sanguin, la

compétition pour les sites de liaison et la quantité de protéines plasmatique (albumine,  $\alpha_1$ -glycoprotéine acide (AGA)) peuvent influencer la fraction libre. Seule la fraction libre du médicament peut traverser les membranes biologiques pour se distribuer dans les tissus.

### 1.4.1.3 Métabolisme et élimination

Plusieurs mécanismes aident à éliminer les médicaments de l'organisme et ils comprennent principalement la dégradation pré-systémique, le métabolisme hépatique ou tissulaire et l'excrétion rénale. La somme de tous ces phénomènes représente la capacité de l'organisme à éliminer un médicament et est représentée par le paramètre pharmacocinétique de la clairance (CL).

#### 1.4.1.3.1 Métabolisme hépatique

Le foie est responsable de la majorité des biotransformations qui se font dans l'organisme. Avec le modèle hépatique dit « well-stirred » [85] la clairance hépatique peut être décrite par l'équation suivante :

$$CL = Q_H \cdot E = Q_H \cdot \frac{f_{\text{libre}} CL_{\text{int,libre}}}{Q_H + f_{\text{libre}} CL_{\text{int,libre}}}$$

où  $Q_H$  est le débit hépatique,  $E$  est le coefficient d'extraction hépatique qui est fonction de la fraction libre ( $f_{\text{libre}}$ ) et de la clairance intrinsèque du médicament libre ( $CL_{\text{int,libre}}$ ). Pour les médicaments avec un coefficient d'extraction hépatique faible  $f_{\text{libre}} * CL_{\text{int,libre}}$  est négligeable devant  $Q_H$  et l'équation peut être simplifiée à :

$$CL = Q_H \cdot E = Q_H \cdot \frac{f_{\text{libre}} CL_{\text{int,libre}}}{Q_H \gg f_{\text{libre}} CL_{\text{int,libre}}} = f_{\text{libre}} CL_{\text{int,libre}}$$

Ainsi une augmentation de la fraction libre, par exemple suite à une acidose métabolique [86], augmentera la clairance totale et diminuera la concentration totale. La

concentration libre qui est le produit de la fraction libre et de la concentration totale restera sensiblement inchangée en assumant que la clairance intrinsèque est inchangée:

$$C_{\text{libre}} = f_{\text{libre}} \cdot C_{\text{totale}} = f_{\text{libre}} \uparrow \cdot C_{\text{totale}} \downarrow = C_{\text{libre}} \leftrightarrow$$

Le métabolisme hépatique se fait par l'intermédiaire d'enzymes qui sont généralement classifiées selon l'ordre de leur intervention sur le médicament : enzymes de phase I (principalement oxydation par les cytochromes P450) et les enzymes de phase II (réactions de conjugaison).

Les cytochromes P450 (CYP) font partie d'une superfamille d'enzymes qui comportent plusieurs familles et sous familles. Les familles de cytochromes impliquées dans la biotransformation de médicaments sont les familles : 1, 2, 3, et 4. Les cytochromes les plus importants pour la biotransformation des médicaments sont les CYP3A4, CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 et CYP2C19 [87]. Les cytochromes impliqués dans le métabolisme des médicaments traités dans cette thèse sont discutés dans les sections spécifiques de chaque médicament.

Certains cytochromes comme les CYP2C19, CYP2C8, CYP2C9 et CYP2D6 présentent des polymorphismes pharmacogénétiques importants qui requièrent une adaptation posologique selon le phénotype [88-91].

Les enzymes de synthèse classiquement dites de phase II incluent la sulfotransférase, la glutathion-S-transférase, la glucuronyltransférase et la N-acétyltransférase.

#### 1.4.1.3.2 Excrétion Rénale

L'excrétion rénale est la principale voie d'élimination des médicaments sous forme inchangée hors de l'organisme. Elle comprend la filtration glomérulaire, la sécrétion tubulaire, et la réabsorption tubulaire.

La filtration glomérulaire est un processus physiologique de filtration du plasma qui génère l'urine primitive. La filtration élimine les déchets de l'organisme et elle se fait



passivement selon la différence de pression. La paroi glomérulaire est comme un tamis qui ne laisse pas passer les molécules avec un grand poids moléculaire ( $> 20$  KDa), telles que les protéines. Pour qu'un médicament soit filtré, il faut qu'il soit sous forme libre non liée aux protéines.

La sécrétion tubulaire est un processus actif qui utilise des transporteurs spécifiques pour transporter les médicaments du sang vers les tubules. Puisqu'il s'agit de transporteurs, la compétition, l'inhibition ou la saturation sont possibles. Les transporteurs sécrétant les acides (OATP, OAT) sont différents de ceux transportant les bases (OCT).

La réabsorption tubulaire est un processus physiologique qui aide à concentrer l'urine et à récupérer les substances utiles pour l'organisme. La réabsorption peut être active pour les substances endogènes ( $K^+$ ,  $Na^+$ , glucose, etc.) et pour certains médicaments et passive pour l'eau (osmose). La réabsorption dépend des caractéristiques physico-chimiques du médicament (lipophilicité, propriétés acido-basiques, etc.), et le pH tubulaire.

#### **1.4.1.4 Profil pharmacocinétique d'un médicament après administration orale**

Les caractéristiques physicochimiques de chaque médicament (coefficient de partage, lipophilicité, masse moléculaire, propriétés acido-basiques, solubilité dans l'eau, etc.) déterminent son comportement à chacune des étapes pharmacocinétiques. Un profil pharmacocinétique typique des concentrations plasmatiques d'un médicament administré par voie orale est représenté dans la Figure 1-12 .

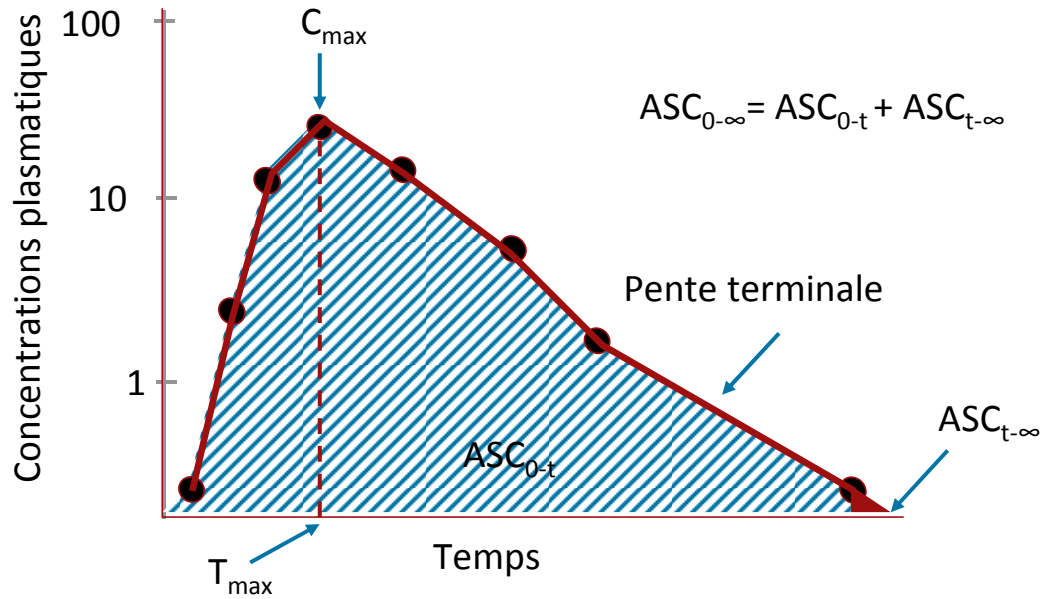


Figure 1-12 Profil pharmacocinétique typique après administration orale en coordonnées semi-logarithmiques

On note une augmentation des concentrations dans l'intervalle de temps correspondant à la phase d'absorption jusqu'à ce qu'on atteigne la concentration maximale ( $C_{\max}$ ) et dont le temps associé est appelé  $T_{\max}$ . Ensuite, un déclin progressif associé aux phénomènes d'élimination et caractérisé par une pente terminale exponentielle est noté. Souvent les profils pharmacocinétiques sont représentés en coordonnées semi-logarithmiques pour linéariser la phase terminale. Un paramètre pharmacocinétique très important est l'aire sous la courbe (ASC) qui représente l'exposition totale au cours du temps et qui a une importance clinique puisqu'elle peut être corrélée avec l'effet ou la toxicité. L' $ASC_{0-t}$  est définie par l'intégrale des concentrations plasmatiques du temps zéro au dernier temps d'échantillonnage  $t$ , cette aire est souvent extrapolée au temps infini pour obtenir l' $ASC_{0-\infty}$ . La pente terminale permet de calculer le temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) qui est le temps requis pour éliminer la moitié du médicament de l'organisme. Le temps de demi-vie terminale permet de déterminer le temps requis pour atteindre l'équilibre ou pour éliminer

complètement le médicament de l'organisme (5 à 7  $t_{1/2}$ ). La pente terminale peut être utilisée également pour extrapoler les concentrations résiduelles avant la prochaine dose du médicament.

En général, l'importance de la pharmacocinétique résulte du fait que les concentrations plasmatiques déterminent l'effet et la toxicité du médicament. Dans le cas particulier des anesthésiques locaux administrés localement pour un bloc périphérique, les concentrations plasmatiques permettent de déterminer indirectement la quantité du médicament qui reste au site d'action (le nerf) et servent également à évaluer directement le risque de présenter des effets secondaires cardiaques ou centraux.

L'écart entre la concentration minimale efficace et la concentration minimale toxique constitue l'index thérapeutique. La pharmacocinétique devient particulièrement très importante pour les médicaments à index thérapeutique étroit où une individualisation de la posologie s'avère nécessaire.

## 1.5 Pharmacodynamie

La pharmacodynamie (PD) est la science qui étudie l'évolution des effets du médicament en fonction du temps. Les effets peuvent être thérapeutiques (recherchés) ou toxiques (indésirables). La PD s'intéresse également aux mécanismes d'action et au site d'action (biophase). Le mécanisme d'action est souvent connu et lié à une liaison à un récepteur ou à une activation ou désactivation d'une enzyme. Un récepteur est une protéine cellulaire située sur la membrane cellulaire, dans le cytoplasme ou même dans le noyau. Certains médicaments miment ou bloquent des substances endogènes qui possèdent des affinités particulières à un ou plusieurs sous-types de récepteurs. Les interactions entre le médicament et son récepteur peuvent être activatrices (médicament agoniste) ou inhibitrices (médicament antagoniste). La Figure 1-13 illustre l'évolution de l'effet pharmacodynamique au cours du temps d'un médicament administré par voie orale et ayant un effet pharmacodynamique inhibiteur direct sans délai.

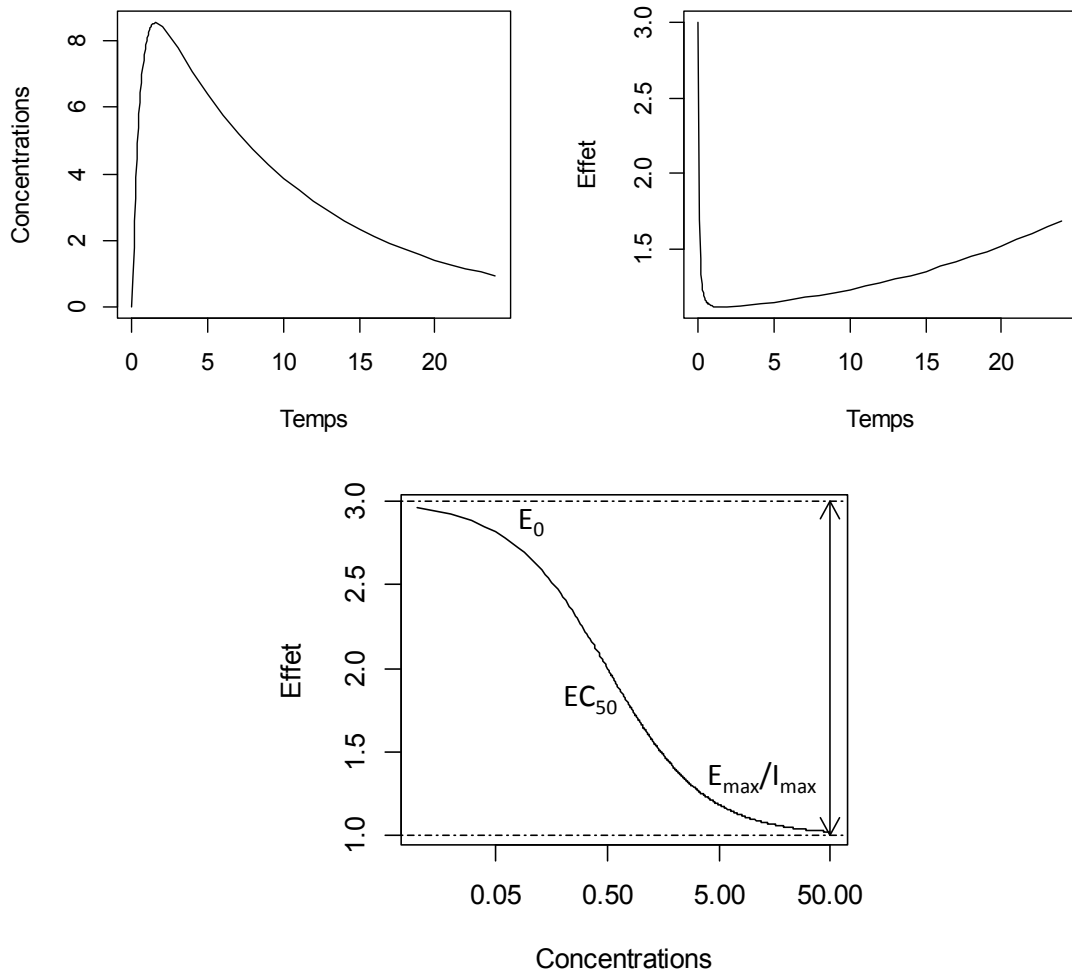


Figure 1-13 Profil pharmacodynamique d'un médicament avec un effet direct

Quand on représente l'effet pharmacodynamique en fonction des concentrations en échelle logarithmique, on distingue une courbe en forme de S, ici inversée à cause de l'effet inhibiteur. L'effet au temps zéro est connu sous le nom de l'effet de base « baseline » et c'est l'effet observé normalement avant l'action d'aucun médicament. Il est représenté par  $E_0$ . L'effet maximal, est la différence entre l'effet de base et l'effet maximal/minimal atteint et est désigné par  $E_{\max}$  quand il s'agit d'un effet agoniste activateur ou par  $I_{\max}$  quand il s'agit d'un effet antagoniste inhibiteur. La concentration produisant la moitié de l'effet maximal est la puissance désignée par  $EC_{50}$ . Si on compare deux médicaments, celui qui a

un effet maximal plus important est désigné comme plus efficace, et celui qui présente une  $EC_{50}$  plus petite, tout en ayant un effet maximal similaire, est désigné comme plus puissant.

Certains médicaments ont un site d'action difficile d'accès comme les médicaments qui agissent au niveau du système nerveux central. D'autres requièrent une cascade d'évènements qui doivent se dérouler avant que l'effet se manifeste. Ces phénomènes résultent en un délai d'apparition des effets pharmacodynamiques par rapport aux concentrations plasmatiques (hystérèse). Plusieurs approches sont possibles pour modéliser un délai d'action pharmacodynamique, les principales sont l'utilisation d'un compartiment effet [92], ou l'utilisation de modèles pharmacodynamiques indirects [93].

## 1.6 Les anesthésiques locaux

### 1.6.1 Aperçu historique

Les propriétés de feuilles de coca étaient connues par les Incas au Pérou. Ils les utilisaient pour l'effet stimulant, l'élimination de la fatigue, de la faim et de la douleur après des marches prolongées en montagne [94]. Quarante ans après la découverte et la démonstration de l'anesthésie générale à l'éther par Morton, Kohler démontre une première application clinique en utilisant la cocaïne localement pour une chirurgie de l'œil en 1846 [95]. Suite à sa popularité croissante, le corps médical a vite découvert les effets toxiques de la cocaïne amenant à la dépendance et parfois la mort des membres du corps médical [94]; ce qui a stimulé la recherche d'analogues tels que la procaïne en 1905 et la tétracaïne en 1930. Cependant, ces molécules étaient des esters dont la durée d'action était trop courte et qui pouvaient induire des réactions allergiques. Ce n'est qu'en 1943 qu'on synthétise le premier dérivé amide de la famille, la lidocaïne. Elle a l'avantage d'une durée d'action beaucoup plus prolongée que la procaïne ou la tétracaïne [96]. La synthèse de la bupivacaïne en 1957 constitue un autre jalon important dans l'histoire des anesthésiques locaux. Finalement, des recherches démontrant la cardiotoxicité de la bupivacaïne ont mené à la découverte de la ropivacaïne en 1996 et la levobupivacaïne en 1999.

### 1.6.2 Structures chimiques des anesthésiques locaux

Les anesthésiques locaux ont une structure qui comporte un noyau aromatique hydrophobe et lipophile, une chaîne intermédiaire et une amine tertiaire hydrophile. La chaîne intermédiaire peut être un amino-ester ou un amino amide. La Figure 1-14, adaptée de Catterall *et al.* 2010 [97], montre la structure chimique des principaux anesthésiques locaux utilisés en blocs de nerfs périphériques. Les énantiomères S [98-100] ont un profil de toxicité central et cardiaque plus favorable. Ceci a amené au développement des énantiomères S purs : la levobupivacaïne et la ropivacaïne.

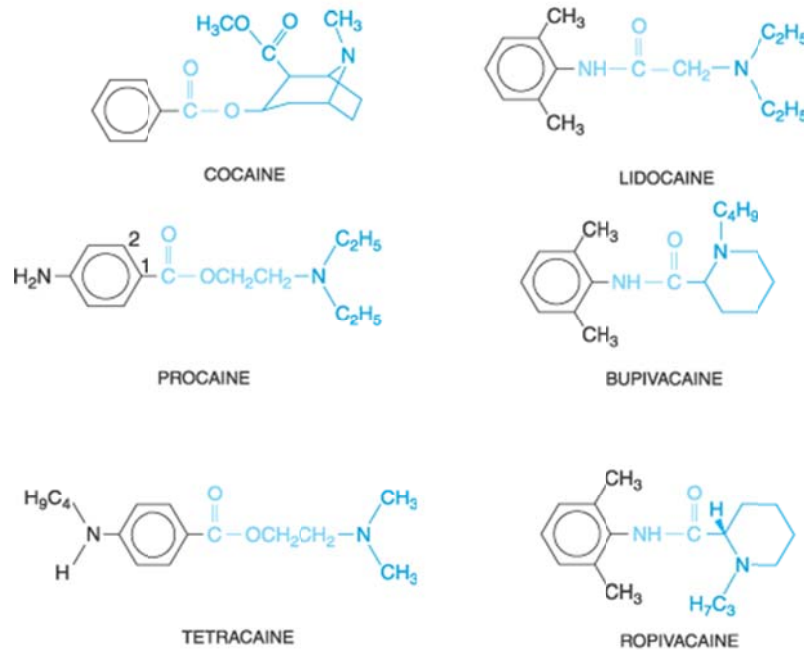


Figure 1-14 Structures chimiques des principaux anesthésiques locaux

(adaptée de Catterall *et al.* 2010 [97])

### 1.6.3 Mécanisme d'action

Les anesthésiques locaux sont des médicaments qui stabilisent les membranes. Ils réduisent la vitesse de dépolarisation et de repolarisation des membranes d'une façon réversible ce qui bloque la conduction nerveuse. Les anesthésiques locaux agissent principalement en inhibant le canal du sodium voltage-dépendant de la membrane cellulaire phospholipidique. Quand l'influx du  $\text{Na}^+$  est bloqué, la dépolarisation et la propagation de l'influx nerveux sont arrêtées. Le site de liaison des anesthésiques locaux est situé dans la partie interne cytoplasmique du canal sodique. Les anesthésiques sont des bases faibles avec un pKa proche de 8, ce qui expliquerait l'existence de la forme protonée et la forme non-protonée, en équilibre, au pH physiologique (7.4). La forme basique neutre est liposoluble et peut traverser la bicouche phospholipide plus aisément. Une fois dans la cellule, la forme basique attire un proton et redevient chargée positivement. C'est la forme

ionisée qui va s'introduire dans le canal par l'intérieur de l'axone pour le bloquer. La Figure 1-15 illustre le passage de l'anesthésique local à travers la membrane et son mécanisme d'action.

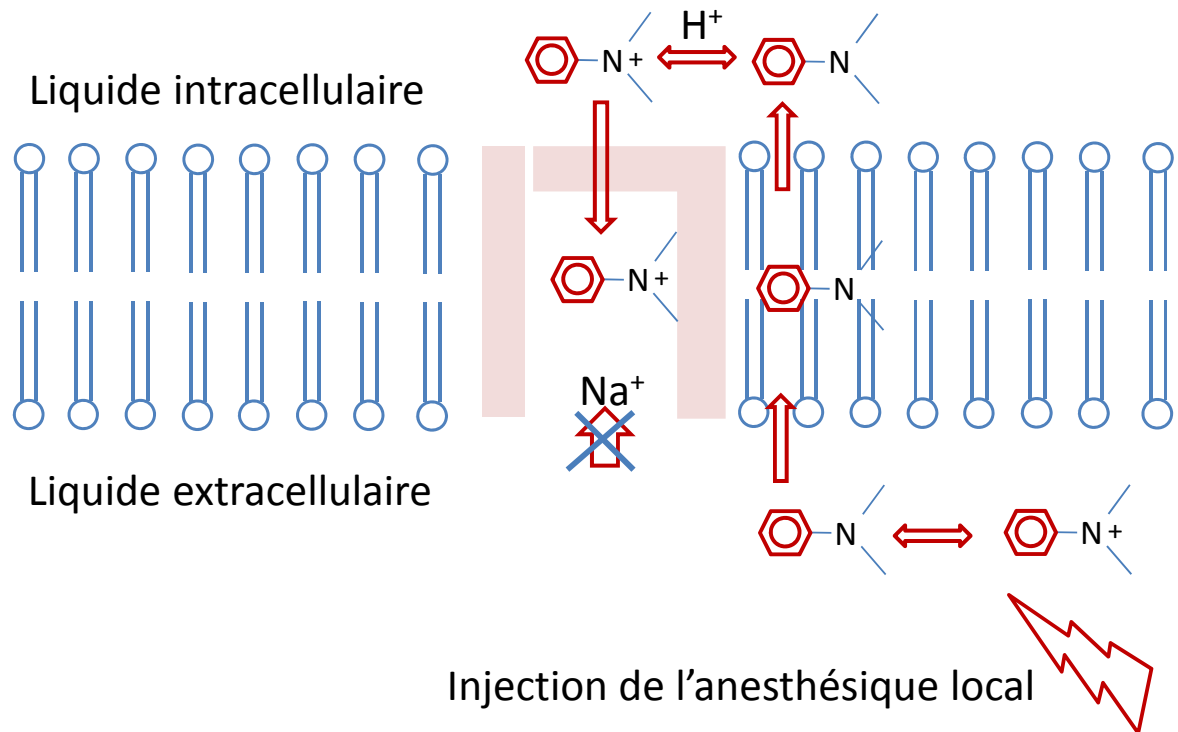


Figure 1-15 Mécanisme d'action des anesthésiques locaux

L'affinité de l'anesthésique local pour les canaux sodiques activés est plus forte (action « usage-dépendant »). De plus, l'accès est plus facile dans les fibres amyéliniques. Par contre, pour obtenir un bloc nerveux efficace dans les fibres myélinisées, l'anesthésique local doit bloquer deux ou trois nœuds de Ranvier consécutifs pour empêcher la conduction saltatoire. La distance entre les nœuds de Ranvier est corrélée avec la taille de la fibre. Ainsi, les fibres de plus petit diamètre auront plus de nœuds de Ranvier bloqués pour la même quantité d'anesthésique local. Ceci pourrait expliquer l'observation de bloc différentiel où on peut bloquer la douleur (fibre C, fibre A $\delta$ ) et garder la motricité (fibre A $\alpha$ ).



#### **1.6.4 Propriétés physico-chimiques des anesthésiques locaux**

Les structures chimiques variées des anesthésiques locaux leur confèrent des propriétés physico-chimiques différentes et elles sont présentées dans le Tableau 1-2.

Les anesthésiques locaux sont des bases faibles avec un pKa qui leur permet de présenter majoritairement la forme ionisée au pH sanguin. Ils ont également un coefficient de partage lipide/eau élevé. Cette liposolubilité leur permet de pénétrer facilement au travers des membranes biologiques et surtout les nerfs [101]. Afin de permettre une bonne solubilité dans l'eau les anesthésiques locaux sont commercialisés sous forme de sels chlorhydrates.

**Tableau 1-2 Propriétés physico-chimiques et pharmacodynamiques des principaux anesthésiques locaux**

<b>Anesthésique Local</b>	<b>Poids Moléculaire</b>	<b>pKa</b>	<b>Pourcentage ionisé au pH sanguin</b>	<b>Coefficient de partage lipide/eau</b>
<b>Bupivacaïne</b>	288	8.1	83	27.5
<b>Lévobupivacaïne</b>	288	8.1	83	27.5
<b>Ropivacaïne</b>	274	8.1	83	6.10
<b>Lidocaïne</b>	234	7.9	76	2.90
<b>Anesthésique Local</b>	<b>Liaison aux protéines (%)</b>	<b>Délai d'action</b>	<b>Durée d'action</b>	<b>Puissance</b>
<b>Bupivacaïne</b>	95	intermédiaire	3-3.5h	4
<b>Lévobupivacaïne</b>	95	intermédiaire	3-3.5h	4
<b>Ropivacaïne</b>	94	intermédiaire	2.5-3h	3.3
<b>Lidocaïne</b>	65	court	1.5-2 h	1

(Adapté de Mazoit et Beloeil 2005)

### 1.6.5 Pharmacocinétique de la ropivacaïne et la bupivacaïne

Les concentrations plasmatiques sont responsables de la toxicité et de l'efficacité des médicaments d'une façon directe ou indirecte. Les anesthésiques locaux utilisés pour des blocs de nerfs périphériques constituent un cas particulier puisque le site d'action est local. Ainsi les concentrations systémiques ne corrèlent pas nécessairement avec l'effet mais plutôt avec la toxicité. La Figure 1-16 représente schématiquement les enjeux pharmacocinétiques des anesthésiques locaux en blocs de nerfs périphériques.

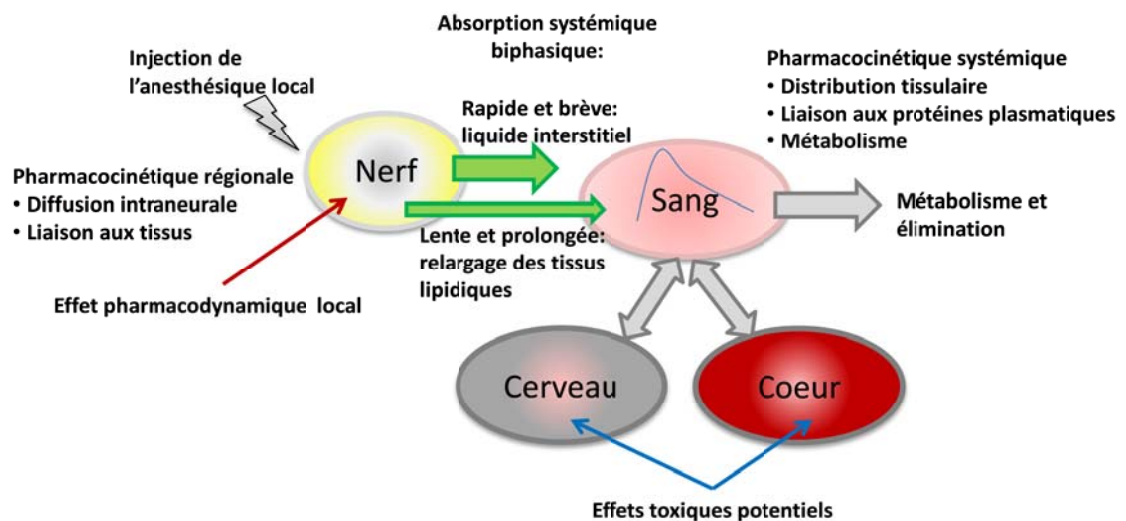


Figure 1-16 Importance de la pharmacocinétique régionale et systémique des anesthésiques locaux

#### 1.6.5.1 Absorption

L'absorption systémique des anesthésiques locaux dépend principalement du site d'administration et des propriétés physico-chimiques de chaque anesthésique local. Une absorption immédiate suite à une injection intraveineuse accidentelle, peut engendrer des concentrations plasmatiques très élevées entraînant une toxicité systémique. La vitesse de l'absorption dépend du degré d'ionisation, la liposolubilité, l'irrigation sanguine locale, la liaison aux protéines plasmatiques et le partage entre le sang et les tissus gras [102]. Au site de l'injection, les anesthésiques locaux se partagent entre un milieu aqueux (ex.

liquide interstitiel) avec absorption rapide et un milieu lipidique (ex. structures enveloppant les nerfs) avec absorption plus lente [103]. Ceci donne généralement une absorption biphasique. Les anesthésiques locaux lipophiles ont une grande affinité pour les structures du nerf et rejoignent moins rapidement la circulation systémique, d'où leur durée d'action prolongée. En principe, la biodisponibilité d'un anesthésique local de type amide injecté à proximité d'un nerf est complète puisque aucun métabolisme local n'est attendu. L'épinéphrine est souvent ajoutée à la solution de l'anesthésique local pour induire une vasoconstriction locale diminuant la diffusion du site d'injection vers le sang. Ceci, diminuera la vitesse de l'absorption et les concentrations plasmatiques maximales atteintes. Par conséquent, le risque de toxicité est plus faible. De plus, l'épinéphrine pourra prolonger la durée d'action, surtout pour les anesthésiques locaux moins lipophiles [104].

Parmi les blocs de nerfs périphériques, l'absorption la plus lente est observée après le bloc sciatique ou fémoral [105]. Avec cette situation, l'absorption systémique devient le facteur limitant qui contrôle l'apparition des concentrations de l'anesthésique local dans la circulation sanguine; ce qui engendre un phénomène appelé « flip-flop » [106, 107]. Dans ce cas, la pente terminale des concentrations plasmatiques est beaucoup plus lente et correspond à plusieurs phénomènes simultanés: relargage lent à partir du nerf, le métabolisme et l'élimination de l'anesthésique local du sang. Si on s'intéresse à mieux comprendre et à isoler l'absorption lente, on peut utiliser la déconvolution, une technique mathématique, qui permet de séparer les phénomènes simultanés. Par exemple, la déconvolution permettra de séparer les vitesses d'absorption rapide et lente en « soustrayant » les concentrations obtenues après administration intraveineuse [108, 109] tel que illustré dans la Figure 1-17.

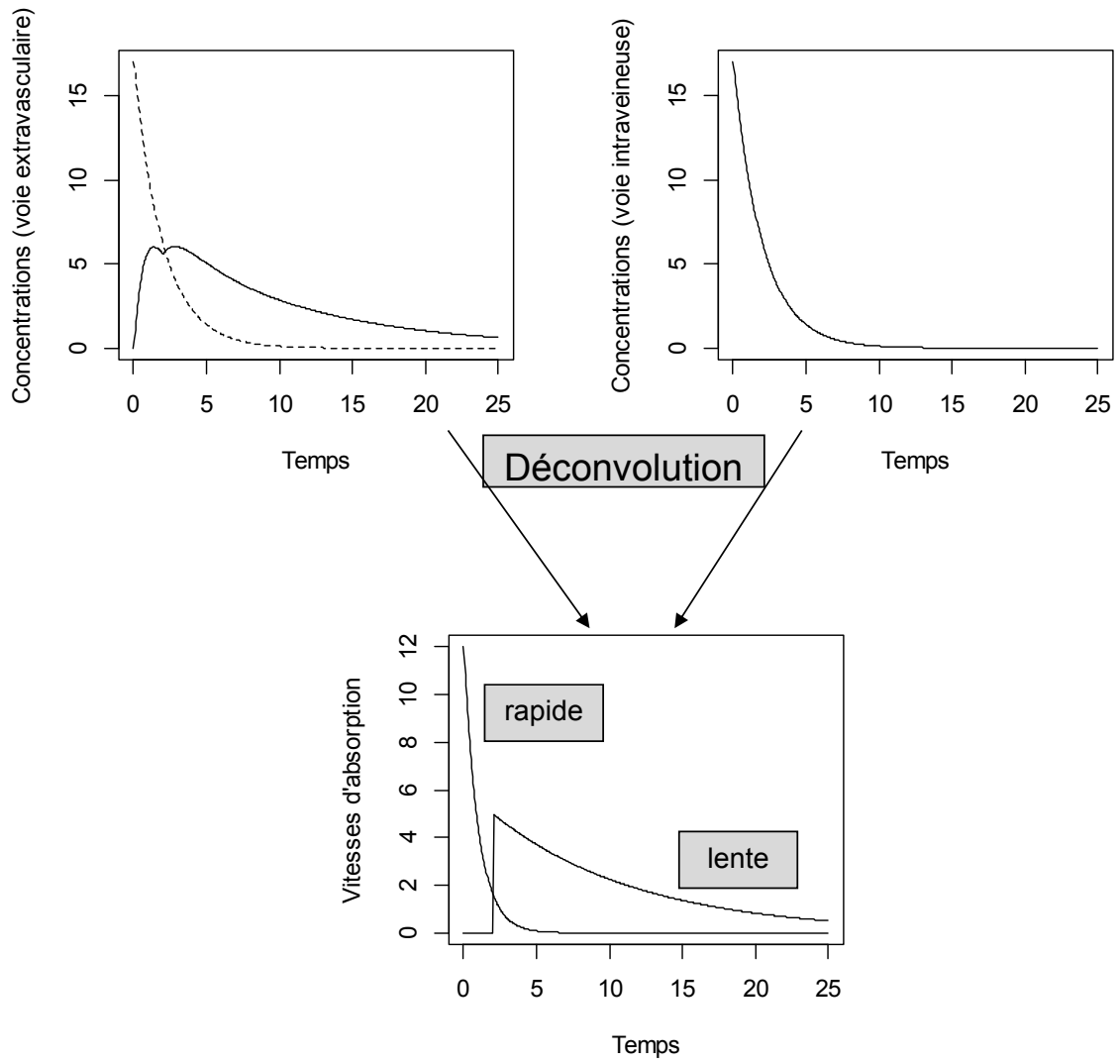


Figure 1-17 Déconvolution des concentrations après administration extravasculaire

### 1.6.5.2 Liaison aux protéines et distribution

Dans la circulation systémique, les anesthésiques locaux se lient aux protéines plasmatiques comme l'albumine mais surtout à la  $\alpha_1$ -glycoprotéine acide (AGA) qui contient un site de liaison spécifique. La toxicité est directement liée à la fraction libre de l'anesthésique local [110, 111].

L'AGA est un site de liaison préférentiel pour toutes les bases faibles comme les anesthésiques locaux de type amide. Par contre, la liaison à l'albumine est non spécifique avec une affinité très inférieure.

L'AGA, également appelée orosomucoïde, est une des protéines inflammatoires impliquées dans la réaction de phase aiguë. La concentration de l'AGA est normalement entre 0.8 et 1 g/L [112] et augmente graduellement chez les patients subissant une intervention chirurgicale pour atteindre un maximum vers 48 h après l'intervention [113]. L'AGA se sature facilement en présence de concentrations élevées de l'anesthésique local. Par exemple, en cas de concentration de ropivacaïne plus grande que 2  $\mu$ g/ml la liaison aux protéines passe de 98 à 90 % [114, 115].

La concentration plasmatique de l'albumine est environ 40 g/L, donc elle est plus abondante que l'AGA et beaucoup moins saturable. Puisque la liaison de l'anesthésique local se fait avec une affinité faible, l'albumine commence à jouer un rôle tampon important lorsque l'AGA est saturée. Les érythrocytes peuvent également jouer un rôle lors de la saturation de l'AGA [116-118].

La ropivacaïne et la bupivacaïne sont fortement liés aux protéines plasmatiques (**Tableau 1-2**) et ont un coefficient d'extraction hépatique faible à moyen (0.3-0.6) [119, 120]. Après une chirurgie, la concentration en AGA augmentent graduellement et peuvent atteindre le double des valeurs initiales dans 48 à 120 h [115, 121]. Une diminution de la fraction libre en résulte et par conséquent, la clairance totale diminue et la concentration totale augmente. La concentration libre reste sensiblement inchangée, en assumant que la clairance intrinsèque est inchangée. Ceci a été observé lors des études cliniques [122, 123].

Il est à noter qu'en cas d'utilisation pédiatrique chez le nourrisson, l'AGA est rapidement saturable à cause de plus faibles concentrations de la protéine durant la première année de vie [124] ce qui nécessitera une attention particulière et un suivi étroit.

Le volume de distribution des anesthésiques locaux à l'état d'équilibre approche 1 L/kg. Le volume de distribution dépend du coefficient de partage et du degré de liaison aux protéines plasmatiques et tissulaires. Le volume de distribution de la ropivacaïne est plus petit que celui de la bupivacaïne après administration intraveineuse, 0.50 L/kg [125] et 0.85 L/kg [126], respectivement.

### 1.6.5.3 Métabolisme et élimination

Pour la ropivacaïne, le cytochrome 1A2 (CYP1A2) est responsable de la formation des métabolites majoritaires : 3'-OH- et 4'-OH-ropivacaïne [127] et le cytochrome 3A4 (CYP3A4) de la formation du métabolite 2',6'-pipecoloxylidide (PPX) [128]. Plusieurs études ont décrit des interactions métaboliques impliquant le CYP3A4, le CYP1A2 ainsi que l'impact du tabac [119, 129-131]. Dans ce cas, le ratio métabolique entre la 3'-OH-ropivacaïne et le PPX peut changer mais sans affecter les concentrations plasmatiques du parent (ropivacaïne). L'impact clinique reste minimal.

Pour la bupivacaïne, le CYP3A4 est impliqué par la formation du principal métabolite 2',6'-pipecoloxylidide [132]. Les clairances systémiques de la ropivacaïne et de la bupivacaïne après administration intraveineuse sont comparables et de l'ordre de 100 ml/min/kg [125, 126]. L'estimation de la clairance reste robuste, indépendamment du « flip-flop », si l'aire sous la courbe est bien caractérisée.

### 1.6.5.4 Pharmacocinétique clinique

La pharmacocinétique de la ropivacaïne et la bupivacaïne est linéaire et peut être décrite par un modèle à deux compartiments après administration intraveineuse [133, 134].

La pharmacocinétique des deux anesthésiques locaux a été étudiée extensivement après administration épidurale [135, 136]. Burm *et al.* [137] ont montré que l'absorption

après administration épidurale est biphasique. Ceci était possible de démontrer en administrant simultanément une petite dose intraveineuse radioactive et en appliquant la déconvolution. Cependant, beaucoup de questions restent sans réponses après les blocs de nerfs périphériques. Le problème réside dans l'échantillonnage des concentrations plasmatiques qui est effectué seulement pendant les premières heures après l'injection. Ceci permet de déterminer les concentrations maximales atteintes et les risques associés mais ne permet pas d'apprécier l'évolution des concentrations au cours de toute la durée de l'action du médicament. La plupart des études pharmacocinétiques étudiant les concentrations des anesthésiques locaux après blocs de nerfs périphériques avaient un échantillonnage allant jusqu'à 2 heures après le bloc [138-143], à l'exception d'une étude récente avec un bloc paravertébrale qui avait échantillonné jusqu'à 4 h [144]. L'absorption lente et le flip-flop (défini dans la section **1.6.5.1**) peuvent expliquer l'apparition d'un état de pseudo-équilibre des concentrations, souvent rapporté après un bloc sciatique et/ou fémoral [139, 141]. Le Tableau 1-3 résume les données pharmacocinétiques après administration intraveineuse de la ropivacaïne et la bupivacaïne. En général, la ropivacaïne a une demi-vie plus courte que celle de la bupivacaïne, 1.6-1.95 h contre 2.6-3.5 h, respectivement. De même, le volume de distribution de la ropivacaïne est plus petit que celui de la bupivacaïne, 38-49 L contre 54-84 L, respectivement.

Le Tableau 1-4 résume les données pharmacocinétiques obtenues après blocs de nerfs périphériques du membre inférieur. Ces études ont utilisé plusieurs volumes d'injection (ex. 15 à 30 mL pour un bloc du nerf sciatique) et ont testé l'effet de l'épinéphrine et du pH sur les concentrations maximales atteintes. Cependant, les informations pharmacocinétiques restent très limitées à cause de l'échantillonnage insuffisant.

L'objectif du premier article de recherche de cette thèse est de mieux comprendre la pharmacocinétique de la ropivacaïne et la bupivacaïne en testant un échantillonnage allant jusqu'à 32 h après l'administration. Le deuxième article de recherche étudiera la pharmacocinétique de la ropivacaïne chez le lapin et sa liaison aux protéines plasmatiques.



**Tableau 1-3 Pharmacocinétique clinique de la ropivacaïne et la bupivacaïne après administration intraveineuse**

<b>Étude</b>	Halldin <i>et al.</i> 1996 [145]	Lee <i>et al.</i> 1989 [134]	Emanuelsson <i>et al.</i> 1997 [146]	Emanuelsson <i>et al.</i> 1997 [147]	Tucker <i>et al.</i> 1975 [148]	Burm <i>et al.</i> 1994 [133]*		Burm <i>et al.</i> 1987 [137]
<b>AL</b>	ROP	ROP	ROP	ROP	BUP	R BUP	S BUP	*BUP
<b>Sujets (n)</b>	6	6	9	9	3	10		12
<b>Population</b>	sains	sains	sains	sains	sains	sains		patients
<b>Dose mg</b>	50	50	20/40/80	40	75	30		14
<b>Infusion (min)</b>	15	15	30/30/30	30	10	10		-
<b>f<sub>libre</sub> (%)</b>	-	6	4.8/5.1/5.5	-	7	6.6	4.5	-
<b>t<sub>1/2α</sub> (h)</b>	-	0.2	-/-/-	-	-	-	-	0.36
<b>t<sub>1/2β</sub> (h)</b>	1.95	1.83	1.6/1.6/1.8	1.7	2.7	3.5	2.6	2.38
<b>V<sub>ss</sub> (L)</b>	49	42	38/39/41	43	73	84	54	68

Étude	Halldin <i>et al.</i> 1996 [145]	Lee <i>et al.</i> 1989 [134]	Emanuelsson <i>et al.</i> 1997 [146]	Emanuelsson <i>et al.</i> 1997 [147]	Tucker <i>et al.</i> 1975 [148]	Burm <i>et al.</i> 1994 [133]*	Burm <i>et al.</i> 1987 [137]
CL (L/h)	21.9	30	24/24/23	18.8	34.8	23.7 19.0	31.2
C <sub>max</sub> (mg/L)	1	1.5	0.6/1.0/1.9	-	-	- -	-

AL : anesthésique local, BUP : bupivacaïne, \*BUP : bupivacaïne marquée au deutérium, CL : clairance, C<sub>max</sub>= concentrations maximales observées, f<sub>libre</sub> : fraction libre, ROP : ropivacaïne, t<sub>1/2α</sub> : demi-vie de distribution, t<sub>1/2β</sub> : demi-vie d'élimination, V<sub>ss</sub> : volume de distribution à l'équilibre.

\* Administration de la bupivacaïne en mélange racémique, l'analyse a été faite sur les énantiomères R et S séparément.

**Tableau 1-4 Pharmacocinétique clinique de la ropivacaïne et la bupivacaïne après différents types de blocs de nerfs du membre inférieur**

<b>Étude</b>	Moore <i>et al.</i> 1976 [143]	Robison <i>et al.</i> 1991 [142]	Coventry <i>et al.</i> 1989 [139]	Misra <i>et al.</i> 1991 [140]	Connolly <i>et al.</i> 2001 [138]	Snoeck <i>et al.</i> 2003 [141]	Vanterpool <i>et al.</i> 2006 [149]
<b>Sujets (n)</b>	10	22 (11 x 2)	24 (12 x 2)	22 (11 x 2)	24 (12 x 2)	10 (âgés)	20 (10 x 2)
<b>Type de chirurgie</b>	Variées du membre inférieur	Arthroplastie du genou	Chirurgie du pied	Arthroplastie du genou	Ostéotomie métatarsale	Fracture du fémur	Variées du membre inférieur
<b>Type de bloc et volume injecté</b>	BCFS: FEM 50 ml SCI 30 ml	BCFS: FEM 30 ml SCI 15 ml	SCI 2 mg/kg	BCFS: FEM 1.8 mg/kg SCI 1.2 mg/kg	SCI 20 ml	FEM 2 mg/kg	Plexus Lombaire 35 ml SCI 25 ml (si effectué)
<b>Anesthésique local</b>	BUP 0.5%	BUP 0.375% (avec ou sans EPI)	BUP 0.5% (pH=3.9 ou 6.4)	BUP 0.5% (avec ou sans EPI)	ROP 0.75% BUP 0.5%	BUP 0.375%	ROP 0.5%

<b>Étude</b>	Moore <i>et al.</i> 1976 [143]	Robison <i>et al.</i> 1991 [142]	Coventry <i>et al.</i> 1989 [139]	Misra <i>et al.</i> 1991 [140]	Connolly <i>et al.</i> 2001 [138]	Snoeck <i>et al.</i> 2003 [141]	Vanterpool <i>et al.</i> 2006 [149]
<b>Échantillon</b>	Veineux et artériel	Veineux	Veineux	Veineux	Veineux	Artériel	Veineux
<b>Dernière mesure (min)</b>	120	120	90	120	120	360	240
<b>C<sub>max</sub> (µg/mL)</b>	Veineuse 1.6 Artérielle 1.9	EPI 0.98 Sans EPI 1.66	< 4	EPI 0.78 Sans EPI 0.7	ROP 1.1 BUP 0.6	0.74	Lombaire 0.98 Combiné 1.56
<b>T<sub>max</sub> (min)</b>	15 -60	EPI 30 Sans EPI 90	-	EPI 60 Sans EPI 63	ROP 46 BUP 35	99.2 ± 127	Lombaire 80 Combiné 38
BCFS : bloc combiné des nerfs fémoral et sciatique, BUP : bupivacaïne, C <sub>max</sub> : concentrations maximales observées, EPI : épinéphrine, FEM : bloc du nerf fémoral, ROP : ropivacaïne, SCI : bloc du nerf sciatique, T <sub>max</sub> : temps associé à la concentration maximale.							

## 1.7 La néostigmine

La néostigmine est une molécule parasymphomimétique qui potentialise l'effet de l'acétylcholine en empêchant sa dégradation par l'acétylcholinestérase. Elle a été introduite en 1931 pour son faction stimulante du système gastro-intestinal. Plus tard, son effet favorable sur l'amélioration des symptômes de la myasthénie grave a été découvert durant les années 1950 [150]. Elle est disponible sur le marché sous forme orale (néostigmine, bromure) et forme parentérale (néostigmine, méthylsulfate). La néostigmine parentérale est actuellement indiquée pour le diagnostic et le traitement de la myasthénie grave, le traitement de la rétention urinaire post-opératoire non-obstructive, ainsi que pour renverser les effets des bloqueurs neuromusculaires non-dépolarisants.

### 1.7.1 Structure chimique et propriétés physico-chimiques

La néostigmine a une structure phénolique estérifiée à un groupement carbamoyl. La structure est similaire à celle de l'acétylcholine ce qui lui permet d'être la cible de l'acétylcholine estérase (Figure 1-18). La néostigmine est très hydrosoluble puisqu'elle possède un ammonium quaternaire au pH physiologique.

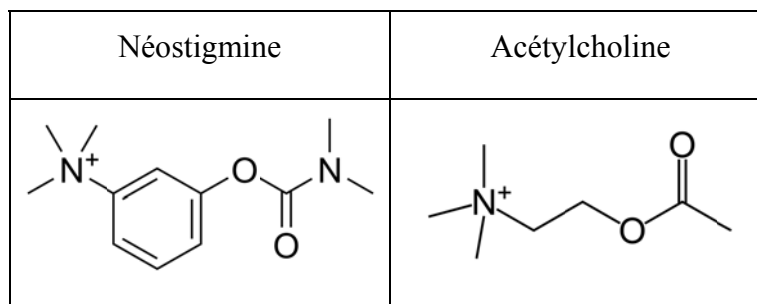


Figure 1-18 Structures chimiques de la néostigmine et de l'acétylcholine

### 1.7.2 Mécanisme d'action

L'acétylcholinestérase hydrolyse la néostigmine plus lentement que l'acétylcholine. Suite à l'hydrolyse, l'acétylcholinestérase devient carbamoylée, plus stable et avec une demi-vie de régénération de 15 à 30 min. Ainsi, après administration systémique de la

néostigmine, la durée d'inhibition de l'acétylcholinestérase peut atteindre 3 à 4 heures [151]. L'acétylcholinestérase ne sera plus disponible pour la dégradation de l'acétylcholine et prolongera l'action de cette dernière sur les récepteurs cholinergiques. La néostigmine présente des effets analgésiques importants suite aux effets de l'acétylcholine au niveau de la corne dorsale [152, 153] par l'intermédiaire de récepteurs muscariniques M1 et M3 [154] ainsi que des récepteurs nicotiniques [155].

### **1.7.3 Pharmacocinétique**

Après administration orale, la néostigmine présente une biodisponibilité limitée de 1-2% à cause de son ammonium quaternaire. Ceci explique pourquoi, pour le traitement de la myasthénie grave, des doses allant de 15 à 30 mg sont nécessaires par voie orale tandis que 0.5 à 2 mg suffiront par voie parentérale [156]. Une fois dans la circulation systémique, la néostigmine est rapidement hydrolysée par les estérases plasmatiques ce qui résulte en une demi-vie de 0.89 h [157]. Une étude pharmacocinétique de la néostigmine administrée par voie intrathécale [158] a révélé que le temps de demi-vie terminale dans le liquide céphalo-rachidien était beaucoup plus long et avait une moyenne de 28 h chez la population étudiée. Il n'existe aucune information dans la littérature sur la pharmacocinétique de la néostigmine après administration épidurale.

### **1.7.4 Absorption à partir des voies intrathécale et épidurale**

La néostigmine intrathécale, injectée directement dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), peut emprunter plusieurs voies: diffusion vers la moelle (site d'action), diffusion vers le sang (absorption systémique) et diffusion dans le LCR (directions caudale et céphalade). Après administration d'un bolus intrathécal et en mesurant les concentrations dans le LCR, on remarque une phase d'absorption qui s'explique par une diffusion du site de dépôt au site d'échantillonnage. Aucune étude n'a caractérisé la diffusion de la néostigmine vers les structures centrales. La néostigmine est hydrophile et ne peut pas pénétrer facilement dans le tissu nerveux; mais puisqu'elle agit indirectement en

augmentant les concentrations de l'acétylcholine dans le LCR, ceci n'est pas requis pour son effet pharmacodynamique.

L'administration épidurale se fait en injectant la néostigmine en antérieur de la dure mère qui protège la moelle épinière (Figure 1-10). Une fois le dépôt formé, l'absorption se fait lentement vers le sang et vers le LCR. En se basant sur l'expérience clinique avec d'autres médicaments, plusieurs facteurs tels que le volume et la vitesse de l'injection, la posture et la vascularisation peuvent influencer la diffusion du volume injecté [159]. À cause de l'accès plus difficile au LCR, la voie épidurale est supposée avoir une biodisponibilité au site d'action moindre que la voie intrathécale ainsi qu'une absorption plus lente vers le LCR.

### **1.7.5 Utilisation de la néostigmine comme adjuvant analgésique post-opératoire**

Les découvertes des effets analgésiques de la néostigmine ont soulevé beaucoup d'intérêt et ont incité les chercheurs à conduire des essais cliniques visant à évaluer l'efficacité de la néostigmine comme adjuvant dans l'analgésie post-opératoire. La combinaison de la néostigmine intrathécale avec les opiacés systémiques s'est montrée additive pour le soulagement de la douleur après une césarienne [160]. De plus, cette combinaison s'est montrée synergique avec les anti-inflammatoires non stéroïdiens chez la souris [161]. La combinaison avec les agonistes  $\alpha$ -2 centraux était synergique pour antagoniser la nociception thermique dans un modèle animal [154] et additive chez des volontaires sains [162]. Plusieurs études précliniques [153, 163] et cliniques [158, 164] ont étudié l'efficacité de la néostigmine pour la douleur post-opératoire. Une revue systématique de la littérature sur l'utilisation de la néostigmine par voie intrathécale comme adjuvant analgésique a démontré que l'effet sur la douleur était marginalement supérieur au placebo mais avec significativement plus d'effets secondaires [165]. La douleur était réduite de -1.4 points (sur une échelle de 0-10) et le temps avant la première utilisation de la thérapie d'urgence était prolongé de 168 min. Le rapport des cotes (odds ratio) était de

5.0 pour la survenue de nausées ou vomissements, 2.7 pour la survenue de la bradycardie et 10.3 pour la survenue de l'anxiété et de l'agitation. Ainsi, la néostigmine intrathécale présente beaucoup d'effets secondaires sans avantage clinique marqué.

Ultérieurement, la néostigmine a été étudiée après administration épidurale pour minimiser les effets secondaires. Cette méthode s'est montrée prometteuse puisqu'elle présentait moins d'effets secondaires [166-168]. Une revue de littérature effectuée en 2006 par Habib et Gan [169] a présenté les différentes études cliniques qui ont testé la néostigmine intrathécale ou épidurale comme un adjuvant à un anesthésique local (lidocaïne, bupivacaïne, mépivacaïne) au fentanyl ou à la morphine. Les auteurs ont conclu que la néostigmine épidurale est efficace pour l'analgésie post-opératoire et pour l'analgésie du travail tout en présentant peu d'effets secondaires. Cependant, la dose optimale reste inconnue [169, 170].

Le troisième article de recherche de cette thèse explore la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de la néostigmine après administration épidurale de trois doses différentes afin d'essayer de déterminer une dose optimale.



## 1.8 Pharmacométrie: modélisation pharmacocinétique et pharmacodynamique

### 1.8.1 Développement du médicament

Le développement d'un médicament est un processus minutieux, long et très coûteux [171, 172]. En moyenne, quinze ans et plus d'un milliard de dollars sont nécessaires pour mettre un médicament sur le marché. De plus, la baisse accrue de productivité de l'industrie pharmaceutique et le nombre des médicaments approuvés qui ne cesse de baisser, ont amené la FDA à une initiative qui vise à améliorer et optimiser le processus du développement du médicament [173]. Au cœur de cette initiative est l'optimisation des outils scientifiques y compris la modélisation par ordinateurs. De nombreuses études (*in vitro*, précliniques et cliniques) sont requises pour transformer un médicament d'une molécule ayant un intérêt thérapeutique à un médicament efficace commercialisable.

Les études commencent par l'identification d'une cible, synthèse et sélection de molécules prometteuses à l'aide de tests *in vitro* et *in silico* (ex. modélisation structure activité 3D). Les molécules ayant les propriétés physicochimiques et pharmacologiques favorables sont ensuite testées *in vivo* chez les animaux. La phase d'études précliniques vise à étudier la pharmacocinétique, la toxicité ainsi que l'effet chez un modèle animal approprié afin de sélectionner les molécules prometteuses.

Les essais cliniques testent la molécule chez l'homme une fois que les essais précliniques ont démontré une certaine efficacité sans toxicités alarmantes. Les essais cliniques se déroulent en quatre principales phases. Les études de phase I sont réalisées chez des volontaires sains (si possible de point de vue éthique), elles sont bien contrôlées et impliquent un nombre limité d'individus. Elles visent à s'assurer que le médicament a des effets secondaires similaires à ceux observés chez l'animal. Les essais cliniques de phase II ont pour objectif d'identifier les courbes exposition/réponse et exposition/toxicité afin de déterminer la dose optimale du médicament chez une population assez homogène de

patients. Les essais cliniques de phase III impliquent, selon les indications, plusieurs milliers de patients qui représentent la population cible chez qui une indication thérapeutique précise est souhaitée afin d'obtenir une autorisation de mise en marché. Si un traitement existe déjà sur le marché, les essais sont de nature comparative au médicament de référence sinon, à un placebo. Ces essais visent à confirmer l'efficacité thérapeutique du médicament et à prouver un rapport bénéfice/risque favorable du point de vue clinique.

Des résultats favorables en phase III sont nécessaires afin de pouvoir compléter le dossier de l'autorisation de mise sur le marché qui est soumis aux autorités de santé comme l'« European Medicines Agency » (EMA) en Europe, la « Food and Drug Administration » (FDA) aux Etats-Unis et Santé Canada au Canada. Le dossier doit inclure toutes les informations nécessaires, provenant des essais précliniques et cliniques qui prouvent l'innocuité et l'efficacité du médicament.

Après la mise sur le marché du médicament, une phase de pharmacovigilance (phase IV) vise à détecter les effets indésirables très rares qui ne se manifestent qu'après exposition au médicament de plusieurs dizaines de milliers de patients. Dans certains cas, les acceptations de mise sur le marché sont conditionnelles à la conduction d'études additionnelles de phase IV afin de mieux comprendre l'utilité de l'utilisation des médicaments chez des populations spéciales.

On estime que sur 5000 à 10 000 molécules identifiées, 250 sont retenues pour les essais précliniques, cinq pour les essais cliniques, et une seule deviendra un médicament. En 2011, la FDA a approuvé 35 nouveaux médicaments ce qui a donné espoir après une moyenne de 22.9 nouvelles molécules mises sur le marché entre 2001 et 2010 [174].

Cette thèse touche à plusieurs types d'études exploratoires qui, en utilisant les techniques de modélisation pharmacocinétique et pharmacodynamique, aideront à mieux comprendre la pharmacocinétique de la ropivacaïne (modèle animal, phase préclinique) la bupivacaïne (étude clinique pharmacocinétique) et la néostigmine (étude de courbe exposition/réponse).

### **1.8.2 Modélisation pharmacocinétique et pharmacodynamique (PK/PD)**

La modélisation, en général, consiste à utiliser des modèles mathématiques et statistiques afin de décrire et quantifier les données observées.

La modélisation se base sur les phénomènes physiologiques et essaie de trouver le nombre minimal de paramètres qui peuvent décrire adéquatement les données observées. Un principe fondamental est la parcimonie: le modèle doit être le plus simple possible (nombre minimum de paramètres) tout en répondant aux objectifs de la modélisation.

Appliquée à la PK, la modélisation sert à décrire les principales étapes par des paramètres et rend possible la simulation de nouvelles conditions à partir du modèle: changement de la dose et fréquence d'administration, changement de l'absorption, de l'élimination et même l'impact d'une maladie ou d'une interaction médicamenteuse sur la pharmacocinétique. La modélisation permet aussi de prédire la pharmacocinétique au même temps que la pharmacodynamie.

Appliquée à la PD, la modélisation sert à décrire le lien entre la PK et la PD. L'analyse PK/PD permet de déterminer les concentrations efficaces ainsi que d'établir des schémas posologiques qui préservent l'efficacité du médicament. La modélisation PK/PD peut également prédire les concentrations au site d'action.

Dans les pages suivantes, je vais présenter les principales techniques de modélisation qui ont été utilisées dans mes articles de recherche, notamment les modèles de pharmacocinétique de population.

### **1.8.3 La modélisation pharmacocinétique de population**

Classiquement, la modélisation pharmacocinétique peut être divisée en deux approches principales : non-compartmentale et compartmentale [175-177]. Les méthodes non-compartmentales sont basées sur des modèles mais avec moins des présuppositions [178]. Elles sont de natures descriptives, analysent chaque sujet à part, et n'offrent aucune possibilité de simulation. Dans cette thèse, l'intérêt est centré principalement sur les

méthodes compartimentales de population. Les modèles compartimentaux ont été utilisés depuis les années 60 [179], et les modèles de population apparurent un peu plus tard avec Lewis Sheiner dans les années 70 [180, 181].

Les méthodes de population offrent plusieurs avantages par rapport aux méthodes classiques individuelles (non-compartimentale ou compartimentale). Elles sont statistiquement valides pour analyser simultanément des données hétérogènes, provenant de volontaires sains ou de patients, qu'elles soient riches ou ponctuelles. L'approche de population permet d'intégrer l'information en un seul modèle capable de quantifier les variabilités observées et d'en expliquer les sources potentielles. L'analyse individuelle (non-compartimentale ou compartimentale) requiert la collecte rigoureuse de données très riches afin de pouvoir calculer les paramètres pharmacocinétiques importants : Clairance, ASC,  $C_{\max}$ ,  $t_{\max}$  et  $t_{1/2}$ . Ceci n'est souvent pas possible chez des patients, d'où l'utilité de l'analyse de population qui peut simultanément analyser ces données limitées avec les données riches disponibles à partir des études de Phase I ou II.

Un avantage très intéressant de l'analyse de population réside dans la possibilité de simuler des scénarios différents de fréquence d'administration chez la population cible tout en tenant compte des sources de variabilité; ce qui aidera à optimiser la pharmacocinétique et/ou la pharmacodynamie *in silico* par simulation avant de confirmer les résultats par une étude clinique.

L'approche populationnelle a été utilisée pour les analyses des différentes études faisant partie de cette thèse afin de pouvoir étudier et quantifier les sources de variabilité, tout en gardant la possibilité de formuler des hypothèses par simulation. Dans les sections suivantes, je vais présenter les différentes étapes d'une analyse typique de pharmacocinétique de population.

La première étape de la pharmacocinétique de population est d'établir le modèle structural compartimental qui essaie de réduire l'organisme en plusieurs compartiments virtuels correspondant à une ou plusieurs entités anatomiques ou tissus. Ces compartiments sont liés par des constantes de vitesse de transferts. Le compartiment ayant une voie

d'élimination a une constante qui lie le système à l'extérieur. Dans chaque compartiment on suppose que le médicament se distribue de manière homogène dans le volume de distribution de chacun de ces compartiments [182]. La deuxième étape est l'aspect de population qui vise à quantifier, à décrire, et à expliquer la variabilité observée dans la population étudiée. Les systèmes biologiques présentent toujours des variabilités qui peuvent être physiologiques, intrinsèques ou liées à des facteurs spécifiques connus. Par exemple, le volume de distribution peut être directement lié au poids du sujet. Cependant, le poids n'explique qu'une partie de la variabilité entre les sujets. Deux sujets ayant un poids égal peuvent présenter des volumes de distribution différents. Dans les paragraphes qui suivent, je vais élaborer sur les différentes étapes d'une analyse pharmacocinétique de population en mettant l'emphase sur les modèles et les méthodes utilisés dans les articles de recherche.

### **1.8.3.1 Modèle compartimental structural**

Le modèle compartimental structural essaie de trouver le nombre de compartiments nécessaires pour décrire adéquatement les données observées. Normalement, il s'agit d'un, de deux ou de trois compartiments. Les modèles plus complexes sont rares. Les transferts entre les compartiments peuvent être écrits en utilisant des équations différentielles. Les systèmes d'équations différentielles sont souvent simples et une solution intégrée décrivant les concentrations au cours du temps peut être obtenue. La Figure 1-19 présente le modèle PK d'un médicament administré par voie orale. On commence par regarder les données en coordonnées cartésiennes et semi-logarithmiques. On distingue une partie ascendante liée à l'absorption et une partie mono-exponentielle terminale. On conclue que les données peuvent être modélisées avec un modèle à un compartiment central et un compartiment qui sert comme dépôt à partir duquel le médicament est absorbé. Les équations différentielles ainsi que la solution intégrée sont également présentées. Le modèle inclut les paramètres suivants :  $K_a$  (constante d'absorption d'ordre 1),  $K_{10}$  (constante d'élimination d'ordre 1) et le volume de distribution ( $V_1$ ). Un paramètre important qui désigne la capacité de l'organisme à éliminer le médicament est la clairance ( $CL$ ) qui est le produit du  $V_1$  et  $K_{10}$ .

Puisque le médicament est donné par voie orale, la biodisponibilité (F) peut ne pas être complète. En absence de données intraveineuses les paramètres estimés seront dits apparents et sont notés :  $V1/F$  et  $CL/F$ .

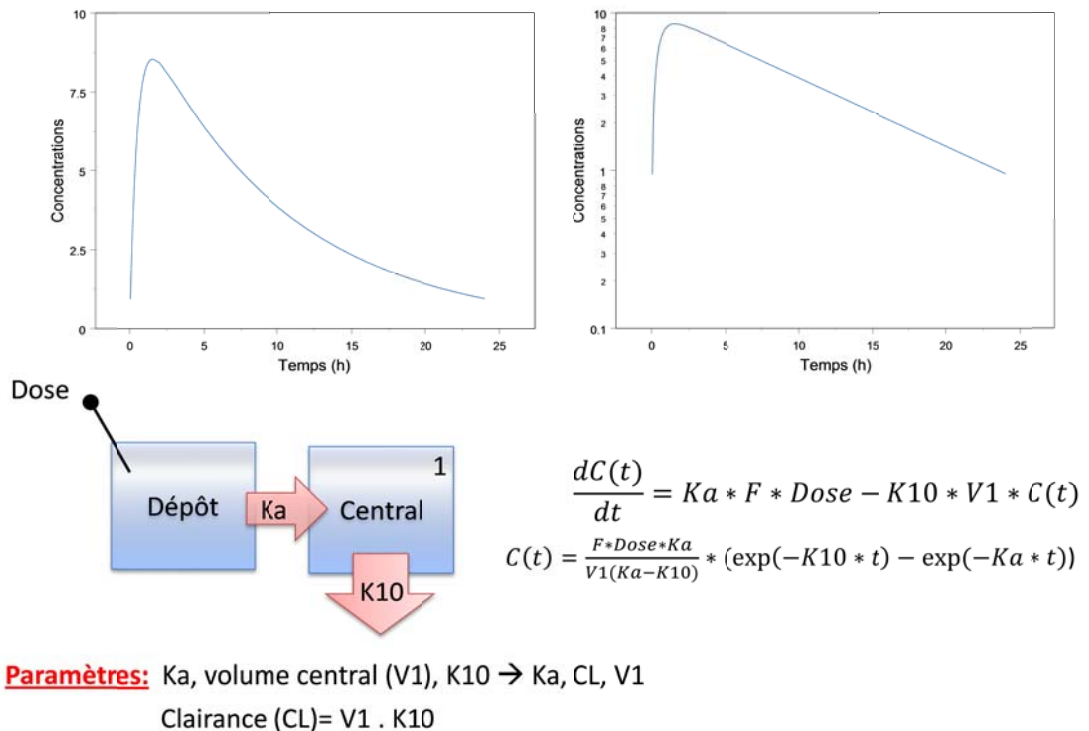


Figure 1-19 Modèle pharmacocinétique d'un médicament donné par voie orale

Un autre exemple de modèle structural est le modèle à deux compartiments. Quand on administre un médicament par voie intraveineuse et qu'on distingue un déclin bi-exponentiel (deux pentes appelées alpha et beta en coordonnées semi-log), on en déduit que le médicament ne se distribue pas d'une façon homogène dans tout l'organisme. L'utilisation d'un deuxième compartiment permet alors de représenter la partie qui se distribue vers les tissus. La Figure 1-20 présente le modèle pharmacocinétique à deux compartiments. Quatre paramètres sont suffisants pour caractériser ce modèle. Il peut s'agir de micro-constantes ( $K_{10}$ ,  $K_{12}$  et  $K_{21}$ ) et le volume central de distribution ( $V_1$ ), servant à

écrire les équations différentielles, ou de macro-constantes (A, B,  $\alpha$  et  $\beta$ ) qui permettent d'écrire une équation intégrée simple du modèle et de calculer les temps de demi-vie de distribution ( $t_{1/2\alpha}$ ) et d'élimination ( $t_{1/2\beta}$ ). Également les paramètres peuvent être représentés par des clairances et des volumes (CL, V1, V2, et Q) à connotations physiologiques et qui seront plus facilement corrélés à des facteurs internes, externes ou physiologiques pouvant expliquer la variabilité.

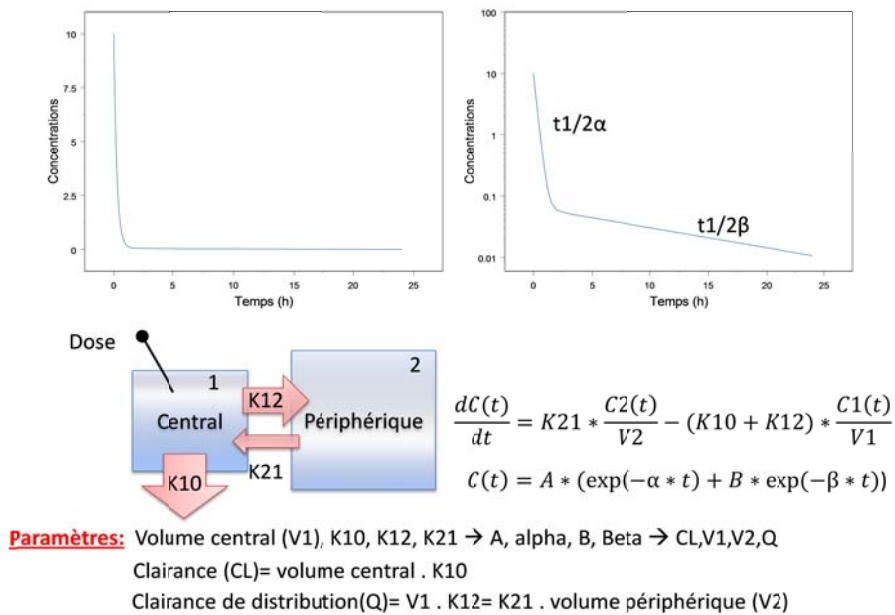


Figure 1-20 Modèle pharmacocinétique à deux compartiments après administration intraveineuse

### 1.8.3.2 Modèle des paramètres pharmacocinétiques

La pharmacocinétique de population essaie de modéliser non seulement la valeur moyenne typique du paramètre pharmacocinétique mais également sa variabilité dans la population. Ceci se fait en assumant une distribution statistique du paramètre avec une moyenne ou médiane et une variance associée à la distribution. La Figure 1-21 illustre la variabilité interindividuelle en simulant des données à partir d'un modèle à un compartiment et avec absorption d'ordre premier. En regardant l'ensemble de la population, on réalise tout de suite l'existence d'une variabilité importante dans la phase d'élimination. Le graphique de

la distribution de la constante d'élimination  $K_{10}$  montre une distribution qui est asymétrique par la droite. Les paramètres pharmacocinétique ne peuvent pas être négatifs et l'asymétrie par la droite peut être modélisée en utilisant une distribution log-normale. Ainsi, l'équation d'un paramètre pharmacocinétique est souvent écrite de cette façon :

$$\text{Paramètre} = \text{Valeur Typique de la Population} * \exp(\eta)$$

Où  $\eta$  est une variable aléatoire qui suit une loi normale avec une moyenne de zéro et une variance  $\Omega^2$ ,  $N(0, \Omega^2)$ . Une implication importante de cette équation est que la racine carrée de la variance est égale à  $\Omega$  et représente un coefficient de variation apparent exprimé en pourcentage qui est facile à interpréter. Par exemple, un paramètre pharmacocinétique de population ayant une  $\Omega^2$  estimée à 0.16 aura une variabilité de 0.4 ou 40 %.

En réalité la variabilité n'est pas totalement aléatoire et elle est due en partie à des caractéristiques physiologiques intrinsèques ou extrinsèques propres à chaque individu. La Figure 1-21 montre que la variabilité du  $K_{10}$  est expliquée, en partie, par l'existence de deux sous-populations de métaboliseurs lents (courbes bleues) et de métaboliseurs rapides (courbes vertes). Quand on réussit à détecter des covariables expliquant les variations interindividuelles, la variabilité aléatoire devient moins grande (ex. elle passe de 30 % à 15 %) et alors on pourra mieux cibler les concentrations plasmatiques en proposant des doses spécifiques à chaque sous population d'intérêt.



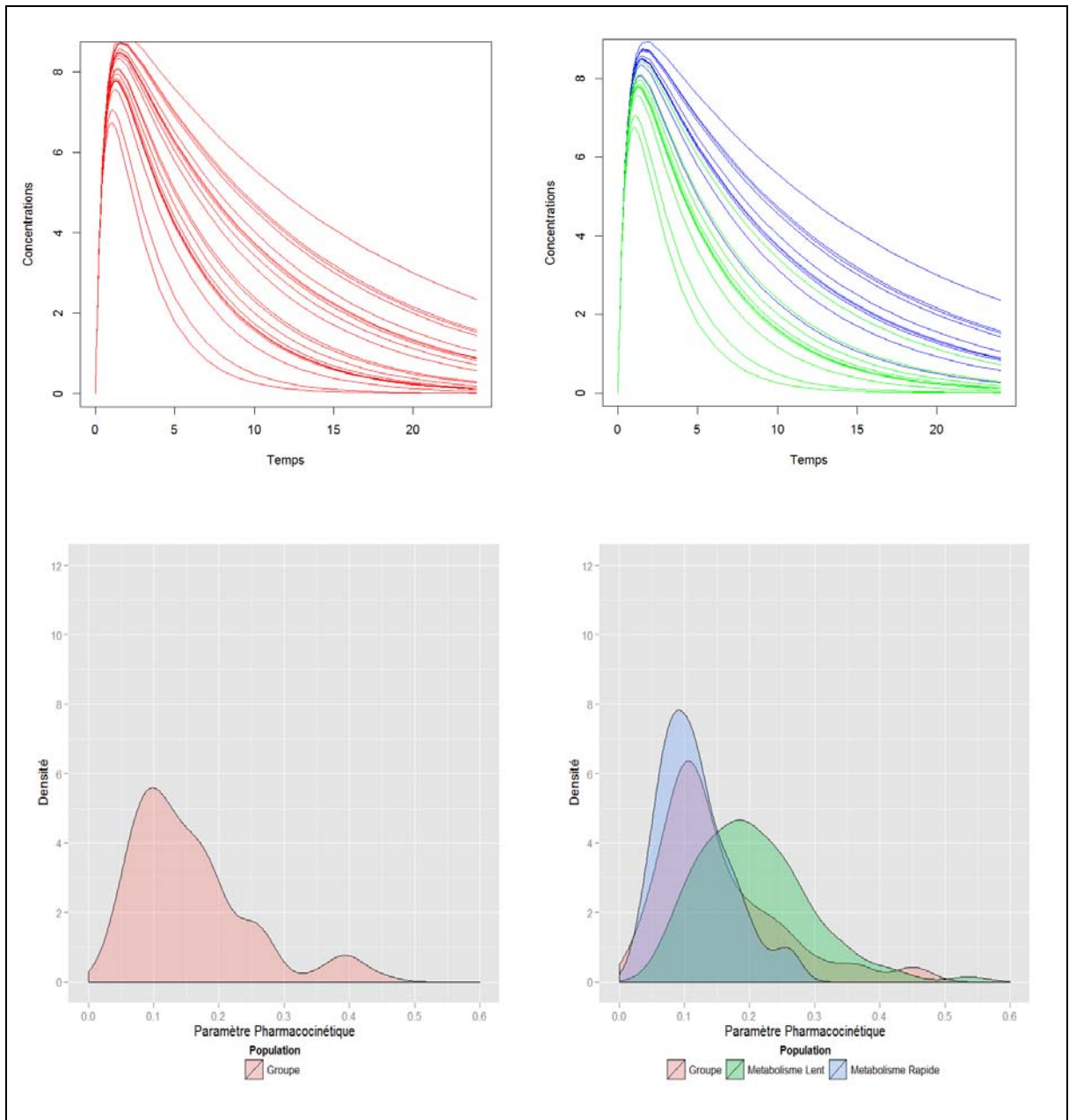


Figure 1-21 Variabilité interindividuelle d'un paramètre pharmacocinétique

### 1.8.3.3 Ajout de covariables

Une fois le modèle structural et les modèles des paramètres choisis, l'étape suivante de la modélisation consiste à détecter les covariables qui expliquent les variabilités interindividuelles. Pour ce faire, on peut utiliser les méthodes statistiques classiques de sélection de variable en régression multiple, mais il faut toujours se fier à l'interprétation physiologique et pharmacologique des covariables détectées. La méthode de sélection la plus couramment utilisée est la méthode d'ajouts par étapes suivie d'élimination de covariables devenues non significatives à cause de corrélations potentielles entre les covariables [183-185]. Normalement, on fixe une valeur de risque alpha à 5 %, pour l'ajout et à 1% pour l'élimination de covariables. Quand le nombre d'individus inclus dans l'analyse est petit, le risque est ajusté à 1% pour l'ajout et 0.1 % pour l'élimination [184] pour éviter l'inclusion de faux positifs. D'autres méthodes de sélection de covariables comportent des techniques statistiques avancées comme le regroupement de variables [186], l'application d'algorithmes génétiques [187] ou le « Lasso » [188]. Plus récemment, l'emphase sur la sélection de covariables qui ont une signification clinique a été soulevée [189]. Dans cette thèse, l'approche classique par étapes sera utilisée tout en regardant la signification clinique de la covariable retenue.

### 1.8.3.4 Modèle d'erreurs résiduelles

La mesure des concentrations du médicament comporte une erreur analytique ainsi que d'autres sources d'erreurs comme le temps du prélèvement de l'échantillon. L'erreur est modélisée en assumant une distribution aléatoire de cette erreur. L'erreur peut être simplement additive, proportionnelle à la concentration prédite, ou mixte:

Concentration au temps (t) = Prédiction du modèle structural +  $\epsilon_1$  (additive)

Concentration au temps (t) = Prédiction du modèle structural \* (1+  $\epsilon_2$ ) (proportionnelle)

Concentration au temps (t) = Prédiction du modèle structural \* (1+ $\epsilon_2$ ) +  $\epsilon_1$  (mixte)

Où  $\epsilon_1$  et  $\epsilon_2$  sont des variables aléatoires qui suivent une loi normale avec une moyenne zéro et une variance  $\Sigma^2$ ,  $N(0, \Sigma^2)$ . De cette équation découlent les propriétés suivantes:

la racine carrée de la variance des  $\varepsilon$  est égale à  $\Sigma$  et représente la déviation standard de l'erreur sur la concentration pour la composante additive, et un coefficient de variation apparent en pourcentage pour la composante proportionnelle. Par exemple, si un modèle pharmacocinétique estime la variance de  $\varepsilon_1$  à 9 et celle de  $\varepsilon_2$  à 0.04 et que la concentration est mesurée en mg/L, ceci signifiera que l'erreur additive est la racine carré de  $9 = 3$  mg/L, tandis que l'erreur proportionnelle est la racine carré de  $0.04 = 0.2 = 20\%$ . Ce concept est illustré dans la Figure 1-22 qui présente un profil pharmacocinétique avec une erreur résiduelle mixte. Quand les concentrations plasmatiques sont petites la variabilité additive domine tandis que la variabilité proportionnelle domine aux grandes concentrations.

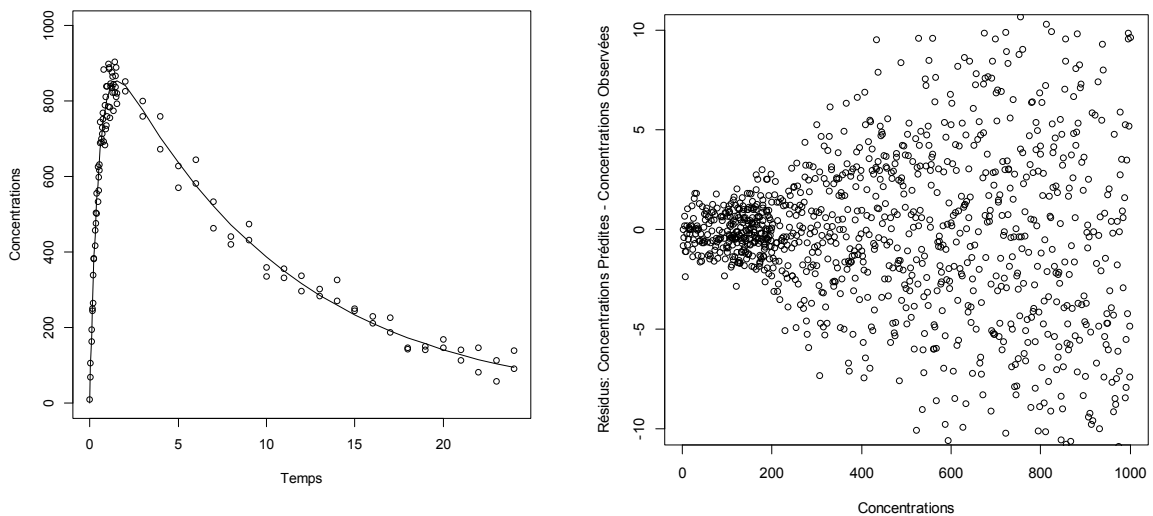


Figure 1-22 Variabilité résiduelle mixte d'un modèle pharmacocinétique

### 1.8.3.5 Sélection et évaluation de modèles

Les modèles de pharmacocinétique de population sont statistiquement des modèles non-linéaires à effet mixtes : effet déterministes et effets aléatoires. La méthode la plus utilisée pour résoudre ces problèmes est la méthode de maximum de vraisemblance.

La vraisemblance de ces modèles est complexe et requiert l'utilisation d'approximations mathématiques comme l'approximation dite de premier ordre introduite par Lewis Sheiner et Stuart Beal [190]. L'évolution des ordinateurs dans les années récentes a permis l'utilisation de méthodes de calculs intensifs, sans approximations, et qui couplent la simulation stochastique avec la maximisation de l'espérance pour déterminer la vraisemblance [191].

La comparaison de différents modèles emboîtés se fait par l'intermédiaire de tests statistiques classiques de rapports de vraisemblance [192]. Afin de comparer deux modèles on regarde la vraisemblance. On favorise le modèle qui a le maximum de vraisemblance. Souvent les logiciels utilisent  $-2 \log$  de vraisemblance ( $-2LL$ ) et le rapport de vraisemblance devient une soustraction sur l'échelle log. On cherche alors le modèle qui a le plus petit  $-2LL$ . Si on compare deux modèles possibles à un modèle de base, on retient celui qui donne la plus grande diminution de  $-2LL$ . La distribution de la différence de  $-2LL$  suit une loi  $\chi^2$  avec un degré de liberté égal au nombre de paramètres ajoutés. Par exemple, si on compare un modèle à un compartiment (deux paramètres) à un modèle à deux compartiments (quatre paramètres) la différence de  $-2LL$  doit être comparée à une  $\chi^2$  à deux degrés de liberté. De plus, quand on ajoute une covariable comme l'effet du sexe sur la clairance, ceci constitue un paramètre de plus, et le degré de signification de la covariable est déterminé en comparant la différence de  $-2LL$  à une  $\chi^2$  à un degré de liberté. Une valeur  $p$  de 5% requiert une diminution de 3.84 points de la différence de  $-2LL$  suivant une loi  $\chi^2$  à un degré de liberté. Dans certaines situations spéciales comme un petit nombre d'individus, les conditions asymptotiques ne sont pas réalisées et le test de rapport de vraisemblance n'est plus valide. On pourrait alors utiliser des tests de permutations ou autres distributions de la différence de  $-2LL$  [193].

Une fois le modèle sélectionné, on évalue sa stabilité, ses performances de simulation et sa capacité à répondre aux objectifs initiaux de modélisation.

Le « bootstrap » est une technique statistique qui permet d'évaluer la stabilité du modèle [194] ainsi que de déterminer la précision et les erreurs standards des paramètres [195]. Elle consiste à ré-échantillonner au hasard, avec remplacement, les individus de la population et à ré-estimer les paramètres. On répète le processus beaucoup de fois (1000 ou plus) afin d'obtenir une distribution des paramètres. Si la médiane de la distribution est consistante avec la valeur estimée initialement, le modèle est dit robuste aux variations aléatoires des données.

Un modèle doit être évalué selon l'objectif pour lequel il a été construit. Un modèle peut servir pour répondre à des questions particulières sur la pharmacocinétique du médicament (ex. Est-ce la clairance diffère selon le génotype?) ou tout simplement pour décrire les données et les paramètres pharmacocinétiques. Il existe des modèles purement descriptifs et d'autres qui ont pour but de simuler des données en modifiant les doses, la fréquence d'administration ou la population cible.

La technique qui permet d'évaluer la capacité du modèle à simuler est la méthode appelée « predictive check » [196]. Elle consiste à simuler aléatoirement à partir du modèle établi et à comparer les simulations aux données observées. Ceci peut se faire sur les concentrations plasmatiques ou sur un paramètre pharmacocinétique particulier. Souvent une représentation graphique qui superpose concentrations observées à celles simulées est utilisée [197]. D'autres méthodes qui normalisent et standardisent les concentrations observées sont aussi possibles [198, 199].

#### **1.8.4 Objectifs et orientation globale de la thèse**

L'analgésie post-opératoire constitue un défi important pour les patients, pour les cliniciens, et pour notre système de santé. Les études cliniques antérieures portant sur l'utilisation et le dosage des anesthésiques locaux et de la néostigmine n'ont pas permis de déterminer avec certitude les doses optimales. Les études des anesthésiques locaux avaient la toxicité et les concentrations maximales atteintes comme intérêt principal tout en négligeant la pharmacocinétique tardive. La néostigmine a été introduite tout d'abord en administration rachidienne et ensuite en administration épidurale pour minimiser les effets secondaires. Son efficacité comme adjuvant est prometteuse, mais, la dose optimale reste à déterminer.

Les techniques de modélisation sont devenues de plus en plus indispensables pendant le développement d'un nouveau médicament. Elles offrent des méthodes robustes, quantitatives et statistiquement valides, pour analyser les données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Dans cette thèse, ces techniques seront utilisées afin de mieux comprendre les données obtenues et pour proposer des améliorations aux futurs devis expérimentaux.

Le premier manuscrit (Manuscrit I) dans cette thèse essaie de caractériser la pharmacocinétique de la ropivacaïne et de la bupivacaïne administrées pour un bloc combiné de nerfs périphériques fémoral et sciatique chez des patients subissant des chirurgies orthopédiques. Cette étude clinique était la première à inclure un échantillonnage plasmatique allant jusqu'à 32 h après le bloc et dévoilera des caractéristiques importantes sur la pharmacocinétique clinique de ces deux médicaments. Le deuxième manuscrit (Manuscrit II) étudiera la pharmacocinétique de la ropivacaïne chez le lapin ainsi que sa liaison aux protéines plasmatiques ce qui est une étape essentielle pour trouver un modèle animal pour les futures études. Le troisième article (Manuscrit III) étudiera la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de la néostigmine après administration épidurale.

## **2 Articles de Recherche**

## **2.1 Manuscrit #1: Pharmacokinetics of Bupivacaine and Ropivacaine up to 32 h after Combined Femoral-Sciatic Nerve block**



### **2.1.1 Introduction du Manuscrit #1**

La première étude exploratoire de la série d'études pharmacocinétiques en analgésie post-opératoire a comme objectif principal de caractériser la pharmacocinétique de la ropivacaïne et de la bupivacaïne après le bloc combiné des nerfs fémoral et sciatique. Ce type de bloc est fréquemment utilisé en chirurgie orthopédique des membres inférieurs mais la pharmacocinétique reste peu connue. Les études cliniques précédentes se sont intéressées principalement à documenter les concentrations maximales atteintes pour éviter la toxicité, tout en négligeant la cinétique de l'élimination. Idéalement les doses utilisées ne devraient pas considérer uniquement la toxicité mais également l'effet recherché et la pharmacodynamie. Établir le lien entre la pharmacocinétique et la pharmacodynamie sera la clé qui va permettre d'optimiser les doses pour ce type de bloc en faisant le compromis entre efficacité et toxicité.

Cette étude est la première à échantillonner le sang jusqu'à 32 h après administration du bloc combiné de nerfs fémoral et sciatique. Bien qu'elle n'ait pas été conçue pour analyser les données en approche populationnelle, il n'en reste pas moins que la modélisation peut aider à caractériser les paramètres pharmacocinétiques et à quantifier la variabilité entre individus ce qui aidera à concevoir de meilleurs devis expérimentaux dans le futur.

## 2.1.2 Page Titre

### **Pharmacokinetics of Bupivacaine and Ropivacaine up to 32 h after a Combined Femoral-Sciatic Nerve block**

M-S. Mouksassi,<sup>1</sup> L. Labbé,<sup>2</sup> P. Beaulieu,<sup>3</sup> and F. Varin,<sup>4</sup>

1. Pharm.D., Faculté de pharmacie, Université de Montréal, Montreal, Canada
2. Ph.D., Faculté de pharmacie, Université de Montréal, Montreal, Canada
3. M.D. PhD., Faculté de médecine, Département de pharmacologie, Université de Montréal, Montreal, Canada
4. Ph.D., Faculté de pharmacie, Université de Montréal, Montreal, Canada

Correspondence to:

Dr France Varin  
Faculté de pharmacie  
Université de Montréal  
C.P.6128, Succursale Centre-ville  
Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7  
Telephone number: 514-343-7016  
FAX number: 514-343-5735  
E-mail address:

### 2.1.3 Abstract

Pharmacokinetic data after combined femoral-sciatic peripheral nerve block beyond 6 hours post-administration are lacking. The objective of this report was to describe the PK of bupivacaine and ropivacaine for up to 32 h in patients undergoing lower extremity orthopedic surgery with a combined block. **Materials and Methods:** Sixteen patients undergoing knee arthroplasty were selected for PK evaluation. Sciatic nerve block (Labatt approach) was performed first by injecting 15 mL of a 0.5% solution of bupivacaine or ropivacaine, and then a classical anterior femoral block was performed with 25 mL. **Results:** For bupivacaine, systemic clearance was 14.5 L/h and the total volume of distribution was 885 L. For ropivacaine, systemic clearance was 7.8 L/h and total volume of distribution was 275 L. Bupivacaine terminal half-life (44 h) was longer than that of ropivacaine (24.5 h). **Discussion:** Although in some patients absorption was completed by 32 h, this was not the case for the majority of patients. **Conclusion:** Plasma concentrations were significant at 32 h post block. Future studies should extend sampling beyond 32 h to capture the slow absorption.

**Key words:** bupivacaine, ropivacaine, local anesthetics, pharmacokinetics

Combined femoral-sciatic peripheral nerve block (CFSB) is a common anesthetic technique for lower extremity orthopedic surgery. Bupivacaine (BUP) is a widely used agent that provides a 14-18 h [1] duration of postoperative analgesia. Ropivacaine (ROP) has a better toxicological profile than BUP [2]. Several studies have compared the pharmacodynamics of ROP and BUP after a femoral and/or sciatic nerve block [1, 3-8] and results indicated a comparable onset when used at the same concentration [4, 7, 8] with a longer duration of motor and sensory block for BUP [8].

Pharmacokinetic (PK) data on BUP and ROP in CFSB block remain scarce. Most PK studies with BUP [3, 9-14] were primarily concerned with its potential toxicity and reported only maximal concentrations ( $C_{max}$ ) and time to maximal concentrations ( $T_{max}$ ). The last sampling time ranged from 90 min to 6 h post injection. Two studies [15, 16] reported plasma concentrations of ROP after a combined sciatic/lumbar plexus (psoas) blocks; however, sampling lasted only till 4 h post injection.

This exploratory study was part of a previously reported pharmacodynamic study[8]. Its objective was to describe the PK of BUP and ROP 0.5 % for up to 32 h time period in patients undergoing CFSB for a lower extremity orthopedic surgery.

### 2.1.4 Materials and Methods

After obtaining approval from the Research Ethic Board Committee of the CHUM Hôtel-Dieu de Montréal and written informed consent from patients, the 16 first patients (8 in each drug group) who accepted to participate in the PK evaluation from a total of 50 patients enrolled in the clinical study, were included. Patients were of American Society of Anesthesiologists (ASA) physical status I to III and scheduled for unilateral total knee arthroplasty necessitating CFSB. Each patient was allocated randomly in a double-blind manner to receive a total of 40 ml of either 0.5 % BUP ( $n = 8$ ) or 0.5 % ROP ( $n = 8$ ). Exclusion criteria included infection at the site of block, neurological injury, chronic opioid use, coagulopathy, and patient refusal.

First, the sciatic nerve block was performed according to the classic Labatt posterior approach using 15 ml of the allocated local anesthetic administered by increments of 5 mL after negative aspiration tests. Then, the femoral nerve block was carried out by incremental injection of the remaining 25 mL of the same local anesthetic drug at 1 cm lateral to the femoral artery at skin-crease level.

Blood samples of 5 mL were collected via a cannula inserted into a peripheral vein contralateral to the site of intravenous administration of anesthetic drugs and fentanyl. Blood samples were drawn, using heparinized tubes, immediately before the injection of the local anesthetic and at 5, 10, 15, 20, 30 min and 1, 1.5, 2, 4, 8, 24 and 32 h after the first block. Blood samples were kept on an ice-water bath and centrifuged at room temperature within 60 minutes. Plasma was separated and stored into polypropylene tubes at  $-70^{\circ}\text{C}$  until analysis.

Plasma samples were analyzed according to the methods of Björk and co-workers [17] and Arvidsson and co-workers [18] with minor modifications. To 1 mL of plasma, tetracaine (1  $\mu\text{g}$ ) was added as internal standard (with 25  $\mu\text{l}$  of echothiophate 0.2% as stabilizer),

followed by 375  $\mu$ l of sodium carbonate 10 %. Then a liquid–liquid extraction with 5 mL of n-hexane:methylene chloride 4:1 was carried out by gentle agitation for 30 min. After centrifugation, the organic layer was transferred into tubes and evaporated to dryness. Residues were reconstituted with 250  $\mu$ l of mobile phase that consisted of sodium sulfate 70 mM in sulphuric acid 1.25 mM 65:35 (v/v). Aliquots of 100  $\mu$ l were injected into an ODS 1 analytical column (Spherisorb 5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm) kept at 40 °C with the pump set at a flow rate of 2 mL/min and coupled to an UV detector set at 210 nm. Peaks were integrated using STAR Varian (version 4.52) software. Calibration curves were comprised between 15.62 and 2000 ng/mL for ROP and between 31.25 and 1000 ng/mL for BUP. For both assays, coefficients of variation (CV) were less than 10 % at all concentrations.

A population approach was used to build a PK model for each drug using the nonlinear mixed effects modelling program NONMEM (version V)[19]. Throughout the model building the first order conditional estimation (FOCE) method with interaction was adopted. Model building was conducted in several steps.

The model was selected by testing the following PK models: one- and two-compartment, first- and zero-order absorption, two parallel absorption processes, and with or without lag time. The one compartment model was parameterized in first order absorption rate constant ( $k_a$ ), apparent central volume of distribution ( $V_1/F$ ) and apparent clearance ( $CL/F$ ). The two compartment model was parameterized in  $k_a$ ,  $V_1/F$ ,  $CL/F$ , apparent inter-compartmental clearance ( $Q/F$ ), and apparent peripheral volume of distribution ( $V_2/F$ ). An exponential variance model was used for the interindividual variability of pharmacokinetic parameters. For the residual error, additive, proportional, and combined (additive and proportional) models were tested. Model selection was based on likelihood ratio tests and on diagnostic goodness of fit plots. likelihood ratio tests were used to assess whether the difference in the objective function value between the base model and the tested more complex model is statistically different or not. NONMEM reported the objective function value is approximately proportional to  $-2 \log$  likelihood and for nested models it follows

asymptotically a Chi-square distribution with  $n$  degrees of freedom;  $n$  equals the difference in the number of parameters between the base and tested models. A  $p$  value of  $\leq 5\%$  was considered significant.

Due to the limited sample size no covariate testing was conducted. The model stability was evaluated by running a nonparametric bootstrap with Perl's `speaks NONMEM` [20] using 2000 random samples with confidence intervals calculated by the bias corrected and acceleration adjustment method [21]. Furthermore, a visual predictive check was performed by simulating from the final model ( $n=2000$  simulations) and by constructing 90 % prediction intervals to verify whether the original data are within the prediction intervals. The statistical program `S-PLUS` [22] was used for graphics and statistical calculations.

### 2.1.5 Results

Table 1 summarizes patient characteristics. In BUP group, there were only men while in ROP group, we had equal number of men and women. Drugs that were CYP1A2 inducer or CYP3A4 inhibitor were omeprazole and atorvastatine, respectively. A total of 75 observations for BUP and 80 observations for ROP constituted the raw data (Figure 1). In general, ROP plasma concentrations were higher than BUP. The median values (minimum - maximum) observed for  $C_{max}$  were 0.48 (0.12-1.1) mg/L and 0.86 (0.44-1.44) mg/L for BUP and ROP, respectively. The median values (minimum - maximum) observed for  $T_{max}$  were 1.02 (0.33-2.00) h and 1.66 (0.25-8.17) h for BUP and ROP, respectively.

Graphics illustrating goodness of fit e.g. observed concentrations vs population and individual predictions, weighed residuals vs population predictions and observed concentration-time data are shown in Figure 2. The parameters of the PK models (population estimates, confidence intervals from the bootstrap) for both drugs are presented in Table 2. The residual variability was small and acceptable in both models.

For BUP, data supported a two compartment model with first-order absorption. The apparent clearance ( $CL/F$ ) and the apparent central volume of distribution ( $V1/F$ ) were 14.5 L/h and 371 L, respectively. The interindividual variabilities expressed as a percentage were 164 % for  $CL/F$  and 99 % for  $V1/F$ . The absorption half-life, computed as  $\text{LOG}(2)/k_a$ , was 10 min while the terminal phase half-life, calculated using standard formulae of a two-compartment model, was 44 h.

For ROP, data supported a one compartment model with first-order absorption. The  $CL/F$  and  $V1/F$  were 7.8 L/h and 275 L, respectively. The interindividual variabilities were 8.2 % for  $CL/F$  and 13.4 % for  $V1/F$ . The absorption half-life, computed as  $\text{LOG}(2)/k_a$ , was 5 min while the terminal phase half-life, computed using standard formulae of a one-compartment model, was 24.5 h.



The bootstrap based confidence intervals are presented in Table 2. Overall the confidence intervals were relatively wide as a result of the small number of subjects participating in this study. The prediction intervals and the original data are shown superimposed in Figure 3. The models simulated data were consistent with the original data for both models. Simulated median C<sub>max</sub> values were 0.44 mg/L and 0.81 mg/L, for BUP and ROP, respectively. The probabilities of having C<sub>max</sub> concentrations > 2 mg/L were 0.05 % and 0.15 % for BUP and ROP, respectively.

### 2.1.6 Discussion

This study describes the pharmacokinetics of BUP and ROP in patients undergoing CFSB. It is the first time, in this type of block, that sustained and substantial plasma levels of both drugs have been shown to stay measurable in most patients 32 hours after administration, thus after the effect has subsided.

BUP and ROP are known to exhibit a two-compartment PK profile after intravenous administration [23, 24]. After peripheral nerve blocks as well as epidural blocks, both drugs' eliminations are known to be limited by a slower absorption, indicating a flip-flop phenomenon [25]. Flip-flop kinetics are observed when the slow absorption phase masks the fast distribution as well as elimination which results in a terminal slope controlled by absorption rather than elimination. Amongst different injection sites used for regional anesthesia, absorption from sciatic and femoral nerves is the slowest [26].

The absorption from sciatic or femoral nerves is complex as it is related to the concentration of the solution, local pH, the presence of epinephrine, local tissue perfusion, as well as the rate of dissociation from both proteins and adipose tissue specific to the site of injection. It is hypothesized that the release rate from the local aqueous and lipoidal structures would result in a biphasic systemic absorption. Burn and co-workers [27] elegantly applied deconvolution to data obtained after IV and epidural administration of BUP in patients and confirmed the biphasic absorption with an initial rapid phase followed by a slower one. Karmakar and co-workers [28] studied the pharmacokinetics of ROP in patients after a paravertebral block and confirmed that the absorption phase was slow. Interestingly, after a 3-in-1 femoral nerve block carried out in elderly patients with a mixture of 2 mg/kg BUP 0.375% and epinephrine 1:400 000, a pseudo steady-state arterial concentration was observed suggesting an absorption rate equal to the elimination rate [13]. In our study, several patients from the two groups presented pseudo steady-state plasma concentrations. Available data did not allow building a more elaborate absorption model (e.g. for each nerve block separately) mostly because the same drug was administered to

both sites and because of the overall small number of samples drawn during the early times as well as the lack of data beyond 32 h. Models to explain two absorption phases (rapid and slow) with two different  $k_a$  or a mixed zero- and first-order absorption did not improve the fit. We further tried to fit the data with a model incorporating a sum of two inverse Gaussian functions for the input function [28] but the models failed to converge probably because of limited data. Of note was the fact that secondary peaks were noted up to 8 hours after administration. This may correspond to patient mobilisation after the surgery. While using the model, we might hypothesize that the estimated  $k_a$  of each drug represents the fast component of absorption with half-lives of 10 and 5 min for BUP and ROP, respectively, the longer  $T_{max}$  values reported for ROP suggest that the reported  $k_a$ 's are hybrid constants describing complex concurrent phenomena.

After a combined lumbar-plexus and sciatic nerve block, earlier reports focused on  $C_{max}$  and  $T_{max}$  values. Only two studies did document plasma concentrations of ROP up to 4 h [15, 16] and one study reported BUP concentrations up to 6 h after a 3-in-1 block [13]. Despite the large interindividual variability, no toxic concentrations were observed in our patients. Total venous concentrations of 2.1 for BUP and 2.2 mg/L for ROP, were reported as maximum tolerated concentrations [29]. In the present study, the observed  $C_{max}$  values for both drugs were at least two fold below these toxic concentrations. In addition, our simulations showed that it is very unlikely that plasma concentrations of either BUP or ROP would rise higher than 2 mg/L, provided injection was properly performed.

For the BUP group, the terminal half-life was 44 h. We hypothesize that this long half-life correspond to a slow absorption phase since it is considerably longer than the absorption half-life of 141 min reported after epidural administration [27]. Previous studies using other routes of administration [26, 30] reported apparent clearances ranging between 18 and 34 L/h which are higher than our  $CL/F$  value (14.5 L/h) suggesting that by the end of the sampling period part of the dose was still at the injection site. We further investigated this finding by conducting non-compartmental analysis and the results were similar ( $16.2 \pm 26.4$

L/h; data not shown). In a previous report based on simulations, estimation of clearance was found to be robust to misspecification of the absorption model [31]; even though our absorption model is a simplified one this is unlikely to cause a bias in clearance. BUP is primarily metabolized by CYP3A4 and to a lesser extent by CYP1A2 [32]. The volume of distribution at steady state ( $V_{ss}/F$ ), calculated as 885 L in our study, is much greater than the  $V_{ss}/F$  of 70 – 90 L reported after IV administration [23, 27]. Since no local metabolism is expected, F should be complete and as such, it is unclear why the model estimated  $V_{ss}/F$  value was higher. In larger studies one can test for covariates that are likely to explain some of the high intersubject variability.

For the ROP group, the estimated terminal half life which we hypothesize to represent a slow absorption phase was 24.5 h. Similar findings to that obtained for BUP clearance were observed:  $CL/F$  of 7.8 L/h is much lower than clearances of 30 and 25 L/h reported after IV administration [24] and brachial plexus block [33], respectively. Noncompartmental analysis gave similar  $CL/F$  results ( $7.4 \pm 2.9$  L/h; data not shown). ROP is metabolized mostly by CYP1A2 and to a lesser extent by CYP3A4 [34]. The volume of distribution of 275 L was in the same range of the  $V_1/F$  of 211 L reported after brachial block [33]. Again, limited PK sampling may have been stopped while some of the dose was still at the site of injection. Larger studies are needed to test for covariates that can explain the intersubject variability.

A different scale was used for the evaluation of the onset and recovery that made the construction of a full PK-PD model not feasible in the current study. In our previous pharmacodynamic report [8], faster sensory and motor recoveries were observed in the ROP group and could be explained by a faster release of ROP from the nerve back into systemic circulation as suggested by the higher systemic concentrations observed for ROP compared to BUP. The ensuing reduced concentration at the site of action would be consistent with higher morphine consumption in the ROP group from 12 to 36 h (results at 24 h were statistically significant) [8].

This exploratory PK study was conducted in a small number of subjects and this obviously is a limitation. Further, by injecting the same anesthetic into the two nerve sites, it was impossible to characterize the site-specific rate of absorption in a given patient. For logistic reasons, sampling was limited to 32 h. Our results showed that the declining terminal phase was longer than what is expected after IV administration suggesting that absorption might still be ongoing (please refer to figure 1).

In addition, unbound concentrations (Cu) and alpha-1 glycoprotein (AAG) concentrations were not measured. These factors may be important determinants for the PK of these two low hepatic extraction drugs [25]. These factors should be especially considered in future studies with extended sampling where AAG are expected to increase 48 h after surgery [35].

### **2.1.7 Conclusion**

A large proportion of the administered dose of BUP and ROP is slowly absorbed in patients undergoing CFSB. Plasma concentrations were significant at 32 h post block. Physicochemical differences, especially with respect to lipid solubility, may lead to different absorption rates and local pharmacokinetics which in turn would explain the faster onset and recovery observed with ROP [8]. This exploratory study has identified important features that will be essential to consider when designing future studies for local anesthetics in peripheral nerve blocks.

## **Acknowledgments**

This work was supported by the Canadian Anesthesiologists' Society (PB) and the Canadian Institutes of Health Research (MA-10274) (FV). The authors would like to sincerely thank Hélène Lanct ot and Suzanne Paris for blood sampling and Johanne Couture for determining ropivacaine and bupivacaine concentrations.

M-S. Mouksassi received a studentship from the Faculté des  tudes supérieures of Université de Montréal. L.L. is recipient of a Rx&D/CIHR Health Research Foundation Career Award in Health Sciences. L.L. was also awarded the Chaire pharmaceutique ACFPP en pharmacocinétique des populations. P. Beaulieu is recipient of a Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) clinician-scientist grant and a Canadian Anesthesiologists Society grant.

## List of references

1. Fanelli, G., A. Casati, P. Beccaria, et al. A double-blind comparison of ropivacaine, bupivacaine, and mepivacaine during sciatic and femoral nerve blockade. *Anesth Analg*, 1998. 87(3): p. 597-600.
2. Graf, B.M. The cardiotoxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine. *Curr Top Med Chem*, 2001. 1(3): p. 207-14.
3. Connolly, C., D.M. Coventry, J.A. Wildsmith. Double-blind comparison of ropivacaine 7.5 mg ml<sup>-1</sup> with bupivacaine 5 mg ml<sup>-1</sup> for sciatic nerve block. *Br J Anaesth*, 2001. 86(5): p. 674-7.
4. Marhofer, P., C. Oismuller, B. Faryniak, et al. Three-in-one blocks with ropivacaine: evaluation of sensory onset time and quality of sensory block. *Anesth Analg*, 2000. 90(1): p. 125-8.
5. Ng, H.P., K.F. Cheong, A. Lim, et al. Intraoperative single-shot "3-in-1" femoral nerve block with ropivacaine 0.25%, ropivacaine 0.5% or bupivacaine 0.25% provides comparable 48-hr analgesia after unilateral total knee replacement. *Can J Anaesth*, 2001. 48(11): p. 1102-8.
6. McNamee, D.A., P.N. Convery, K.R. Milligan. Total knee replacement: a comparison of ropivacaine and bupivacaine in combined femoral and sciatic block. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2001. 45(4): p. 477-81.
7. Greengrass, R.A., S.M. Klein, F.J. D'Ercole, et al. Lumbar plexus and sciatic nerve block for knee arthroplasty: comparison of ropivacaine and bupivacaine. *Can J Anaesth*, 1998. 45(11): p. 1094-6.
8. Beaulieu, P., D. Babin, T. Hemmerling. The pharmacodynamics of ropivacaine and bupivacaine in combined sciatic and femoral nerve blocks for total knee arthroplasty. *Anesth Analg*, 2006. 103(3): p. 768-74.
9. Coventry, D.M.J.G. Todd. Alkalinisation of bupivacaine for sciatic nerve blockade. *Anaesthesia*, 1989. 44(6): p. 467-70.



10. Misra, U., A.K. Pridie, C. McClymont, et al. Plasma concentrations of bupivacaine following combined sciatic and femoral 3 in 1 nerve blocks in open knee surgery. *Br J Anaesth*, 1991. 66(3): p. 310-3.
11. Moore, D.C., L.E. Mather, L.D. Bridenbaugh, et al. Arterial and venous plasma levels of bupivacaine following peripheral nerve blocks. *Anesth Analg*, 1976. 55(6): p. 763-8.
12. Robison, C., D.C. Ray, D.W. McKeown, et al. Effect of adrenaline on plasma concentrations of bupivacaine following lower limb nerve block. *Br J Anaesth*, 1991. 66(2): p. 228-31.
13. Snoeck, M.M., T.B. Vree, M.J. Gielen, et al. Steady state bupivacaine plasma concentrations and safety of a femoral "3-in-1" nerve block with bupivacaine in patients over 80 years of age. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2003. 41(3): p. 107-13.
14. Cuvillon, P., E. Nouvellon, J. Ripart, et al. A comparison of the pharmacodynamics and pharmacokinetics of bupivacaine, ropivacaine (with epinephrine) and their equal volume mixtures with lidocaine used for femoral and sciatic nerve blocks: a double-blind randomized study. *Anesth Analg*, 2009. 108(2): p. 641-9.
15. de Leeuw, M.A., P.M. Bet, A.J. Wilhelm, et al. Total plasma concentrations of bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine after combined psoas compartment-sciatic nerve block. *Eur J Anaesthesiol*, 2009.
16. Vanterpool, S., S.M. Steele, K.C. Nielsen, et al. Combined lumbar-plexus and sciatic-nerve blocks: an analysis of plasma ropivacaine concentrations. *Reg Anesth Pain Med*, 2006. 31(5): p. 417-21.
17. Bjork, M., K.J. Pettersson, G. Osterlof. Capillary gas chromatographic method for the simultaneous determination of local anaesthetics in plasma samples. *J Chromatogr*, 1990. 533: p. 229-34.
18. Arvidsson, T., H.F. Bruce, M.M. Halldin. Lack of metabolic racemisation of ropivacaine, determined by liquid chromatography using a chiral AGP column. *Chirality*, 1995. 7(4): p. 272-7.
19. Boeckman, A., S. Beal, L. Sheiner, *NONMEM user's guide*. 1998, San Francisco: Globomax.

20. Lindbom, L., P. Pihlgren, E.N. Jonsson. PsN-Toolkit--a collection of computer intensive statistical methods for non-linear mixed effect modeling using NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed*, 2005. 79(3): p. 241-57.
21. DiCiccio, T.J.B. Efron. Bootstrap confidence intervals. *Statistical Science*, 1996. 11(3): p. 189-212.
22. Mathsoft, *S-PLUS 2000 User's Guide*. 1999, Seattle: Data Analysis Products Division Mathsoft.
23. Burm, A.G., J.W. Van Kleef, N.P. Vermeulen, et al. Pharmacokinetics of lidocaine and bupivacaine following subarachnoid administration in surgical patients: simultaneous investigation of absorption and disposition kinetics using stable isotopes. *Anesthesiology*, 1988. 69(4): p. 584-92.
24. Lee, A., D. Fagan, M. Lamont, et al. Disposition kinetics of ropivacaine in humans. *Anesth Analg*, 1989. 69(6): p. 736-8.
25. Thomas J.M., S.A. Schug. Recent advances in the pharmacokinetics of local anaesthetics. Long-acting amide enantiomers and continuous infusions. *Clin Pharmacokinet*, 1999. 36(1): p. 67-83.
26. Tucker, G.T. Pharmacokinetics of local anaesthetics. *Br J Anaesth*, 1986. 58(7): p. 717-31.
27. Burm, A.G., N.P. Vermeulen, J.W. van Kleef, et al. Pharmacokinetics of lignocaine and bupivacaine in surgical patients following epidural administration. Simultaneous investigation of absorption and disposition kinetics using stable isotopes. *Clin Pharmacokinet*, 1987. 13(3): p. 191-203.
28. Karmakar, M.K., A.M. Ho, B.K. Law, et al. Arterial and venous pharmacokinetics of ropivacaine with and without epinephrine after thoracic paravertebral block. *Anesthesiology*, 2005. 103(4): p. 704-11.
29. Knudsen, K., M. Beckman Suurkula, S. Blomberg, et al. Central nervous and cardiovascular effects of i.v. infusions of ropivacaine, bupivacaine and placebo in volunteers. *Br J Anaesth*, 1997. 78(5): p. 507-14.

30. Morrison, L.M., B.M. Emanuelsson, J.H. McClure, et al. Efficacy and kinetics of extradural ropivacaine: comparison with bupivacaine. *Br J Anaesth*, 1994. 72(2): p. 164-9.
31. Wade, J.R., A.W. Kelman, C.A. Howie, et al. Effect of misspecification of the absorption process on subsequent parameter estimation in population analysis. *J Pharmacokinet Biopharm*, 1993. 21(2): p. 209-22.
32. Gantenbein, M., L. Attolini, B. Bruguerolle, et al. Oxidative metabolism of bupivacaine into pipecolylxylidine in humans is mainly catalyzed by CYP3A. *Drug Metab Dispos*, 2000. 28(4): p. 383-5.
33. Pere, P., M. Salonen, M. Jokinen, et al. Pharmacokinetics of ropivacaine in uremic and nonuremic patients after axillary brachial plexus block. *Anesth Analg*, 2003. 96(2): p. 563-9.
34. Arlander, E., G. Ekstrom, C. Alm, et al. Metabolism of ropivacaine in humans is mediated by CYP1A2 and to a minor extent by CYP3A4: an interaction study with fluvoxamine and ketoconazole as in vivo inhibitors. *Clin Pharmacol Ther*, 1998. 64(5): p. 484-91.
35. Wiedemann, D., B. Muhlneckel, E. Staroske, et al. Ropivacaine plasma concentrations during 120-hour epidural infusion. *Br J Anaesth*, 2000. 85(6): p. 830-5.

**Table 1 Characteristics of patients**

	<b>Bupivacaine</b>	<b>Ropivacaine</b>
<b>n</b>	8	8
<b>Age (years)</b>	68 (49-77)	67 (58-83)
<b>Weight (kg)</b>	89 (68-115)	87 (51-117)
<b>Height (m)</b>	1.73 (1.62-1.86)	1.64 (1.52-1.87)
<b>Sex (Women/Men)</b>	0/8	4/4
<b>ASA class<sup>a</sup></b>		
<b>I</b>	0	3
<b>II</b>	6	2
<b>III</b>	1	3
<b>CYP1A2 inducer</b>	6	6
<b>CYP3A4 inhibitor</b>	5	5

Reported values are means and (minimum-maximum) for continuous variables and number for categorical variables. ASA is « American Society of Anesthesiologists » status.

<sup>a</sup>One patient in BUP group had a missing ASA value.

**Table 2 Population pharmacokinetic parameters**

Drug	Structural model and PK parameters models	Population parameters			
		Final estimate	Bootstrap <sup>a</sup> CI		
Bupivacaine	Two-compartment	ka (h <sup>-1</sup> )	4.13	3.09 - 9.2	
	First-order absorption	IIV <sub>ka</sub> (%) <sup>b</sup>	65	7 - 134	
		V1/F (L)	371	333 - 797	
		IIV <sub>V1/F</sub> (%) <sup>b</sup>	99	24 - 165	
		V2/F (L)	514	205 - 733	
		CL/F (L/h)	14.5	3.08 - 67	
		IIV <sub>CL/F</sub> (%) <sup>b</sup>	164	35 - 768	
		Q/F (L/h)	97.5	53.4 - 197	
		Prop (%) <sup>c</sup>	11.2	1.4 - 23.8	
		Add (mg/L) <sup>c</sup>	0.026	0.0005 - 0.048	
Ropivacaine	One-compartment	ka (h <sup>-1</sup> )	8.35	4.37 – 20.40	
	First-order absorption	IIV <sub>ka</sub> (%) <sup>b</sup>	91.4	6.3 – 256.8	
		V1/F <sup>c</sup>	V1/F (L)	275	218- 345
		IIV <sub>V1/F</sub> (%) <sup>b</sup>	13.4	2.3- 23.4	
		CL/F (L/h)	7.8	6.5- 10.1	
		IIV <sub>CL/F</sub> (%) <sup>b</sup>	8.2	2.4 – 16.0	
		Prop (%) <sup>c</sup>	13.2	0.5 – 19.4	
		Add (mg/L) <sup>c</sup>	0.050	0.001 – 2.439	

Add: additive error, CL/F: apparent clearance, Ka: first-order absorption rate, IIV: interindividual variability for the subscripted pharmacokinetic parameter, Prop: proportional error, Q/F: apparent inter-compartment clearance, V1/F: apparent central volume of distribution, V2/F: apparent peripheral volume of distribution.

<sup>a</sup> The confidence intervals (CI) are calculated with the bootstrap bias corrected method.

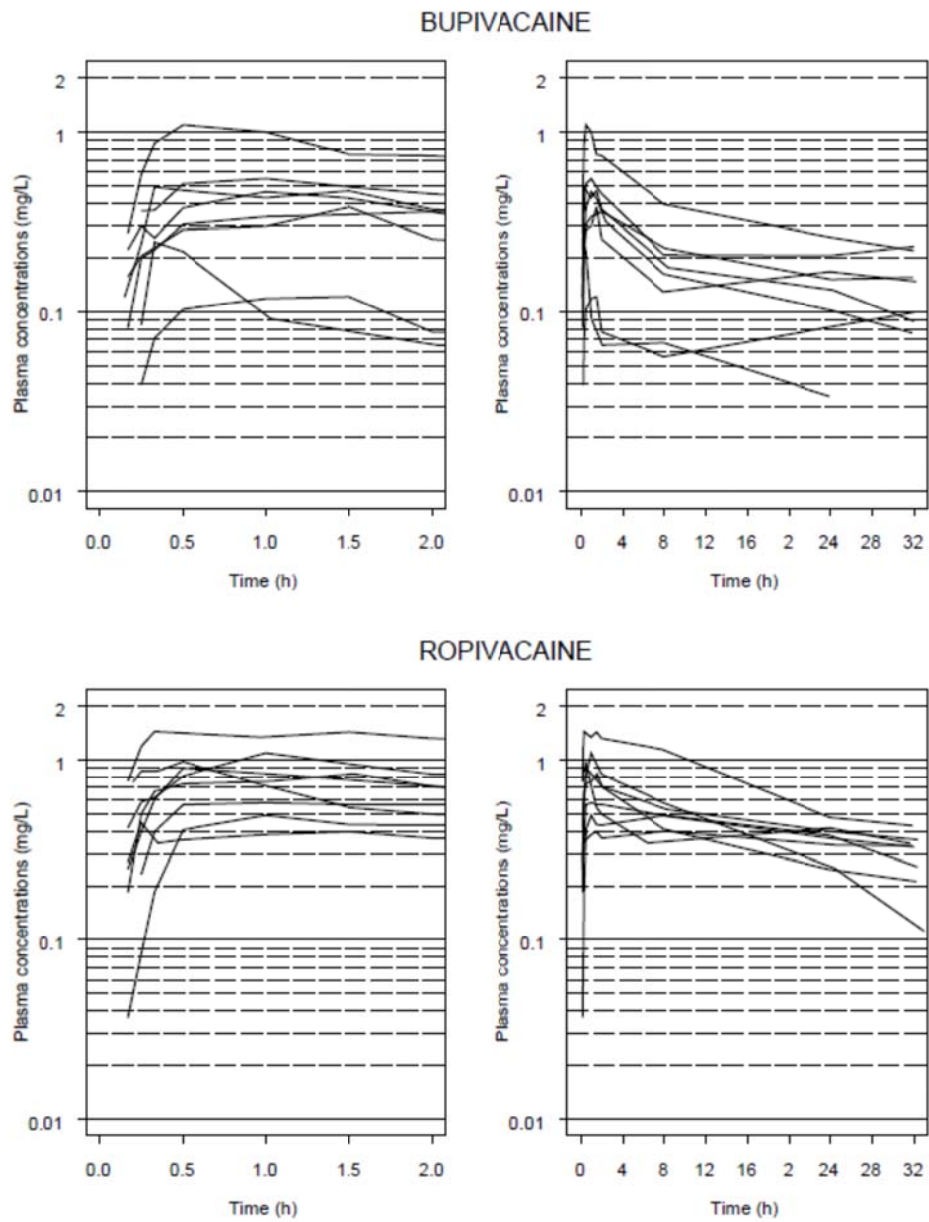
<sup>b</sup> Interindividual variability (IIV) is given as an approximate coefficient of variation calculated from the square root of NONMEM estimated variance.

<sup>c</sup> Residual proportional and additive errors are given as an approximate coefficient of variation and a standard deviation, respectively.

**FIGURES****FIGURE 1**

Semi-logarithmic plots of plasma concentrations vs time for bupivacaine (upper row) and ropivacaine (lower row). Observed concentrations of each patient are connected with a line. A zoom of the earlier points up to 2 h is shown on the left of each row.

FIGURE 1



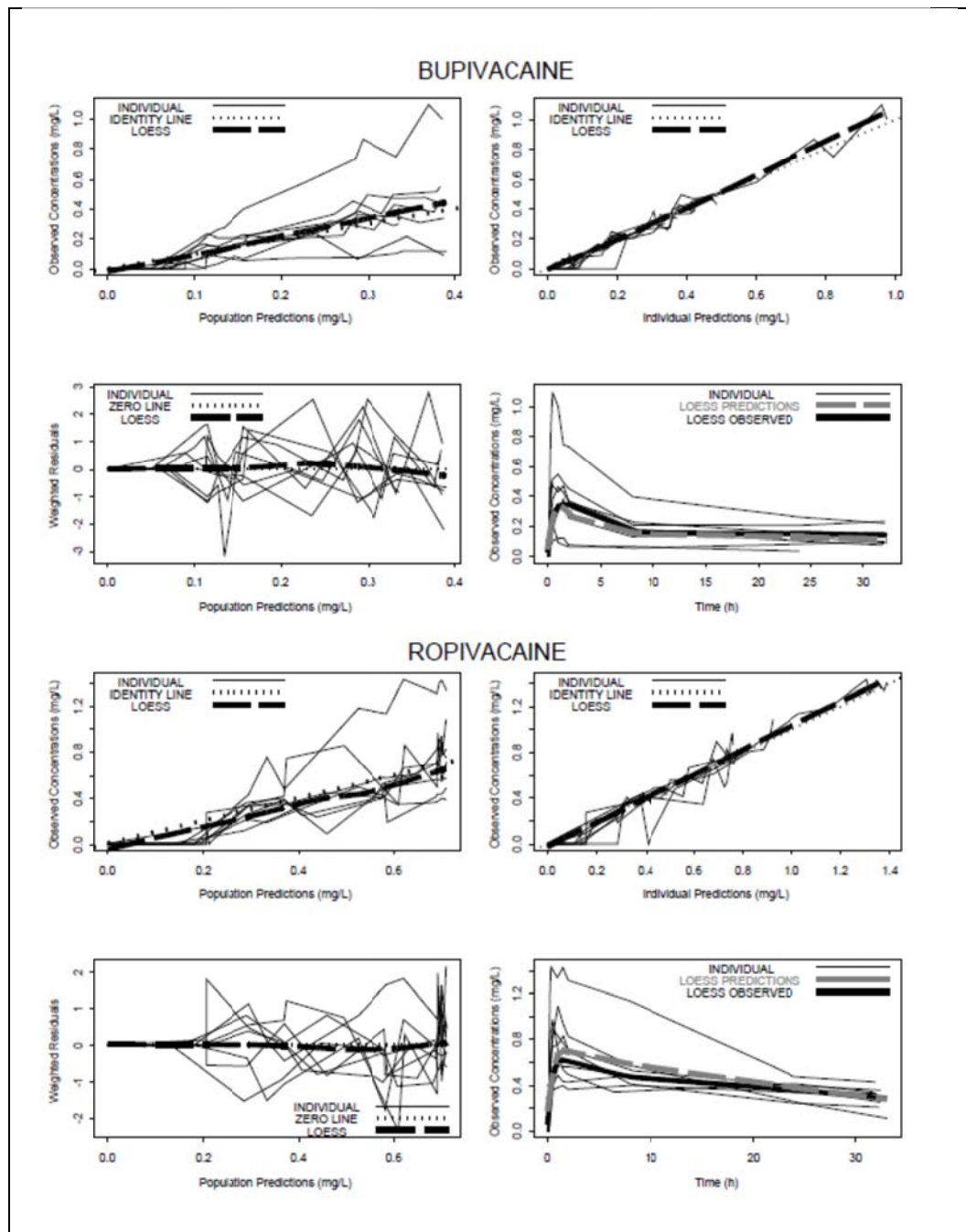
**FIGURE 2**

Goodness of fit plots for the PK models of bupivacaine and ropivacaine.

The heavy broken lines are smooths (LOESS) of the ordinate values. Observed concentrations versus population predictions. Observed concentrations versus individual predictions. Weighted residual versus population predictions. Observed concentrations versus time with LOESS of observed concentrations versus time and LOESS of population predictions versus time. Identity or zero lines are showed in dotted lines and are identified within each subplot legend.



FIGURE 2

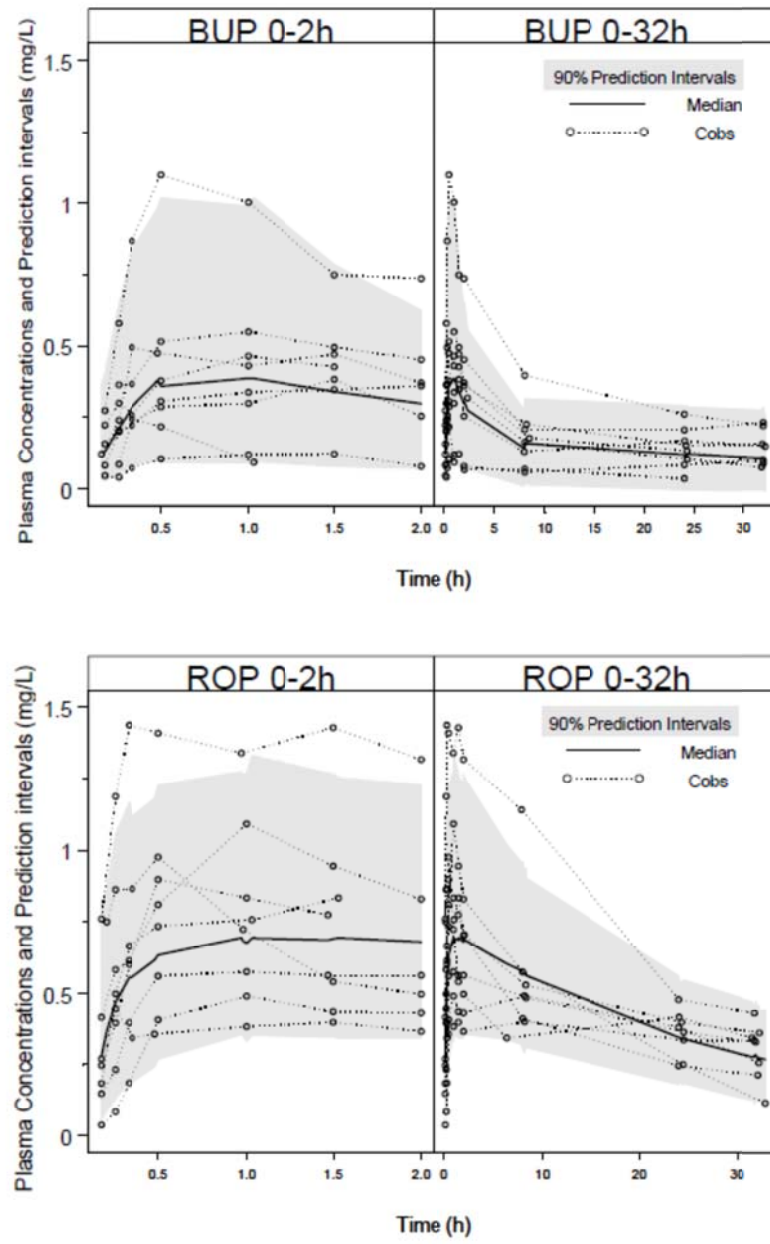


**FIGURE 3**

Visual predictive checks for the PK models.

Observed concentrations and the corresponding prediction intervals simulated from the PK models for bupivacaine upper row and for ropivacaine lower row. Cobs (observed concentrations), Median (median of predictions), 90 % Prediction Intervals (90% simulation-based 95<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> quantiles containing 10 % of the simulated data). A zoom of the early time points is shown on the left of each row.

FIGURE 3



## **2.2 Manuscript #2 Pharmacokinetics of Intravenous Ropivacaine in Rabbits**

### **2.2.1 Introduction du Manuscrit #2**

La deuxième étude avait comme objectif de caractériser la pharmacocinétique de la ropivacaïne après administration intraveineuse chez le lapin.

Cette étude a été conçue dans le cadre d'un programme de recherche compréhensif qui avait pour objectif de mieux comprendre les enjeux de la pharmacocinétique locorégionale aux alentours des nerfs périphériques en étudiant comme première étape la pharmacocinétique intraveineuse. L'avantage d'un modèle animal est de permettre des évaluations plus élaborées et plus invasives et de générer des informations qui seront fort utiles avant de tester de nouvelles procédures ou de nouveaux médicaments chez des patients.

La caractérisation de la pharmacocinétique intraveineuse de la ropivacaïne et de sa liaison aux protéines plasmatiques constitue la première étape avant de pouvoir étudier en profondeur la cinétique périneurale après administration d'un bloc de nerf périphérique.

Une fois la pharmacocinétique intraveineuse caractérisée et après administration périneurale, il sera possible de déterminer les concentrations locales autour du nerf par microdialyse [200] et de séparer l'absorption complexe et biphasique par déconvolution.

## 2.2.2 Page Titre

### **Pharmacokinetics of Intravenous Ropivacaine in Rabbits**

Mohamad-Samer Mouksassi<sup>1</sup>, France Varin<sup>1</sup>, Sandrine Chebekoue<sup>2</sup>, and Line Labbé<sup>1</sup>

1. Faculté de pharmacie, Université de Montréal, Montreal, Canada
2. Faculté de Santé environnementale et santé au travail, Université de Montréal, Montreal, Canada

Author to whom correspondence should be addressed:

Line Labbé

Université de Montréal Faculté de pharmacie

C.P. 6128, Succursale Centre-ville Montréal (Québec) H3C 3J7 Canada

Email:

Phone 514-343-6111 ext: 2781

Fax 514-343-2102

The authors would like to thank Johanne Couture and Lucie Héroux for their technical support.

Running Title: Pharmacokinetics of Intravenous Ropivacaine in Rabbits

M-S. Mouksassi received a studentship from the Faculté des études supérieures of Université de Montréal. L.L. was recipient of a Rx&D/CIHR Health Research Foundation Career Award in Health Sciences. L.L. was also awarded the Chaire pharmaceutique ACFPP en pharmacocinétique des populations.

### **2.2.3 Abstract**

Local anesthetics are widely used for post-operative analgesia in major orthopedic surgery in order to accelerate recovery of patients. The rabbit was chosen as an animal model to study the intravenous pharmacokinetics of local anesthetics and investigate the extent of protein binding.

Two doses were tested 1 mg/kg (n=3) and 2.5 mg/kg (n=3) after intravenous infusion over 2 minutes. Arterial blood samples were collected at 1 and 2 minutes during the infusion and at 5, 10, 15, 20, 30, 60, 180, 240, and 360 minutes after the end of infusion. Protein binding evaluation was performed using ultrafiltration and pharmacokinetic analyses were conducted using the software NONMEM.

A biexponential decay was observed and a two compartment model best described the pharmacokinetics of ropivacaine with a terminal half-life of 83 min. With our study conditions, ropivacaine free fraction ranged between 58 and 72 % at concentrations of 1000 and 5000 ng/mL, respectively.

**Key words:** ropivacaine, rabbits, intravenous, pharmacokinetics, protein binding

### **2.2.4 Introduction**

Peripheral nerve blocks with local anesthetics are widely used in order to accelerate recovery following major orthopedic surgery (Chelly, Greger et al., 2001). Local anesthetics (LA) result in anesthetic action by blocking sodium channels of the main nerve fibers involved in pain transmission, A-delta and C fibers (Gokin, Philip et al., 2001). Ropivacaine and levobupivacaine are relatively newer LA clinically equivalent to bupivacaine but with a better toxicity profile (Casati & Putzu, 2005). Ropivacaine blocks to a lesser extent the A-beta fibers involved in motor conduction (Niesel, Kaiser et al., 1990). However, most studies addressing the proper dosage of local anesthetics solutions for major nerve blockades have focused on avoiding systemic toxicity and did not provide sufficient information to characterize the pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship and the impact of important factors such as protein binding.

We decided to use the rabbit as an animal model and ropivacaine as a model drug. This animal model has been previously used to study the sciatic nerve block of bupivacaine but pharmacokinetic (PK) evaluations were lacking (Helm, Lee et al., 1987). Understanding the PK of ropivacaine after intravenous (IV) injection is the first step to characterize the PK after peripheral nerve injection using deconvolution (Comets, Mentre et al., 1999). This will ultimately help to provide a rational block specific dosing recommendation.

The purpose of the present study was to characterize the PK of IV ropivacaine in rabbits and to investigate the extent of protein binding.



## 2.2.5 Materials and Methods

### *Chemicals and Animals*

Commercial preparations of ropivacaine (NAROPIN<sup>®</sup>, Astra Zeneca Canada Inc. Mississauga, Ontario, Canada) and of the internal standard tetracaine hydrochloride (99%) (SIGMA) were used. All solvents were of high performance liquid chromatography grade and purchased from Anachemia (Montreal, Quebec, Canada).

The experimental protocol was approved by the local institutional Animal Care Committee and was in accordance with the Canadian Council on Animal Care. Veterinary care and housing facilities met Good Animal Practice standards.

For the study, six male New Zealand white rabbits with body weights ranging from 2.79 to 3.51 kg and a mean (standard deviation) of 3.03 (0.30) kg were used. They were allowed one week of accommodation prior to the procedure under a 12 h light/dark cycle. Food was freely available up to 12 h before experiment, after which food was not allowed. There was no restriction for water.

### *In Vivo Procedures*

At the study day, the rabbit's healthy status was verified and its weight recorded. First, a brief anesthesia was induced by inhalation of 5 % isoflurane in 1.5 L/min oxygen delivered via a nose mask. Once an adequate level of anesthesia was verified using neurosensory reflex to pinching, a catheter was inserted into the marginal ear vein for fluid and drug administration and in the central ear artery of the other ear for heart rate/blood pressure monitoring and blood sampling. A urethral catheter was installed to allow voiding of the bladder throughout the study.

After catheterisation, the level of isoflurane was down titrated to remain around 1.5 % to ensure an optimal degree of sedation. Monitoring of sedation was based on hemodynamic

parameters taken every 15 min. Body temperature was monitored with a rectal probe and maintained at 38-39 °C with a homeothermic blanket.

The intravenous tubing was pre-filled with saline then with drug injectable solution and flushed completely before administering ropivacaine 0.5% at a dose of 1 mg/kg (GROUP I, n=3) or 2.5 mg/kg (GROUP II, n=3) with a programmed intravenous pump (Harvard apparatus PHD 2000) over 2 minutes. Arterial blood sampling was carried out at time 0 (predose), at 1 minute (during infusion) and 2 minutes (end of infusion) and at 5, 10, 15, 20, 30, 60, 180, 240, and 360 minutes after the end of the infusion. Each sample consisted of ~1.8 mL blood draw, except for the sample at time 0 (blank) which was ~ 2 mL for protein drug binding determination. The volume of blood taken was replaced by saline. To minimize the *in vitro* degradation, samples were kept on ice water bath and centrifuged within 2 minutes of collection at 4 °C. A maximum of one hour was allowed before transferring the sample to a storage freezer at -70 °C until analysis. At the end of the experiment, the animal was euthanized using a high dose of isoflurane followed by an injection of saturated KCl (5 %).

### ***In Vitro Procedures***

Plasma samples were prepared according to the method of Björk et al. (Björk, Pettersson et al., 1990) with some modifications. To 0.25 mL of plasma, tetracaine (1 µg) was added as internal standard (with 50 µL d'échothiophate 0.2 % as stabilizer), followed by 100 µL sodium carbonate 10 %. Then, a liquid-liquid extraction with 3 mL of n-hexane:methylene chloride 4:1 was carried out by gentle agitation for 30 minutes. After centrifugation, the organic layer was transferred on tubes and evaporated to dryness. Residues were reconstituted with 200 µL mobile phase constituted of a buffer mixture of sodium sulfate 70 mM in sulphuric acid 1.25 mM and acetonitrile 68:32 (v/v) and analyzed by the method of Arvidsson et al. (Arvidsson & Eklund, 1995). Aliquots of 150 µL were injected (Autosampler SpectraSystem AS 3000) into the ODS 1 analytical column (Spherisorb 5 µ, 4.6 x 150 mm, Waters) kept at 40 C° with the pump set at a flow rate of 2 ml/min

(Constametric 4100, Milton Roy) and coupled to an UV detector set to 210 nm (Milton Roy SM 4000). Peaks were integrated using STAR Varian (version 4.52) software. The assay was sensitive with a calibration starting at 32.5 ng/mL, precise with a coefficient of variation (CV) less than 10 % at all concentrations and linear up to 2000 ng/mL.

The plasma protein binding of ropivacaine was determined by an ultrafiltration technique (Pacifichi & Viani, 1992). Ropivacaine was added to rabbit blank plasma samples to have final concentrations of 150, 300, 1000, and 5000 ng/mL concentrations of ropivacaine. The solutions were transferred into polypropylene tubes and placed uncapped into a water bath incubator set to 38.6 °C. A pH meter electrode (Orion Research Inc, Beverly, MA) was put into plasma and an automatic feedback thermometer in the water bath. This system provided accurate pH and temperature recordings. The goal was to maintain pH of plasma between 7.38 and 7.42 by the periodic addition of small volumes (1 to 8 µL) of HEPES buffer. After a 10 minutes time of incubation at stable temperature and pH mimicking *in vivo* conditions, 0.3 mL (in duplicates) from each solution were placed in a Centrifree Micropartition System (Amicon) and then quickly in an ultra-centrifuge (Sorval evolution RS) and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes at room temperature. The ultrafiltrat volume ranged between 100-200 µL and was completed to 300 µL using blank plasma before undergoing the extraction and HPLC techniques described above. The experience was repeated using 5 minutes of centrifugation and we report the average of the two experiments done in duplicates. The unbound fraction was calculated using the ratio of measured concentration in the ultrafiltrat over the measured concentration in the pre-filtration sample.

### ***Pharmacokinetic Analysis***

The PK analysis was performed using a compartmental modeling approach using the software NONMEM (Version VI) (Beal, Sheiner et al., 1996). After initial graphical exploration of the data, relevant compartmental models were tested. Models were parameterized in clearance and volume parameters and secondary PK parameters of interest

such as half-lives were derived. For example, for a two-compartment PK model the following parameters were estimated: systemic clearance, intercompartmental clearance, central and peripheral volumes of distribution. In addition, distribution and terminal half-lives were derived. Model discrimination was based on goodness of fit criteria such as the minimum of objective function value and visual inspection of the plots of observed and model-predicted concentrations *versus* time. A p value of 0.05 was set at the statistical significance limit. PK parameters were normalized by weight. Dose was tested as a continuous and categorical covariate influencing the systemic clearance within the model.

## 2.2.6 Results

Arterial blood pressure and heart rate were stable. Rabbits' body temperatures were well maintained to the corresponding baseline values and averaged  $38.6 \pm 0.13$  °C (range: 38.1 - 38.8 °C). Individual body temperatures did not vary by more than 1 °C during the experiment. In total, 42 concentrations contributed to the PK analysis. A spaghetti plot of individual ropivacaine plasma concentration-time curves is displayed in Figure 1. A biexponential decay was observed and a two compartment model best described the PK of IV ropivacaine in rabbits. The terminal half-life was 83 minutes. The dose did not influence neither systemic clearance nor central volume of distribution as assessed by the likelihood ratio test; data not shown. Figure 2 shows the goodness of fit plots of the model. Table 1 lists the final estimated PK parameters.

For *in vitro* protein binding experiment, the water bath temperature was adjusted to be similar to the mean *in vivo* rabbit's temperature of 38.6 °C and the stability of pH was well documented with no deviation beyond 0.05 pH units from the baseline measurement. Ropivacaine average free fraction ranged between 58 and 72 % at concentrations between 1000 and 5000 ng/mL. Due to limitations of the assay and of the ultrafiltration technique, results with lower concentrations were not reliable and hence are not reported.

Although the highest observed concentration was 5160 ng/mL, it did not result in any symptoms of toxicity.

### 2.2.7 Discussion

This study reports the IV pharmacokinetics of ropivacaine in rabbits as well as the extent of protein binding in rabbits' plasma. Consistent with the reported terminal half-life of bupivacaine after IV administration in rabbits of 89.5 min (Dollo, Malinovsky et al., 2004), in our study ropivacaine showed a terminal half life of 83 min.

The free ropivacaine fraction ranged between 58 and 72 % within the studied range. Although, our method of binding assessment was limited and we could not report ropivacaine free fraction at lower concentrations, we might hypothesize that the free fraction may be lower at lower concentrations as previously observed for bupivacaine in sheep (Mather, Copeland et al., 2005). Furthermore, the extent of free fraction (58-72%) is much higher than the free fraction of ropivacaine in human plasma which is 1% (Thomas & Schug, 1999). Inter-species differences were previously described in the literature for drugs bound to alpha-1 acid glycoprotein (Acharya, Sparreboom et al., 2006; Wargin, Thomas et al., 2009). The moderate binding renders performing microdialysis experiments easier since measuring the dialysate concentrations will not require a very sensitive analytical method and or long duration for equilibrium.

Differences in alpha-1 acid glycoprotein affinity and/or the number of available binding sites between humans and rabbits may explain the different binding fraction between these two species. Assuming a free fraction of 72%, the highest observed concentration of 5160 ng/mL would have resulted in a free arterial concentration of 3715 ng/mL which was above the CNS toxicity range in humans (340-850 ng/mL) reported by Knudsen et al. (Knudsen, Beckman Suurkula et al., 1997). Clinical toxicity such as seizure may have been masked by the light sedation provided by isoflurane administration, nonetheless, no hemodynamic toxicities were observed. The difference of protein binding between humans and rabbits is important to consider when extrapolating pre-clinical data to humans because unbound drug is involved in distribution, elimination, pharmacodynamic action, and toxicity. In

humans, ropivacaine has a relatively low hepatic extraction ratio of around 40 % and as such its clearance is proportional to the unbound fraction of ropivacaine (Halldin, Bredberg et al., 1996; Arlander, Ekstrom et al., 1998; Jokinen, Ahonen et al., 2000). This can partially explain the longer ropivacaine half-life of 111 min in humans (Lee, Fagan et al., 1989).

Overall, our study provided additional understanding on the IV pharmacokinetics of ropivacaine in rabbits that would help in designing future studies.

### **2.2.8 Conclusions**

In conclusion, the IV pharmacokinetics of ropivacaine in rabbits were described by a bi-exponential model with a terminal elimination half-life of 83 minutes. Ropivacaine was found to be moderately bound in rabbit plasma. These results will help in designing future studies of ropivacaine in the rabbit animal model.



## REFERENCES

- Acharya, M.R., Sparreboom, A., Sausville, E.A., Conley, B.A., Doroshow, J.H., Venitz, J. & Figg, W.D. (2006) Interspecies differences in plasma protein binding of MS-275, a novel histone deacetylase inhibitor. *Cancer Chemother Pharmacol*, **57**(3), 275-281.
- Arlander, E., Ekstrom, G., Alm, C., Carrillo, J.A., Bielenstein, M., Bottiger, Y., Bertilsson, L. & Gustafsson, L.L. (1998) Metabolism of ropivacaine in humans is mediated by CYP1A2 and to a minor extent by CYP3A4: an interaction study with fluvoxamine and ketoconazole as in vivo inhibitors. *Clinical pharmacology and therapeutics*, **64**(5), 484-491.
- Arvidsson, T. & Eklund, E. (1995) Determination of free concentration of ropivacaine and bupivacaine in blood plasma by ultrafiltration and coupled-column liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl*, **668**(1), 91-98.
- Beal, S.L., Sheiner, L.B. & Boeckmann, A. (1996). NONMEM Users' Guides. NONMEM Project Group, University of California, San Francisco, CA.
- Björk, M., Pettersson, K.J. & Osterlof, G. (1990) Capillary gas chromatographic method for the simultaneous determination of local anaesthetics in plasma samples. *J Chromatogr*, **533**, 229-234.
- Casati, A. & Putzu, M. (2005) Bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine: are they clinically different? *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, **19**(2), 247-268.
- Chelly, J.E., Greger, J., Gebhard, R., Coupe, K., Clyburn, T.A., Buckle, R. & Criswell, A. (2001) Continuous femoral blocks improve recovery and outcome of patients undergoing total knee arthroplasty. *J Arthroplasty*, **16**(4), 436-445.
- Comets, E., Mentre, F., Nimmerfall, F., Kawai, R., Mueller, I., Marbach, P. & Vonderscher, J. (1999) Nonparametric analysis of the absorption profile of octreotide in rabbits from long-acting release formulation OncoLAR. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **59**(2), 197-205.

- Dollo, G., Malinovsky, J.M., Peron, A., Chevanne, F., Pinaud, M., Le Verge, R. & Le Corre, P. (2004) Prolongation of epidural bupivacaine effects with hyaluronic acid in rabbits. *Int J Pharm*, **272**(1-2), 109-119.
- Gokin, A.P., Philip, B. & Strichartz, G.R. (2001) Preferential block of small myelinated sensory and motor fibers by lidocaine: in vivo electrophysiology in the rat sciatic nerve. *Anesthesiology*, **95**(6), 1441-1454.
- Halldin, M.M., Bredberg, E., Angelin, B., Arvidsson, T., Askemark, Y., Elofsson, S. & Widman, M. (1996) Metabolism and excretion of ropivacaine in humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **24**(9), 962-968.
- Hayashida, M., Fukunaga, A., Fukuda, K., Yamazaki, S.Y., Arita, H. & Hanaoka, K. (2004) A rabbit model for evaluation of surgical anesthesia and analgesia: characterization and validation with isoflurane anesthesia and fentanyl analgesia. *J Anesth*, **18**(4), 282-291.
- Heavner, J.E. (2004) Let's abandon blanket maximum recommended doses of local anesthetics. *Reg Anesth Pain Med*, **29**(6), 524.
- Helm, R.H., Lee, Y.S. & Pho, R.W. (1987) Experimental studies of the effect of bupivacaine on peripheral nerves. *J Hand Surg [Br]*, **12**(1), 19-22.
- Jokinen, M.J., Ahonen, J., Neuvonen, P.J. & Olkkola, K.T. (2000) The effect of erythromycin, fluvoxamine, and their combination on the pharmacokinetics of ropivacaine. *Anesthesia and analgesia*, **91**(5), 1207-1212.
- Knudsen, K., Beckman Suurkula, M., Blomberg, S., Sjovall, J. & Edvardsson, N. (1997) Central nervous and cardiovascular effects of i.v. infusions of ropivacaine, bupivacaine and placebo in volunteers. *Br J Anaesth*, **78**(5), 507-514.
- Lee, A., Fagan, D., Lamont, M., Tucker, G.T., Halldin, M. & Scott, D.B. (1989) Disposition kinetics of ropivacaine in humans. *Anesthesia and analgesia*, **69**(6), 736-738.
- Mather, L.E., Copeland, S.E. & Ladd, L.A. (2005) Acute toxicity of local anesthetics: underlying pharmacokinetic and pharmacodynamic concepts. *Reg Anesth Pain Med*, **30**(6), 553-566.

- Niesel, H.C., Kaiser, H. & Eilingsfeld, T. (1990) [Ropivacaine--a new local anesthetic with specific properties]. *Regional-Anaesthesie*, **13**(3), 54-56.
- Pacifici, G.M. & Viani, A. (1992) Methods of determining plasma and tissue binding of drugs. Pharmacokinetic consequences. *Clin Pharmacokinet*, **23**(6), 449-468.
- Thomas, J.M. & Schug, S.A. (1999) Recent advances in the pharmacokinetics of local anaesthetics. Long-acting amide enantiomers and continuous infusions. *Clin Pharmacokinet*, **36**(1), 67-83.
- Wargin, W., Thomas, H., Clohs, L., St-Louis, C., Ejksjaer, N., Gutierrez, M., Shaughnessy, L. & Kosutic, G. (2009) Contribution of protein binding to the pharmacokinetics of the ghrelin receptor agonist TZIP-101 in healthy volunteers and adults with symptomatic gastroparesis: two randomized, double-blind studies and a binding profile study. *Clin Drug Investig*, **29**(6), 409-418.

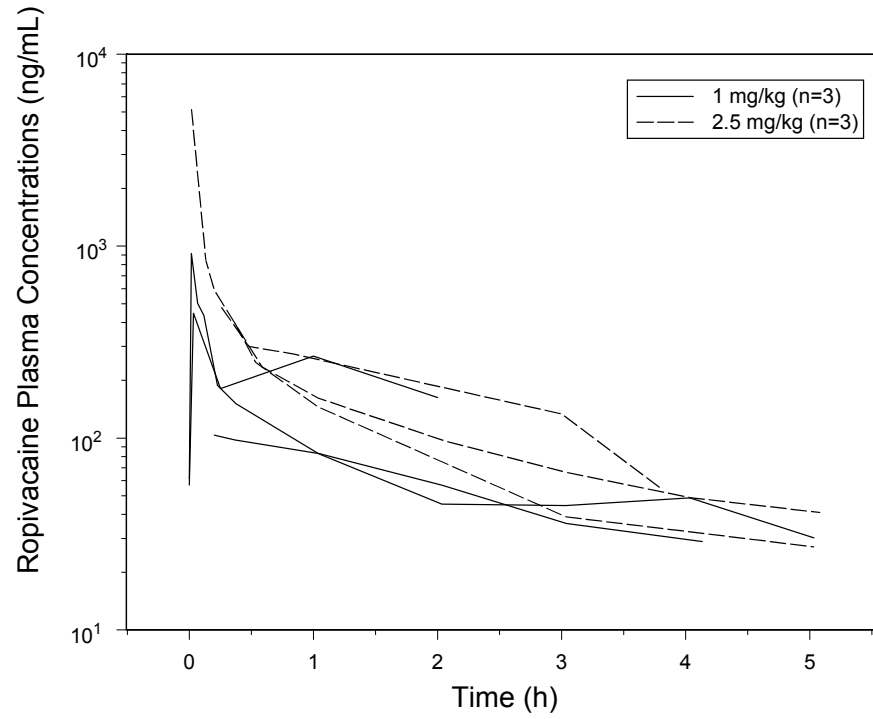
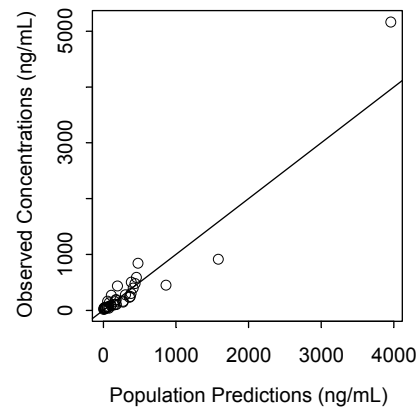
**Figure 1**

FIGURE 1

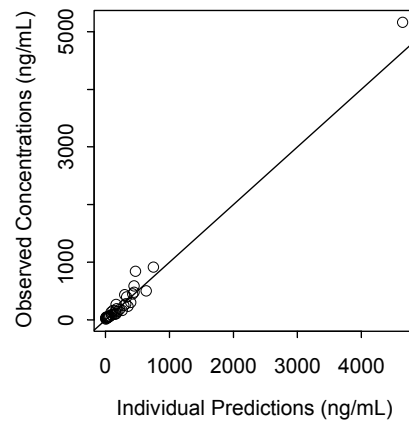
Spaghetti plot of ropivacaine plasma concentrations over time. Each rabbit data are connected with a line.

Figure 2

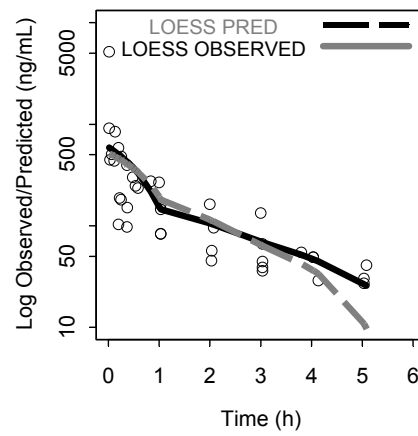
A



B



C



**FIGURE 2**

Goodness of fit plots for the PK model. Plots A and B: Individual rabbit data are shown as dots, identity lines are showed in solid lines. Plot C: Individual rabbit data are shown as dots and heavy lines are smooths (LOESS) of the observations (solid line) and model-based predictions (dashed line).

**Table 1 . Estimated population pharmacokinetic parameters (n=6 rabbits)**

	Population Mean	RSE (%)	BSV (%)
Systemic clearance (L/min/Kg)	0.0413	15.1	34.5
Central volume (L/Kg)	0.192	64.1	114
Intercompartment Clearance (L/min/Kg)	0.173	24.2	
Peripheral volume (L/Kg)	3.12	10.4	
Distribution half life (min)	5.5		
Elimination half life (min)	83		

RSE: relative standard error BSV: between subject variability

### **2.3 Manuscript #3 Pharmacokinetic and pharmacodynamics of three different doses of epidural neostigmine**



### 2.3.1 Introduction du Manuscrit #3

La troisième étude exploratoire a comme objectif de caractériser la pharmacocinétique de la néostigmine épidurale et de caractériser la réponse pharmacodynamique en utilisant trois doses différentes : 0.5, 1 et 1.5 mg.

Le mécanisme d'action de la néostigmine est prometteur dans une stratégie d'analgésie post-opératoire multimodale en administration rachidienne ou épidurale. La néostigmine a été testée en administration rachidienne mais les effets secondaires en ont limité l'utilisation [201, 202]. Par la suite, elle a été testée en administration épidurale, mais les doses utilisées étaient modestes, soit aux alentours de 0.2 mg [168, 203-208].

Notre hypothèse de recherche était que la voie épidurale donnerait une absorption graduelle et plus lente qu'une administration rachidienne directe d'où moins d'effets secondaires. En testant trois doses différentes et en allant à une dose aussi élevée que 1.5 mg pour la première fois, on a essayé d'établir la courbe dose-réponse et d'atteindre la dose maximale tolérable.

Les résultats de l'étude démontreront que la dose de 1.5 mg est trop élevée puisqu'elle peut causer de l'hypertension. Toutefois, la pharmacocinétique est demeurée linéaire et l'évidence d'un lien potentiel entre la pharmacocinétique et la pharmacodynamie a été révélée.

### 2.3.2 Page Titre

#### **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of three different doses of epidural neostigmine**

M-S. Mouksassi,<sup>1</sup> L. Labbé,<sup>2</sup> A. Homsy<sup>3</sup>, R. Couture<sup>4</sup>, F. Varin,<sup>5</sup>

1. Ph.D. Candidate, Pharm.D., Faculté de pharmacie, Université de Montréal, Montreal, Canada
2. Assistant Professor, Ph.D., Faculté de pharmacie, Université de Montréal, Montreal, Canada
3. M.D., Anesthesiologist, Rosemont Hospital, Montreal, Canada
4. Professor, Ph.D., Faculté de médecine, Département de physiologie, Université de Montréal, Montreal, Canada
5. Professor, Ph.D., Faculté de pharmacie, Université de Montréal, Montreal, Canada

M-S. Mouksassi received a studentship from the Faculté des études supérieures of Université de Montréal. L.L. was recipient of a Rx&D/CIHR Health Research Foundation Career Award in Health Sciences. L.L. was also awarded the Chaire pharmaceutique ACFPP en pharmacocinétique des populations. This work was supported in part by a CIHR operating grant (MA-10274) awarded to FV.

### 2.3.3 Abstract

Acetylcholinesterase inhibitors, like neostigmine, have been shown to cause analgesia in animals and humans. Although intrathecally administered neostigmine contributes significantly to analgesia, it results in high incidence of dose dependent nausea and vomiting. On the other hand, epidural neostigmine is expected to have a better safety profile and while it has been tested clinically, the information regarding its exposure-response relationship is lacking. The objectives of this study were to evaluate the PK and safety of the 0.5, 1 and 1.5 mg doses of epidural neostigmine and to examine the relationship between the cerebro-spinal fluid (CSF) and blood concentrations and the resulting analgesic efficacy when given in addition to mepiridine epidural patient controlled analgesia (EPCA). Pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK/PD) modeling techniques were tested in order to characterize and quantify the potential exposure-response relationship. A total of 93 CSF concentrations were available whereas the blood concentrations were below the limit of quantitation. A one compartment model with first order absorption and a lag time described the data well. A trend toward a 1.9 higher clearance in men as compared to clearance in women was noted, but the bootstrap based confidence interval showed that there is not sufficient data to claim statistical significance. Patients from all three groups had a suitable analgesia. In addition, the numerical analogue scale (NAS) pain scores were lower in the neostigmine 1.5 mg group during exercise compared to the neostigmine 0.5 and 1 mg groups,  $p < 0.05$ . Mepiridine consumption and cumulative dose requirements were similar across the three dose groups. However, the neostigmine 1.5 mg group required a lesser consumption of mepiridine at 24 h after surgery compared to the 0.5 and 1 mg groups (81.4 mg vs 108.6 mg, respectively,  $p < 0.05$ ). Relationships of CSF neostigmine concentrations with NAS pain scores at rest or during exercise as well as with cumulative mepiridine EPCA consumption were not clear and as such PK/PD modeling was not pursued further. The adverse events of concern were hypertension observed in two patients receiving neostigmine 1.5 mg (205/110 and 175/113 mmHg). In conclusion, neostigmine has a promising opioid sparing effect. More studies with direct comparisons between

lipophilic opioids and neostigmine are needed for efficacy and safety, before establishing neostigmine as a key player in epidural postoperative pain management.

### 2.3.4 Introduction

Cholinergic agonists have been shown to induce analgesia in animals after intrathecal (IT) injection [1]. In addition, IT injection of acetylcholinesterase (AChE) inhibitors, like neostigmine, have been shown to cause analgesia in animals [2, 3] and humans [4]. The analgesia, in humans and other species, seems to be dependent on the degree of tonic activity of cholinergic interneurons, located in the dorsal horn of the spinal cord, which increases in the acute postoperative period [5]. The higher synaptic levels of acetylcholine following neostigmine injection would cause analgesia through muscarinic post synaptic (M1) receptors mechanisms [6, 7]. Furthermore, higher concentration of cerebro-spinal fluid (CSF) acetylcholine have been described following IT administration of neostigmine in volunteers [8]. Neostigmine can potentiate the analgesic action elicited by spinal opioids or noradrenergic drugs, through similar cholinergic interneurons [9]. This accumulated evidence prompted the use of IT neostigmine in clinical trials and validated an important target for analgesia [10]. It is currently well documented that IT neostigmine can contribute significantly to the analgesia when administered with opioids or with alpha2-adrenoreceptor agonists given neuroaxially [11]. The IT route, although directly targeting the site of action, was not without drawbacks. IT neostigmine has been shown to produce a high incidence of dose dependent nausea and vomiting in early phase I studies [12, 13] and later in clinical studies [14-17] where doses between 25 to 150 µg of IT neostigmine have been tried for different types of surgical procedures. When doses as low as 10 µg were tested [18] nausea was reported in three of the six patients with one patient needing a medical treatment. In addition, IT doses of 6.25, 12.5 and 50 µg in volunteers produced high incidences of side effects and delayed recovery from anesthesia [19]. As such, the adverse events profile of IT neostigmine prevents it to be routinely used in the clinical practice and prompted the investigation of the epidural route.

An epidural neostigmine dose of 1 mg, but not 0.5 mg, has been shown to produce analgesia in human volunteers with no side effects reported in an experimental pain study [20]. It is unclear whether these results remain applicable in the postoperative conditions,

where the cholinergic tone seems higher. Lauretti *et al.* [21] tested epidural neostigmine 1, 2, or 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  with lidocaine in knee surgery and found a reduction in opiates use. A recent editorial by Eisenach [11] extensively reviewed the use of epidural neostigmine for the use in labor or postoperative pain. In a study testing 250, 500 and 750  $\mu\text{g}$  of epidural neostigmine combined with sulfentanil 10  $\mu\text{g}$  for early labor analgesia [22] the minimum effective dose was 500  $\mu\text{g}$ . The 750  $\mu\text{g}$  dose was equivalent to the 500  $\mu\text{g}$  dose which provided effective analgesia equivalent to 20  $\mu\text{g}$  sulfentanil and without side effects. Many questions regarding the optimal dose of neostigmine that would achieve adequate analgesic properties while minimizing side effects remain to be answered. An exposure-response study may address some of these questions. While a ratio of 30 to 1 of epidural to IT morphine provide equipotent analgesic response [23] and since neostigmine is a positively charged polar molecule, we hypothesized that the epidural to IT dose ratio of neostigmine can be down to 10 to 1 ratio. As such, the epidural dose ranges of neostigmine to be tested in our study were set between 0.5 and 1.5 mg.

The objectives of this study were: first, to evaluate the PK and safety of the 0.5, 1 and 1.5 mg doses of epidural neostigmine. Second, to examine the relationship between the cerebro-spinal fluid and plasma concentrations with the resulting analgesic efficacy when given in combination to mepiridine epidural patient controlled analgesia (EPCA) during the first 24 hours after abdominal surgery.

### **2.3.5 Methods**

#### **Patients and study design**

The study protocol and consent forms had the approval of the ethical committee of Maisonneuve-Rosemont Hospital. Oral and written informed consents were obtained from all patients.

Fifteen patients undergoing various elective abdominal, gynecological or urological procedures requiring an abdominal incision participated in this pharmacokinetic study.

Patients were ASA I-III and were selected between 55 to 72 years old to minimize the incidence of post epidural puncture headaches. Patients with uncontrolled high blood pressure, or having pacemakers, or treated with lidocaine derivatives, NSAIDs, other analgesics, antidepressant or cortisone, or those suffering from severe chronic obstructive pulmonary disease and finally patients with known hypersensitivity to bupivacaine, neostigmine, vecuronium, fentanyl, were excluded from the study.

The goal of the randomization was to have a total of 15 patients equally allocated to one of the three following groups: 0.5 mg, 1 mg, or 1.5 mg epidural neostigmine. Four patients were screened and started the study but had to be eliminated for technical reasons: mainly sampling problems (n=2), passage of the epidural catheter into the IT space (n=1) or erroneous injection of mepiridine in the spinal catheter (n=1). The two patients who had sampling problems received a dose of 1.5 mg neostigmine and were monitored for the evaluation of adverse events. The randomization procedure was carried out blindly by a research assistant who was responsible for preparing the injectable solutions and sampling the CSF and blood specimens but was not otherwise involved in the study.

Before any drug administration, a lactate-ringer perfusion was started at 300 ml/h in order to allow patients to receive 10 to 15 ml/kg of perfusate by the time of the insertion of the epidural and spinal catheters. Patients were also premedicated with a 10 mg oral dose of diazepam 1 to 1.5 h before entering the operating room. Upon their arrival in the operating

room, all patients had a radial artery catheterisation for blood sampling and for continuous monitoring of their blood pressure. The rest of the monitoring was standard. If needed, more sedation was given to the patients with intravenous increments of midazolam 0.5-1 mg.

Patients were positioned on the left side before starting the procedures to insert the epidural and spinal catheters. The first, epidurally with a G17 Tuohy needle, at mid-level of the surgical incision, between T10-12, with a classical loss of resistance (saline) technique. The catheter (G20, Perifix, Braun) was then thread cephalad 3 to 5 cm and 3 ml test dose lidocaine 1.5% with epinephrine 1/200000 were injected. The second, intrathecally with a G24 Portex nylon micro catheter (with stylet, open end, no eyes), at the L2-3 level, through a G20 Tuohy 3"1/2 needle, and threaded 10 to 12 cm upwards at a distance theoretically planned to face the tip of the epidural catheter. An aspiration test of 0.3-0.5 ml of CSF was done and kept as the baseline sample for CSF-neostigmine. Similarly, 3 ml of arterial blood was then sampled for baseline dosage of plasma neostigmine. The patients were then positioned supine and 1.5 ml of isobaric 0.5 % bupivacaine (7.5 mg) were injected through the spinal catheter followed by epidural injection of the randomized neostigmine dose, one to two minutes later. Neostigmine epidural injections for the pharmacokinetic study consisted of a 3 ml solution containing 0.5, 1 or 1.5 mg of neostigmine methylsulfate (preservative-free solution Sabex 1/2000; 0.5 mg/mL, Canada) completed if needed with saline. Following neostigmine injection, every 3 minutes and for a total of 12 minutes, vital signs, pupil size (<2 or >4 mm), nystagmus, sialorrhea (the need to swallow or to spit, and/or regular aspiration of saliva), nausea and /or vomiting according to the following scale (0= none, 1= nausea not treated, 2= nausea treated, 3= vomiting), abdominal cramps ,or loss of stools and the level of spinal blockade were assessed and recorded. Hypotension (systolic blood pressure < 90 mmHg) was treated with boluses of 10 mg ephedrine. After the last sampling, the intrathecal catheter was removed carefully, the puncture site inspected and protected with a sterile dressing.



**General anesthesia and sedation protocols**

For patients who had combined general and regional anesthesia, the protocol of general anesthesia included at induction: propofol 1-2 mg/kg, fentanyl 1-3 µg/kg and rocuronium 0.6-0.8 mg/kg. Anesthesia was maintained with N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> 50 to 70 %, fentanyl 1.5 to 3.5 µg/kg/h, repeated injections of rocuronium (10 to 15 mg) up to 45 min before the end of the surgery and isoflurane up to 0.5 MAC end tidal, if needed. In no instances, curarization was reversed at the end of the procedure with neostigmine. If surgical conditions allowed it and upon patients' demand, the surgery was carried on under regional anesthesia with variable degree of sedation using propofol 30 to 50 µg/kg/min, midazolam 30 to 40 µg/kg/h and bolus injections of fentanyl 0.5 to 1 µg/kg.

**Postoperative analgesia and monitoring**

Analgesia was provided with NSAIDs suppository (indomethacin 100 mg bid for 48 h) and meperidine epidural PCA (EPCA). The loading doses were started at first complaint in the postoperative care unit with 10 mg meperidine bolus, followed by doses of 6 mg given every 10 minutes as long as the numerical analogue pain scale (NAS) (0 to 10) was above 4 at rest or during exercise elicited by cough or moving on the side. Then, the EPCA device was set with bolus doses of 3 to 4 mg and a lock-out time of 10 minutes. Cumulative meperidine requirements as well as pain NAS were recorded every hour for the first 12 hours, then every 3 to 6 hours until the 24<sup>th</sup> hour. All measurements in the postoperative care unit and on floor were made by nurses who were instructed on the nature of the study, but blinded to the group. They had all received adequate training in pain evaluation and neostigmine specific adverse reactions monitoring. In the postoperative period, vital signs, heart rate, blood pressure, respiratory rate, nystagmus, nausea, vomiting, the time and intensity to first complaint, and finally pain and sedation scales (0= awake, 1= asleep, easy to arouse, 2= asleep, need strong stimulation to arouse, 3= unable to arouse) were recorded. These evaluations were repeated every 10 min during the first postoperative hour, then every hour for 12 hours and finally every 4 hours for additional 12 hours for a total of 24 hours.

Meperidine consumption in the 0.5, 1 and 1.5 mg neostigmine dose groups were statistically compared by blocks of 3 h up to 12 h after surgery and in blocks of 6 h up to 24 h after surgery, using a one way ANOVA test, completed with a Tuckey test when appropriate. Other statistics were performed using the Student 's t-test. A p value  $\leq 0.05$  was considered significant.

### **Pharmacokinetic samples**

CSF samples (0.5 to 0.7 ml) were withdrawn from the intrathecal catheter at times 0, 0.33, 0.66, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, and 12 hours after neostigmine injection. These samples were immediately put on ice, centrifuged and frozen at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  within an hour. The epidural catheter was left in place for another two to three days, according to the patient's need for analgesia. Arterial blood (3 ml) was drawn into heparinized tubes at 0, 5, 10, 20, 30, 40 min and 1, 2, 4, 6, 8 and 10 h after neostigmine injection, and processed as the CSF samples.

### **Neostigmine HPLC analysis**

Neostigmine was extracted from blood and CSF samples using solid-phase extraction columns and analysed by strong cation exchange high pressure liquid chromatography (SCX-HPLC) with ultraviolet detection [24]. The lower limit of quantification was 2.6 ng/ml in plasma. Since CSF samples were diluted 1:1 with drug-free plasma before the extraction, the limit of quantification was 5.2 ng/ml. The inter-assay reproducibility of the assay was less than 7.7% over the concentration range studied.

### **Pharmacokinetic pharmacodynamic analysis**

A population approach was used to build a PK model using the nonlinear mixed effects modelling program Phoenix NLME (version 1.2). The model was developed using the first order conditional estimation extended least square method with interaction (FOCE-ELS). The model was selected by testing the following PK models: one- and two-compartment, first- and zero-order absorption with or without lag time. The models were parameterized

using clearance and volume terms. The one compartment model had the following parameters: first order absorption rate constant ( $K_a$ ), apparent volume of distribution ( $V/F$ ) and apparent clearance ( $CL/F$ ). An exponential variance model was used for the interindividual variability of pharmacokinetic parameters. For the residual error, additive, proportional, and combined (additive and proportional) models were tested. Model selection was based on likelihood ratio tests and on diagnostic goodness of fit plots. Likelihood ratio tests were used to assess whether the difference in the objective function value (OFV) between a base model and the tested more complex model is statistically different or not. A difference of nested models likelihoods reflecting a p value of  $\leq 0.05$  was considered significant. Although the number of subjects participating in this study was limited, covariate testing was conducted for exploratory purposes using a classical stepwise approach with forward addition (p-value  $\leq 0.05$ ) and backward elimination (p-value  $\leq 0.01$ ). The model parameters stability was evaluated by running a nonparametric bootstrap using 1000 random samples and computing confidence intervals derived from the percentiles of the bootstrap distribution. Furthermore, a visual predictive check was performed by simulating from the final model ( $n= 1000$  simulations) and by constructing 90 % prediction intervals to verify whether the original data are within the prediction intervals.

The PK/PD analysis tried to correlate the CSF concentrations to mepiridine use over time in order to quantify the expected reduction of opioid with epidural neostigmine. Standard PK/PD models were tested including: direct  $E_{max}$  with or without an effect compartment, indirect response models with drug effects on formation or loss of response. The collected pain data was deemed not sufficient for a PK/PD model, rather summaries were calculated and are represented. The statistical program S-PLUS was used for graphics and statistical calculations.

### 2.3.6 Results

Patients` demographic characteristics are summarized in Table 1. The collected raw data (PK, pain scores and EPCA consumptions) over time are represented in Figure 1.

Neostigmine plasma concentrations were measured in the first five patients (2 from the 0.5 mg and 1 mg groups and one from the 1.5 mg group) but all concentrations were lower than the sensitivity of the assay. As such, no plasma draws were sampled in subsequent patients. A total of 93 neostigmine CSF concentrations were available for the PK analysis. The initial graphical exploration of neostigmine concentration-profiles over time showed an absorption phase followed by a decline in all dose groups. Concentrations were measurable up to 10 h after the injection. The selected base model was a one-compartment PK model with first order absorption and a lag time and a combined mixed error model. No evidence of dose-dependent PK was noted as demonstrated by the likelihood ratio tests. The first-order absorption rate was fixed to a value estimated from previous runs to stabilize the model.

Covariate analysis detected a significant sex effect on clearance. The clearance in men was 1.9 fold higher than the clearance estimated in women. To investigate potential confounding effect between the sex, weight and dose effects, models having an allometric weight effect on CL/F and V/F and a dose effect on CL/F were tested and the sex effect on CL/F remained significant and was estimated to be 1.6 times the CL/F in women. The 95 % bootstrap confidence intervals of the sex effect on CL/F was 0.9-3 and contained the null value of 1 which reflects the lack of power and uncertainty due to small sample size.

The parameters of the final PK model (population estimates, relative standard errors from bootstrap) are presented in Table 2. The residual variability was small and acceptable: 20.7 % proportional and a very small additive component that was later fixed to a small value of 0.001. CL/F and V/F were 3.3 L/h and 11.6 L, respectively. The interindividual variabilities expressed as a coefficient of variation were 72.3, 56.4 and 46.9 % for Ka, CL/F and V/F,

respectively. The absorption half-life was fixed to 0.43 hours, based on values from previous runs, while the lag time was around 7 minutes. The terminal phase half-life was 2.4 and 1.3 h for women and men, respectively. Overall the confidence intervals were relatively wide as a result of the small number of subjects participating in this study. The goodness of fit plots of the final model are shown in Figure 2 and the performance of the visual predictive check is shown in Figure 3. The model fitted the data reasonably well and was able to generate simulated data consistent with the original data.

Patients from the 0.5, 1 and 1.5 mg groups had a suitable analgesia, although the NAS scores were lower in the neostigmine 1.5 mg group during exercise compared to the neostigmine 0.5 and 1 mg groups (Figure 4). The overall pattern for meperidine consumption and cumulative dose requirements, were similar in the three groups. However, the neostigmine 1.5 mg group required a lesser consumption at 24 h after surgery compared to the 0.5 and 1 mg groups ( $81.4 \text{ mg} \pm 55$  vs  $112 \text{ mg} \pm 84.1$  and  $108.6 \text{ mg} \pm 52.2$ , respectively,  $p < 0.05$ ) (Figure 5).

Exploratory figures of CSF neostigmine concentrations with NAS pain scores at rest or during exercise as well as with cumulative meperidine EPCA consumption were not clear (Figure 6). As such, PK/PD concentration–effect modeling was not pursued.

After neostigmine injection, variations of heart rate, systolic, diastolic and mean arterial blood pressures were comparable in the three groups during the pre-operative (0-15 min) period. However, during the postoperative (0 – 60 min) period, blood pressure was higher in the neostigmine 1.5 mg group as compared to the neostigmine 0.5 and 1 mg groups; respectively (MAP, mean  $\pm$  SD (range),  $103.7 \pm 14.3$  (80.2-133.1) mmHg vs  $86.8 \pm 3.7$  (80.8-89.9) mmHg and  $86.7 \pm 7.3$  (78.3-96.2) mmHg;  $p < 0.05$ ). Blood pressure elevation lasted for approximately two hours and by the time patients returned on floor it subsided with no treatment. In the 1.5 mg group, treatment was withheld for two patients whose postoperative blood pressures went up to 205/110 and 175/113 mmHg. These two patients

were still painful, had no known previous hypertension and their preoperative pressures in the operating room were 198/95 and 160/80 mmHg, respectively. No other differences could be shown regarding the incidence of perioperative hypertension and its treatment, or the incidence or severity of nausea and vomiting which seemed well controlled with usual medication. One patient with headaches needed a blood patch at postoperative day 3. Neither pupil size, nystagmus, sialorrhea nor bradycardia were of particular concern.

### 2.3.7 Discussion

The flexibility of the epidural route is better suited than the IT route to be a part of a multimodal optimized regimen for postoperative analgesia. There are no reports in the literature that studied the pharmacokinetics (PK) of neostigmine after epidural injection.

Our study investigated the pharmacokinetics of neostigmine after epidural injection and to explore its exposure-response relationship. A dose as high as 1.5 mg was tested because it was hypothesized to be on the higher end of the exposure-response curve. There are no reports in the literature that described the PK of neostigmine after epidural injection. The only available information about the PK of neostigmine in the CSF is from a study after an intrathecal injection of 50  $\mu\text{g}$  - 750  $\mu\text{g}$  [8]. That study had a lower limit of quantification (0.5 ng/mL) and could fit a three-compartment model to the data with a long terminal half-life of 28 hours. Although our data did not have measurable concentrations beyond 10 hours and only supported a one-compartment model, it was adequate to characterize the overall exposure as the slow terminal phase have very little contribution (< 1%) to the area under the curve [8]. Our data also showed that the PK of epidural neostigmine remained linear up to a 1.5 mg dose.

Should we compare our estimated apparent CL/F of 3.3 L/h to the one reported after intrathecal injection of 0.13 L/h, we may conclude that the bioavailability after epidural injection is around 4 %. In addition, our maximal observed CSF neostigmine concentration after a 1.5 mg epidural dose was 96.51 ng/mL while it was 7342 ng/mL in a patient receiving a 500  $\mu\text{g}$  dose in the Shafer et al. study [8]. This further confirms the low bioavailability of epidural neostigmine which is expected for molecules containing a positively charged quaternary ammonium.

The between subject variability in PK parameters were very high and may be due in part to the variability of the insertion point of the intrathecal catheter with respect to the level of epidural injection. The high PK variability and high dependency of concentration on the site of CSF sampling explain the difficulty to conduct PK/PD modeling [8].

Although previous reports suggested that a 100 µg or less is enough for postoperative analgesia when neostigmine is used with combination to other adjunct analgesics [11], we showed that the highest dose group of 1.5 mg had resulted in significantly lower mepiridine consumption at 24 h. However, this was at the expense of an unexpected adverse event: hypertension as evidenced by a significant elevation of the mean arterial pressure. The maximum previously tested epidural dose of 0.75 mg was in labor analgesia [25] and proved to be safe. This suggests the maximal clinically acceptable epidural neostigmine dose is between 1 and 1.5 mg. Our findings paves the way to conducting a larger trial where doses up to 1 mg neostigmine can be tested to assess its effect on pain and opioid consumption.

In conclusion, neostigmine has a promising opioid sparing effect. More studies with direct comparisons between lipophilic opioids and neostigmine are needed for efficacy and safety, before establishing neostigmine as a key player in epidural postoperative pain management. Once an effective initial bolus dose of epidural neostigmine is established, bolus reinjections or continuous infusion will need to be considered should the duration of action be shorter than needed.



**Acknowledgement**

The authors would like to thank Kevin Boivin for his assistance in sample and data collection and Mrs Johanne Couture for HPLC analysis.

**Table 1 Patients' demographic characteristics**

<b>Neostigmine group</b>	<b>0.5 mg n = 5</b>	<b>1 mg n = 5</b>	<b>1.5 mg n = 5</b>
Age (years)	62 ± 4.1	64 ± 5.4	64 ± 7.6
Weight (kg)	66 ± 10.8	69 ± 7.8	72 ± 2.7
Height (cm)	164 ± 5.9	172 ± 8.4	167 ± 12
Sex (men/women)	2/3	3/2	4/1
ASA (I/II/III)	3/1/1	2/3/0	2/3/0
General anesthesia	3	3	3
Sedation	2	2	2

Reported values are means ± (standard deviation) for continuous variables and the number of patients for categorical variables.

ASA is « American Society of Anesthesiologists » status.

**Table 2 Pharmacokinetic parameters and associated confidence intervals**

	Typical Population Value (RSE% <sup>a</sup> )	Bootstrap Median	Lower 95% CI <sup>b</sup>	Upper 95% CI <sup>b</sup>
Ka <sup>c</sup> (h <sup>-1</sup> )	1.6	-	-	-
BSV <sub>Ka</sub> <sup>d</sup> (%)	72.3 (36.0)	83.0	52.2	151.7
LAG (min)	6.7 (29.6)	7.0	4.6	12.8
CL/F (L/h)	3.3 (27.2)	3.4	2.0	5.8
BSV <sub>CL/F</sub> <sup>d</sup> (%)	56.4 (22.4)	49.3	27.3	70.5
V/F (L)	11.6 (15.8)	11.0	8.0	14.4
BSV <sub>V/F</sub> <sup>d</sup> (%)	46.9 (49.9)	58.5	27.3	130.6
SEX effect on CL/F	1.9 (11.2)	1.6	0.9	3.0
Add error <sup>e</sup> (ng/mL)	0.001	-	-	-
Prop error <sup>f</sup> (%)	20.7 (5.4)	19.5	15.1	23.5

Add error: additive error, BSV: between subject variability for the subscribed pharmacokinetic parameter, CL/F: apparent clearance, Lag: absorption lag time, Ka: first-order absorption rate, Prop: proportional error, V/F: apparent central volume of distribution.

<sup>a</sup> RSE (%): relative standard error in percentage.

<sup>b</sup> The 95 % confidence intervals (CI) are calculated from the 2.5 % and 97.5 % percentiles of the bootstrap distribution from 1000 replicates.

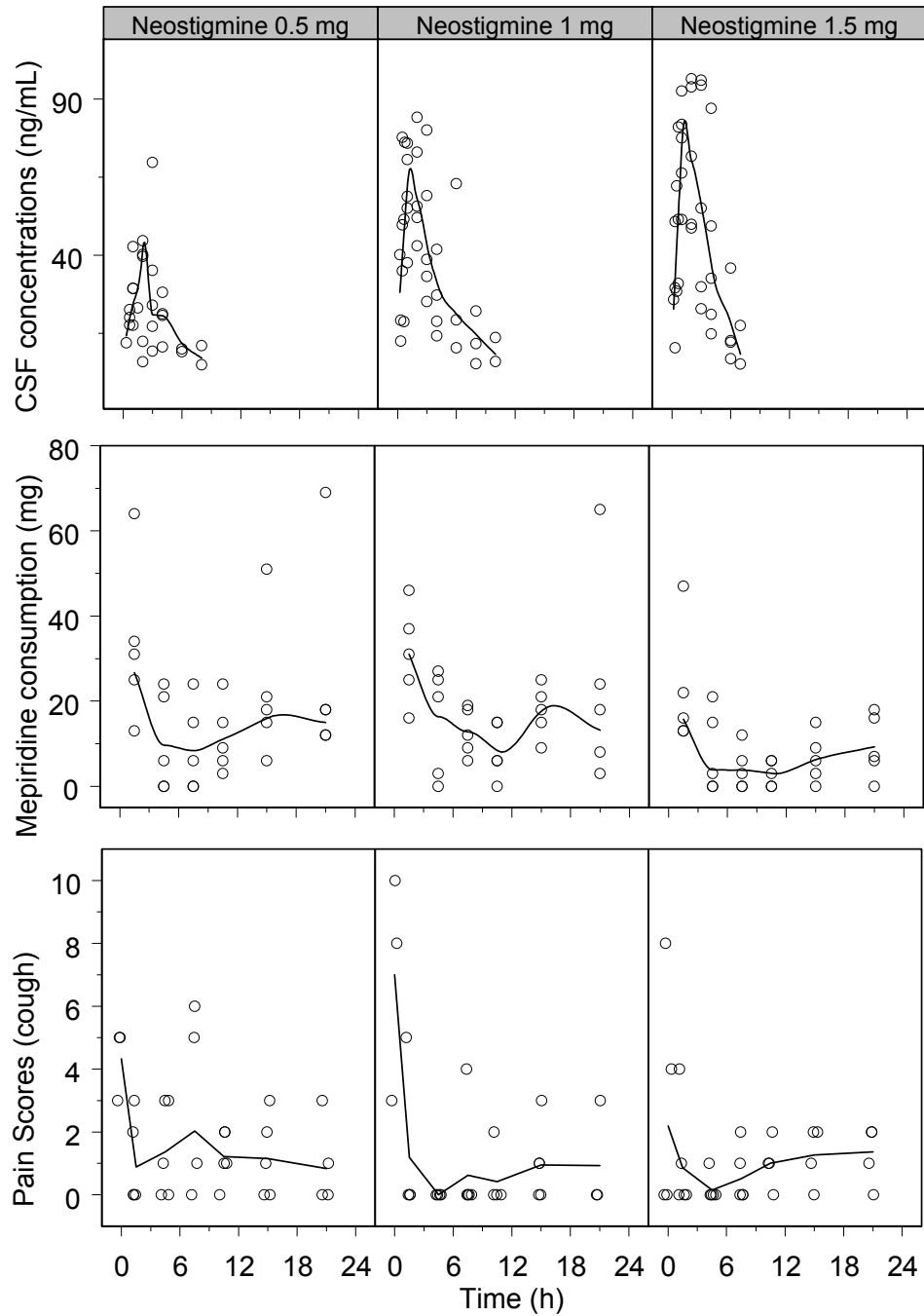
<sup>c</sup> Ka has been fixed in order to stabilize the model.

<sup>d</sup> BSV is given as an approximate coefficient of variation calculated from the square root of estimated variance.

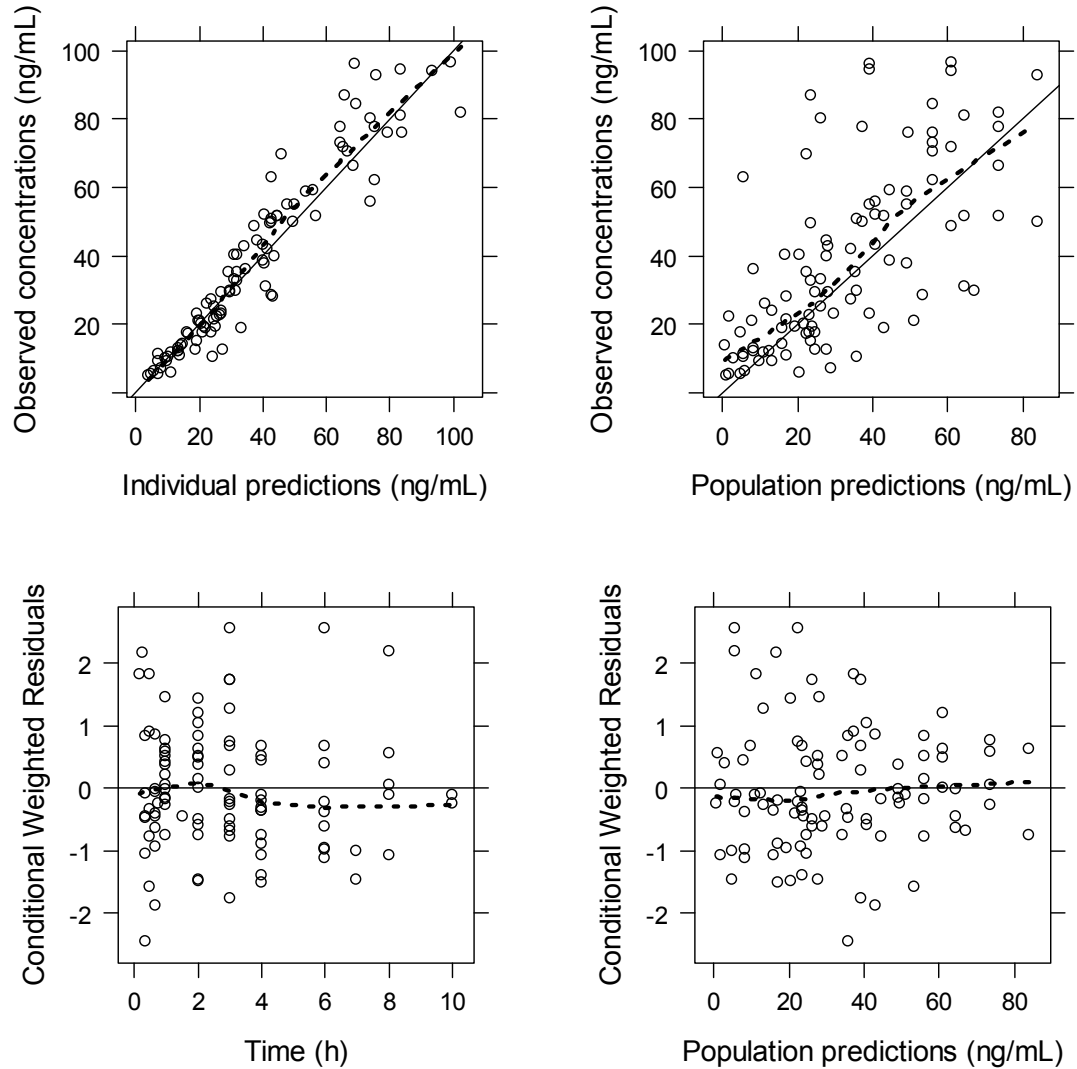
<sup>e</sup> Residual additive error is given as standard deviation and was fixed to stabilize the model.

<sup>f</sup> Residual proportional error is given as an approximate coefficient of variation.

**Figure 1 Observed Pharmacokinetic and pharmacodynamic data**

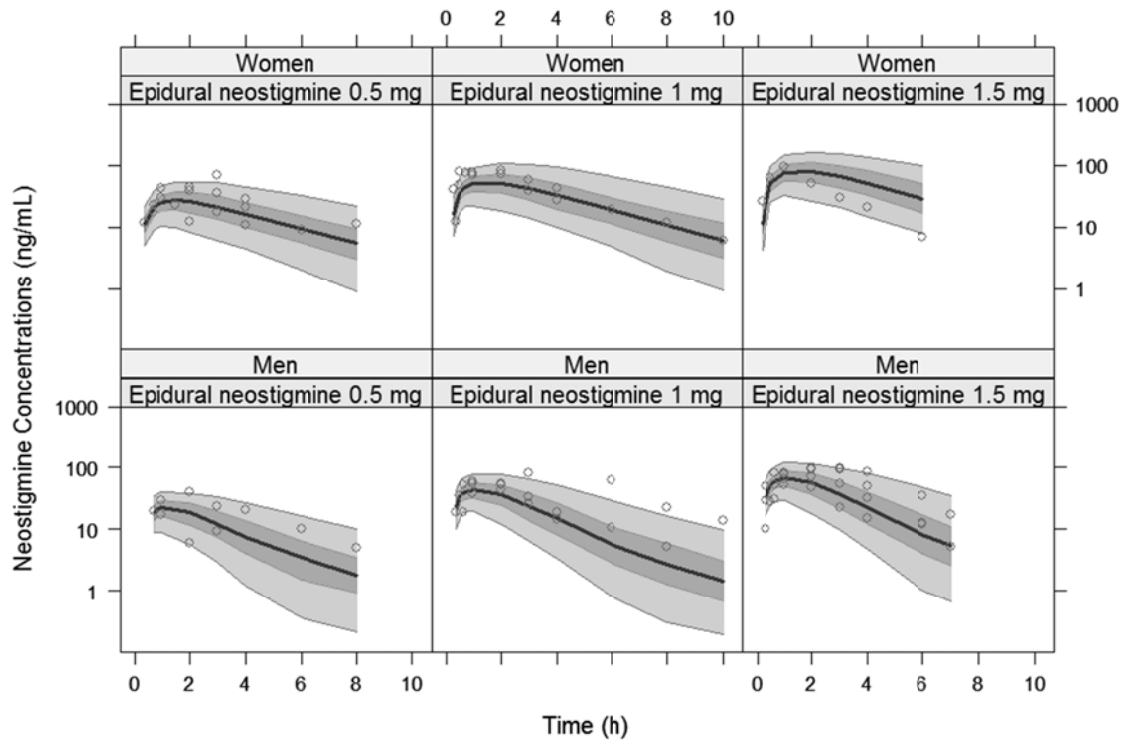


**Solid lines are local smooth lines that help to capture the trends in the data.**

**Figure 2 Goodness of fit plots of the final POP PK model**

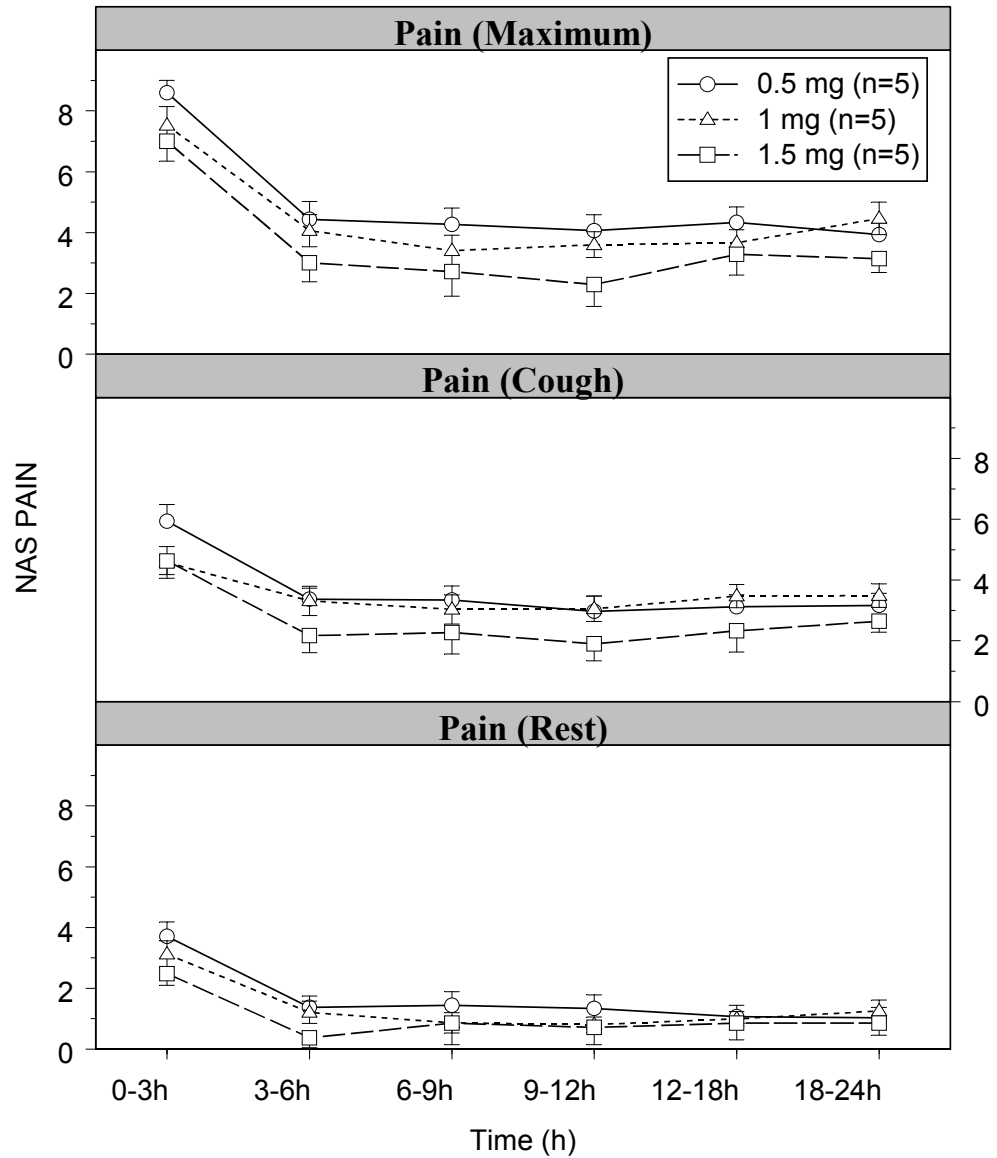
The heavy broken lines are smooths (LOESS) of the ordinate values. Identity or zero lines are shown as solid lines within each plot to ease the interpretation of the plots.

**Figure 3 Visual predictive check of the final POP PK model**



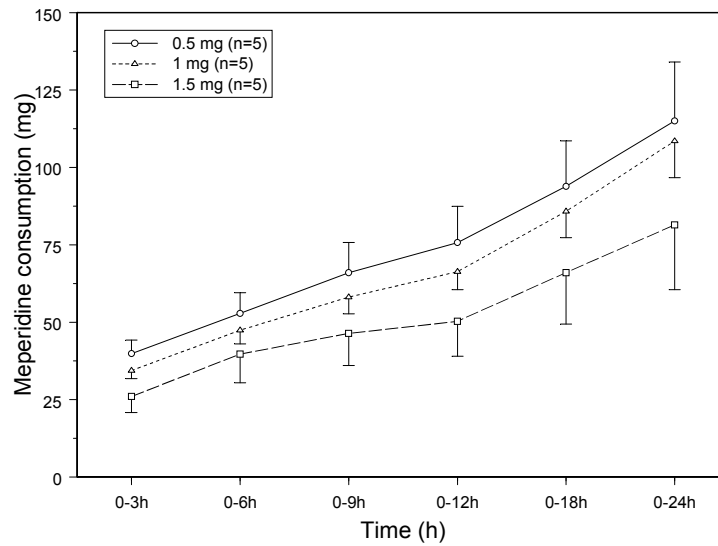
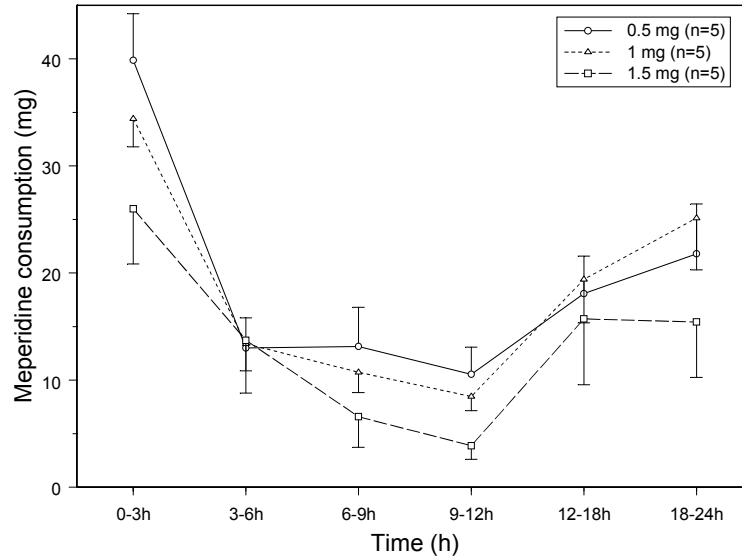
Observed concentrations are shown in open circles. Prediction intervals are depicted using the dark gray areas (25<sup>th</sup> to 75<sup>th</sup> percentiles) and the gray areas (5<sup>th</sup> to 95<sup>th</sup> percentiles). Solid lines represent the median of the simulated predictions.

**Figure 4 Mean pain scores (Maximum, Cough and Rest)  
over time by treatment group**



The symbols and the bars represent the data means  $\pm$  standard errors

**Figure 5 Mean mepiridine consumption over time by treatment group**



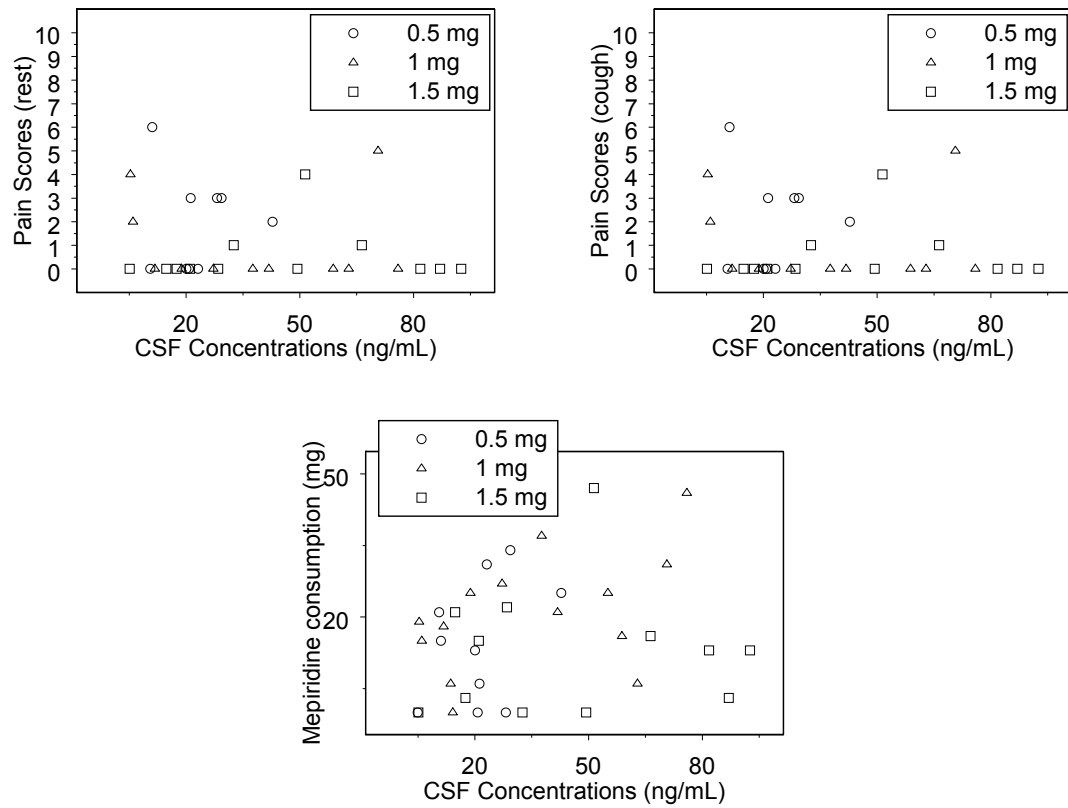
**The symbols and the bars represent the data means  $\pm$  standard errors.**

**The upper panel represents mepiridine consumption at each time interval.**

**The lower panel represents cumulative mepiridine consumption over time.**



**Figure 6 Exploratory correlations of CSF PK concentrations and pharmacodynamic endpoints**



## REFERENCES

1. Yaksh, T.L., R. Dirksen, and G.J. Harty, *Antinociceptive effects of intrathecally injected cholinomimetic drugs in the rat and cat*. Eur J Pharmacol, 1985. **117**(1): p. 81-8.
2. Bouaziz, H., C. Tong, and J.C. Eisenach, *Postoperative analgesia from intrathecal neostigmine in sheep*. Anesth Analg, 1995. **80**(6): p. 1140-4.
3. Gordh, T., Jr., et al., *Interactions between noradrenergic and cholinergic mechanisms involved in spinal nociceptive processing*. Acta Anaesthesiol Scand, 1989. **33**(1): p. 39-47.
4. Lauretti, G., *The clinical use of intrathecal neostigmine*. Regional Anesthesia, 1996.
5. Eisenach, J.C., et al., *Cerebrospinal fluid norepinephrine and acetylcholine concentrations during acute pain*. Anesthesia and analgesia, 1996. **82**(3): p. 621-6.
6. Gillberg, P. and H. Askmark, *Changes in cholinergic and opioid receptors in the rat spinal cord, dorsal root and sciatic nerve after ventral and dorsal root lesion*. J Neural Transm, 1991. **85**: p. 31-39.
7. Hwang, J.H. and D.M. Lee, *The antiallodynic effect of intrathecal edrophonium and neostigmine in a rat model of neuropathic pain*. Anesthesiology, 1997. **87**(3A): p. A819.
8. Shafer, S.L., et al., *Cerebrospinal fluid pharmacokinetics and pharmacodynamics of intrathecal neostigmine methylsulfate in humans*. Anesthesiology, 1998. **89**(5): p. 1074-88.
9. Bouaziz, H., C. Hewitt, and J.C. Eisenach, *Subarachnoid neostigmine potentiation of alpha 2-adrenergic agonist analgesia. Dexmedetomidine versus Clonidine*. Reg Anesth, 1995. **20**(2): p. 121-7.
10. Collins, J.G., *Spinally administered neostigmine--something to celebrate*. Anesthesiology, 1995. **82**(2): p. 327-8.

11. Eisenach, J.C., *Epidural neostigmine: will it replace lipid soluble opioids for postoperative and labor analgesia?* Anesthesia and analgesia, 2009. **109**(2): p. 293-5.
12. Eisenach, J.C., D.D. Hood, and R. Curry, *Phase I human safety assessment of intrathecal neostigmine containing methyl- and propylparabens.* Anesthesia and analgesia, 1997. **85**(4): p. 842-6.
13. Hood, D.D., J.C. Eisenach, and R. Tuttle, *Phase I safety assessment of intrathecal neostigmine methylsulfate in humans.* Anesthesiology, 1995. **82**(2): p. 331-43.
14. Lauretti, G., A. Kitayama, and A. Reis, *A Randomized Double-Blind Prospective Study of Intrathecal Neostigmine in Orthopedic Surgery.* Regional Anesthesia, 1996. **21**(2S): p. 76.
15. Hye, M.A., et al., *Intrathecal neostigmine for postoperative analgesia in caesarean section.* Mysensingh medical journal : MMJ, 2010. **19**(4): p. 586-93.
16. Lauretti, G.R., et al., *Intrathecal neostigmine for postoperative analgesia after orthopedic surgery.* Journal of Clinical Anesthesia, 1997. **9**(6): p. 473-7.
17. Lauretti, G.R., et al., *A multi-center study of intrathecal neostigmine for analgesia following vaginal hysterectomy.* Anesthesiology, 1998. **89**(4): p. 913-8.
18. Krukowski, J.A., et al., *Intrathecal neostigmine for post-caesarean section analgesia: dose response.* Anesthesia and analgesia, 1997. **84**(6): p. 1269-75.
19. Liu, S., et al., *Dose-response effects of spinal Neostigmine added to bupivacaine spinal anesthesia in volunteers.* Anesthesiology, 1999. **90**: p. 710-717.
20. Chen, B.X., et al., *Analgesic effect of epidural neostigmine in human.* Anesth Analg, 1998. **86**(2S): p. S264.
21. Lauretti, G., et al., *Study of three different doses of epidural neostigmine coadministered with lidocaine for post operative analgesia.* Anesthesiology, 1999. **90**: p. 1534-38.
22. Roelants, F. and P.M. Lavand'homme, *Epidural neostigmine combined with sufentanil provides balanced and selective analgesia in early labor.* Anesthesiology, 2004. **101**(2): p. 439-44.

23. Yamaguchi, H., et al., *Effective doses of epidural morphine for relief of postcholecystectomy pain*. *Anesthesia and analgesia*, 1991. **72**(1): p. 80-3.
24. Varin, F., J. Couture, and H. Gao, *Determination of neostigmine in human plasma and cerebrospinal fluid by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection*. *Journal of chromatography B*, 1999. **723**: p. 319-323.
25. Roelants, F., P.M. Lavand'homme, and V. Mercier-Fuzier, *Epidural administration of neostigmine and clonidine to induce labor analgesia: evaluation of efficacy and local anesthetic-sparing effect*. *Anesthesiology*, 2005. **102**(6): p. 1205-10.

### 3 Discussion et Conclusion

La douleur post-opératoire est la douleur la plus répandue [3, 4] et reste un défi important pour les cliniciens [209]. Elle peut toucher jusqu'à 80% des patients subissant une chirurgie [6] et constitue une des causes primaires de réadmission en hôpital après les chirurgies d'un jour [210]. Une clinique de soins pour la douleur efficace comporte une équipe multidisciplinaire supervisée par des anesthésistes qui travaillent en collaboration avec les chirurgiens et les infirmières spécialisées en douleur. Un autre composante essentielle pour la réussite de cette unité de soin est l'éducation continue du patient et de l'équipe médicale [211]. Cette thèse inclut des travaux qui avaient pour but d'explorer les propriétés pharmacocinétiques des médicaments utilisés en analgésie post-opératoire à l'aide de la modélisation.

La pharmacométrie et l'analyse pharmacocinétique/pharmacodynamique sont reconnues comme des outils essentiels dans le développement du médicament et dans les décisions de mise en marché par les agences réglementaires [212]. En 1997, Lewis Sheiner, le pionnier de l'approche populationnelle, a présenté et contrasté deux étapes très différentes et très importantes dans la compréhension des effets des médicaments et leurs applications au développement des médicaments : « learning versus confirming » ou apprentissage *versus* confirmation [213]. Cette publication importante a bouleversé la façon de concevoir le développement du médicament et a mené à un changement de mentalité. En bref, apprendre consiste, en premier lieu, à formuler des hypothèses et des modèles sur des phénomènes physiologiques et pharmacologiques complexes et, en deuxième lieu, à collecter des données riches en information. Des données extensives et adéquatement interprétées, aident à quantifier et à comprendre les phénomènes impliqués et fournissent les informations nécessaires pour planifier l'étude confirmatoire définitive. L'objectif d'une étude de confirmation sera de répondre à une hypothèse de recherche simple en se basant sur un test statistique approprié. L'application de ce principe pourra même mener à l'acceptation d'un médicament en se basant sur une étude de phase III au lieu de deux [214]. Souvent, le développement d'un médicament échoue en phase III à cause d'un

manque d'apprentissage dans les phases antérieures du développement et de la mauvaise formulation des facteurs confondants. En analgésie post-opératoire, il y a encore beaucoup à apprendre; les études incluses dans cette thèse étaient exploratoires et avaient pour but de générer des informations qui seront nécessaires dans le futur pour des devis de confirmation.

Beaucoup d'information concernant la pharmacocinétique des médicaments utilisés en analgésie post-opératoire est encore nécessaire. Comprendre la pharmacocinétique constitue la première étape avant de pouvoir faire le lien entre la pharmacocinétique et la pharmacodynamie afin d'optimiser les traitements disponibles. Dans un cas classique de pharmacocinétique, les concentrations plasmatiques précèdent et corrént éventuellement avec la pharmacodynamie. Ceci n'est pas le cas pour les médicaments étudiés dans cette thèse puisque ces derniers sont déposés près de leur site d'action et un effet local est recherché.

Dans les cas des anesthésiques locaux utilisés pour bloquer les nerfs périphériques, les concentrations plasmatiques sont en aval du site d'action. Ce qu'on observe dans le plasma a déjà quitté le site d'action et la corrélation avec l'effet ne peut se faire qu'indirectement. Les techniques pour échantillonner autour du nerf (biophase) ne sont pas encore mises au point. Le modèle animal qu'on a proposé a essayé de paver le chemin pour rendre réalisables les prochaines études. Par contre, dans le cas de la néostigmine épidurale, bien que les concentrations plasmatiques n'aient pas été mesurables, les concentrations au site d'action de la néostigmine, le liquide céphalo-rachidien, étaient disponibles. Échantillonner ce liquide biologique et quantifier la néostigmine présentaient un défi.

La première partie de cette thèse avait pour objectif de mieux comprendre la pharmacocinétique de la ropivacaïne et bupivacaïne après le bloc combiné des nerfs fémoral et sciatique, bloc couramment utilisé en chirurgie orthopédique. Pour ce faire, une étude clinique échantillonnant les concentrations plasmatiques jusqu'à 32 h après administration a été conçue. Au mieux de nos connaissances, cette étude est la première à inclure un échantillonnage pharmacocinétique aussi extensif. Nos résultats ont démontré

que la pharmacocinétique est complexe à cause des enjeux locorégionaux aux alentours des nerfs qui rendent l'absorption systémique biphasique avec une portion rapide et une autre lente. La portion lente de l'absorption contrôle le déclin des concentrations plasmatiques qui restent mesurables et significatives même à 32 h après le bloc. Il est connu depuis longtemps que l'absorption à partir de ces nerfs peut être très lente [120] mais cette étude est la première à tenter d'en quantifier la vitesse et à démontrer que l'absorption n'est pas terminée après 32 h. Les demi-vies d'absorption de la ropivacaïne et de la bupivacaïne ont été estimées de 24.5 et 44 h, respectivement. Ceci suggère que l'échantillonnage devrait aller jusqu'à 4 ou même 5 jours après administration afin d'atteindre la fin de l'absorption. L'injection simultanée de l'anesthésique local près de deux nerfs différents a rendu la pharmacocinétique encore plus complexe et difficile à caractériser. Une autre source possible de variabilité qui aurait pu être prévenue était l'utilisation de l'échographie en plus de la neurostimulation pour guider l'injection de l'anesthésique local. Ces limites ont été prévenues dans la conception de la continuation des travaux de recherche mené par professeur France Varin. Depuis la rédaction de mes travaux, la nouvelle étude est maintenant publiée [215] et les résultats confirment nos hypothèses. Cette nouvelle étude a utilisé 100 mg (20 mL) de ropivacaïne pour un bloc du nerf fémoral et l'échantillonnage pharmacocinétique s'est étalé jusqu'à 93 h après l'administration de la dose. L'absorption après bloc du nerf fémoral était biphasique et complexe : une première phase rapide impliquant 35 % de la dose absorbée par un processus gaussien inverse avec un temps d'absorption moyen de 0.4 h suivie par une phase plus lente avec une vitesse qui dépend du temps avec un temps pour atteindre la moitié de la vitesse maximale de 22 h.

La bupivacaïne et la ropivacaïne ont présenté des concentrations plasmatiques maximales allant de 0.12 à 1.1 mg/L et de 0.44 à 1.44 mg/L, respectivement. Ces concentrations sont dans les limites de concentrations veineuses tolérables et sécuritaires (< 2 mg/L) [111] et nos simulations ont démontré que la probabilité de dépasser 2 mg/L est très minime (< 1%). La pharmacocinétique plus rapide de la ropivacaïne peut être à l'origine de la résolution plus rapide des blocs moteurs et sensorielles et l'utilisation plus importante de la morphine chez ces patients [216]. Ceci suggère qu'un lien entre la

pharmacocinétique locorégionale et la pharmacodynamie existe et notre étude ouvre la porte à l'utilisation de doses plus élevées que 200 mg (40 mL d'une solution à 5%) si une augmentation de l'effet pharmacodynamique est recherchée.

Une autre limite de cette étude était l'impossibilité de construire un modèle PK/PD puisque le devis n'avait pas été conçu en fonction de cet objectif. L'étude a proposé une méthode d'évaluation différente de l'installation et de la résolution des blocs moteurs et sensitifs. Une évaluation quantitative et sélective des fibres C de la douleur ou des fibres A $\delta$  de la motricité est possible par électro-neurostimulation [217-219] et peut constituer un outil important dans les études futures.

Durant mon doctorat, j'ai eu accès aux données de deux autres études cliniques sur la ropivacaïne administrée en bloc du psoas en utilisant une infusion continue [220] et en bloc paravertébral [221], mais la quantité et la qualité des données disponibles n'ont pas permis une modélisation pharmacocinétique. L'absorption très variable et les concentrations qui fluctuent et peuvent osciller selon la mobilisation du patient ont généré des données difficilement réconciliables sous un même modèle. Ceci nous a confirmé que la pharmacocinétique des anesthésiques locaux après un bloc des nerfs périphériques représente beaucoup de défis et requiert une planification minutieuse et basée sur des études préliminaires exploratoires.

Notre étude après bloc combiné de nerfs fémoral et sciatique a souligné les limites de l'état des connaissances actuelles. Elle a généré les informations nécessaires pour entreprendre un meilleur devis expérimental qui aidera à caractériser la pharmacocinétique des anesthésiques locaux après les blocs de nerfs périphériques. Nous avons suggéré qu'un devis optimal sera d'administrer un anesthésique local différent pour le bloc de chaque nerf, ou d'entreprendre une étude avec un bloc simple, et d'échantillonner le plus longtemps possible avant que le patient ne quitte l'hôpital (4 à 5 jours selon la chirurgie). Ceci a été réalisé et confirmé par les résultats d'une nouvelle étude menée par professeur Varin [215]. Autres facteurs à considérer seront la mesure des concentrations de l' $\alpha$ -<sub>1</sub>-glycoprotéine acide ainsi que le temps de la physiothérapie ou de la mobilisation des patients puisque ceci



peut accélérer le relargage de l'anesthésique local à partir du dépôt près du nerf. Idéalement, une unité de mesure quantitative de la douleur devra être utilisée pour l'installation et la résolution de l'effet analgésique afin de pouvoir construire un modèle PK/PD. Les autres médicaments utilisés chez ces patients dans le cadre de l'analgésie multimodale devraient être bien documentés et précisés afin de pouvoir séparer l'effet des anesthésiques locaux.

Bien que la recherche clinique soit l'étape définitive pour la confirmation de l'utilité et l'efficacité des médicaments, la recherche préclinique permet d'aller plus loin dans la compréhension des phénomènes et rend le développement du médicament plus efficace [222]. La deuxième partie de cette thèse consistait à développer un modèle animal pour la ropivacaïne administrée pour un bloc fémoral. Ce volet exigeait d'abord de caractériser la pharmacocinétique intraveineuse de la ropivacaïne chez le lapin et son degré de liaison aux protéines plasmatiques. Le but ultime sera d'établir un modèle animal qui va pouvoir déterminer les concentrations de l'anesthésique local au site d'action par microdialyse tel que rapporté auparavant pour mesurer l'anesthésique libre dans le cerveau de rat [223] et dans le liquide céphalo-rachidien chez les lapins [224]. La microdialyse est une technique de plus en plus utilisée pour mesurer les concentrations libres aux sites difficiles d'accès [200, 225].

La pharmacocinétique de la ropivacaïne chez le lapin était biexponentielle avec un temps de demi-vie de la phase terminale de 83 min. La fraction non liée aux protéines plasmatiques s'est avérée entre 58 à 72 %. Ces informations aideront à planifier les prochaines expériences de microdialyse qui permettraient de mesurer les concentrations périneurales. Les concentrations, proches du site d'action, devraient corrélérer mieux avec l'effet et permettront d'identifier la relation concentration-effet. La liaison de la ropivacaïne aux protéines chez l'homme est quasi-complète et est de 99% [135]. Cette différence sera considérée lors de transposition des expériences de microdialyse chez l'homme. L'utilisation de microdialyse chez les patients devient de plus en plus courante [226-228] et

offre des possibilités intéressantes dans la caractérisation de la relation PK/PD des anesthésiques locaux en blocs de nerfs périphériques.

Les doses utilisées dans notre étude exploratoire chez le lapin ont généré des concentrations proches des limites de concentrations artérielles sécuritaires chez l'homme soit 0.340-0.850 mg/L [111]. La concentration artérielle la plus élevée observée était de 5.15 mg/L et résulterait en une concentration libre de 3.7 mg/L en assumant une fraction libre de 72%. Bien qu'aucune toxicité n'ait été observée, on suggère néanmoins de ne pas dépasser la dose de 2.5 mg/kg dans les études futures.

La prochaine étape dans le modèle animal sera d'étudier la pharmacocinétique après administration péri-neurale et d'isoler la vitesse d'absorption complexe par déconvolution [108]. De plus, mesurer les concentrations locorégionales par microdialyse permettra de les corréler avec la vitesse d'absorption ou du relâchement à partir du nerf et à établir la relation PK/PD entre concentrations locorégionales et effets analgésiques [229]. Ce nouveau devis donnera les informations nécessaires pour entreprendre des expériences de microdialyse chez l'homme dans de nouveaux sites anatomiques tel que le nerf sciatique ou fémoral. Les résultats préliminaires de la continuation des travaux sont prometteurs avec la réussite de la mise au point d'une technique de microdialyse [230].

La troisième partie de cette thèse a étudié la pharmacocinétique de la néostigmine par administration épidurale chez les patients subissant des chirurgies abdominales. La néostigmine par administration spinale, bien que directement administrée au site d'action, a présenté beaucoup d'effets secondaires notamment des nausées et vomissements [164, 231-233]. Dans la littérature, on trouve des études qui ont essayé d'établir la courbe dose réponse de la néostigmine épidurale utilisée avec des adjuvants comme le sufentanil (doses de néostigmine testées : 0.25, 0.5 et 0.75 mg) [207] ou comme la lidocaïne (doses de néostigmine testées : 1, 2 ou 4 µg/kg) [168]. Cependant ces résultats sont difficiles à réconcilier surtout en absence de données pharmacocinétiques. L'étude avec le sufentanil concluait que l'effet maximal est atteint avec la dose de 0.5 mg tandis que l'étude avec la lidocaïne n'avait pas pu trouver de différence entre les doses de néostigmine qui ont

prolongé l'analgésie de 3.5 h (groupe contrôle) à 8 h. Au mieux de nos connaissances, aucune étude n'avait étudié la pharmacocinétique de la néostigmine après administration épidurale. Notre hypothèse était que les doses des études antérieures n'étaient pas suffisantes et les effets pharmacodynamiques étaient confondus par l'utilisation des adjuvants. Ainsi, nous avons proposé une étude utilisant 0.5, 1 et 1.5 mg sans adjuvants en administration épidurale afin d'éliminer les facteurs confondants potentiels. Il était important de caractériser la pharmacocinétique qui pourrait expliquer les différences pharmacodynamiques éventuelles entre les doses. Notre étude a suggéré une relation dose réponse avec une dose maximale tolérée de 1.5 mg puisqu'elle a causé une élévation de la tension artérielle chez deux patients. En conclusion, la néostigmine s'est montrée comme un bon candidat thérapeutique capable de réduire l'utilisation des opioïdes en analgésie post-opératoire.

Les opioïdes, traitement de choix pour la douleur post-opératoire, ne sont pas sans effets secondaires [234] et peuvent même causer une prolongation de l'hospitalisation et des coûts [235]. Les cliniciens continuent à chercher des solutions pour diminuer leur utilisation et la recherche clinique essaie d'attaquer ce problème sur plusieurs fronts [236]: adjuvants (néostigmine, capsaïcine, kétamine, gabapentin), nouvelles formulations liposomales, nouvelles voie d'administration (ex. intranasale), nouvelles techniques (bloc de nerfs périphériques contrôlés par le patient) et nouvelles molécules comme le tapentadol qui a plusieurs mécanismes d'action: agonisme du récepteur opioïde ( $\mu$ ) et inhibition de la récapture de la norépinéphrine [237].

En conclusion, cette thèse a présenté des études de recherche explorant deux options thérapeutiques dans l'analgésie post-opératoire: les anesthésiques locaux pour les blocs de nerfs périphériques et la néostigmine comme adjuvant par voie épidurale. Ces travaux ont aidé à comprendre les particularités pharmacocinétiques des anesthésiques locaux et ont montré le relargage très lent à partir du site de dépôt près du nerf. En ce qui concerne la néostigmine, les travaux ont montré une tendance d'une relation dose-réponse et que la dose de 1.5 mg est trop élevée et cause des hypertensions.

## 4 Bibliographie

1. Gureje, O., et al., *Persistent pain and well-being: a World Health Organization Study in Primary Care*. JAMA : the journal of the American Medical Association, 1998. **280**(2): p. 147-51.
2. Phillips, C.J., [*Pain management: health economics and quality of life considerations*]. Drugs, 2003. **63 Spec No 2**: p. 47-50.
3. Carr, D.B. and L.C. Goudas, *Acute pain*. Lancet, 1999. **353**(9169): p. 2051-8.
4. Schug, S.A. and R.G. Large, *Economic considerations in pain management*. PharmacoEconomics, 1993. **3**(4): p. 260-7.
5. Keats, A.S., *Postoperative pain: research and treatment*. Journal of chronic diseases, 1956. **4**(1): p. 72-83.
6. Apfelbaum, J.L., et al., *Postoperative pain experience: results from a national survey suggest postoperative pain continues to be undermanaged*. Anesthesia and analgesia, 2003. **97**(2): p. 534-40, table of contents.
7. Raja, S.N. and T.S. Jensen, *Predicting postoperative pain based on preoperative pain perception: are we doing better than the weatherman?* Anesthesiology, 2010. **112**(6): p. 1311-2.
8. Perkins, F.M. and H. Kehlet, *Chronic pain as an outcome of surgery. A review of predictive factors*. Anesthesiology, 2000. **93**(4): p. 1123-33.
9. Wood, S., *Postoperative pain 1: understanding the factors affecting patients' experiences of pain*. Nursing times, 2010. **106**(45): p. 10-3.
10. Akkaya, T. and D. Ozkan, *Chronic post-surgical pain*. Agri : Agri, 2009. **21**(1): p. 1-9.
11. Nikolajsen, L., et al., *Chronic pain following total hip arthroplasty: a nationwide questionnaire study*. Acta anaesthesiologica Scandinavica, 2006. **50**(4): p. 495-500.

12. Wilder-Smith, O.H., et al., *Patients with chronic pain after abdominal surgery show less preoperative endogenous pain inhibition and more postoperative hyperalgesia: a pilot study*. *Journal of pain & palliative care pharmacotherapy*, 2010. **24**(2): p. 119-28.
13. Phillips, C.J. and C. Harper, *The economics associated with persistent pain*. *Current opinion in supportive and palliative care*, 2011. **5**(2): p. 127-30.
14. *Practice guidelines for acute pain management in the perioperative setting: an updated report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Acute Pain Management*. *Anesthesiology*, 2004. **100**(6): p. 1573-81.
15. *Practice guidelines for acute pain management in the perioperative setting. A report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Pain Management, Acute Pain Section*. *Anesthesiology*, 1995. **82**(4): p. 1071-81.
16. Gordon, D.B., et al., *American pain society recommendations for improving the quality of acute and cancer pain management: American Pain Society Quality of Care Task Force*. *Archives of internal medicine*, 2005. **165**(14): p. 1574-80.
17. *Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations. Pain management and assessment: an organizational approach*. . 2000: JCAHO publications.
18. *Canadian Institute for Health Information. Hip and Knee Replacements in Canada—Canadian Joint Replacement Registry (CJRR) 2008–2009 Annual Report*.
19. Kim, S., *Changes in Surgical Loads and Economic Burden of Hip and Knee Replacements in the United States*. *Arthritis Care & Research*, 2008. **59**(4): p. 481-488.
20. [cited 2011 3-May-2011]; Available from: <http://www.parl.gc.ca/Content/LOP/researchpublications/prb0582-e.htm#a8>.

21. Chelly, J.E., et al., *Continuous femoral blocks improve recovery and outcome of patients undergoing total knee arthroplasty*. The Journal of arthroplasty, 2001. **16**(4): p. 436-45.
22. Capdevila, X., et al., *Effects of perioperative analgesic technique on the surgical outcome and duration of rehabilitation after major knee surgery*. Anesthesiology, 1999. **91**(1): p. 8-15.
23. Horlocker, T.T., et al., *Analgesia for total hip and knee arthroplasty: a multimodal pathway featuring peripheral nerve block*. The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2006. **14**(3): p. 126-35.
24. Pagnano, M.W., J. Hebl, and T. Horlocker, *Assuring a painless total hip arthroplasty: a multimodal approach emphasizing peripheral nerve blocks*. The Journal of arthroplasty, 2006. **21**(4 Suppl 1): p. 80-4.
25. Wang, H., B. Boctor, and J. Verner, *The effect of single-injection femoral nerve block on rehabilitation and length of hospital stay after total knee replacement*. Regional anesthesia and pain medicine, 2002. **27**(2): p. 139-44.
26. Niesen, A.D. and J.R. Hebl, *Multimodal clinical pathways, perineural catheters, and ultrasound-guided regional anesthesia: the anesthesiologist's repertoire for the 21st century*. Minnesota medicine, 2011. **94**(3): p. 31-4.
27. Stephens, J., et al., *The burden of acute postoperative pain and the potential role of the COX-2-specific inhibitors*. Rheumatology, 2003. **42 Suppl 3**: p. iii40-52.
28. Costantini, R., et al., *Controlling pain in the post-operative setting*. International journal of clinical pharmacology and therapeutics, 2011. **49**(2): p. 116-27.
29. Heavner, J.E., *Let's abandon blanket maximum recommended doses of local anesthetics*. Regional anesthesia and pain medicine, 2004. **29**(6): p. 524.
30. McClellan, K.J. and D. Faulds, *Ropivacaine: an update of its use in regional anaesthesia*. Drugs, 2000. **60**(5): p. 1065-93.

31. Casati, A., et al., *The effects of the single or multiple injection technique on the onset time of femoral nerve blocks with 0.75% ropivacaine*. *Anesthesia and analgesia*, 2000. **91**(1): p. 181-4.
32. Casati, A., et al., *Interscalene brachial plexus anaesthesia with 0.5%, 0.75% or 1% ropivacaine: a double-blind comparison with 2% mepivacaine*. *British journal of anaesthesia*, 1999. **83**(6): p. 872-5.
33. Casati, A., et al., *Ropivacaine or 2% mepivacaine for lower limb peripheral nerve blocks. Study Group on Orthopedic Anesthesia of the Italian Society of Anesthesia, Analgesia, and Intensive Care*. *Anesthesiology*, 1999. **90**(4): p. 1047-52.
34. Rodgers, A., et al., *Reduction of postoperative mortality and morbidity with epidural or spinal anaesthesia: results from overview of randomised trials*. *BMJ*, 2000. **321**(7275): p. 1493.
35. Wu, C.L., et al., *Postoperative cognitive function as an outcome of regional anesthesia and analgesia*. *Regional anesthesia and pain medicine*, 2004. **29**(3): p. 257-68.
36. Bonica, J.J., *The need of a taxonomy*. *Pain*, 1979. **6**(3): p. 247-8.
37. Besson, J.M. and A. Chaouch, *Peripheral and spinal mechanisms of nociception*. *Physiological reviews*, 1987. **67**(1): p. 67-186.
38. Holzer, P. and U. Holzer-Petsche, *Pharmacology of inflammatory pain: local alteration in receptors and mediators*. *Digestive diseases*, 2009. **27 Suppl 1**: p. 24-30.
39. Ma, W. and R. Quirion, *Inflammatory mediators modulating the transient receptor potential vanilloid 1 receptor: therapeutic targets to treat inflammatory and neuropathic pain*. *Expert opinion on therapeutic targets*, 2007. **11**(3): p. 307-20.
40. de Souza, R.C., et al., *Different inflammatory mediators induce inflammation and pain after application of liquid nitrogen to the skin*. *Cryobiology*, 2006. **53**(3): p. 319-29.

41. Guirimand, F., *Physiologie de la douleur: données récentes*. Néphrologie, 2003. **24**(7): p. 401-407.
42. Beaulieu, P., ed. *Pharmacologie de la douleur*. 2005, Les Presses de l'Université de Montréal.
43. Treede, R.D., R.A. Meyer, and J.N. Campbell, *Myelinated mechanically insensitive afferents from monkey hairy skin: heat-response properties*. Journal of neurophysiology, 1998. **80**(3): p. 1082-93.
44. Ikoma, A., et al., *Neurophysiology of pruritus: interaction of itch and pain*. Archives of dermatology, 2003. **139**(11): p. 1475-8.
45. Stander, S., et al., *Neurophysiology of pruritus: cutaneous elicitation of itch*. Archives of dermatology, 2003. **139**(11): p. 1463-70.
46. Olausson, H., et al., *Unmyelinated tactile afferents signal touch and project to insular cortex*. Nature neuroscience, 2002. **5**(9): p. 900-4.
47. Manzano, G.M., L.M. Giuliano, and J.A. Nobrega, *A brief historical note on the classification of nerve fibers*. Arquivos de neuro-psiquiatria, 2008. **66**(1): p. 117-9.
48. Stoeckli, E.T., *Molecular mechanisms of growth cone guidance: stop and go?* Cell and tissue research, 1997. **290**(2): p. 441-9.
49. Häggström, M. *Anterior Dermatomes*. 2010; Available from: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dermatomes\\_and\\_cutaneous\\_nerves\\_-\\_anterior.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dermatomes_and_cutaneous_nerves_-_anterior.png).
50. Häggström, M. *Posterior Dermatomes*. 2010; Available from: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dermatomes\\_and\\_cutaneous\\_nerves\\_-\\_posterior.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dermatomes_and_cutaneous_nerves_-_posterior.png).
51. *Lower Member Dermatomes*. 2008; Available from: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gray826and831.PNG>.
52. Berde, C. and G. Strichartz, *Local Anesthetics*, in *Miller's Anesthesia, Volumes 1 and 2*, R.D. Miller, Editor. 2009, Churchill Livingstone: Philadelphia.



53. McDonald, T.V., K.R. Courtney, and W.T. Clusin, *Use-dependent block of single sodium channels by lidocaine in guinea pig ventricular myocytes*. Biophysical journal, 1989. **55**(6): p. 1261-6.
54. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*. The Journal of physiology, 1952. **117**(4): p. 500-44.
55. Matthews, G. *NEUROBIOLOGY, Molecules, Cells and Systems*. [cited 2011 24-July-2011]; Available from: <http://www.blackwellpublishing.com/matthews/actionp.html>.
56. Melzack, R. and P.D. Wall, *Pain mechanisms: a new theory*. Science, 1965. **150**(699): p. 971-9.
57. Millan, M.J., *Descending control of pain*. Progress in neurobiology, 2002. **66**(6): p. 355-474.
58. Basbaum, A.I. and H.L. Fields, *Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis*. Annals of neurology, 1978. **4**(5): p. 451-62.
59. Fields, H.L., M.M. Heinricher, and P. Mason, *Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits*. Annual review of neuroscience, 1991. **14**: p. 219-45.
60. Fields, H.L. and M.M. Heinricher, *Anatomy and physiology of a nociceptive modulatory system*. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 1985. **308**(1136): p. 361-74.
61. Coull, J.A., et al., *BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain*. Nature, 2005. **438**(7070): p. 1017-21.
62. Coull, J.A., et al., *Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain*. Nature, 2003. **424**(6951): p. 938-42.
63. Granot, M., *Can we predict persistent postoperative pain by testing preoperative experimental pain?* Current opinion in anaesthesiology, 2009. **22**(3): p. 425-30.

64. Traub, R.J., *Spinal modulation of the induction of central sensitization*. Brain research, 1997. **778**(1): p. 34-42.
65. Dickenson, A.H., *Gate control theory of pain stands the test of time*. British journal of anaesthesia, 2002. **88**(6): p. 755-7.
66. Aanonsen, L.M., S. Lei, and G.L. Wilcox, *Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord*. Pain, 1990. **41**(3): p. 309-21.
67. Dickenson, A.H., *Spinal cord pharmacology of pain*. British journal of anaesthesia, 1995. **75**(2): p. 193-200.
68. Levine, J.D., H.L. Fields, and A.I. Basbaum, *Peptides and the primary afferent nociceptor*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 1993. **13**(6): p. 2273-86.
69. Munoz, M. and R. Covenas, *NK-1 Receptor Antagonists: A New Paradigm in Pharmacological Therapy*. Current medicinal chemistry, 2011. **18**(12): p. 1820-31.
70. Urban, L., et al., *The effects of NK-1 and NK-2 receptor antagonists on the capsaicin evoked synaptic response in the rat spinal cord in vitro*. Regulatory peptides, 1993. **46**(1-2): p. 413-4.
71. Morton, C.R., et al., *Morphine and substance P release in the spinal cord*. Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale, 1990. **82**(1): p. 89-96.
72. Mika, J., I. Obara, and B. Przewlocka, *The role of nociceptin and dynorphin in chronic pain: Implications of neuro-glial interaction*. Neuropeptides, 2011.
73. De Potter, W.P., et al., *Noradrenergic neurons release both noradrenaline and neuropeptide Y from a single pool: the large dense cored vesicles*. Synapse, 1997. **25**(1): p. 44-55.
74. Reynolds, D.V., *Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation*. Science, 1969. **164**(878): p. 444-5.

75. Leith, J.L., et al., *Spinal processing of noxious and innocuous cold information: differential modulation by the periaqueductal gray*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2010. **30**(14): p. 4933-42.
76. Friedrich, A.E. and G.F. Gebhart, *Modulation of visceral hyperalgesia by morphine and cholecystinin from the rat rostroventral medial medulla*. Pain, 2003. **104**(1-2): p. 93-101.
77. Zhuo, M., J.N. Sengupta, and G.F. Gebhart, *Biphasic modulation of spinal visceral nociceptive transmission from the rostroventral medial medulla in the rat*. Journal of neurophysiology, 2002. **87**(5): p. 2225-36.
78. Le Bars, D., A.H. Dickenson, and J.M. Besson, *Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat*. Pain, 1979. **6**(3): p. 283-304.
79. Morgan, M.M., K.R. Gogas, and A.I. Basbaum, *Diffuse noxious inhibitory controls reduce the expression of noxious stimulus-evoked Fos-like immunoreactivity in the superficial and deep laminae of the rat spinal cord*. Pain, 1994. **56**(3): p. 347-52.
80. Ossipov, M.H., G.O. Dussor, and F. Porreca, *Central modulation of pain*. The Journal of clinical investigation, 2010. **120**(11): p. 3779-87.
81. Ho, K.Y., et al., *Duloxetine reduces morphine requirements after knee replacement surgery*. British journal of anaesthesia, 2010. **105**(3): p. 371-6.
82. Heinricher, M.M., et al., *Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity*. Brain research reviews, 2009. **60**(1): p. 214-25.
83. Eisenach, J.C., *Muscarinic-mediated analgesia*. Life sciences, 1999. **64**(6-7): p. 549-54.
84. Colvin, L. and J. McClure, *Anatomy and physiology of pain*, in *Principles and Practice of Regional Anesthesia (3rd)*, J. Wildsmith, E. Armitage, and J. McClure, Editors. 2002.

85. Yang, J., et al., *Misuse of the well-stirred model of hepatic drug clearance*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2007. **35**(3): p. 501-2.
86. Denson, D.D., et al., *Bupivacaine protein binding in the term parturient: effects of lactic acidosis*. Clinical pharmacology and therapeutics, 1984. **35**(5): p. 702-9.
87. Guengerich, F.P., *Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity*. The AAPS journal, 2006. **8**(1): p. E101-11.
88. Mega, J.L., et al., *Dosing clopidogrel based on CYP2C19 genotype and the effect on platelet reactivity in patients with stable cardiovascular disease*. JAMA : the journal of the American Medical Association, 2011. **306**(20): p. 2221-8.
89. Crews, K.R., et al., *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guidelines for codeine therapy in the context of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) genotype*. Clinical pharmacology and therapeutics, 2012. **91**(2): p. 321-6.
90. Wang, B., et al., *Genetic polymorphism of the human cytochrome P450 2C9 gene and its clinical significance*. Current drug metabolism, 2009. **10**(7): p. 781-834.
91. Leskela, S., et al., *Polymorphisms in cytochromes P450 2C8 and 3A5 are associated with paclitaxel neurotoxicity*. Pharmacogenomics J, 2011. **11**(2): p. 121-9.
92. Holford, N.H. and L.B. Sheiner, *Understanding the dose-effect relationship: clinical application of pharmacokinetic-pharmacodynamic models*. Clinical pharmacokinetics, 1981. **6**(6): p. 429-53.
93. Sharma, A. and W.J. Jusko, *Characteristics of indirect pharmacodynamic models and applications to clinical drug responses*. British journal of clinical pharmacology, 1998. **45**(3): p. 229-39.
94. Ruetsch, Y.A., T. Boni, and A. Borgeat, *From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetic drugs*. Current topics in medicinal chemistry, 2001. **1**(3): p. 175-82.
95. Hall, M., *"Coca koller". The beginning of local anesthesia*. Anesthesia progress, 1972. **19**(3): p. 65-7.

96. Gordh, T., *Lidocaine: the origin of a modern local anesthetic*. 1949. *Anesthesiology*, 2010. **113**(6): p. 1433-7.
97. Catterall, W.A. and K. Mackie, *Chapter 20: Local Anesthetics*, in *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12e*, L.L. Brunton, B.A. Chabner, and B.C. Knollmann, Editors. 2010 <http://www.accesspharmacy.com/content.aspx?aID=16665256>.
98. Denson, D.D., M.M. Behbehani, and R.V. Gregg, *Enantiomer-specific effects of an intravenously administered arrhythmogenic dose of bupivacaine on neurons of the nucleus tractus solitarius and the cardiovascular system in the anesthetized rat*. *Regional anesthesia*, 1992. **17**(6): p. 311-6.
99. Zink, W. and B.M. Graf, *The toxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine and levobupivacaine*. *Current opinion in anaesthesiology*, 2008. **21**(5): p. 645-50.
100. Scott, D.B., et al., *Acute toxicity of ropivacaine compared with that of bupivacaine*. *Anesthesia and analgesia*, 1989. **69**(5): p. 563-9.
101. Mazoit, J.X. and H. Beloeil, *Pharmacologie des anesthésiques locaux*, in *Pharmacologie de la douleur*, P. Beaulieu, Editor. 2005, Les presses de l'Université de Montréal.
102. Buckenmaier, C.C., 3rd and L.L. Bleckner, *Anaesthetic agents for advanced regional anaesthesia: a North American perspective*. *Drugs*, 2005. **65**(6): p. 745-59.
103. Santos, A.C., et al., *Comparative systemic toxicity of ropivacaine and bupivacaine in nonpregnant and pregnant ewes*. *Anesthesiology*, 1995. **82**(3): p. 734-40; discussion 27A.
104. Burm, A.G., *Clinical pharmacokinetics of epidural and spinal anaesthesia*. *Clinical pharmacokinetics*, 1989. **16**(5): p. 283-311.
105. Tucker, G.T., *Pharmacokinetics of local anaesthetics*. *Br J Anaesth*, 1986. **58**(7): p. 717-31.

106. Yanez, J.A., et al., *Flip-flop pharmacokinetics - delivering a reversal of disposition: challenges and opportunities during drug development*. Therapeutic delivery, 2011. **2**(5): p. 643-672.
107. Boxenbaum, H., *Pharmacokinetics tricks and traps: flip-flop models*. Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques, 1998. **1**(3): p. 90-1.
108. Burm, A.G., et al., *Pharmacokinetics of lidocaine and bupivacaine following subarachnoid administration in surgical patients: simultaneous investigation of absorption and disposition kinetics using stable isotopes*. Anesthesiology, 1988. **69**(4): p. 584-92.
109. Comets, E., et al., *Nonparametric analysis of the absorption profile of octreotide in rabbits from long-acting release formulation OncoLAR*. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 1999. **59**(2): p. 197-205.
110. Tucker, G.T., *Is plasma binding of local anesthetics important?* Acta anaesthesiologica Belgica, 1988. **39**(3): p. 147-50.
111. Knudsen, K., et al., *Central nervous and cardiovascular effects of i.v. infusions of ropivacaine, bupivacaine and placebo in volunteers*. British journal of anaesthesia, 1997. **78**(5): p. 507-14.
112. Taheri, S., et al., *Hydrophobic and ionic factors in the binding of local anesthetics to the major variant of human alpha1-acid glycoprotein*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2003. **304**(1): p. 71-80.
113. Hanada, K., et al., *Effects of surgery and chronic disease states on the concentrations and phenotype distribution of alpha1-acid glycoprotein: studies in patients with breast cancer and patients with chronic inflammatory disease*. International journal of clinical pharmacology and therapeutics, 2011. **49**(7): p. 415-21.

114. Muller, M., et al., *Grand mal convulsion and plasma concentrations after intravascular injection of ropivacaine for axillary brachial plexus blockade*. British journal of anaesthesia, 2001. **87**(5): p. 784-7.
115. Wiedemann, D., et al., *Ropivacaine plasma concentrations during 120-hour epidural infusion*. British journal of anaesthesia, 2000. **85**(6): p. 830-5.
116. Tucker, G.T., et al., *Binding of anilide-type local anesthetics in human plasma. I. Relationships between binding, physicochemical properties, and anesthetic activity*. Anesthesiology, 1970. **33**(3): p. 287-303.
117. Mazoit, J.X., L.S. Cao, and K. Samii, *Binding of bupivacaine to human serum proteins, isolated albumin and isolated alpha-1-acid glycoprotein. Differences between the two enantiomers are partly due to cooperativity*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1996. **276**(1): p. 109-15.
118. Denson, D., et al., *Alpha 1-acid glycoprotein and albumin in human serum bupivacaine binding*. Clinical pharmacology and therapeutics, 1984. **35**(3): p. 409-15.
119. Jokinen, M.J., et al., *The effect of erythromycin, fluvoxamine, and their combination on the pharmacokinetics of ropivacaine*. Anesthesia and analgesia, 2000. **91**(5): p. 1207-12.
120. Tucker, G.T., *Pharmacokinetics of local anaesthetics*. British journal of anaesthesia, 1986. **58**(7): p. 717-31.
121. Desborough, J.P., *The stress response to trauma and surgery*. British journal of anaesthesia, 2000. **85**(1): p. 109-17.
122. McDonald, S., et al., *Determination of local tissue concentrations of bupivacaine released from biodegradable microspheres and the effect of vasoactive compounds on bupivacaine tissue clearance studied by microdialysis sampling*. Pharmaceutical research, 2002. **19**(11): p. 1745-52.

123. Veering, B.T., et al., *Pharmacokinetics of bupivacaine during postoperative epidural infusion: enantioselectivity and role of protein binding*. *Anesthesiology*, 2002. **96**(5): p. 1062-9.
124. Mazoit, J.X., D.D. Denson, and K. Samii, *Pharmacokinetics of bupivacaine following caudal anesthesia in infants*. *Anesthesiology*, 1988. **68**(3): p. 387-91.
125. Emanuelsson, B.M., et al., *Intraindividual and interindividual variability in the disposition of the local anesthetic ropivacaine in healthy subjects*. *Therapeutic drug monitoring*, 1997. **19**(2): p. 126-31.
126. Burm, A.G., et al., *Pharmacokinetics of lidocaine and bupivacaine and stable isotope labelled analogues: a study in healthy volunteers*. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 1988. **9**(1): p. 85-95.
127. Oda, Y., et al., *Metabolism of a new local anesthetic, ropivacaine, by human hepatic cytochrome P450*. *Anesthesiology*, 1995. **82**(1): p. 214-20.
128. Arlander, E., et al., *Metabolism of ropivacaine in humans is mediated by CYP1A2 and to a minor extent by CYP3A4: an interaction study with fluvoxamine and ketoconazole as in vivo inhibitors*. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 1998. **64**(5): p. 484-91.
129. Jokinen, M.J., et al., *Effect of ciprofloxacin on the pharmacokinetics of ropivacaine*. *European journal of clinical pharmacology*, 2003. **58**(10): p. 653-7.
130. Jokinen, M.J., et al., *Effect of rifampin and tobacco smoking on the pharmacokinetics of ropivacaine*. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 2001. **70**(4): p. 344-50.
131. Jokinen, M.J., et al., *Effect of clarithromycin and itraconazole on the pharmacokinetics of ropivacaine*. *Pharmacology & toxicology*, 2001. **88**(4): p. 187-91.



132. Gantenbein, M., et al., *Oxidative metabolism of bupivacaine into pipecolylxylidine in humans is mainly catalyzed by CYP3A*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2000. **28**(4): p. 383-5.
133. Burm, A.G., et al., *Pharmacokinetics of the enantiomers of bupivacaine following intravenous administration of the racemate*. Br J Clin Pharmacol, 1994. **38**(2): p. 125-9.
134. Lee, A., et al., *Disposition kinetics of ropivacaine in humans*. Anesthesia and analgesia, 1989. **69**(6): p. 736-8.
135. Thomas, J.M. and S.A. Schug, *Recent advances in the pharmacokinetics of local anaesthetics. Long-acting amide enantiomers and continuous infusions*. Clinical pharmacokinetics, 1999. **36**(1): p. 67-83.
136. Hansen, T., Tom G, *Ropivacaine: a pharmacological review*. Expert Rev Neurother, 2004. **4**(5): p. 781-791.
137. Burm, A.G., et al., *Pharmacokinetics of lignocaine and bupivacaine in surgical patients following epidural administration. Simultaneous investigation of absorption and disposition kinetics using stable isotopes*. Clinical pharmacokinetics, 1987. **13**(3): p. 191-203.
138. Connolly, C., D.M. Coventry, and J.A. Wildsmith, *Double-blind comparison of ropivacaine 7.5 mg ml(-1) with bupivacaine 5 mg ml(-1) for sciatic nerve block*. British journal of anaesthesia, 2001. **86**(5): p. 674-7.
139. Coventry, D.M. and J.G. Todd, *Alkalinisation of bupivacaine for sciatic nerve blockade*. Anaesthesia, 1989. **44**(6): p. 467-70.
140. Misra, U., et al., *Plasma concentrations of bupivacaine following combined sciatic and femoral 3 in 1 nerve blocks in open knee surgery*. British journal of anaesthesia, 1991. **66**(3): p. 310-3.
141. Snoeck, M.M., et al., *Steady state bupivacaine plasma concentrations and safety of a femoral "3-in-1" nerve block with bupivacaine in patients over 80 years of age*.

- International journal of clinical pharmacology and therapeutics, 2003. **41**(3): p. 107-13.
142. Robison, C., et al., *Effect of adrenaline on plasma concentrations of bupivacaine following lower limb nerve block*. British journal of anaesthesia, 1991. **66**(2): p. 228-31.
143. Moore, D.C., et al., *Arterial and venous plasma levels of bupivacaine following epidural and intercostal nerve blocks*. Anesthesiology, 1976. **45**(1): p. 39-45.
144. Karmakar, M.K., et al., *Arterial and venous pharmacokinetics of ropivacaine with and without epinephrine after thoracic paravertebral block*. Anesthesiology, 2005. **103**(4): p. 704-11.
145. Halldin, M.M., et al., *Metabolism and excretion of ropivacaine in humans*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 1996. **24**(9): p. 962-8.
146. Emanuelsson, B.M., et al., *Intraindividual and interindividual variability in the disposition of the local anesthetic ropivacaine in healthy subjects*. Ther Drug Monit, 1997. **19**(2): p. 126-31.
147. Emanuelsson, B.M., et al., *Systemic absorption and block after epidural injection of ropivacaine in healthy volunteers*. Anesthesiology, 1997. **87**(6): p. 1309-17.
148. Tucker, G.T. and L.E. Mather, *Pharmacology of local anaesthetic agents. Pharmacokinetics of local anaesthetic agents*. British journal of anaesthesia, 1975. **47 suppl**: p. 213-24.
149. Vanterpool, S., et al., *Combined lumbar-plexus and sciatic-nerve blocks: an analysis of plasma ropivacaine concentrations*. Regional anesthesia and pain medicine, 2006. **31**(5): p. 417-21.
150. Hatch, H.A., *Myasthenia gravis: report of a case with exophthalmos, without hyperthyroidism, relieved by neostigmine*. The New England journal of medicine, 1952. **246**(22): p. 856-8.

151. Taylor, P., *Chapter 10. Anticholinesterase Agents*, in *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12e*, L.L. Brunton, B.A. Chabner, and B.C. Knollmann, Editors. 2010  
<http://www.accesspharmacy.com/content.aspx?aID=16660859>.
152. Yaksh, T.L., et al., *Studies on the safety of chronically administered intrathecal neostigmine methylsulfate in rats and dogs*. *Anesthesiology*, 1995. **82**(2): p. 412-27.
153. Abram, S.E. and R.P. Winne, *Intrathecal acetyl cholinesterase inhibitors produce analgesia that is synergistic with morphine and clonidine in rats*. *Anesthesia and analgesia*, 1995. **81**(3): p. 501-7.
154. Naguib, M. and T.L. Yaksh, *Antinociceptive effects of spinal cholinesterase inhibition and isobolographic analysis of the interaction with mu and alpha 2 receptor systems*. *Anesthesiology*, 1994. **80**(6): p. 1338-48.
155. Chiari, A., et al., *Sex differences in cholinergic analgesia I: a supplemental nicotinic mechanism in normal females*. *Anesthesiology*, 1999. **91**(5): p. 1447-54.
156. Aquilonius, S.M., et al., *Pharmacokinetic Study of Neostigmine in Man Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. *European journal of clinical pharmacology*, 1979. **15**(5): p. 367-371.
157. Aquilonius, S.M. and P. Hartvig, *Clinical pharmacokinetics of cholinesterase inhibitors*. *Clinical pharmacokinetics*, 1986. **11**(3): p. 236-49.
158. Shafer, S.L., et al., *Cerebrospinal fluid pharmacokinetics and pharmacodynamics of intrathecal neostigmine methylsulfate in humans*. *Anesthesiology*, 1998. **89**(5): p. 1074-88.
159. Visser, W.A., R.A. Lee, and M.J. Gielen, *Factors affecting the distribution of neural blockade by local anesthetics in epidural anesthesia and a comparison of lumbar versus thoracic epidural anesthesia*. *Anesthesia and analgesia*, 2008. **107**(2): p. 708-21.

160. Krukowski, J.A., et al., *Intrathecal neostigmine for post-cesarean section analgesia: dose response*. *Anesthesia and analgesia*, 1997. **84**(6): p. 1269-75.
161. Miranda, H.F., F. Sierralta, and G. Pinardi, *Neostigmine interactions with non steroidal anti-inflammatory drugs*. *British journal of pharmacology*, 2002. **135**(7): p. 1591-7.
162. Hood, D.D., et al., *Interaction between intrathecal neostigmine and epidural clonidine in human volunteers*. *Anesthesiology*, 1996. **85**(2): p. 315-25.
163. Marucio, R.L., et al., *Postoperative analgesic effects of epidural administration of neostigmine alone or in combination with morphine in ovariohysterectomized dogs*. *American journal of veterinary research*, 2008. **69**(7): p. 854-60.
164. Hood, D.D., J.C. Eisenach, and R. Tuttle, *Phase I safety assessment of intrathecal neostigmine methylsulfate in humans*. *Anesthesiology*, 1995. **82**(2): p. 331-43.
165. Ho, K.M., et al., *Use of intrathecal neostigmine as an adjunct to other spinal medications in perioperative and peripartum analgesia: a meta-analysis*. *Anaesthesia and intensive care*, 2005. **33**(1): p. 41-53.
166. Omais, M., G.R. Lauretti, and C.A. Paccola, *Epidural morphine and neostigmine for postoperative analgesia after orthopedic surgery*. *Anesthesia and analgesia*, 2002. **95**(6): p. 1698-701, table of contents.
167. Lauretti, G.R., et al., *Postoperative analgesia by intraarticular and epidural neostigmine following knee surgery*. *Journal of clinical anesthesia*, 2000. **12**(6): p. 444-8.
168. Lauretti, G.R., et al., *Study of three different doses of epidural neostigmine coadministered with lidocaine for postoperative analgesia*. *Anesthesiology*, 1999. **90**(6): p. 1534-8.
169. Habib, A.S. and T.J. Gan, *Use of neostigmine in the management of acute postoperative pain and labour pain: a review*. *CNS drugs*, 2006. **20**(10): p. 821-39.

170. Congedo, E., M. Sgreccia, and G. De Cosmo, *New drugs for epidural analgesia*. Current drug targets, 2009. **10**(8): p. 696-706.
171. Collier, R., *Drug development cost estimates hard to swallow*. CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne, 2009. **180**(3): p. 279-80.
172. DiMasi, J.A., R.W. Hansen, and H.G. Grabowski, *The price of innovation: new estimates of drug development costs*. Journal of health economics, 2003. **22**(2): p. 151-85.
173. Woosley, R.L. and J. Cossman, *Drug development and the FDA's Critical Path Initiative*. Clinical pharmacology and therapeutics, 2007. **81**(1): p. 129-33.
174. *Comparison of NMEs approved in 2010 to previous years*. [cited 2012 5 February]; Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/DrugandBiologicApprovalReports/UCM242695.pdf>.
175. Landaw, E.M. and J.J. DiStefano, 3rd, *Multiexponential, multicompartmental, and noncompartmental modeling. II. Data analysis and statistical considerations*. The American journal of physiology, 1984. **246**(5 Pt 2): p. R665-77.
176. DiStefano, J.J., 3rd and E.M. Landaw, *Multiexponential, multicompartmental, and noncompartmental modeling. I. Methodological limitations and physiological interpretations*. The American journal of physiology, 1984. **246**(5 Pt 2): p. R651-64.
177. DiStefano, J.J., 3rd, *Noncompartmental vs. compartmental analysis: some bases for choice*. The American journal of physiology, 1982. **243**(1): p. R1-6.
178. Gillespie, W.R., *Noncompartmental versus compartmental modelling in clinical pharmacokinetics*. Clinical pharmacokinetics, 1991. **20**(4): p. 253-62.
179. Levy, G., *Pharmacokinetics of salicylate elimination in man*. Journal of pharmaceutical sciences, 1965. **54**(7): p. 959-67.

180. Sheiner, L.B., B. Rosenberg, and K.L. Melmon, *Modelling of individual pharmacokinetics for computer-aided drug dosage*. Computers and biomedical research, an international journal, 1972. **5**(5): p. 411-59.
181. Stanski, D.R., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of d-tubocurarine during nitrous oxide-narcotic and halothane anesthesia in man*. Anesthesiology, 1979. **51**(3): p. 235-41.
182. Gibaldi, M. and D. Perrier, *Pharmacokinetics*. 2nd ed., New York: Marcel Dekker.
183. Wahlby, U., E.N. Jonsson, and M.O. Karlsson, *Comparison of stepwise covariate model building strategies in population pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis*. AAPS pharmSci, 2002. **4**(4): p. E27.
184. Wahlby, U., E.N. Jonsson, and M.O. Karlsson, *Assessment of actual significance levels for covariate effects in NONMEM*. Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics, 2001. **28**(3): p. 231-52.
185. Jonsson, E.N. and M.O. Karlsson, *Automated covariate model building within NONMEM*. Pharmaceutical research, 1998. **15**(9): p. 1463-8.
186. Semmar, N., et al., *Cluster analysis: an alternative method for covariate selection in population pharmacokinetic modeling*. Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics, 2005. **32**(3-4): p. 333-58.
187. Bies, R.R., et al., *A genetic algorithm-based, hybrid machine learning approach to model selection*. Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics, 2006. **33**(2): p. 195-221.
188. Ribbing, J., et al., *The lasso--a novel method for predictive covariate model building in nonlinear mixed effects models*. Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics, 2007. **34**(4): p. 485-517.
189. Tunblad, K., et al., *The use of clinical irrelevance criteria in covariate model building with application to dofetilide pharmacokinetic data*. Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics, 2008. **35**(5): p. 503-26.

190. Sheiner, L.B. and S.L. Beal, *Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetics parameters. I. Michaelis-Menten model: routine clinical pharmacokinetic data*. Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics, 1980. **8**(6): p. 553-71.
191. Lavielle, M. and F. Mentre, *Estimation of population pharmacokinetic parameters of saquinavir in HIV patients with the MONOLIX software*. Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics, 2007. **34**(2): p. 229-49.
192. Vonesh, E.F., V.M. Chinchilli, and K. Pu, *Goodness-of-fit in generalized nonlinear mixed-effects models*. Biometrics, 1996. **52**(2): p. 572-87.
193. Bertrand, J., et al., *Some Alternatives to Asymptotic Tests for the Analysis of Pharmacogenetic Data Using Nonlinear Mixed Effects Models*. Biometrics, 2011.
194. Ette, E.I., *Stability and performance of a population pharmacokinetic model*. Journal of clinical pharmacology, 1997. **37**(6): p. 486-95.
195. Ette, E.I. and L.C. Onyiah, *Estimating inestimable standard errors in population pharmacokinetic studies: the bootstrap with Winsorization*. European journal of drug metabolism and pharmacokinetics, 2002. **27**(3): p. 213-24.
196. Yano, Y., S.L. Beal, and L.B. Sheiner, *Evaluating pharmacokinetic/pharmacodynamic models using the posterior predictive check*. Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics, 2001. **28**(2): p. 171-92.
197. Post, T.M., et al., *Extensions to the visual predictive check to facilitate model performance evaluation*. Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics, 2008. **35**(2): p. 185-202.
198. Comets, E., K. Brendel, and F. Mentre, *Why Should Prediction Discrepancies Be Renamed Standardized Visual Predictive Check?* Journal of clinical pharmacology, 2011.

199. Wang, D.D. and S. Zhang, *Standardized visual predictive check versus visual predictive check for model evaluation*. Journal of clinical pharmacology, 2012. **52**(1): p. 39-54.
200. Yu, W., et al., *Microdialysis for pharmacokinetic-pharmacodynamic studies*. Die Pharmazie, 2007. **62**(12): p. 883-91.
201. Liu, S.S., et al., *Dose-response effects of spinal neostigmine added to bupivacaine spinal anesthesia in volunteers*. Anesthesiology, 1999. **90**(3): p. 710-7.
202. Lauretti, G.R., et al., *Postoperative analgesia and antiemetic efficacy after intrathecal neostigmine in patients undergoing abdominal hysterectomy during spinal anesthesia*. Regional anesthesia, 1997. **22**(6): p. 527-33.
203. Harjai, M., et al., *A comparative study of two different doses of epidural neostigmine coadministered with lignocaine for post operative analgesia and sedation*. Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology, 2010. **26**(4): p. 461-4.
204. Ross, V.H., et al., *Neostigmine decreases bupivacaine use by patient-controlled epidural analgesia during labor: a randomized controlled study*. Anesthesia and analgesia, 2009. **109**(2): p. 524-31.
205. Kida, K., et al., *Postoperative pain status after intraoperative systemic dexmedetomidine and epidural neostigmine in patients undergoing lower abdominal surgery*. European journal of anaesthesiology, 2008. **25**(11): p. 869-75.
206. Roelants, F., P.M. Lavand'homme, and V. Mercier-Fuzier, *Epidural administration of neostigmine and clonidine to induce labor analgesia: evaluation of efficacy and local anesthetic-sparing effect*. Anesthesiology, 2005. **102**(6): p. 1205-10.
207. Roelants, F. and P.M. Lavand'homme, *Epidural neostigmine combined with sufentanil provides balanced and selective analgesia in early labor*. Anesthesiology, 2004. **101**(2): p. 439-44.



208. Roelants, F., M. Rizzo, and P. Lavand'homme, *The effect of epidural neostigmine combined with ropivacaine and sufentanil on neuraxial analgesia during labor*. *Anesthesia and analgesia*, 2003. **96**(4): p. 1161-6, table of contents.
209. Breivik, H. and A. Stubhaug, *Management of acute postoperative pain: still a long way to go!* *Pain*, 2008. **137**(2): p. 233-4.
210. Coley, K.C., et al., *Retrospective evaluation of unanticipated admissions and readmissions after same day surgery and associated costs*. *Journal of clinical anesthesia*, 2002. **14**(5): p. 349-53.
211. Breivik, H., *How to implement an acute pain service*. *Best practice & research. Clinical anaesthesiology*, 2002. **16**(4): p. 527-47.
212. Lee, J.Y., et al., *Impact of pharmacometric analyses on new drug approval and labelling decisions: a review of 198 submissions between 2000 and 2008*. *Clinical pharmacokinetics*, 2011. **50**(10): p. 627-35.
213. Sheiner, L.B., *Learning versus confirming in clinical drug development*. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 1997. **61**(3): p. 275-91.
214. Peck, C.C., D.B. Rubin, and L.B. Sheiner, *Hypothesis: a single clinical trial plus causal evidence of effectiveness is sufficient for drug approval*. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 2003. **73**(6): p. 481-90.
215. Gaudreault, F., et al., *A population pharmacokinetic model for the complex systemic absorption of ropivacaine after femoral nerve block in patients undergoing knee surgery*. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 2012.
216. Beaulieu, P., D. Babin, and T. Hemmerling, *The pharmacodynamics of ropivacaine and bupivacaine in combined sciatic and femoral nerve blocks for total knee arthroplasty*. *Anesthesia and analgesia*, 2006. **103**(3): p. 768-74.
217. Passavanti, M.B., et al., *Pain and sensory dysfunction after breast cancer surgery: neurometer CPT evaluation*. *Anticancer research*, 2006. **26**(5B): p. 3839-44.

218. Takami, K., et al., *Abeta and Adelta but not C-fibres are involved in stroke related pain and allodynia: an experimental study in mice*. The Journal of pharmacy and pharmacology, 2011. **63**(3): p. 452-6.
219. Raj, P.P., et al., *Painless electrodiagnostic current perception threshold and pain tolerance threshold values in CRPS subjects and healthy controls: a multicenter study*. Pain practice : the official journal of World Institute of Pain, 2001. **1**(1): p. 53-60.
220. Kaloul, I., et al., *Ropivacaine plasma concentrations are similar during continuous lumbar plexus blockade using the anterior three-in-one and the posterior psoas compartment techniques*. Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthesie, 2004. **51**(1): p. 52-6.
221. Lemay, E., et al., *The number of injections does not influence local anesthetic absorption after paravertebral blockade*. Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthesie, 2003. **50**(6): p. 562-7.
222. Singh, S.S., *Preclinical pharmacokinetics: an approach towards safer and efficacious drugs*. Current drug metabolism, 2006. **7**(2): p. 165-82.
223. Kau, Y.C., et al., *Simultaneous determination of unbound ropivacaine in rat blood and brain using microdialysis*. Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications, 2001. **760**(1): p. 107-12.
224. Clement, R., et al., *In vitro and in vivo microdialysis calibration using retrodialysis for the study of the cerebrospinal distribution of bupivacaine*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 1998. **17**(4-5): p. 665-70.
225. Chaurasia, C.S., et al., *AAPS-FDA Workshop White Paper: microdialysis principles, application, and regulatory perspectives*. Journal of clinical pharmacology, 2007. **47**(5): p. 589-603.

226. Wiskirchen, D.E., et al., *Determination of tissue penetration and pharmacokinetics of linezolid in patients with diabetic foot infections using in vivo microdialysis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2011. **55**(9): p. 4170-5.
227. Bulik, C.C., et al., *Tissue penetration and pharmacokinetics of tigecycline in diabetic patients with chronic wound infections described by using in vivo microdialysis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2010. **54**(12): p. 5209-13.
228. Boyadjiev, I., et al., *Penetration of ertapenem into muscle measured by in vivo microdialysis in mechanically ventilated patients*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2011. **55**(7): p. 3573-5.
229. Thomas, F., P. Drolet, and F. Varin, *Ropivacaine intravenous and peripheral kinetics in rabbits*. *Can J Anesth*, 2010. **57**(S1): p. S56.
230. Thomas, F., P. Drolet, and F. Varin, *Simultaneous percutaneous implantation of a microdialysis probe for monitoring perineural concentrations of local anaesthetics during peripheral nerve block in rabbits*. *Vet Anaesth Analg*, 2011. **38**(6): p. 576-9.
231. Eisenach, J.C., D.D. Hood, and R. Curry, *Phase I human safety assessment of intrathecal neostigmine containing methyl- and propylparabens*. *Anesthesia and analgesia*, 1997. **85**(4): p. 842-6.
232. Lauretti, G.R., et al., *Intrathecal neostigmine for postoperative analgesia after orthopedic surgery*. *Journal of clinical anesthesia*, 1997. **9**(6): p. 473-7.
233. Hye, M.A., et al., *Intrathecal neostigmine for postoperative analgesia in caesarean section*. *Mymensingh medical journal : MMJ*, 2010. **19**(4): p. 586-93.
234. Wheeler, M., et al., *Adverse events associated with postoperative opioid analgesia: a systematic review*. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*, 2002. **3**(3): p. 159-80.
235. Oderda, G.M., et al., *Opioid-related adverse drug events in surgical hospitalizations: impact on costs and length of stay*. *The Annals of pharmacotherapy*, 2007. **41**(3): p. 400-6.

236. Vadivelu, N., S. Mitra, and D. Narayan, *Recent advances in postoperative pain management*. The Yale journal of biology and medicine, 2010. **83**(1): p. 11-25.
237. Kapoor, S., *Pain management with tapentadol: a better and safer alternative to oxycodone*. J Opioid Manag, 2012. **8**(3): p. 141.

## **Annexe I**