Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Jijel

Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire

Pour obtenir le Diplôme de Magistère en Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : Toxicologie Moléculaire

Par

RECHAK Habiba

THEME

Contribution à l'étude in vivo de l'influence de l'acide valproïque et du diazépam sur la toxicocinétique du vérapamil chez le rat

Présenté et soutenu devant le jury composé de :

IDOUI Tayeb	**(MCA, Univ. de Jijel)**	**Président**
HAMDI Abderazzek	**(Pr, USTHB, Alger)**	**Encadreur**
LAHOUEL Mesbah	**(Pr, Univ. de Jijel)**	**Examinateur**
RECHRECHE Hocine	**(MCA, Univ. de Jijel)**	**Examinateur**

REMERCIEMENTS

Je remercie d'abord et vivement Dieu, le tout puissant, qui m'a donné la puissance et la patience pour accomplir ce travail.

J'adresse des remerciements très particuliers à mon encadreur de mémoire, Mr HAMDI Abderazzek, Professeur à l'université de Bab Ezzouar pour ses conseils avisés, sa gentillesse et sa rigueur qui m'ont permis de mener à bien ce travail.
J'espère, à l'avenir, faire bon usage de ce que j'ai pu apprendre à ses côtés.

Mes remerciements s'adressent aussi à chacun des membres de jury :
Mr IDOUI Tayeb
Maître de conférences à l'université de Jijel,
Mr LAHOUEL Mesbah
Professeur à l'université de JIJEL,
Et
Mr RECHRECHE Hocine
Maître de conférences à l'université de Jijel
Je vous suis extrêmement reconnaissante d'avoir accepté de siéger à mon jury.
Trouvez ici le témoignage de mon estime et de ma profonde considération.

Mes remerciements vont ensuite :

A mes co-promos Aicha, Nabila et Nada pour toutes les années passées ensemble

Aux ingénieurs des laboratoires LPP et LIME Hadia, Riad et Amira
Tout particulièrement Hadia pour sa gentillesse extrême, pour nous avoir soutenues dans les moments difficiles, pour sa bonne humeur et ses fameuses blagues
A madame Bouchair Nabila et Samia abdelaziz pour leur aide et leur soutien tout au long de ce travail
A Hadjer Brihoum, ingénieur du laboratoire de toxicologie moléculaire
A meriem kemmel , Imène Derbak et sa tante pour leur aide
A toutes mes amies, Ryma, Samira, Rokia et Saida,

A Sawsen, Amina et Assia

A tous ceux qui m'ont aidé à accomplir cette tache, soit directement ou indirectement.

Aux ingénieurs des laboratoires du département de la biologie moléculaire et cellulaire très particulièrement Soumia pour sa gentillesse, sa disponibilité et son aide précieuse.

A madame Roula massika et Mr Harouche Kamel

Enfin, je ne voudrais pas oublier tous mes collègues les chimistes que j'ai côtoyé au Laboratoire de Pharmacologie et de Phytochimie à l'Université Jijel.

Meriem A., Ammar, Hamid, Khaled et les autres

Toute ma gratitude et ma reconnaissance à vous, maman, mes frères et sœurs. Vous êtes ma famille et je suis là grâce à vous. Ce travail, c'est le vôtre, l'aboutissement de votre présence et de votre amour.

À celui qui n'est plus là mais qui aurait été fier de moi, mon papa, que le Bon Dieu lui entoure de sa sainte miséricorde, je dis : GRAND MERCI …

SOMMAIRE

Introduction 02

Première partie : Revue bibliographique

I.1. Interactions médicamenteuses 05
I.1.1. Rappels toxicocinétiques..... 05
I.1.2. Mécanismes des interactions médicamenteuses..... 07
I.1.2.1. Interaction avec l'absorption 07
I.1.2.2. Interaction avec la distribution 08
I.1.2.3. Interaction avec le métabolisme 08
I.1.2.3.1. Inhibition des enzymes du métabolisme et des transporteurs membranaires 09
I.1.2.3.1. Induction des enzymes du métabolisme et des transporteurs membranaires..... 09
I.1.2.4. Interaction avec l'élimination 11
I.1.3. Méthodes d'étude des interactions médicamenteuses..... 11
I.1.3.1. Méthodes d'étude des interactions médicamenteuses *in vitro* 11
I.1.3.2. Méthodes d'étude des interactions médicamenteuses *in vivo* 13
I.2. Profils cinétiques du vérapamil, de l'acide valproïque et du diazépam 14
I.2.1. Profil cinétique du vérapamil 14
I.2.2. Profil cinétique de l'acide valproïque 17
I.2.3. Profil cinétique du diazépam..... 18

Deuxième partie : Matériels et méthodes

II.1. Matériels 22
II.1.1. Produits chimiques et réactifs 22
II.1.2. Animaux 22
II.2. Méthodes..... 22
II.2.1. Traitement des animaux et prélèvements sanguins 22
II.2.2. Extraction du vérapamil..... 23
II.2.3. Analyse des concentrations du vérapamil par RP-HPLC 24
II.2.4. Analyse toxicocinétique : estimation des paramètres toxicocinétiques du vérapamil. 25

II.2.4.1. Estimation des paramètres toxicocinétiques du vérapamil après administration par voie intraveineuse 26
II.2.4.2. Estimation des paramètres toxicocinétiques du vérapamil après administration par voie orale 27
II.2.5. Analyse statistique 29
II.2.5. Validation de la méthode d'analyse par RP-HPLC 29

Troisième partie : Résultats et discussion

III.1. Résultats de la validation de la méthode d'analyse par RP-HPLC 32
III.2. Résultats de l'analyse toxicocinétique du vérapamil 33
III.2.1. Influence de l'acide valproïque sur la toxicocinétique du vérapamil 34
III.2.2. Influence du diazépam sur la toxicocinétique du vérapamil 42

Conclusion et perspectives 49
Références 52

Liste des abréviations

AUC : *Surface sous la courbe (Area under the curve).*

Ke : *Constante de vitesse d'élimination.*

Ka : *Constante de vitesse d'absorption.*

Vd : *Volume de distribution apparent.*

$T_{1/2}$: *Temps de demi-vie d'élimination.*

VPA : *Acide valproïque.*

Cl : *Clairance plasmatique.*

LCR : *Liquide céphalorachidien*

***Cmax* :** *Concentration maximale.*

***Tmax* :** *Temps nécessaire pour atteindre la concentration maximale.*

CYPs *: Cytochromes P.*

UGT *: Uridine diphosphate glucuronosyltransférase.*

P-gP : *Glycoprotéine P.*

MDR : *Multidrug resistance*

MRP *: Multidrug résistance protein.*

TK *: Toxicocinétique (toxicokinetic).*

Introduction

Les intoxications médicamenteuses constituent un problème de santé publique majeur notamment chez les sujets âgés. Les médicaments les plus souvent impliqués appartiennent aux classes thérapeutiques de la sphère du système nerveux central et de la sphère cardiovasculaire. Le vérapamil est un médicament anti arythmique possédant une fourchette thérapeutique étroite. Il est utilisé à la fois en médecine humaine et vétérinaire. Sa principale indication est le traitement de l'angine de poitrine et de l'hypertension artérielle. Il est métabolisé par les enzymes du système cytochrome P450 notamment le CYP 3A4, CYP 1A2, et CYP 2C. A cause de sa fourchette thérapeutique étroite, de la variabilité intra- et inter-individuelle due au polymorphisme génétique des cytochromes P450, l'usage du vérapamil est associé à un risque élevé d'interactions médicamenteuses. La cinétique du vérapamil seul a été largement étudiée (Schwartz et *al*., 1985 ; Bhatti et Foster, 1997 ; Busse et *al*., 2001 ; Mori et *al*., 2001) alors que sa cinétique associé à d'autres médicaments anxiolytiques comme le diazépam ou épileptiques comme l'acide valproïque n'a pas fait l'objet d'une étude jusqu'à présent. Des médications combinant le vérapamil avec l'acide valproïque et/ou le diazépam sont fréquemment retrouvées en clinique. En effet, chez les patients épileptiques traités par l'acide valproïque, les crises d'épilepsies sont accompagnées de modifications dans la fonction autonome, qui influent sur le système cardiovasculaire (hypertension et bradyarythmie) (Beig et *al*., 2009) ce qui nécessite souvent un traitement par le vérapamil. Le diazépam, quant à lui, est un anxiolytique utilisé pour traiter l'anxiété, mais également utilisé pour ses propriétés anticonvulsivantes dans certaines formes d'épilepsie.

Une revue de littérature sur le métabolisme de chacun de ces médicaments révèle l'existence de voies métaboliques communes ce qui laisse à penser à d'éventuelles interactions d'ordre toxicocinétique. En terme de mécanismes, ces interactions mettent principalement en jeu les enzymes impliquées dans le métabolisme du médicament, les transporteurs qui déterminent le passage transcellulaire et les récepteurs nucléaires qui contrôlent l'expression des enzymes et des transporteurs (Levêque et *al*., 2010). Ces interactions d'ordre cinétique peuvent modifier l'efficacité et l'innocuité des médicaments surtout s'ils possèdent une faible fourchette thérapeutique.

Le but de notre travail serait alors d'étudier l'existence d'une éventuelle influence de l'acide valproïque et du diazépam sur la toxicocinétique du vérapamil par le dosage plasmatique du vérapamil par RP-HPLC et l'estimation de ses paramètres toxicocinétiques

chez des rats témoins traités par le vérapamil seul et chez des rats traités par le vérapamil en combinaison avec le diazépam ou avec l'acide valproïque.

La première partie de ce mémoire s'efforce de décrire succinctement les mécanismes moléculaires impliqués dans la survenue des interactions médicamenteuses ainsi que les méthodes couramment utilisées pour la recherche et la prédiction de ces interactions. Suit une revue de la littérature concernant les profils cinétiques de chacun des médicaments de cette étude. La deuxième partie présentera nos travaux personnels. Elle apporte des détails sur les méthodes utilisées lors de la réalisation de cette étude. Dans la troisième partie, sont rapportés les résultats de notre étude réalisée sur des rats, des commentaires et une discussion sur l'ensemble des résultats obtenus.

Première partie :

Revue bibliographique

I.1. Interactions médicamenteuses

Les interactions médicamenteuses constituent la majeure partie des accidents consécutifs à la polymédication. Cette dernière augmente souvent dans un contexte de polypathologie et est associée à une prise de risque souvent liée à la nécessité d'administrer de nombreux médicaments aux patients, multipliant ainsi les risques d'interactions. En effet, ce n'est pas l'efficacité individuelle des médicaments qui est en cause, mais la façon dont ils interagissent les uns vis-à-vis des autres dans l'organisme, et notamment sur des organismes fragilisés. Les complications qui en résultent frappent des populations vulnérables : personnes âgées, enfants, femmes enceintes…. La plupart de ces accidents sont évitables grâce à une bonne connaissance du médicament et des mécanismes d'interactions possibles. On distingue deux types d'interactions médicamenteuses : les interactions toxicodynamiques et les interactions toxicocinétiques. Seules les interactions toxicocinétiques sont traitées dans cette revue.

I.1.1. Rappels toxicocinétiques

La toxicocinétique d'un médicament ou de tout autre xénobiotique recouvre plusieurs phases distinctes : l'absorption, la distribution, le métabolisme, et l'excrétion. Les principaux organes impliqués dans la toxicocinétique sont l'intestin grêle (absorption mais également métabolisme et sécrétion), le foie (métabolisme et excrétion biliaire) et les reins (métabolisme et excrétion) (Levêque et *al*., 2010).

Le terme absorption a un sens large car il définit le trajet du médicament du site d'administration jusqu'à la circulation générale. Par exemple, la phase d'absorption d'un médicament administré par voie orale correspond au franchissement de la barrière intestinale et au passage hépatique via la veine porte avant diffusion dans la circulation générale. L'absorption d'un médicament est définie par la biodisponibilité absolue qui est le rapport des expositions (aire sous la courbe des concentrations sériques ou plasmatiques en fonction du temps, ASC ou AUC en terminologie anglosaxonne) obtenues après administration orale et intraveineuse. La biodisponibilité d'un médicament correspond à la fraction qui a rejoint la circulation générale (part disponible pour l'action thérapeutique ou éventuellement toxique). La perte éventuelle de médicament qui survient après le franchissement de la membrane intestinale en général par métabolisme dans les entérocytes et dans les

hépatocytes avant diffusion dans la circulation générale est appelé effet de premier passage ou effet présystémique (Levêque et *al*., 2010).

La distribution est le déplacement du médicament dans l'organisme et sa répartition dans les différents tissus, incluant les organes cibles. Les caractéristiques physico-chimiques du médicament conditionnent son affinité pour les différents tissus mais d'autres facteurs peuvent aussi influencer cette distribution (fixation protéique, débit sanguin tissulaire…. (Moulin et Coquerel, 2002).

Le métabolisme peut être divisé en trois phases : la phase I consiste en des oxydations, réductions ou hydrolyses catalysées par des enzymes microsomales ou cytosoliques. La majeure partie du métabolisme de phase I fait appel au cytochrome P450 (CYP 450). Ce dernier est une hémoprotéine constituée d'une apoprotéine et d'un groupement prosthétique, l'hème. Il se trouve surtout dans les hépatocytes, à l'intérieur des membranes du réticulum endoplasmique lisse. Cette enzyme a été très étudiée, si bien qu'on dénombre aujourd'hui 270 familles de cytochromes P450 différentes (dont 70 chez l'homme). Aussi, ne doit-on pas parler du cytochrome P450 mais des cytochromes P450. Ces cytochromes métabolisent un grand nombre de xénobiotiques dont les médicaments mais également des substances endogènes (stéroïdes, eicosanoïdes, vitamines...) et ont un rôle primordial dans la protection de l'organisme contre les agressions extérieures (polluants, pesticides...). Une caractéristique d'une partie de ces enzymes capables de métaboliser des xénobiotiques est leur faible expression basale et leur expression élevée en présence d'inducteurs (Guéguen et *al*., 2006).

Les réactions de phase II sont dites de conjugaison. Ces réactions catalysées par des transférases, permettent l'ajout d'un radical hydrophile pour former un nouveau composé plus soluble dans l'eau et donc plus facilement éliminé par les reins. Parmi les enzymes de conjugaison, figurent les uridine diphosphate glucuronosyltransférases (UGT), les N-acétyltransférases (NAT), les glutathion S-transférases (GST) et les sulfotransférases (SULT). Les enzymes de phase II sont généralement cytosoliques et sont exprimées dans le foie ainsi que dans de nombreux tissus périphériques. La glucuronoconjugaison constitue le mécanisme principal : elle est catalysée par des UGT qui favorisent la fixation de l'acide glucuronique sur un atome d'oxygène, d'azote ou de souffre d'une molécule facilitant ainsi sont élimination (Liston et *al*., 2001).

La phase III du métabolisme regroupe les systèmes de transport qui jouent un rôle important dans la défense de la cellule et de l'organisme contre les xénobiotiques (Ishikawa, 1992 ; Zimniak et *al*., 1993). Ces transporteurs sont généralement des glycoprotéines membranaires de type MDR (Multi-drug resistance) et MRP (multidrug resistance protein) (Bellamy, 1996). Au cours de cette phase, le médicament conjugué est excrété par la bile ou les urines via ces transporteurs (Bertz, et Granneman, 1997 ; Hansten, 1998).

L'élimination ou excrétion des médicaments est principalement assurée par le foie et les reins. Outre ses capacités métaboliques, le foie participe à l'excrétion des médicaments hors de l'organisme par le biais du système biliaire. Après excrétion dans la bile, le médicament se retrouve dans la lumière intestinale où il peut être réabsorbé : c'est le cycle entéro-hépatique. Au niveau rénal, la réabsorption tubulaire intervient tout au long du néphron. Il s'agit le plus souvent d'un processus passif qui est influencé par le degré d'ionisation du médicament : seule la fraction non ionisée au pH urinaire est réabsorbée. (Bonate et *al*., 1998).

I.1.2. Mécanismes des interactions médicamenteuses

Les interactions médicamenteuses d'ordre toxicocinétique se traduisent soit par une diminution, soit par une augmentation des concentrations du médicament mesurées au niveau sanguin (Levêque et *al*., 2010). Elles se produisent lorsqu'un médicament altère la cinétique d'un autre médicament par l'un des mécanismes suivants : modification de l'absorption, modification de la distribution, induction ou inhibition d'une ou de plusieurs enzymes du métabolisme des médicaments ou des transporteurs membranaires, et modification de l'excrétion. Les conséquences cliniques de ces interactions sont plus difficiles à prévoir, principalement parce qu'il existe des différences entre les individus (Albengres et *al*., 1998).

I.1.2.1. Interactions avec l'absorption

Le phénomène de l'altération de l'absorption se produit la plupart du temps au niveau de l'estomac ou de l'intestin (Hartshorn et Tatro, 2001). Les mécanismes d'interactions médicamenteuses affectant l'absorption orale des médicaments impliquent des changements physiologiques (changement du temps de vidange gastrique et augmentation de la motilité intestinale), physicochimiques (changement de pH et formation de complexe par ions métalliques), et biochimiques (modification de l'activité ou de l'expression des transporteurs

membranaires intestinaux) (Perloff et *al*., 2002 ; Spahn-Langguth et Langguth, 2001 ; Wandel et *al*., 2002 ; Wu et Benet, 2005 ; Yu, 1999).

I.1.2.2. Interactions avec la distribution

Le déplacement des liaisons aux protéines plasmatiques a longtemps été considéré comme un mécanisme classique d'interactions toxicocinétiques. Ces interactions survenant lors de la phase de distribution concernent principalement les phénomènes de déplacement d'un principe actif lié aux protéines plasmatiques par un autre principe actif de plus grande affinité. Des interactions notables peuvent survenir lorsqu'un médicament fortement lié aux protéines et ayant un faible volume de distribution est administré en même temps qu'un médicament possédant lui aussi une affinité élevée pour ces protéines et dont la concentration approche ou dépasse la concentration molaire des sites de liaisons des protéines, ce dernier médicament déplacera le premier. Le médicament déplacé voit alors sa fraction libre augmenter, soit la fraction qui peut se lier à son récepteur et produire un effet thérapeutique ou toxique (Hansten, 1998). Certaines de ces interactions peuvent jouer un rôle important dans la toxicité des médicaments (Daniel, 2003).

I.1.2.3. Interactions avec le métabolisme

De toutes les étapes du devenir du médicament dans l'organisme, le métabolisme est le siège principal des interactions médicamenteuses toxicocinétiques (Guéguen et *al*., 2006). Ces interactions mettent principalement en jeu les enzymes impliquées dans le métabolisme du médicament (CYP 450, enzymes de conjugaison comme les UGT, les GST…), les transporteurs qui déterminent le passage transcellulaire et les récepteurs nucléaires qui contrôlent l'expression des enzymes et des transporteurs. Toutefois, les systèmes enzymatiques constituent le mécanisme principal de ces interactions. L'augmentation des concentrations plasmatiques d'un médicament est liée à l'inhibition de l'activité enzymatique et/ou de transport membranaire par un médicament associé qualifié d'inhibiteur. La diminution des concentrations plasmatiques reflète l'activation de récepteurs nucléaires par un médicament inducteur entraînant l'augmentation de l'expression des enzymes métaboliques et des transporteurs (Levêque et *al*., 2010).

I.1.2.3.1. Inhibition des enzymes du métabolisme et des transporteurs membranaires

L'inhibition peut concerner les systèmes enzymatiques (en cas d'effet de premier passage ou de clairance métabolique) et/ou les transporteurs membranaires du médicament si ce dernier est sujet à un transfert intestinal actif, à une excrétion biliaire ou rénale. L'inhibition enzymatique est la réduction de l'activité enzymatique par une interférence directe d'une substance avec l'enzyme. Les inhibitions sont considérées comme plus dangereuses que les inductions enzymatiques, en raison de leur rapidité d'apparition (Guengerich, 1997). Les inhibitions des CYP 450 peuvent être subdivisées en trois catégories : les inhibitions réversibles (compétitives ou allostériques), quasi-irréversibles (formation de complexes stables avec le groupement prosthétique du CYP 450) et irréversibles (intermédiaires réactifs qui causent une inactivation irréversible de l'enzyme en se liant au site actif). Les inhibitions réversibles constituent le mécanisme le plus fréquent (Lin et Lu, 1998). L'inhibition entraine une hausse des concentrations sanguines des médicaments et par voie de conséquence une augmentation de leur activité et éventuellement de leur toxicité (Landry et *al*, 2008). Les mécanismes des inhibitions de transporteurs membranaires sont complexes. Par exemple avec les P-gp, l'inhibition peut être de type compétitif au niveau du site de liaison du substrat (vérapamil) ou du site de fixation de l'ATP et/ou résulter d'un blocage de l'hydrolyse de l'ATP (ciclosporine) (Lin, 2003). La comodulation de la P-gp et du CYP3A est une propriété partagée par de nombreux inhibiteurs enzymatiques. L'inhibition de la P-gp aura par ailleurs, le plus souvent, les mêmes conséquences cliniques que l'inhibition du CYP3A, à savoir une augmentation des concentrations plasmatiques du substrat (Roustit et Detavernier, 2011).

I.1.2.3.2. Induction des enzymes du métabolisme et des transporteurs membranaires

Contrairement à l'inhibition qui implique directement l'enzyme ou le transporteur, le phénomène d'induction reflète une augmentation de l'activité transcriptionnelle via notamment l'activation de récepteurs nucléaires contrôlant l'expression des enzymes du métabolisme et des transporteurs membranaires. Parmi ces récepteurs on distingue : le récepteur répondant au phénobarbital et aux composés dits « *phénobarbital like* » (CAR), le récepteur répondant au pregnanes (PXR), le récepteur des glucocorticoïdes (GR), et le récepteur PPAR (*peroxysome proliferative activated receptor*). Ces récepteurs appartiennent à une grande famille de facteurs de transcription activés par des ligands. Ceux-ci sont représentés par une grande variété de molécules lipophiles telles que les stéroïdes, les acides

gras, les eicosanoïdes, les acides biliaires et les oxystérols. Cependant, certains récepteurs, dont aucun ligand endogène n'a encore été identifié, peuvent être activés par des médicaments et d'autres xénobiotiques (Guéguen et *al*., 2006).

Dans la majorité des cas, la présence d'un ligand endogène ou exogène va moduler la transcription des gènes cibles selon une séquence mécanistique maintenant bien établie (Souidi et *al*., 2004). Schématiquement, en absence de ligand, les facteurs de transcription sont bloqués par des protéines nucléaires (co-represseurs). L'arrivée d'une molécule activatrice (ligand ou autre) va entraîner le départ des protéines « bloquantes » et la libération des capacités transcriptionnelles du facteur de transcription (Meyer et gut, 2002 ; Handschin et Meyer, 2003). L'analyse des liens qui existent entre les récepteurs nucléaires et les différents agonistes exogènes (ou toxicogénomique) représente un champ d'étude en pleine expansion (Meyer et gut, 2002 ; Handschin et Meyer, 2003).

À la différence des mécanismes d'inhibition, dont la réponse est immédiate, l'induction des CYP 450 est un mécanisme lent (Landry et *al*., 2008). Cela tient au fait que le phénomène d'induction est un processus transcriptionnel et l'augmentation de l'expression d'enzymes du métabolisme et des transporteurs des médicaments prend quelques jours pour arriver à l'effet maximum. Cependant dans certains cas, des mécanismes non transcriptionnels sont connus (Guéguen et *al*., 2006). En stimulant la transcription du gène codant pour une enzyme, un inducteur enzymatique entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de l'enzyme induite. Ceci se traduit par une élévation significative de l'activité enzymatique (Petersen, 1995 ; Lin et Lu ,1998). L'induction enzymatique augmente la clairance de nombreux médicaments, exposant à un risque de sous-dosage et d'échec thérapeutique. Cependant cette induction peut également accroître la toxicité d'un médicament dans le cas des prodrogues ou lorsque l'activation du métabolisme conduit à une augmentation de la concentration des métabolites toxiques du médicament, dans la plupart des cas ceux-ci sont éliminés. L'exemple le plus caricatural est celui de l'alcool qui, en induisant CYP2E1, augmente la toxicité hépatique du paracétamol chez l'alcoolique (Park et *al*., 2005).

La rifampicine est considérée comme l'inducteur du CYP3A4 le plus puissant. Ce dernier étant impliqué dans le métabolisme de 50% des médicaments (Ohno et *al*., 2008). La rifampicine active les récepteurs nucléaires PXR et CAR au niveau hépatique et entérocytaire qui vont s'hétérodimériser avec le récepteur nucléaire *retinol X-receptor*

(RXR). Les complexes ainsi formés agissent comme des facteurs transcriptionnels de nombreux gènes codant pour des enzymes et des transporteurs (Lehmann et *al*., 1998 ; Köhle et Bock, 2009). Une augmentation de la transcription, sous l'effet de la rifampicine, a été mise en évidence avec les CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4, l'UGT1A1 mais également des transporteurs comme la P-gp (Urquhart et *al*., 2007 ; Köhle et Bock, 2009).

I.1.2.4. Interactions avec l'élimination

L'élimination ou excrétion des médicaments est principalement assurée par le foie et les reins. Les interactions toxicocinétiques se produisant au niveau de l'élimination impliquent généralement des modifications du transfert des médicaments dans les tubules rénaux ou des changements de pH urinaire qui affectent l'excrétion des médicaments (Bonate et *al*., 1998).

I.1.3. Méthodes d'étude des interactions médicamenteuses

Diverses approches méthodologiques se sont développées ces dernières années pour la recherche et la prédiction des interactions médicamenteuses toxicocinétiques. Deux sortes d'études sont utilisées : les études *in vitro* et les études *in vivo*.

I.1.3.1. Méthodes d'étude des interactions médicamenteuses *in vitro*

Les seules interactions prédictibles, au moins partiellement, sont les interactions métaboliques car elles font appel à des méthodes *in vitro* largement développées (Danan et Labbe, 2000). On distingue deux mécanismes de la variation de l'activité d'une enzyme lors des interactions toxicocinétiques : l'inhibition et l'induction. Les modèles expérimentaux qui suivent ont été utilisés avec succès dans l'étude des interactions toxicocinétiques médicamenteuses liées à des inhibitions enzymatiques : les fractions intracellulaires de tissu hépatique humain, les modèles cellulaires, et les enzymes humaines du métabolisme des médicaments exprimées en système hétérologue**.**

Les fractions intracellulaires consistent en des microsomes hépatiques humains (vésicules du réticulum endoplasmique) et sont couramment utilisés pour l'exploration des effets d'un nouveau médicament sur les CYP 450 et pour l'obtention de données préliminaires sur les interactions susceptibles de survenir entre médicaments (Rodrigues et Wong, 1997 ; Ekins, 1999). Les principales enzymes du métabolisme des médicaments présentes dans cette fraction microsomale comprennent la superfamille du cytochrome P450, les époxydes hydrolases et diverses transférases (p. ex. les UGT). Ce système

comporte des avantages : il est facile à préparer, disponible sur le marché et stable à long terme en cryoconservation (Ekins, 1999).

Les modèles cellulaires consistent en des biopsies du foie, ainsi que les foies qui ont été prélevés à des fins de transplantation sans pouvoir être utilisés. Les hépatocytes isolés en suspension ou en culture primaire (Li, 1997 ; Sinz, 1999) et les coupes de foie (Ferrero et Brendel, 1997) offrent de nombreux avantages par rapport aux suspensions intracellulaires, (Présence de la totalité des enzymes hépatiques du métabolisme des médicaments, des cofacteurs endogènes, et une reproduction plus exacte des différences susceptibles d'exister entre la concentration du médicament de part et d'autre de la membrane cellulaire). Ces modèles permettent également d'étudier le rôle d'autres voies métaboliques pour un substrat donné en présence de médicaments qui inhibent sa principale voie métabolique (Sinz, 1999).

Dans les systèmes hétérologues, les ADNc des CYP 450 les plus courants ont été clonés et les enzymes humaines recombinantes ont été exprimées dans une variété de cellules qui présentent une faible activité intrinsèque cytochrome P450, notamment bactéries, levures, cellules d'insectes, cellules d'hépatome humain HepG2. L'activité de l'enzyme exprimée en système hétérologue peut être étudiée dans des préparations de microsomes obtenues à partir de lysats de cellules transgéniques. Les modèles recombinants ont l'avantage d'offrir un seul système enzymatique pour l'étude du métabolisme d'un médicament spécifique par une isoforme ou de la capacité d'un médicament à inhiber le métabolisme d'un substrat par cette isoforme. Les enzymes exprimées par l'ADNc peuvent servir à confirmer les résultats obtenus à partir de microsomes ou du tissu hépatique humain à l'état natif (Crespi et Penman, 1997 ; Rodrigues, 1999). L'étude d'enzymes recombinantes aptes au métabolisme dans des cellules transfectées représente une technologie toute récente.

Toutes ces études *in vitro* de l'inhibition enzymatique par compétition pour les mêmes enzymes, visent à mesurer les constantes cinétiques de types Km (constante de Michaelis) ou Ki (constante d'inhibition). L'activité inhibitrice peut être exprimée sous la forme de la Ki ou de la concentration inhibant 50 % de l'activité (CI_{50}). La CI_{50} est une estimation de la concentration de médicament inhibant de 50 % le taux maximal de métabolisme d'une concentration donnée de substrat et, de ce fait, mesure sa capacité inhibitrice. Les mesures de la CI_{50} ont l'avantage d'être indépendantes du mécanisme biochimique d'inhibition des enzymes. Les résultats permettent d'évaluer les interactions médicamenteuses possibles par

comparaison des Km et des Ki ou CI_{50} de différents substrats ou d'inhibiteurs pour une même enzyme (Danan et Labbe, 2000).

Les études de l'induction enzymatique *in vitro* sont effectuées sur les cultures primaires d'hépatocytes humains et les lignées cellulaires d'hépatocytes (p. ex. lignée cellulaire d'hépatome humain HepG2) qui se sont parfois révélées utiles pour ce type des études. L'induction enzymatique peut être mesurée par le dosage de l'activité des isoformes spécifiques, par immunodétection de la protéine isoforme ou par le dosage quantitatif de l'ARNm. Le recours à des inducteurs connus à titre de témoins positifs s'impose et permet de vérifier la sensibilité des systèmes (Kedderis, 1997).

I.1.3.2. Méthodes d'étude des interactions médicamenteuses *in vivo*

Les espèces animales sont fréquemment utilisées pour l'étude des interactions médicamenteuses toxicocinétiques. La comparaison du métabolisme d'un médicament chez l'humain et chez l'animal joue un rôle utile dans la sélection rationnelle de modèles animaux pour ces études de toxicologie. L'existence d'écarts notables dans le métabolisme d'un médicament chez un animal et chez l'humain atténue la valeur prédictive des données toxicologiques obtenues chez cet animal. L'élaboration de modèles animaux transgéniques pour l'expression d'enzymes métabolisant les médicaments en systèmes hétérologues constitue une démarche *in vivo* pour l'étude du rôle d'enzymes spécifiques participant au métabolisme des médicaments (Friedberg, 1999). Toutefois, en raison des différences entre les espèces, les paramètres d'évaluation de ces études ne refléteront pas nécessairement la situation chez l'humain. Cela fait que l'étude clinique des interactions médicamenteuses potentielles devrait être entreprise autant que possible (McKinnon et Nebert, 1998).

La méthodologie choisie pour la réalisation des études d'interactions médicamenteuses toxicocinétiques devrait permettre de sélectionner de façon appropriée les espèces animales (les patients s'il s'agit d'une étude clinique) qui recevront les deux médicaments soupçonnés d'interactions. Un prérequis est nécessaires pour toute étude d'interaction : les voies métaboliques des deux médicaments, uniques ou multiples, doivent être identifiées (Danan et Labbe, 2000). Des données utiles sur ces interactions médicamenteuses peuvent parfois être obtenues à partir des dosages effectués sur des échantillons de sang prélevés en plus ou moins grand nombre pendant une période de temps donnée. Ces données peuvent se révéler utiles pour confirmer une interaction soupçonnée à la lumière des résultats obtenus

in vitro ou pour identifier des interactions inattendues. Ces études devraient porter sur les paramètres d'évaluation toxicocinétiques et avoir recours aux analyses statistiques appropriées. Les paramètres utiles pour l'analyse des données toxicocinétiques d'une interaction médicamenteuse comprennent la surface sous la courbe de la concentration du médicament dans le sang, le plasma ou le sérum par rapport au temps (SSC ou AUC), la concentration maximale (C_{max}), le délai d'obtention de la C_{max} (T_{max}), la concentration minimale (C_{min}), la clairance (CL), le volume de distribution (V_d) et la demi-vie ($t_{1/2}$). La fraction de médicament libre dans le plasma peut servir à l'évaluation des interactions médicamenteuses mettant en jeu certains agents fortement liés aux protéines, qui sont distribués plutôt dans le plasma que dans les tissus (c-à-d. faible V_d) (Sun, 1999).

I.2. Profils cinétiques du vérapamil, de l'acide valproïque et du diazépam

La connaissance du métabolisme d'un médicament pourra nous permettre de mieux comprendre les interactions potentielles lors de l'administration concomitante d'autres médicaments. Pour cela, nous présentant une revue de littérature concernant les profils cinétiques de chaque médicament pris dans cette étude.

I.3.1. Profil cinétique du vérapamil

Comme tous les inhibiteurs calciques, le vérapamil agit en bloquant les canaux calciques lents empêchant ainsi l'entrée du calcium dans la cellule. Ce blocage s'exerce au niveau des cellules myocardiquues et des cellules musculaires lisses artérielles. En bloquant l'entrée du calcium dans la cellule, le vérapamil perturbe la contraction de la cellule myocardique, d'où un effet inotrope négatif puissant (Kittleson et Kienle, 1998 ; Rousselot, 2001 ; Girerd et *al*., 2004). Pour les mêmes raisons, en perturbant la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires, il est aussi générateur d'une vasodilatation minime des artères ce qui entraine une diminution de la pression artérielle (Allert et Adams, 1987 ; Thiebault, 1987; Rousselot, 2001 ; Girerd et *al*., 2004). Ces effets sont dose-dépendants (Muir et *al*., 1999).

Le vérapamil est rapidement absorbé par voie orale à plus de 90 % avec une concentration sanguine maximale atteinte en 1 à 3 heures. La biodisponibilité orale apparente a été estimée à environ de 10 à 30% en raison d'une métabolisation intestinale et hépatique importante qui explique aussi une grande variation intra-individuelle des taux plasmatiques mesurés après administration (Castel et *al*., 1992).

Le vérapamil est largement distribué dans l'organisme avec un volume de distribution apparent d'ordre de 2.3 à 9 l/kg (Mc.Allister et *al*., 1982 ; Castel et *al*., 1992) chez les sujets normaux, et double chez les patients présentant une cirrhose (Somogyi et *al*., 1981). Le vérapamil traverse la barrière placentaire et a été également trouvé en lait de sein. La liaison aux protéines plasmatiques est forte, puisque 90% du composé administré, par voie intraveineuse, se trouve sous forme liée (Castel et *al*., 1992). L'albumine et l'acide α_1 glycoprotéine sont impliqués dans cette liaison (Echizen et Eichelbaum, 1986).

Le métabolisme est essentiellement hépatique, caractérisé par un important effet du premier passage d'où de grandes variations inter-individuelles des taux plasmatiques pour une même dose administrée (Eichelbaum et *al*., 1979). Le vérapamil est métabolisé principalement par les CYP3As par déméthylation et désalkylation (Kroemer et *al*., 1992 ; Tisdale et Miller, 2010). Il a été estimé que le CYP3A4 enzyme présente au niveau de la paroi intestinale est responsable d'une métabolisation pré-systémique de plus de 70 % de la dose (Thummel et *al*., 1996). De nombreux métabolites ont été mis en évidence dont le principal est le norvérapamil. Le vérapamil est d'abord métabolisé en deux métabolites primaires, le norvérapamil et le D-617. Les autres métabolites sont formés par métabolisation secondaire de ces métabolites primaires (Figure 01).

Des études précédentes ont démontré l'implication du CYP3A4 et du CYP1A2 dans la N désalkylation (formation du D-617 [2- (3, 4- dimethoxyphenyl)- 5- methylamino- 2- isopropylvaleronitrile]) et la N- déméthylation (formation du norvérapamil [2, 8- bis- (3, 4- diméthoxyphenyl)- 2- isopropyl- 6- azoctanitrile]) (Kroemer et *al*., 1993). Les CYP2C ont été également impliqués dans la O-déméthylation du vérapamil plus précisément le CYP2C9 et CYP2C18 responsables de la formation des produits O-déméthylés, D- 703 [2- (4- hydroxy- 3- methoxyphenyl)- 8- (3, 4 dimethoxyphenyl)- 6- methyl- 2- isopropyl- 6- azaoctanitrile] et D-702 [2 (3, 4 dimethoxyphenyl)- 8- (4- hydroxy- 3- methoxyphenyl)- 6- methyl- 2- isopropyl- 6 azaoctanitrile] alors que le CYP2C8 donne que du D-703 (Busse et *al*., 1995). Le principal métabolite, le norvérapamil conserve 20% de l'activité cardiovasculaire. Les autres métabolites ont montré une activité très faible ou négligeable (Abernethy et *al*., 2000).

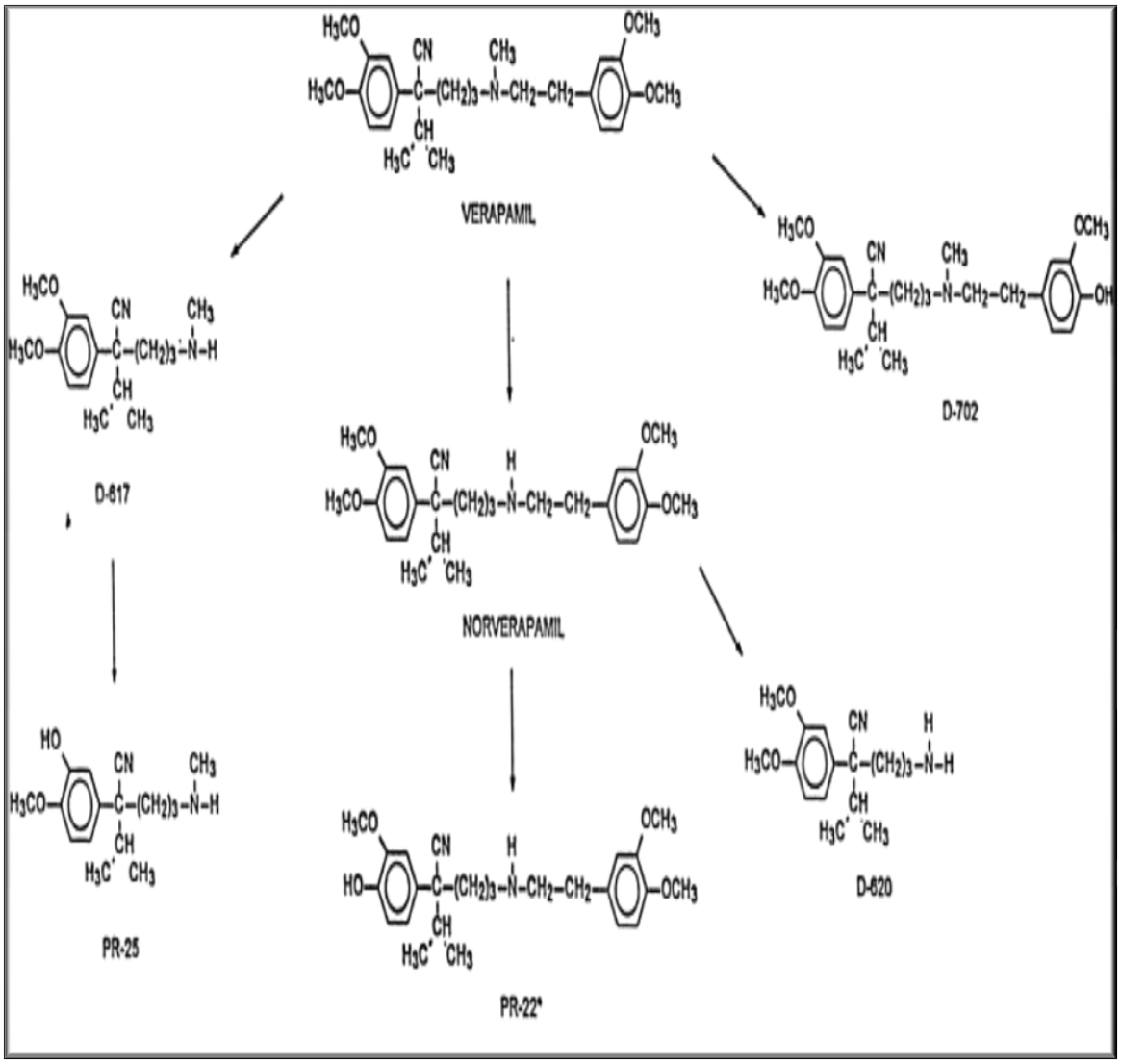

Figure 01. *Voies métaboliques du vérapamil (Abernethy et al., 2000).*

Plus de 70% de métabolites sont excrétés dans les urines et seulement 15 à 25% dans la bile. La demi-vie d'élimination est comprise entre 2 et 8 heures, mais elle augmente après quelques semaines d'utilisation, ce qui entraine un ajustement de la posologie (Castel et *al*., 1992 ; Woodcock et *al*., 1981). Les deux isomères R(+) et S(-) présentent des clairances systémiques différentes, respectivement de 800 ml/min et de 1400 ml/min. Ainsi les rapports des concentrations plasmatiques R et S varient avec la voie d'administration et dans le temps (Castel et *al*., 1992).

I.3.2. Profil cinétique de l'acide valproïque

L'acide Valproïque (Dépakine®) est un antiépileptique majeur utilisé dans le traitement de formes variées d'épilepsies (Rouillon, 2004). Son absorption est rapide et complète, le pic plasmatique est observé 1 à 4 heures après l'ingestion. Sa biodisponibilité est de 80% (Zetlaoui et Lenoble, 2004). L'acide valproïque est lié à 90% aux protéines aux concentrations plasmatiques thérapeutiques (40 - 100 mg/l) (Bailly, 2007 ; Leblanc et Gilbert, 2009 ; Marquet, 2004 ; Rouillon, 2004). À concentration > 90-100 mg/l, la liaison est saturable. La fraction libre augmente dans des proportions importantes jusqu'à 30%. La concentration libre est dose dépendante avec une relation concentration libre concentration totale non linéaire. La liaison est indépendante de l'âge (Marquet, 2004). De nombreux facteurs modifient la fraction libre : concentration totale en acide valproïque, concentration de protéines plasmatiques, médicaments liés aux protéines, acides gras libres, conditions physiopathologiques (grossesse, jeun prolongé, urémie élevée, insuffisance hépatique ou rénale) (Marquet, 2004).

L'acide valproïque est rapidement distribué dans les tissus bien irrigués : foie, rein, placenta. Dans le cerveau, il se distribue dans un premier temps au niveau de la substance blanche et secondairement se fixe sur la substance grise (Marquet, 2004). Le volume apparent de distribution est dans les limites de 0,14 à 0,4 l/kg (Zetlaoui et Lenoble, 2004). Ce volume serait augmenté chez les malades épileptiques, les sujets cirrhotiques ou atteints d'hépatite. La concentration de l'acide valproïque représente 10% de la concentration plasmatique totale dans le LCR, 7 à 10% dans le lait maternel, et 0,6 à 6% dans la salive. Le passage de l'acide valproïque dans la salive ne semble pas faire appel à un transfert uniquement passif. L'acide valproïque traverse la barrière placentaire (Marquet, 2004).

Le métabolisme est à 90% hépatique, notamment en composés actifs (Baillie et Sheffels, 1995 ; Eadie, 1991), en grande majorité par glucurono-conjugaison, même si d'autres voies métaboliques dont l'oxydation dépendante du CYP 450 peuvent intervenir. L'acide valproïque est métabolisé majoritairement par glucuronoconjugaison (70%) et minoritairement par d'autres voies, telles que l'hydroxylation et la b-oxydation mitochondriale en présence de la L-carnitine. Le défaut de la L-carnitine entraine une déviation du métabolisme vers une oméga oxydation avec production de dérivés hépatotoxiques et une hyperammoniémie (Zetlaoui et Lenoble, 2004). L'acide 2-propyl-2-

pentenoique et l'acide 2-propyl-4-pentenoique, deux de ses métabolites ont une activité anticonvulsivante (Naas, 2005).

L'acide valproïque ne semble pas induire son propre métabolisme (Dierick, 2003 ; Marquet, 2004) mais ce métabolisme peut être induit par des médicaments inducteurs (Naas, 2005). L'acide valproïque est aussi un puissant inhibiteur enzymatique du système des cytochromes et intervient, par ce biais, sur le métabolisme de nombreux médicaments, dont d'autres anti-épileptiques (Pons et *al*., 2001 ; Leblanc et Gilbert, 2009 ; Rossetti et Seeck, 2010). Il peut mener à des interactions lorsqu'il est administré conjointement à d'autres médicaments métabolisés par le cytochrome P450 hépatique, particulièrement le CYP2C9. Bien que l'oxydation dépendante du CYP 450 constitue une voie mineure, l'acide valproïque est également le substrat du CYP2C19 et CYP3A4 (Drugdex, 2009).

L'acide valproïque et ses métabolites sont éliminés par voies rénale et biliaire principalement sous forme glucuronoconjuguée (Leblanc et Gilbert, 2009). La demi-vie plasmatique varie de 5 à 20 heures (Rouillon, 2004 ; Zetlaoui et Lenoble, 2004 ; Bailly, 2007 ; Leblanc et Gilbert, 2009). La clairance corporelle totale est en moyenne de 9 ml/h/kg chez l'adulte après administration d'une dose de 400 à 800 mg. Les clairances urinaires et totales sont influencées par le nycthémère. Elles sont augmentées le soir (Marquet, 2004).

I.3.3. Profil cinétique du diazépam

Le diazépam appartient à la famille des benzodiazépines qui constitue une série chimique et une classe pharmacologique et est très largement utilisée pour traiter l'anxiété, l'insomnie et certains troubles convulsifs ou neuromusculaires (OMS, 1983). Elle se caractérise par une importante homogénéité structurale. La structure de base est la 1,4 benzodiazépine qui admet de nombreuses substitutions et permutations (Vaubourdolle, 2007).

Après l'administration orale, plus de 90% de diazépam sont absorbés et le temps moyen pour accomplir des concentrations de plasma maximales est de 1 à 1.5 heures. Le diazépam a un début d'action rapide et est habituellement moins utilisés, sauf pour des situations commandant un effet thérapeutique rapide, tel qu'une insomnie initiale (Landry et *al*., 2008).

Chez le sujet normal, le diazépam est lié à plus de 98% aux protéines plasmatiques. À l'état d'équilibre, le volume de distribution est de 0,8 à 1,0 L/kg. Seule la fraction libre non

ionisée diffuse dans les tissus et la fixation protéique ne constitue un facteur limitant la distribution du médicament que si elle a lieu avec une affinité supérieure à la fixation tissulaire (Singlas, 1986). Chez l'humain, on a obtenu des taux comparables dans le sang maternel et celui du cordon ombilical, ce qui indique un transfert placentaire rapide du médicament. La grande affinité des benzodiazépines pour les lipides favorise non seulement leur distribution dans le cerveau mais également leur redistribution vers les tissus adipeux périphériques. Cela se traduit par une chute des concentrations cérébrale et plasmatique en deçà de la concentration minimale effective, et la molécule cesse alors de produire son effet thérapeutique (Chouinard et *al*., 1999).

Le métabolisme du diazépam est essentiellement hépatique et conduit, par deux voies distinctes à la production de plusieurs métabolites : on distingue une déméthylation (voie principale) et une hydroxylation (voie secondaire) (Figure 02).

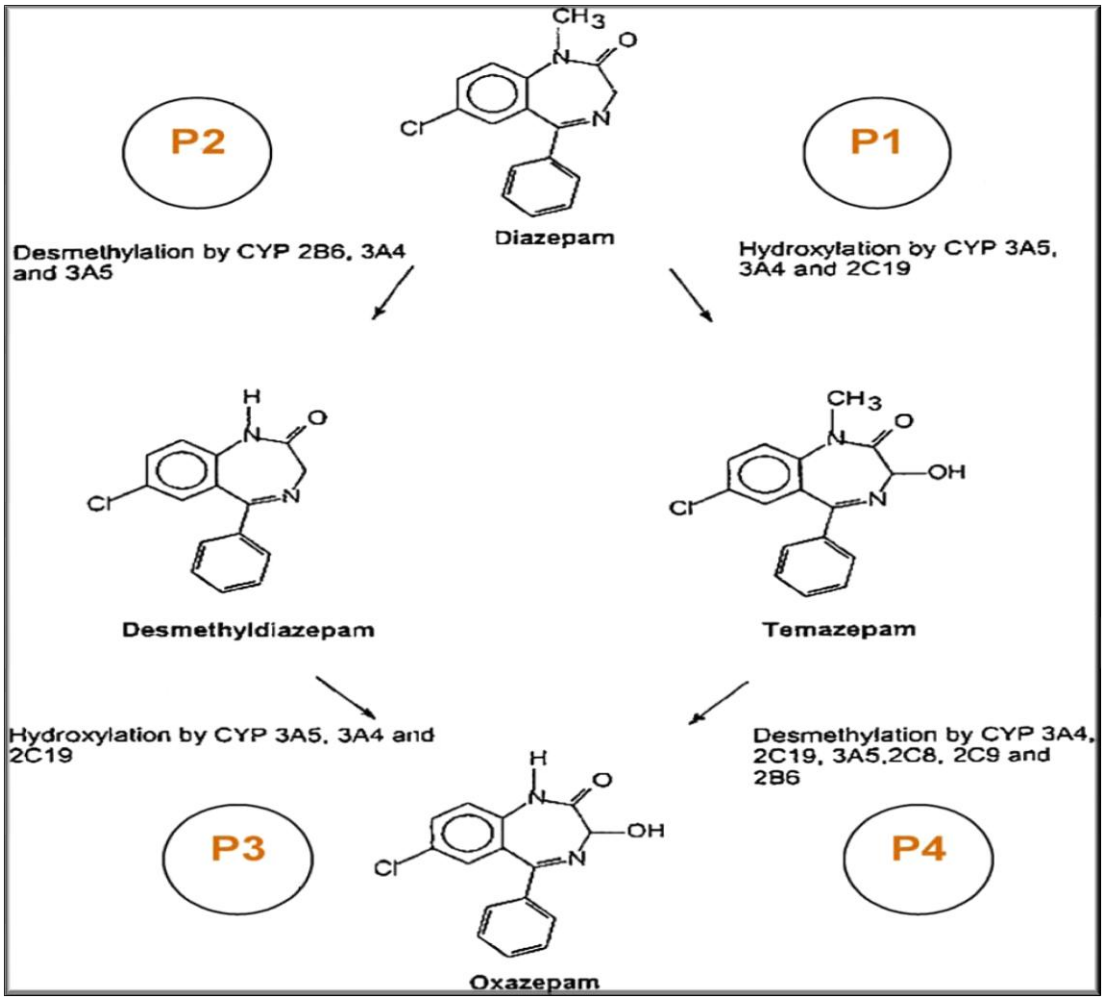

Figure 02. *voies métaboliques du diazépam (Acikgöz et al., 2008)*

Le diazépam est N-demethylé par le CYP3A4 et CYP2B6 au métabolite actif N-desmethyldiazepam ou nordiazépam et est hydroxylé par CYP3A4, le CYP2C19 et le CYP3A5 au métabolite actif temazepam (Ono et *al*., 1996 ; Jung et *al*., 1997 ; Yang et *al*., 1998). Le-desmethyldiazepam ou nordiazépam possède une activité clinique (Desilva et *al*., 1966). Cette première génération de métabolites est métabolisée soit par hydroxylation (déméthyldiazépam) médié par CYPs 2C19, 3A4 et 3A5, ou par déméthylation (témazépam) médiée par CYPs 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 3A4 et 3A5 (Ono et *al*., 1996). Ceci aboutira à la formation de l'oxazépam, une molécule avec une demi vie intermédiaire, elle même d'ailleurs commercialisée. Finalement les dérivés 3-hydroxy, Temazepam et oxazepam sont conjugués à l'acide glucuronique et transformés en métabolites hydrosolubles inactifs pouvant être excrétés dans l'urine (Landry et *al*., 2008).

La phase de distribution initiale est suivie par une phase d'élimination terminale prolongée. Le diazépam et ses métabolites sont excrétés principalement dans l'urine. La demi-vie d'élimination terminale du métabolite actif N-déméthyldiazépam est à la hauteur de 100 heures. Le diazépam a une plus longue demi-vie mais sa plus grande liposolubilité réduit la durée de son action (Landry et *al*., 2008).

Deuxième partie :

Matériels et méthodes

II.1. Matériels

II.1.1. Produits chimiques et réactifs

Au cours de nos expériences, nous avons utilisé les médicaments suivants pour le traitement des animaux : le vérapamil (Isoptine®, Abbott, France), le diazépam (Valium®, Roche, Suisse) et l'acide valproïque (dépakine®, Sanofi-aventis, France). Le chlorhydrate de vérapamil et son étalon interne, le chlorhydrate de propranolol (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.)) ont été utilisés pour la validation de la méthode analytique. L'acétonitrile et le méthanol de qualité HPLC ont été fournis par Sigma-Aldrich. Tous les autres réactifs utilisés étaient au moins de qualité analytique (ACS) dont l'éther diéthylique, l'acide phosphorique 85% et le KH_2PO_4 et provenaient de chez Merck.

II.1.2. Animaux

Des rats Wistar ayant un poids variant entre 230 et 270 gr et provenant de l'institut Pasteur d'Alger ont été utilisés. Ils sont hébergés dans des cages en plastique d'une longueur de 55 cm, d'une largeur de 35 cm et d'une hauteur de 19 cm. Ces animaux ont disposé d'eau de robinet et de nourriture standard (croquettes) ad libitum. La litière est renouvelée trois fois par semaine. Ils sont acclimatés aux conditions de l'animalerie de département de la biologie de l'université de Jijel pendant au moins une quinzaine de jours avant l'expérimentation.

II.2. Méthodes

Cette étude a porté sur des animaux de laboratoire (des rats). Le déroulement des travaux comprend le traitement des animaux, le prélèvement des échantillons sanguins à des temps choisis, l'extraction du vérapamil à partir du plasma et son dosage par RP-HPLC et enfin l'interprétation des données toxicocinétiques qui impliquent le choix d'un modèle et de méthodes statistiques permettant l'évaluation des paramètres toxicocinétiques caractéristiques du vérapamil.

II.2.1. Traitement des animaux et prélèvements sanguins

L'étude de l'influence du diazépam et de l'acide valproïque sur la toxicocinétique du vérapamil, après administration orale et intraveineuse, a été réalisée sur des rats Wistar. Les animaux ont été répartis en deux grands groupes de trois lots. Un groupe servait pour l'administration orale des médicaments et l'autre pour l'administration intraveineuse. Les

doses utilisées pour chaque voie d'administration sont rapportées dans le tableau 01. Nous avons sélectionné les doses à administrer aux rats à partir des travaux publiés auparavant et incluant dans l'étude l'utilisation de l'un des médicaments de notre étude (Paul et Whitehouse, 1977 ; Bhatti et Foster, 1997 ; Hu et *al*., 2010).

Tableau 01. *Doses utilisées pour l'administration orale et intraveineuse des médicaments.*

Administration orale			**Administration intraveineuse**		
Lot N° 1	***Lot N° 2***	***Lot N° 3***	***Lot N° 4***	***Lot N° 5***	***Lot N° 6***
10 mg/kg de vérapamil	10 mg/kg de vérapamil + 100 mg/kg de l'acide valproïque	10 mg/kg de vérapamil + 5 mg/kg de diazépam	1 mg/kg de vérapamil	1 mg/kg de vérapamil + 10 mg/kg de l'acide valproïque	1 mg/kg de vérapamil + 0,5 mg/kg de diazépam

L'étude de la toxicocinétique du vérapamil comportaient 10 prélèvements réalisés juste avant (t_0) puis 5, 20, 30 min et 1, 2, 3, 5, 8, 12 heures après la prise des médicaments par voie orale et 8 prélèvements réalisés aux temps : 5, 10, 20, 30 min et 1, 2, 3, 4 h après la prise de médicaments par voie intraveineuse. Les prélèvements sanguins ont été effectués à l'aide de tubes capillaires d'hématocrites à travers le sinus rétro orbitale au niveau de la veine oculaire des rats. Le recueil du sang a été effectué sur des tubes héparinés au cours de chaque prélèvement. Les tubes héparinés sont ensuite centrifugés à 3000 trs/min pendant 5 minutes et dont le plasma récupéré a été congelé a -18° C en attendant les étapes analytiques de la phase suivante (extraction et analyse par RP-HPLC)

II.2.2. Extraction du vérapamil à partir du plasma

L'extraction du vérapamil à partir du plasma a été réalisée sur les échantillons plasmatiques que nous avons décongelés. L'objectif est de recueillir le vérapamil présent dans l'échantillon sous forme d'extrait brut. Pour cela 50 µl de propranolol (étalon interne) (6 µg/ml) ont été ajoutés à 500 µl de plasma et l'extraction a été réalisée avec 6 ml d'éther diéthylique pur. Le surnageant est ensuite évaporé à sec sous courant d'azote et l'extrait sec

est reconstitué avec 200 µl de la phase mobile. Le rendement d'extraction absolu de cette méthode égal à 83±12 % a été jugé satisfaisant. Ce rendement est égal au rapport des signaux mesurés, d'une part après extraction et analyse du 0,5 ml de plasma dopé avec une quantité de vérapamil égale à 500 ng et d'autre part après injection directe dans le système analytique d'une solution aqueuse contenant une concentration équivalente de vérapamil (Hubert, 2003).

II.2.3. Analyse des concentrations du vérapamil par RP-HPLC

L'étude de l'influence de l'acide valproïque et du diazépam sur la toxicocinétique du vérapamil devrait porter sur le dosage du vérapamil et de son principal métabolite actif, le norvérapamil. Or, faute de disponibilité du norvérapamil, nous n'avons dosé que le vérapamil.

La première partie des analyses a consisté en la validation d'une méthode analytique pour la mesure des concentrations du vérapamil dans le plasma par HPLC en phase inverse (RP-HPLC) couplée à la détection UV. Bien que d'autres méthodes analytiques validées existent déjà pour la mesure du vérapamil dans les milieux biologiques, elles nécessitent l'accès à des appareils qui n'étaient pas disponibles dans le laboratoire. Les critères de la validation étudiés incluent la linéarité, la spécificité, et la fidélité. Les étapes de la validation sont décrites ultérieurement dans le paragraphe II.2.6. La deuxième partie des analyses a consisté en le dosage plasmatique du vérapamil par cette technique RP-HPLC validée.

Après l'extraction du vérapamil à partir des échantillons de plasma, cinquante microlitres de chaque extrait sec ont été injectés dans le système HPLC qui consiste en une pompe (LC-20 AT Shimadzu corporation, Tokyo, Japon), un dégazeur (DGU-20A3 Shimadzu corporation, Tokyo, Japon). La séparation a été réalisée en utilisant la colonne nucleosil 100- 5 C18 (125m x 4.6mm) éluée par un mélange tampon phosphate 75 mM pH=3 /acétonitrile (60/40, v/v) à un débit de 1 mL/min. La détection a été assurée par un détecteur UV-Vis (SPD-20AV Shimadzu corporation, Tokyo, Japon) réglé à une longueur d'onde de 230 nm.

Lors d'une analyse d'échantillon par RP-HPLC couplée à la détection UV, le logiciel de traitement de données traduit la quantité de l'absorbance de l'échantillon en « aire de pic ». Pour convertir les aires de pics obtenus en concentrations plasmatiques, nous avons employé une gamme d'étalonnage qui permet d'établir la corrélation entre la concentration connue en

vérapamil et une aire sous le pic fournie par le système HPLC. Dans ce but, nous avons préparé des dilutions allant de 0.05 à 10 µg/ml à partir de la solution mère de vérapamil. Des volumes de 50 µl de chaque dilution et de 50 µl (6 µg/ml) du propranolol (étalon interne) ont été utilisés pour doper 0,5 ml de plasma provenant d'animaux non traités en vue d'obtenir des solutions standards de concentrations comprises entre 5 et 1000 ng/ml. Ces dernières ont ensuite subi les étapes de l'extraction décrites dans le paragraphe II.2.2.

Nous avons analysé ces solutions sur un chromatographe HPLC. Chaque gamme est répétée trois fois.

Nous avons pris la précaution d'utiliser un étalon interne (le propranolol) aussi bien pour la réalisation de la gamme étalon que dans l'analyse des différents échantillons d'analyse. Ceci nous a servi à vérifier que tous les tubes étaient préparés de façon homogène. Tous nos résultats d'analyse ont pris en compte ce standard interne dans le calcul du 'R' suivant :

$$R = \text{aire de pic}_{\text{vérapamil}} / \text{aire de pic}_{\text{étalon interne}}$$

Le rapport de la surface du pic du vérapamil sur celui du propranolol a été tracé en fonction des concentrations de vérapamil correspondantes. Les résultats ont été évalués au moyen des méthodes statistiques appropriées (la régression des moindres carrés).

II.2.4. Analyse toxicocinétique : estimation des paramètres toxicocinétiques du vérapamil

Les concentrations plasmatiques du vérapamil calculées permettent le tracé graphique des courbes expérimentales de son évolution en fonction du temps après administration orale et intraveineuse. A partir de la courbe de suivi de la concentration du médicament en fonction du temps, plusieurs paramètres toxicocinétiques peuvent être estimés (Clairance, volume de distribution, temps de demi-vie,…). L'estimation de ces paramètres passe par la définition du modèle toxicocinétique auquel pourra obéir le médicament administré. Le modèle toxicocinétique est en fait une représentation mathématique permettant de décrire l'évolution des concentrations d'un médicament dans les fluides biologiques (ex : plasma) en fonction du temps et de quantifier les principales étapes du devenir de ce médicament dans l'organisme (Moulin et Coquerel, 2002).

L'approche que nous avons utilisée pour calculer les paramètres caractéristiques de la toxicocinétique du vérapamil au cours de notre étude est l'approche monocompartimentale.

La représentation mathématique décrivant l'évolution des concentrations d'un médicament dans le sang en fonction du temps varie selon la voie d'administration (Moulin et Coquerel, 2002).

II.2.4.1. Estimation des paramètres toxicocinétiques après administration intraveineuse

Dans un modèle monocompartimental avec administration intraveineuse, l'expression analytique décrivant l'évolution des concentrations plasmatiques en fonction du temps est donnée par l'équation (1).

$$Ct = Co\ e^{-ket} \qquad Eq\ (1)$$

L'équation $Ct = Co\ e^{-ke.t}$ peut être écrite sous la forme logarithmique :

$$\ln Ct = \ln Co - ket \qquad Eq\ (2)$$

Ke est la constante d'élimination et correspond à la pente de la courbe.

Co est la concentration en vérapamil à l'instant zéro, c'est-à-dire au moment de l'administration du médicament (t_0).

Les paramètres suivants seront calculés à partir de la courbe de l'évolution des concentrations plasmatiques en fonction du temps : l'AUC, le temps de demi-vie d'élimination ($T_{1/2}$), la clairance (Cl), le volume de distribution (Vd).

L'AUC (aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de vérapamil en fonction du temps) est calculée par la méthode des trapèzes qui consiste à tracer des trapèzes sous la courbe entre les points expérimentaux, calculer leur surface et effectuer la somme des aires selon la formule suivante :

Si (C_i, T_i) sont les points de mesure,

$$AUC_{0\text{-}t\ last} = ½(C_1+C_2)\ (T_2-T_1) + ½(C_2+C_3)\ (T_3-T_2) + \ldots\ldots\ldots ½(C_{n-1}+C_n)\ (T_n - T_{n-1})$$

(Gibaldi, 1991).

$$AUC_{0\text{-}\infty} = AUC_{0\text{-}t\ last} + C_{last} / Ke \qquad Eq\ (3)$$

C_{last}: dernière concentration mesurée.

Ke: Constante de vitesse d'élimination.

L'AUC s'exprime en concentration.temps (Moulin et Coquerel, 2002).

Le temps de demi-vie ($T_{1/2}$) est calculé qu'à partir de la phase terminale de la courbe des concentrations plasmatiques selon l'équation (4) (Moulin et Coquerel, 2002).

$$T_{1/2} = 0{,}693/Ke \qquad Eq\ (4)$$

La clairance plasmatique du vérapamil a été déterminée par le rapport entre la dose administrée et l'AUC (Moulin et Coquerel, 2002).

$$Cl = Dose_{IV} / AUC_{IV}$$

Dose $_{IV}$= dose administrée par voie intraveineuse.

Le volume de distribution est obtenu par le rapport entre la clairance (Cl) et la constante d'élimination Ke (Moulin et Coquerel, 2002).

$$V_d = Cl/Ke$$

II.2.4.2. Estimation des paramètres toxicocinétiques après administration orale

Lors d'une administration par voie orale, il a été démontré que les équations représentant l'évolution des concentrations plasmatiques d'un médicament en fonction du temps, dans un modèle monocompartimental, sont représentées par (Moulin et Coquerel, 2002) :

$$C(t) = \underbrace{C_1\, e^{-Ke.t}}_{1} - \underbrace{C_2\, e^{-ka.t}}_{2} \qquad Eq\ (5)$$

1 : équation de la portion de la courbe qui représente l'élimination du médicament avec C_1 l'interception à l'origine de la partie de la courbe représentant l'élimination du produit en fonction du temps et Ke la constante de vitesse d'élimination (pente de cette partie de la courbe).

2 : équation de la portion de la courbe qui représente l'absorption du médicament avec C_2 l'interception à l'origine de la partie de la courbe représentant l'absorption du produit en fonction du temps et ka la constante de vitesse d'absorption.

Pour calculer la constante de vitesse d'absorption (Ka) et la constante de vitesse d'élimination (Ke), on trace la représentation graphique en cordonnées semi logarithmiques de la concentration en fonction du temps. Ke est déterminée graphiquement et est égale à la pente de la partie de la courbe qui correspond à l'élimination. Par la méthode des résidus on peut calculer une deuxième pente qui correspond à la constante d'absorption Ka. A tout instant t on déduit de la droite extrapolée à partir des derniers points (temps tardifs) une valeur obtenue par soustraction de la valeur estimée sur la courbe expérimentale. L'ensemble de ces points décrit une droite passant par la concentration C_0.

Les paramètres suivants seront calculés à partir de la courbe de l'évolution des concentrations plasmatiques en fonction du temps : l'AUC, Cmax et Tmax, $T_{1/2}$, la clairance (Cl) et le volume de distribution (Vd).

L'AUC du vérapamil et son temps de demi-vie d'élimination sont calculés à partir des équations (3) et (4) respectivement.

La Cmax est la concentration plasmatique maximale relevée durant l'étude cinétique et le Tmax est le temps nécessaire pour atteindre la Cmax.

$$Tmax = Ln\ (Ka / Ke)/Ka\text{-}Ke$$

$$Cmax = C_1\, e^{-Ke\ Tmax} - C_2\, e^{-Ka\ Tmax}$$

La clairance plasmatique (Cl) est déterminée par la formule :

$$CL = F \frac{Dose}{AUC\ 0rale};$$

avec F, le facteur de biodisponibilité = $\frac{AUCorale}{AUCIV} x \frac{Dose\ IV}{Dose\ orale}$

Le volume de distribution (Vd) est obtenu par le rapport entre la clairance et la constante d'élimination Ke.

$$Vd = \frac{CL}{Ke}$$

II.2.5. Analyse statistique

La distribution exacte des paramètres est difficile à établir, du fait du petit nombre d'animaux inclus dans l'étude. Par conséquent une transformation logarithmique, qui " normalise " la distribution, est effectuée avant toute évaluation statistique. Les analyses statistiques ont été réalisées avec les logiciels Origin 6.0 (Microcal Software. Inc) et Excel 2007. Les différences statistiques des paramètres toxicocinétiques entre le lot témoin et chacun des deux lots de l'essai sont effectuées avec le test t de student. Toutes les expériences ont été faites en triple et les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type (Sd). Une valeur de p inférieure à 0.05 a été considérée comme statistiquement significative.

II.2.6. Validation de la méthode analytique

La stratégie de validation s'est basée sur une adaptation d'une approche proposée par la société française des sciences et techniques pharmaceutiques (SFSTP) (Chapuzet, 1997 ; Hubert, 2003). Les paramètres de validation étudiés incluent la linéarité, la spécificité, et la fidélité.

La linéarité a été estimée en analysant des échantillons plasmatiques dopés à des concentrations différentes de vérapamil. Le protocole d'étude employé pour étudier la linéarité est similaire à celui de la préparation de la gamme d'étalonnage décrit dans le paragraphe II.2.2. Le domaine de calibration testé a été choisi à partir de la limite de quantification inférieure (5 ng/ml) et jusqu'à la limite supérieure des valeurs habituellement rencontrées lors des dosages du vérapamil (1000 ng/ml).

Dans le but de vérifier la spécificité de la méthode d'analyse, nous avons analysé un échantillon de plasma provenant d'animaux non traités ainsi qu'un échantillon de plasma dopé avec des concentrations 500 ng/ml de vérapamil et 300 ng/ml de son étalon interne le propranolol. Les chromatogrammes obtenus avec les différents échantillons ont été comparés dans le but d'identifier d'éventuelles interférences (Chapuzet, 1997 ; Hubert, 2003).

La fidélité peut être exprimée à trois niveaux : la répétabilité (variabilité minimale), la fidélité intermédiaire (variabilité maximale) et la reproductibilité (variation inter laboratoire) (Chapuzet, 1997 ; Hubert, 2003). Seules les deux premières sont étudiées ici. Afin d'étudier

la répétabilité, trois solutions de contrôle de qualité interne (25, 500, 1000 ng/ml de vérapamil) tirées des segments bas, moyens et élevés de la plage d'étalonnage ont été analysées 10 fois par le même opérateur, dans un court intervalle de temps et dans les mêmes conditions opératoires. Deux répétitions (n=2) ont été faites pour chaque échantillon (p=10). L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne (m), l'écart-type (Sd) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales de chaque série. Le CV est calculé par la formule suivante : (Sd / m) 100 et représentera la répétabilité de la méthode en %. Il sera comparé au CV limite d'acceptabilité qui est inférieur ou égal à 15% (Chapuzet, 1997 ; Hubert, 2003).

La condition de la fidélité intermédiaire est vérifiée en faisant effectuer les manipulations par deux opérateurs distincts sur un même appareillage à des jours différents et avec la même méthode. Chacun de ces deux opérateurs analysant trois échantillons homogènes aux trois niveaux de contrôle de qualité (25, 500 et1000 ng/ml de vérapamil). Les modalités de calcul sont identiques à celles de la répétabilité. La méthode est fidèle si le CV est inférieur ou égal à 15% (Chapuzet, 1997 ; Hubert, 2003).

Troisième partie :

Résultats et discussion

III.1. Résultats de la validation analytique

La méthode analytique par RP-HPLC et détection UV que nous avons développée pour le dosage du vérapamil et de son étalon interne, le propranolol, dans le plasma à été jugée satisfaisante. Les paramètres de la validation étudiés sont : la spécificité, la linéarité et la fidélité (fidélité intermédiaire et répétabilité) de la méthode analytique.

Une procédure d'analyse est dite spécifique lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient uniquement de la substance à analyser (Hubert, 2003). Le chromatogramme obtenu avec le plasma provenant d'animaux non traités n'a pas présenté de pics aux temps de rétention du vérapamil et celui de son étalon interne, le propranolol, permettant de conclure à une absence d'interférences. Ceci garantit que les signaux proviennent uniquement du vérapamil et de son étalon interne. La méthode est donc spécifique. Certains pics d'intensité assez importante ont été observés sur le chromatogramme, mais à des temps de rétention inférieurs à ceux du vérapamil et du propranolol. Leur origine peut être attribuée à la matrice biologique (le plasma).

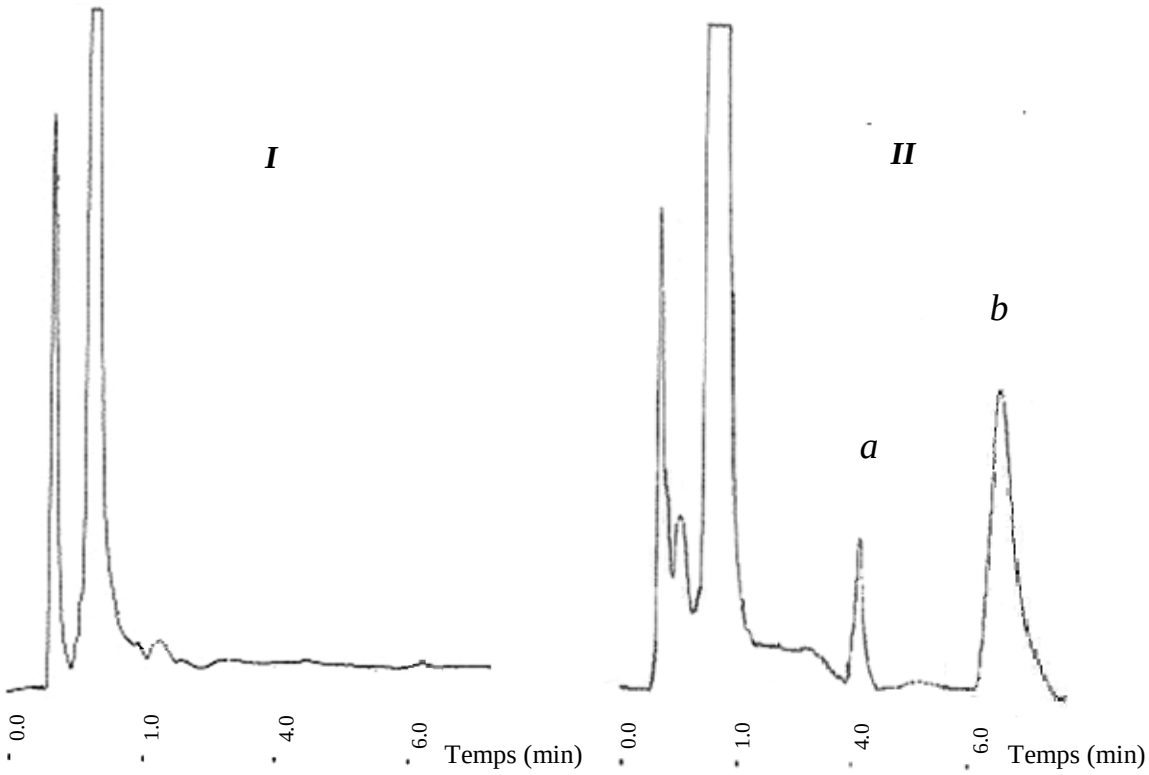

Figure 03. *Chromatogrammes obtenus après injection dans le système RP-HPLC de 50 µl de : (I) plasma provenant d'animaux non traités ; (II) plasma dopé avec 500 ng/ml du vérapamil (b) et 300 ng/ml de son étalon interne le propranolol (a) réalisés lors de l'étude de la spécificité de la méthode analytique.*

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon (Hubert, 2003). Une relation linéaire a pu être établie entre la concentration et la réponse du vérapamil pour un intervalle de dosage englobant les valeurs de la gamme testée. Ainsi, les réponses obtenues en fonction de la concentration pour le vérapamil étaient de type linéaire (droite d'équation $y = ax + b$, où a est la pente et b l'ordonnée à l'origine) pour l'intervalle de dosage allant de 5 à 1000 ng/ml pour les échantillons plasmatiques. Le coefficient de détermination R^2 obtenu avec les échantillons plasmatiques étaient de 0,9957.

La fidélité de la méthode exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de prises multiples d'un échantillon homogène, dans des conditions prescrites (Hubert, 2003). La fidélité, qui comprend la fidélité intermédiaire et la répétabilité, obtenue aux différents niveaux a été jugée satisfaisante et correspond aux besoins de la méthode dans le cadre de son utilisation en analyse (Tableau 02).

Tableau 02. *Résultats de la fidélité (fidélité intermédiaire et la répétabilité) de la méthode RP-HPLC utilisée pour la mesure des concentrations du vérapamil dans le plasma.*

		Niveaux		
		25 ng/ml	***500ng/ml***	***1000ng/ml***
Fidélité	***CV* de répétabilité***	10,2%	7,6%	8,7%
	CV* de fidélité intermédiaire	18,4%	11,9%	8,5%

** CV : Coefficient de variation.*

CV limite d'acceptabilité égal à 15%.

III.2. Résultats de l'analyse toxicocinétique du vérapamil

Les interactions médicamenteuses toxicocinétiques sont à l'origine d'échecs thérapeutiques ou d'événements indésirables graves pouvant conduire à des contre-indications d'association ou à des retraits de commercialisation (Drayton et *al*., 1995 ; Ray et *al*., 2004 ; Boule et *al*., 2008). Les premières interactions toxicocinétiques ont été rapportées dans les années quatre vingt-dix (digoxine/quinidine) suite à des événements inattendus. Leur connaissance, et ainsi leur prévention, s'est améliorée ces dernières années grâce au développement de la toxicocinétique moléculaire (Levêque et *al*., 2010).

L'étude que nous avons menée s'inscrit dans le cadre de la recherche de ces interactions et avait pour but de mettre en évidence l'influence de l'acide valproïque et du diazépam sur la toxicocinétique du vérapamil. Pour cela, nous avons déterminé la biodisponibilité orale et intraveineuse du vérapamil chez des rats Wistar après administration du vérapamil seul ou en présence de l'acide valproïque ou du diazépam.

Dans un premier temps nous avons développé une nouvelle méthode analytique permettant de mesurer les concentrations du vérapamil dans le plasma. Cette méthode développée permet de mesurer facilement et de façon précise et peu coûteuse les concentrations du vérapamil dans le plasma. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé cette méthode pour la caractérisation de la toxicocinétique du vérapamil. Ainsi des analyses par RP-HPLC ont été effectuées sur divers échantillons de plasma provenant des animaux ayant reçu du vérapamil seul ou en présence de l'acide valproïque ou du diazépam. Les paramètres caractérisant la toxicocinétique du vérapamil ont été ensuite calculés selon un modèle monocompartimental. Le choix de ce modèle est basé sur des études antérieures portées sur la cinétique du vérapamil chez le rat (Bhatti et Foster, 1997). Ce modèle a permis de prédire la cinétique plasmatique du vérapamil en cas de son administration seul ou en présence de l'acide valproïque ou du diazépam.

Les résultats ont été édités pour chaque groupe d'animaux et consistent-en :

- Une courbe de la cinétique plasmatique du vérapamil ;
- Un tableau résumant les paramètres caractéristiques de la toxicocinétiques du vérapamil.

III.2.1. Influence du l'acide valproïque sur la toxicocinétique vérapamil

Les moyennes des concentrations plasmatiques du vérapamil calculées après administration orale et intraveineuse nous ont permis de tracer les courbes moyennes de la cinétique plasmatique du vérapamil dans chaque groupe d'animaux de l'essai (figure 04 et 05).

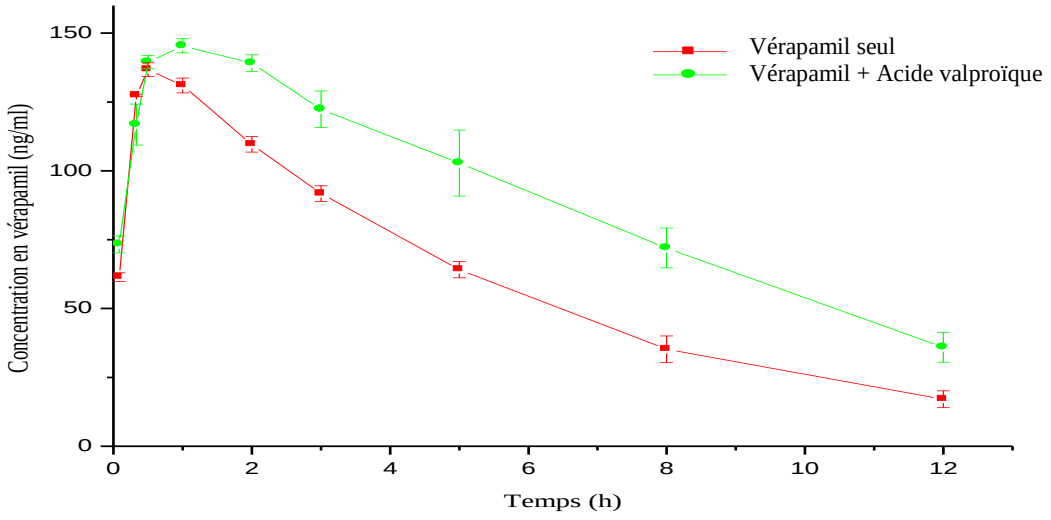

Figure 04. *Courbes de l'évolution des concentrations plasmatiques moyennes du vérapamil au cours du temps après administration orale de 10 mg/Kg de vérapamil seul chez les rats du groupe témoin et de 10 mg/Kg du vérapamil en présence de 100 mg/Kg de l' acide valproïque chez les rats du groupe de l'essai. Chaque point représente la moyenne ± Sd obtenue chez 3 rats de chaque groupe.*

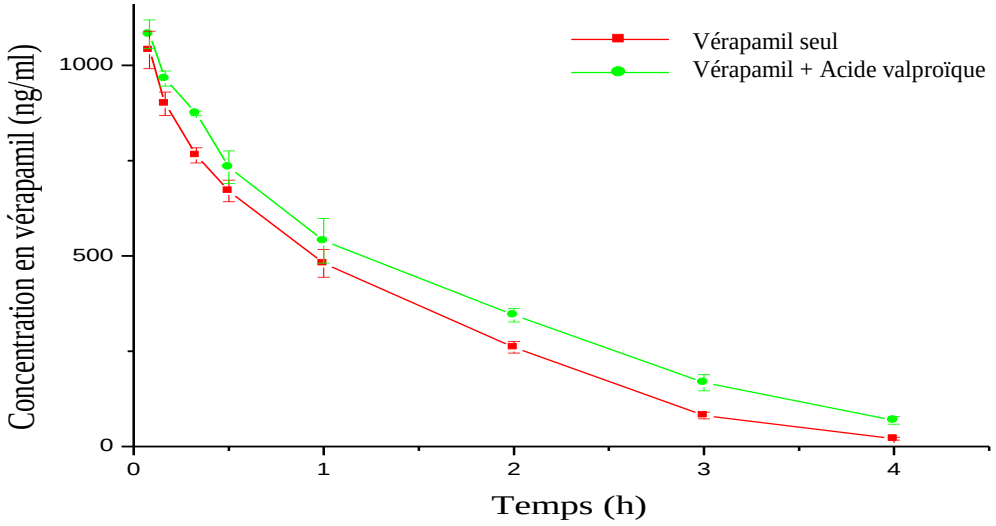

Figure 05. *Courbes de l'évolution des concentrations plasmatiques moyennes du vérapamil au cours du temps après administration intraveineuse de 10 mg/Kg de vérapamil seul chez les rats du groupe témoin et de 10 mg/Kg du vérapamil en présence de 100 mg/Kg de l'acide valproïque chez les rats du groupe de l'essai. Chaque point représente la moyenne ± Sd obtenue chez 3 rats de chaque groupe.*

Les deux courbes de la figure 04 présentent un profil relativement régulier, composé d'une phase de distribution rapide de la molécule, puis d'une phase d'élimination plus lente. Après administration de 10 mg/kg du vérapamil seul par voie orale (groupe témoin), sa concentration plasmatique augmente jusqu'à un pic de concentration (Cmax) égal à 137,950 ± 3,179 ng/mL. Ce pic est atteint en moyenne après 0,614 ± 0,04 h (c'est le Tmax). Après ce Cmax, la concentration plasmatique du vérapamil diminue progressivement jusqu'à atteindre 17,083 ± 3,032 ng/ml douze heures après l'administration du médicament. La co-administration de l'acide valproïque et du vérapamil, entraine une augmentation moyenne significative de la Cmax de 137,950 ± 3,179 ng/mL à 151,069 ± 3,9 ng/ml ($P<0,05$). Le temps nécessaire pour atteindre ce pic de concentration est aussi significativement augmenté par rapport au groupe témoin ($p<0,05$).

Après l'administration intraveineuse des médicaments (figure 05), la concentration du vérapamil décroit progressivement en fonction du temps. La courbe de décroissance des concentrations plasmatiques correspond mathématiquement à une courbe exponentielle. Lors de la co-administration de l'acide valproïque, les concentrations du vérapamil à chaque temps de prélèvement dans le groupe d'essai sont légèrement supérieures à celles du groupe témoin.

A partir des courbes de l'évolution des concentrations plasmatiques du vérapamil en fonction du temps, nous avons été en mesure de calculer plusieurs paramètres caractérisant la toxicocinétique du vérapamil dans chaque groupe : le t½, l'AUC, la clairance plasmatique (Cl) et le volume de distribution (Vd). Le mode de calcul de ces paramètres a été détaillé dans la partie matériels et méthodes. Ces paramètres calculés après administration orale et intraveineuse sont résumés dans les tableaux 05 et 06.

Tableau 03. *Paramètres toxicocinétiques moyens (moyenne ± Sd, n=3) du vérapamil suite à l'administration orale de 10 mg/Kg du vérapamil seul ou en présence de 100 mg/Kg de l'acide valproïque.*

Paramètres	**Vérapamil**	**Vérapamil + acide valproïque**
Ke	0,187 ± 0,017	0,126 ± 0,014
Ka	5,793 ± 0,633	3,107 ± 0,450
T ½ (h)	3,727 ± 0,345	5,522 ± 0,596
AUC (h.ng/ml)	838,793 ± 56,781	1385,812 ± 99,850
Cl (ml/min/Kg)	11,956 ± 0,784	8,448 ± 0,627
Vd (ml/min/Kg)	64,079 ± 2,821	67,107 ± 3,651

Tableau 04. *Paramètres toxicocinétiques moyens (moyenne ± Sd, n=3) du vérapamil suite à l'administration intraveineuse de 1 mg/Kg du vérapamil seul ou en présence de 10 mg/Kg de l'acide valproïque.*

Paramètres	**Vérapamil**	**Vérapamil + acide valproïque**
Ke	0,936 ± 0,047	0,661 ± 0,032
T ½(h)	0,74 ± 0,037	1,048 ± 0,049
AUC (h.ng/ml)	1332,199 ± 36,892	1702,433 ± 28,014
CL (ml/min/Kg)	12,516 ± 0,341	9,791 ± 0,161
Vd (ml/min/Kg)	13,387 ± 0,815	14,815 ± 0,506

Ke : la constante de vitesse d'élimination, Ka : la constante de vitesse d'absorption, T½ : temps de demi-vie de la phase terminale, AUC : aire sous la courbe des concentrations, Cl : clairance plasmatique, Vd : volume de distribution à l'état d'équilibre.

La comparaison des paramètres toxicocinétiques caractérisant l'évolution des concentrations plasmatiques du vérapamil en fonction du temps entre le groupe témoin (traité avec le vérapamil) et le groupe de l'essai (traité avec le vérapamil et l'acide valproïque) montre que le traitement des rats avec l'acide valproïque modifie significativement la cinétique du vérapamil.

L'AUC est représentée par la surface sous-tendue par la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps. Elle exprime le niveau d'exposition de l'organisme au médicament (Moulin et Coquerel, 2002). L'AUC du vérapamil a augmenté de manière significative ($p<0,05$) de 838,793 ± 56,781 à 1385,812 ± 99,850 après la co-administration de l'acide valproïque.

Le temps de demi-vie (t½) est le temps nécessaire pour que les concentrations plasmatiques soient divisées par deux lorsque l'équilibre de distribution est obtenu : il ne peut donc être calculé qu'à partir de la phase terminale de la courbe des concentrations plasmatiques (Moulin et Coquerel, 2002). Le temps de demi vie du vérapamil égal à 5,522 ± 0,596 heures a été beaucoup plus long après l'administration concomitante de l'acide valproïque qu'après l'administration du vérapamil seul (3,727 ± 0,345 heures).

La clairance mesure la capacité d'un organisme ou d'un organe à éliminer un médicament et est spécifique à chaque molécule. Au sens toxicologique du terme, c'est la fraction du débit sanguin traversant un organe qui sera totalement débarrassée du médicament (Moulin et Coquerel, 2002). La clairance plasmatique moyenne du vérapamil obtenue suite à l'administration concomitante de l'acide valproïque a été significativement inférieure à la clairance plasmatique moyenne obtenue chez les animaux du groupe témoin (traités seulement avec le vérapamil) (8,448 ± 0,627 versus 11,956 ± 0,784 ml/kg/min) ($p<0,05$).

Le volume de distribution (Vd) est le volume apparent (c'est-à-dire théorique, fictif…) dans lequel semble se répartir la totalité de la quantité (Q) du médicament (Moulin et Coquerel, 2002). Au cours de cette étude nous avons enregistré une légère augmentation non significative du Vd.

Suite à l'administration intraveineuse des médicaments, nous avons également pu mettre en évidence l'existence d'une différence significative de l'AUC entre le groupe témoin et le

groupe de l'essai : les valeurs des AUC sont plus faibles chez le groupe témoin (1332,199 ± 36,892 h.ng/mL) que chez le groupe de l'essai (1702,433 ± 28,014 h.ng/ml).

Le temps de demi-vie apparent (t½) est également, en moyenne, plus bas chez les animaux du groupe témoin (0,74 ± 0,037 h versus 1,048 ± 0,049 h dans le groupe de l'essai).

Un autre paramètre varie de façon significative, il s'agit de la clairance dont la valeur est plus importante chez les animaux du groupe témoin (12,516 ± 0,341 ml/min/Kg) que chez les animaux du groupe de l'essai (9,791 ± 0,161 ml/min/Kg). Aucune différence significative dans le Vd n'a pu être signalée.

De nombreuses études ont déjà montré l'influence de différents médicaments sur la cinétique du vérapamil dans le cadre des interactions toxicocinétiques (Mooy et *al*., 1987 ; Sandström et Lennernäs, 1999 ; Chung et *al*., 2009 ; Kovarik et *al*., 2005 ; Elkiweri et *al*., 2009). Une revue de la littérature, concernant le vérapamil présentée dans la première partie de cet ouvrage, a permis de démontrer que la cinétique du vérapamil a été amplement étudiée (Schwartz et *al*., 1985 ; Bhatti et Foster, 1997 ; Busse et *al*., 2001). Cependant, aucune étude in vivo n'a été menée sur l'influence de l'acide valproïque et du diazépam sur la toxicocinétique du vérapamil. Notre étude apporte donc des données nouvelles sur la toxicocinétique du vérapamil co-administré avec l'acide valproïque chez le rat.

Les résultats retrouvés dans notre étude montrent des différences significatives dans les paramètres toxicocinétiques du vérapamil après l'administration concomitante de l'acide valproïque tant après administration par voie intraveineuse que par voie orale. Les seules différences non significatives concernent le Vd. Etant donné qu'aucune étude comparative, *in vitro*, portée sur la toxicocinétique du vérapamil co-administré avec l'acide valproïque ou le diazépam à des rats n'avait été réalisée auparavant, les résultats de notre étude seront discutés sur la base des données bibliographiques disponibles sur la cinétique de chaque médicament inclus dans l'étude.

Le vérapamil est indiquée dans les cas d'hypertension, de certains types d'arythmies, notamment lors de la tachycardie supraventriculaire (Kittleson et Kienle, 1998 ; Muir et *al*., 1999 ; Rousselot, 2001). Certains malades épileptiques ou anxieux recevant l'acide valproïque ou du diazépam peuvent développer des maladies cardiovasculaires pour lesquelles le vérapamil pourrait être prescrit (Beig et *al*., 2009). Le vérapamil est métabolisé

quasi totalement par le système des cytochromes P450. C'est un substrat du CYP3A4 et du CYP2C plus précisément le CYP2C9 et CYP2C18. Il est soumis à un intense effet de premier passage après administration orale et ses paramètres toxicocinétiques sont influencés par l'ampleur de la liaison aux protéines plasmatiques et aux altérations du métabolisme hépatique (Ling et Jamali, 2005). L'acide valproïque est métabolisé majoritairement par glucuronoconjugaison (70 %) et minoritairement par d'autres voies, telles que la β-oxydation mitochondriale et l'hydroxylation. L'acide valproïque est un inhibiteur enzymatique pouvant mener à des interactions lorsqu'il est administré conjointement à d'autres médicaments métabolisés par le cytochrome P450 hépatique, particulièrement le CYP2C9. Il est également le substrat du CYP2C19 et CYP3A4 et est fortement lié aux protéines plasmatiques (90 à 95 %). L'administration concomitante de l'acide valproïque provoque une augmentation significative de l'AUC du vérapamil et de son temps de demi-vie ainsi qu'une diminution significative de sa clairance.

Parmi les mécanismes proposés pour tenter d'expliquer les modifications observées dans les paramètres toxicocinétiques du vérapamil après la co-administration de l'acide valproïque, on retrouve comme première hypothèse une compétition pour les mêmes sites de liaison aux protéines plasmatiques. En effet, pour les médicaments fortement liées aux protéines, même les petits changements de la disponibilité des protéines peuvent avoir comme conséquence de grandes augmentations de la fraction non liée du médicament (Ling et Jamali, 2005). Le vérapamil et ses métabolites sont un exemple de ces médicaments qui se lient fortement aux protéines plasmatiques (90% du composé administré se trouve sous forme liée) et toute condition qui réduit la disponibilité des protéines peut augmenter la fraction libre du médicament dans le plasma, soit la fraction libre active qui peut se lier à son récepteur et produire un effet thérapeutique ou toxique. Sa clairance plasmatique est alors significativement réduite et sa demi-vie d'élimination est allongée. L'AUC est aussi fortement augmentée en raison d'une clairance ralentie. C'est bien ce que nous avons observé lors de cette étude. Le CYP2C9 est une enzyme impliquée dans une grande partie du métabolisme du vérapamil. Il est raisonnable donc de croire qu'il s'agit aussi d'une interaction médicamenteuse médiée par une inhibition enzymatique, étant donné que l'acide valproïque est un inhibiteur du CYP2C9. L'inhibition du CYP2C9 pourrait réduire notablement la clairance plasmatique du vérapamil et augmenter sa biodisponibilité (AUC augmentée) et de ce fait allonger sa demi-vie d'élimination. Les résultats d'une étude *in vitro* de Wen et ses collaborateurs (2001) semblent confirmer cette hypothèse. Ainsi, lors

d'une étude *in vivo* sur des médicaments substrats du CYP2C9 dont le vérapamil, ces auteurs prétendent que l'acide valproïque a diminué la clairance métabolique de ces médicaments. L'acide valproïque est aussi un faible inhibiteur réversible de l'activité du CYP3A4 (Wen et *al*., 2001). Malgré son pouvoir inhibiteur un peu faible vis-à-vis de l'activité du CYP3A4, l'acide valproïque est généralement administré à fortes doses (Davis et *al*., 1994), et sa concentration dans les entérocytes peut être très élevée et par conséquence une inhibition de l'activité du CYP3A4 intestinale pourrait être discutée. Le CYP3A4 des entérocytes est associée à la glycoprotéine P (P-gP), transporteur qui fait sortir le médicament de la cellule, qui réabsorbé, peut à nouveau être métabolisé par le CYP3A4 ce qui participe à une forte élimination présystémique du vérapamil. L'inhibition du CYP3A4 limite ainsi l'élimination présystémique du vérapamil et augmente sa biodisponibilité après administration orale. Lors d'une étude similaire sur des sujets épileptiques, le traitement avec l'acide valproïque a été associé à une augmentation de l'AUC (environ 50%) de la nimodipine (Tartara et *al*., 1991).

Parmi les mécanismes aussi proposés pour tenter d'expliquer ces résultats, on retrouve comme hypothèse une diminution de l'élimination du vérapamil. L'élimination hépatique des médicaments fait intervenir une biotransformation de type II telle qu'une glucuroconjugaison. Les uridine diphosphate glucuronosyltransférases (UGT) sont des enzymes qui catalysent les réactions de glucuroconjugaison, le processus métabolique majeur de détoxification qui permet au médicament et à ses métabolites de s'associer à l'acide glucuronique pour former un nouveau composé plus soluble dans l'eau et donc plus facilement éliminé par les reins. L'acide valproïque est un inhibiteur de l'UGT (Yuen et *al*., 1992 ; Bernus et *al*., 1994). L'inhibition de l'UGT est donc probablement à l'origine de la diminution de la clairance plasmatique du vérapamil et l'allongement de sa demi-vie d'élimination.

Il faut souligner l'absence de phénomènes d'inductions du métabolisme des CYP 450 et des enzymes de phase II faisant intervenir des mécanismes transcriptionnels qui pourraient être à l'origine de la diminution de la biodisponibilité du vérapamil étant donné que nous avions assisté à une augmentation et non pas à une diminution de cette dernière dans cette étude.

III.2.2. Influence du diazépam sur la toxicocinétique du vérapamil

Les moyennes des concentrations du vérapamil calculées après administration orale et intraveineuse nous ont permis de tracer les courbes moyennes de la cinétique plasmatique du vérapamil dans le groupe témoin et le groupe de l'essai (Figure 06 et 07).

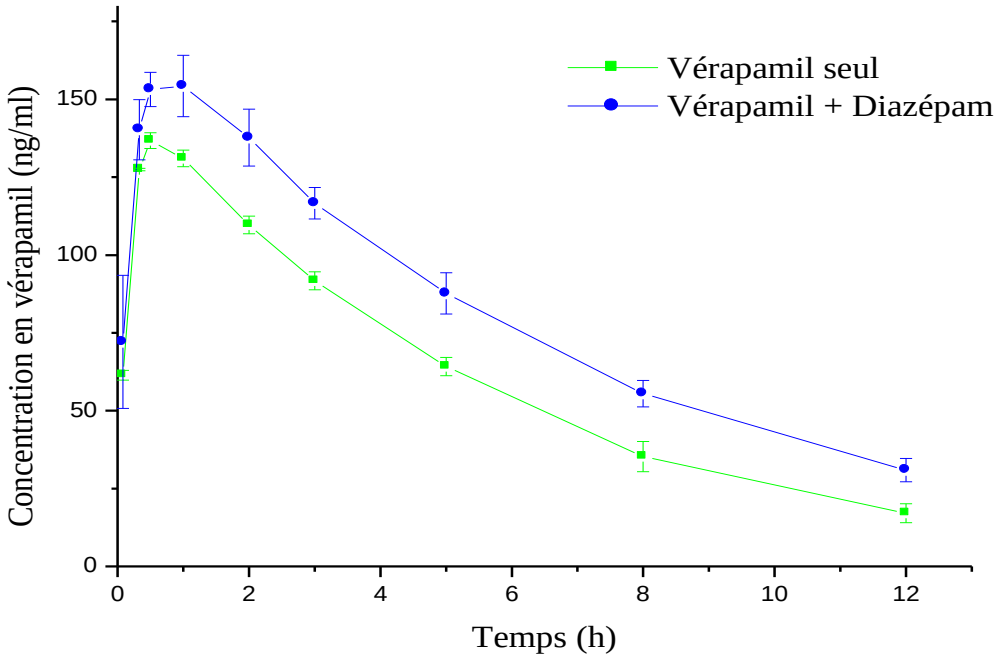

Figure 06. *Courbes de l'évolution des concentrations plasmatiques moyennes de vérapamil au cours du temps après administration orale de 10 mg/Kg de vérapamil seul chez les rats du groupe témoin et de 10 mg/Kg de vérapamil en présence de 5 mg/Kg du diazépam chez les rats du groupe de l'essai. Chaque point représente la moyenne ± Sd obtenue chez 3 rats de chaque groupe.*

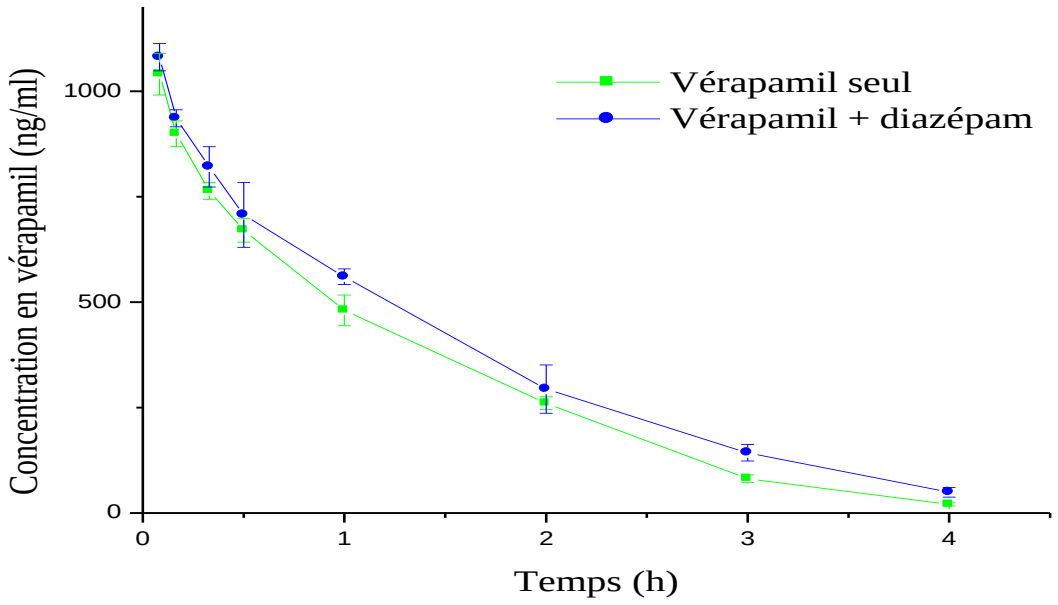

Figure 07. *Courbes de l'évolution des concentrations plasmatiques moyennes de vérapamil au cours du temps après administration intraveineuse de 10 mg/Kg de vérapamil seul chez les rats du groupe témoin et de 10 mg/Kg de vérapamil en présence de 0,5 mg/Kg du diazépam chez les rats du groupe de l'essai. Chaque point représente la moyenne ± Sd obtenue chez 3 rats de chaque groupe*

Les deux courbes de la figure 06 présentent un profil relativement régulier, composé d'une phase de distribution rapide de la molécule, puis d'une phase d'élimination plus lente. Après administration orale de 10 mg/kg de vérapamil seul (groupe témoin), sa concentration plasmatique maximale (Cmax) est égale à 137,950 ± 3,179 ng/mL. Ce pic est atteint en moyenne après 0,614 ± 0,04 h (c'est le Tmax). Une diminution progressive des concentrations plasmatiques a été observée après ce Tmax. Lors de l'administration concomitante du diazépam et du vérapamil, nous avons observé une augmentation moyenne significative de la Cmax de 137,950 ± 3,179 ng/mL à 159,641 ± 9,735 ng/ml (Diazépam) ($P<0,05$). Une augmentation significative ($p<0,05$) du temps nécessaire pour atteindre ce Cmax a été également observée dans le groupe de l'essai.

Après la co-administration intraveineuse du diazépam (groupe de l'essai), la cinétique du vérapamil voit une décroissance progressive des concentrations du vérapamil (figure 07) et les concentrations du vérapamil dans le groupe témoin sont nettement inférieures à celles du groupe de l'essai.

Les courbes de l'évolution des concentrations plasmatiques du vérapamil en fonction du temps dans chaque groupe, nous ont permis de calculer les différents paramètres caractéristiques de la cinétique du vérapamil dans chaque groupe : le t½, l'AUC et la clairance plasmatique et le volume de distribution. Ces paramètres TK sont présentés dans les tableaux 09 et 10.

Tableau 05. *Paramètres toxicocinétiques moyens (moyenne ± Sd, n=3) du vérapamil suite à l'administration orale de 10 mg/Kg du vérapamil seul ou en présence de 5 mg/Kg du diazépam.*

Paramètres	**Vérapamil**	**Vérapamil + Diazépam**
Ke	0,187 ± 0,017	0,147 ±0,006
Ka	5,793 ± 0,633	4,844 ±0,529
T ½ (h)	3,727 ± 0,345	4,698 ±0,190
AUC (h.ng/ml)	838,793 ± 56,781	1206,353 ± 100,932
Cl (ml/min/Kg)	11,956 ± 0,784	9,714 ±0,778
Vd (ml/min/Kg)	64,079 ± 2,821	65,729 ± 3,184

Tableau 06. *Paramètres toxicocinétiques moyens (moyenne ± Sd, n=3) du vérapamil suite à l'administration intraveineuse de 1 mg/Kg du vérapamil seul ou en présence de 0,5 mg/Kg du diazépam.*

Paramètres	**Vérapamil**	**Vérapamil + Diazépam**
Ke	0,936 ± 0,047	0,714 ± 0,050
T ½(h)	0,74 ± 0,037	0,910 ± 0,056
AUC (h.ng/ml)	1332,199 ± 36,892	1551,139 ± 66,317
C_0 (ng/ml)	1153,4 ± 47,324	1112,295 ± 40,904
Cl (ml/min/Kg)	12,516 ± 0,341	10,757 ± 0,468
Vd (ml/min/Kg)	13,387 ± 0,815	14,418 ± 0,727

Ke : la constante de vitesse d'élimination, C_0 : la concentration initiale, T½ : temps de demi-vie de la phase terminale, AUC : aire sous la courbe des concentrations, Cl : clairance plasmatique, Vd : volume de distribution à l'état d'équilibre.

Les résultats obtenus au cours de nos travaux sur les rats montrent que l'évolution de la concentration plasmatique du vérapamil est différente, après la co-administration par voie orale du diazépam (groupe de l'essai).

L'AUC, paramètre d'exposition, est passé à 1206,353 ± 100,932 h.ng/ml dans le groupe de l'essai versus 838,793 ± 56,781 h.ng/ml dans le groupe témoin. Le temps de demi-vie apparent (t½) du vérapamil sur la phase de décroissance a été beaucoup plus long après l'administration concomitante du diazépam (4,698 ± 0,190 heures) qu'après l'administration du vérapamil seul (3,727 ± 0,345 heures). La clairance plasmatique, facteur de quantification de la capacité d'épuration du vérapamil par l'organisme, a été significativement inférieure dans le groupe témoin (9,714 ± 0,778 mL/kg/min dans le groupe de l'essai versus 11,956 ± 0,784 mL/kg/min dans le groupe témoin). Le volume de distribution permettant l'appréciation de la distribution tissulaire du vérapamil a connu une légère augmentation non significative du Vd.

L'administration intraveineuse nous a permis de mettre en évidence l'existence d'une différence significative des AUC entre le groupe témoin et le groupe de l'essai : les valeurs des AUC sont plus faibles chez le groupe témoin (1332,199 ± 36,892 h.ng/mL) que chez les animaux du groupe de l'essai (1551,139 ± 66,317 h.ng/ml). Le temps de demi-vie apparent (t½) est également, en moyenne, plus bas chez les animaux du groupe témoin (0,74 ± 0,037 h versus 0,910 ± 0,056 chez les animaux du groupe de l'essai). Un autre paramètre varie de façon significative; il s'agit de la clairance dont la valeur est plus importante chez les animaux du groupe témoin (12,516 ± 0,341 ml/min/Kg versus 10,757 ± 0,468 ml/min/Kg). Aucune différence significative du Vd n'a pu être signalée.

Les valeurs moyennes des paramètres toxicocinétiques du vérapamil change lors de l'administration concomitante du diazépam, tant après administration orale qu'après administration intraveineuse. Ainsi, une augmentation de la biodisponibilité du vérapamil a été enregistrée dans le groupe de l'essai. Comme nous l'avons déjà évoqué, aucune étude comparative, *in vivo*, n'a été faite sur l'influence du diazépam sur la toxicocinétique du vérapamil, nous tenterons donc d'expliquer nos résultats sur la base des connaissances que nous disposons sur ces deux médicaments.

Le diazépam est une benzodiazépine largement utilisée pour traiter les troubles émotionnels, d'anxiété, et d'épilepsie, certains symptômes du syndrome d'abstinence à

retrait d'alcool, la tension des muscles, ainsi que certaines maladies neurologiques (Gries et *al*., 2005). Le diazépam est aussi substrat du système des cytochromes P450. Il est métabolisé soit par hydroxylation (déméthyldiazépam) médiée par les CYPs 3A4 et 3A5, ou par déméthylation (témazépam) médiée par les CYPs 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 3A4 et 3A5 (Ono et *al*., 1996). Le vérapamil quant à lui est métabolisé par de nombreuses enzymes du cytochrome P450. L'augmentation significative des concentrations du vérapamil en présence du diazépam enregistrée lors de notre étude pourrait être due à une interaction au niveau de la liaison aux protéines plasmatiques étant donné que ces deux médicaments sont tous deux fortement liés aux protéines plasmatiques. Ainsi pour un médicament initialement fixé à 90%, un simple déplacement de quelques pourcentages de quantités fixées suffit pour multiplier de façon significative la fraction libre active (Singlas, 1986). Cette hypothèse parait parfaitement en accord avec les résultats d'une étude menée, *in vitro*, par Yong et ses collaborateurs (1980) et portant sur les facteurs affectant la liaison du vérapamil aux protéines plasmatiques chez l'homme. Ces investigateurs prétendent que les concentrations thérapeutiques du diazépam augmentent significativement la fraction libre du vérapamil.

Notre première hypothèse expliquerait donc l'évolution des paramètres toxicocinétiques du vérapamil observée suite à l'administration concomitante du diazépam : avec une fraction libre plus importante, le médicament reste plus longtemps dans le plasma ; ce qui correspond à un temps de demi-vie plus allongé et par conséquent à des valeurs d'AUC plus élevées (biodisponibilité plus importante) et des valeurs de clairance plus faibles chez les rats traités avec l'association vérapamil-diazépam. La diminution de la clairance plasmatique du vérapamil peut être aussi en partie expliquée sur la base des interactions métaboliques. Ainsi, Le diazépam est un substrat bien connu du CYP3A4 et peut être impliqué dans de nombreuses interactions toxicocinétiques en déplaçant d'autres médicaments substrats du CYP 3A4 comme le vérapamil de leurs sites métaboliques.

L'augmentation de la biodisponibilité du vérapamil sous l'effet de l'acide valproïque et du diazépam constatée lors de cette étude pourrait prédisposer à des intoxications cardiaques consécutives à une accumulation du vérapamil qui peut rejoindre ses sites d'action et provoquer des effets exagérés. Ceci pourrait avoir des répercussions considérables en clinique puisque plusieurs patients traités avec le vérapamil et présentant des troubles épileptiques sont régulièrement sous traitement avec l'acide valproïque et le diazépam. Cependant des expériences supplémentaires, *in vitro* et in vivo, seraient nécessaires pour

bien identifier les mécanismes pouvant expliquer ces différences. Une étude clinique de ces interactions serait aussi nécessaire pour établir si ces différences existent également chez l'humain, car les différences inter et intra-espèces sur le plan des enzymes qui métabolisent les médicaments restreignent la capacité d'extrapoler à l'humain les résultats expérimentaux obtenus chez l'animal (Danan et Labbe, 2000).

Conclusion et perspectives

La polymédication est un problème fréquent, en particulier chez les personnes âgées. Le risque majeur est lié aux interactions toxicocinétiques. Le vérapamil un inhibiteur des canaux calciques est sujet à ce type d'interactions lorsqu'il est co-administré avec l'acide valproïque ou le diazépam.

Cette étude portait sur des rats Wistar et avait pour objectif l'étude de l'effet de l'acide valproïque et du diazépam sur la toxicocinétique du vérapamil après administration orale et intraveineuse du vérapamil en présence ou en absence de l'acide valproïque ou du diazépam. L'acide valproïque et le diazépam ont modifié la pharmacocinétique du vérapamil. La présence de l'acide valproïque et du diazépam a augmenté de manière significative ($p<0,05$) la biodisponibilité (AUC, Cmax) du vérapamil et a aussi diminué significativement sa clairance. L'acide **v**alproïque et le diazépam augmentent la biodisponibilité orale et intraveineuse du vérapamil par son déplacement des sites de liaison aux protéines plasmatiques. L'inhibition du métabolisme médié par le CYP2C9 et l'inhibition d'UGT par l'acide valproïque pourrait également être à l'origine de cette augmentation.

Une attention particulière devrait être portée aux patients atteints de maladies cardiovasculaires, avec des troubles neuroleptiques nécessitant la prise de l'acide valproïque ou du diazépam. En effet, ces patients sont plus susceptibles de présenter des interactions médicamenteuses puisque la polymédication est fréquente ce qui peut résulter en des toxicités et ainsi prédisposer le patient à une intoxication cardiaque consécutive à une accumulation de vérapamil.

Cependant, des études supplémentaires en clinique devront être réalisées afin de déterminer si ce phénomène peut être identifié chez les humains. Aussi compte tenu du caractère stéréosélectif du métabolisme du vérapamil, le développement et la validation d'une méthode analytique par HPLC chirale pour le dosage des énantiomères R et S du vérapamil lors de ces interactions révèle d'une grande importance.

De plus, la découverte récente des récepteurs nucléaires régulant l'expression des enzymes du métabolisme et des transporteurs membranaires ouvre de nouvelles voies de recherche sur la modulation du métabolisme des xénobiotiques dont les médicaments. L'extraction des transcrits des gènes qui codent pour les enzymes du métabolisme et les transporteurs membranaires et leur quantification (par RT-PCR ou par northern blot) dans le

cas des interactions vérapamil-acide valproïque et vérapamil-diazépam devraient donc être prévues.

Enfin, la compréhension de ces interactions permettra de mieux appréhender les conséquences physiopathologiques de stimuli affectant le métabolisme des médicaments et leurs éventuels effets indésirables.

Références

Abernethy DR, Wainer IW, and anacleto AI.Verapamil metabolite exposure in older and younger men during. Steady-state oral verapamil administration. (2000) *Drug metab. dispos*. 28 (7) : 760–765.

Acikgöz A, Karim N, Giri S, Schmidt-Heck W, and Bader A. Two compartment model of diazepam biotransformation in an organotypical culture of primary human hepatocytes. (2008) *Toxicol. App. Pharmacol.* 234 : 179–191.

Albengres E, Lelouet H, and Tillement JP. Systemic antifungal agents. Drug interactions of clinical significance. (1998) *Drug safety.* 18 (2) : 83-97.

Allert JA and Adams HR. New perspectives in cardiovascular medecine: The calcium channel blocking drugs. (1987) *J. am. vet. med. Assoc.* 190 : 573-578.

Baillie A and Sheffels PR. Chemistry and biotransformation. In : Levy RH., Matson RH., Meldrum BS., 1995. Antiepileptic Drugs “ Valproic acid”. (1995) *4th Ed. Raven Press*. 589-604.

Bailly D. Prescriptions médicamenteuses en psychiatrie de l’enfant et de l’adolescent. (2007) *Elsevier Masson*. 117.

Barbier O, Duran-Sandoval D, Pineda-Torra I, Kosykh V, Fruchart JC, and *al*. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha induces hepatic expression of the human bile acid glucuronidating UDP glucuronosyltransferase 2B4 enzyme. (2003) *J. Biol. Chem.* 278 : 32852- 32860.

Beig ML, Chandra R, Talwar A, Fahim M, and Katyal A. Epileptic seizure-induced hypertension and its prevention by calcium channel blockers: a real-time study in conscious telemetered rats. (2009) *Can. J. Physiol. pharmacol*. 7 (87) : 1-4.

Bellamy WT. P-glycoproteins and multidrug resistance. (1996) *Pharmacol., Toxicol*. 36 : 161-183.

Bernus I, Dickinson RG, Hooper WD, Eadie MJ. Inhibition of phenobarbitone N glucosidation by valproate. (1994) *Br. J. Clin. Pharmacol*. 38 : 411-416.

Bertz RJ And Granneman GR. Use of *in vitro* and *in vivo* data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. (1997) *Clin. Pharmacokinet.* 32 (3) : 210-258.

Bhatti M and Foster R. Pharmacokinetics of the enantiomers of vérapamil after intravenous and oral administration of racemic verapamil in rat model. (1997) *Biopharm. drug dispos*. 18 (5) : 387-396.

Bonate PL and Reith K. Drug interactions at the renal level. Implications for drug development. (1998) *Clin. Pharmacokinet.* 34 (5) : 375-404.

Boulle A, Cutsem G, Cohen K, Hilderbrand K, Mathee S, and *al.* Outcomes of nevirapine- and efavirenz-based antiretroviral therapy when coadministered with rifampicin-based antitubercular therapy. (2008) *JAMA* 300 : 530-539.

Busse D, Fromm M, Klaus M, Drescher S, Kuhlkamp V and *al*. Disposition and pharmacologic effects of R/S vérapamil in patients with chronic atrial fibrillation : An investigation comparing single and multiple dosing. (2001) *Clin. Pharmacol. Therapeutics* 5 (69) : 324-323.

Carson SW, Ousmanou AD, and Hoyler SL. Emerging significance of P glycoprotein in understanding drug disposition and drug interactions in psychopharmacology. (2002) *Bulletin*, 36 : 67-81.

Castel J, Debaert M, Fournier JP, and Fulcraud P. Les antagonsites du calcium ou inhibiteurs calciques. Traité de chimie thérapeutique. (1992) *Tec & Doc*. 142-155.

Chapuzet E, Mercier N, Bervoas-Martin S. Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques: stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP. (1997) *STP Pharma Pratiques*. 7 (3) : 169-194.

Chouinard G, Lefko-Singh K, and Teboul E. Metabolism of anxiolytics andhypnotics: Benzodiazepines, buspirone, zoplicone, and zolpidem. (1999) *Cell. Mol. Neurobiol.* 19 : 533–352.

Chung JH, Choi DH and Choi JS. Effect of oral epigallocatechin gallate on the oral pharmacokinetics of vérapamil in rats. (2009) *Biopharm. Drug Dispos*. 30 : 90-93.

Crespi CL and Penman BW. Use of cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes to study potential drug-drug interactions. (1997) *Adv. Pharmacol.* 43 : 171-188.

Danan G, Labbe G. Utilisation clinique de l'étude des interactions médicamenteuses. (2000) *Lett. Pharmacol.* 5 (14) : 105-115.

Daniel WA. Mechanisms of cellular distribution of psychotropic drugs. Significance for drug action andinteractions. (2003) *Progress in neuro psychopharmacology and biological psychiatry*. 27 : 65-73.

Desilva JAF, Koechlia BA, and Bader R. Blood level distribution of diazepam and its major metabolite in man. (1966) *J. Pharm. Sci.* 55 : 692-702.

Dierick M, Peuskens J, Ansseau M, D'haenen H, and Linkowski P. Manuel de psychopharmacothérapie. (2003) *BCNBP, Academia Press. Gent*. 99-115.

Drayton J, Dickinson G, and Rinaldi MG. Coadministration of rifampin and itraconazole leads to undetectable levels of serum itraconazole. (1995) *Clin. Infect. Dis*. 18 : 266.

Drugdex system. Valproic Acid (drug evaluation). Thomson micromedex health care series. Greenwood Village, Colorado (2002-2009).

Eadie MJ. Formation of active metabolites of anticonvulsiant drugs. A review of their pharmacokinetic and therapeutic significance. (1991) *Clin. Pharmacokinet.*, 21 : 27-41.

Echizen H and Eichelbaum M. Clinical pharmacokinetics of verapamil, nifedipine and diltiazem. (1986). *Clin. Pharmacokinet*. 11 : 425–449.

Eichelbaum M, Ende M, Remberg G, Schomerus M, and Dengler H. The metabolism of DL-[14C]-verapamil in man. (1979) *Drug Metab. Dispos*. 7: 145–148.

Ekins, S. *In vitro* metabolism: Subcellular fractions. In : Handbook of Drug Metabolism. (1999) *Marcel Dekker, Inc.* 363-399.

Elkiweri IA, Patot M, Zhang YL, Christians U, and Henthorn TK, The effect of loperamide and Fentanyl on the distribution kinetics of vérapamil in the lung and brain in Sprague Dawley rats. (2009) *World academy of science, engineering and technology*. 55 : 582-587.

Ferrero JL and Brendel K. Liver slices as a model in drug metabolism. (1997) *Adv. Pharmacol.* 43 : 131-169.

Friedberg T. *In vivo* and *in vitro* recombinant DNA technology as a powerful tool in drug development. In : Handbook of Drug Metabolism (1999) *Marcel Dekker, Inc.* 321-362.

Gibaldi M. Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics (4thed). (1991) *Lea and Febiger publications.* 377.

Girerd X, Digeos Hasnies S, and Le Henzey JY. Guide pratique de l'hypertension artérielle. (2004) *Masson*. 173-180.

Gonzalez FJ, Liu SY, and Yano M. Regulation of cytochrome P450 genes : molecular mechanisms. (1993) *Pharmacogenetics*. 3 : 51-57.

Gries DA, Condouris GA, Shey Z, and Houpt M. Anxiolytic-like action in mice treated with nitrous oxide an oral triazolam or diazepam. (2005) *Life Sci*. 76 : 1667–1674.

Gronemeyer H and Laudet V. Transcription factors 3: nuclear receptors. (1995) *Protein Profile.* 2 : 1173- 1308.

Guéguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, and Lobaccaro A. Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. (2006) *Ann. Biol. Clin*. 64 (6) : 538-548.

Guenguerich F. Role of cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions. (1997) *Adv. Pharmacol*. 43 : 7-35.

Handschin C and Meyer UA. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. (2003) *Pharmacol. Rev.* 55 : 649-673.

Hansten P. Understanding drug-drug interactions. (1998) *Science & medicine*. (January/February), 16-22.

Hartshorn EA and Tatro DS. Principles of drug interactions. In : drug interaction facts. Facts and comparisons. (2001) *Wolters Kluwer,* VVII-XXVIII.

Hu N, Xie S, Liu L, Wang X, Pan X, and *al*. Opposite effect of diabetes induced by Streptosotocin on oral intravenous pharmacokinetics of vérapamil on rat. (2010) *American society for pharmacology and experimental therapeutics*, 1-38.

Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ, and Boulanger B. Validation des procédures analytiques quantitatives.Harmonisation des démarches. (2003) *STP Pharma Pratiques*, 13 (3) : 101-138.

Ishikawa T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. (1992) *Biochem. Sci.* 17 : 463-468.

Jung F, Richardson TH, Raucy JL, and Johnson EF. Diazepam metabolism by cDNAexpressed human 2C P450s : identification of P4502C18 and P4502C19 as low K(M)diazepam N-demethylases. (1997) *Drug Metab. Dispos.* 25 : 133–139.

Kedderis GL. Pharmacokinetics of drug interactions. (1997) *Adv. Pharmacol.* 43 : 189-203.

Kittleson MD, And Kienle RD, Drugs Used in Treatement of Cardiac Arrhythmias In : Kittleson MD, Kienle RD. Small Animal Cardiovascular Medecine. (1998) *Mosby*. 502-524.

Köhle C, Bock KW. Coordinate regulation of human drug-metabolizing enzymes, and conjugate transporters by the Ah receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. (2009) *Biochem. Pharmacol.* 77 : 589–99.

Kok T, Bloks VW, Wolters H, Havinga R, Jansen PL, and *al*. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα) mediated regulation of multidrug resistance 2 (Mdr2) expression and function in mice. (2003) *Biochem. J.* 369 : 539-547.

Kovarik JM, Beyer D, Bizot MN, Jiang Q, Allison M, and *al*. Pharmacokinetics interaction between verapamil and everolimus in healthy subjects. (2005) *Br. J. Clin. Pharmacol*. 434-437.

Kroemer HK, Echizen H, Heidemann H, and Eichelbaum M. Predictability of the *in vivo* metabolism of verapamil from *in vitro* data : contribution of individual metabolic pathways and stereoselective aspects. (1992) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260 : 1052-1057.

Kroemer HK, Gautier JC, Beaune P, Henderson C, Wolf CR, and *al*. Identification of P450 enzymes involved in metabolism of verapamil in humans. (1993) *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 348 : 332–337.

Landry P, Gervais M, and O'Connor KP. Mise à jour sur les considérations pharmacocinétiques,pharmacodynamiques et les interactionsmédicamenteuses dans le choix d'une benzodiazépine. Update on the pharmacokinetics andpharmacodynamic properties, drug interactions andtherapeutic usage of benzodiazepines. (2008) *Ann. Méd. Psychol*. 166 : 585–594.

LeBlanc M and Gilbert M. Chute significative des concentrations plasmatiques d'acide valproïque à la suite de l'introduction du méropénem. (2009) *Pharmactuel*. 42 (4) : 248-253.

Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, and Moore JT. 1998. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J. Clin. Invest*., 102, 1016-1023.

Li AP. Primary hepatocyte cultures as an *in vitro* experimental system for the evaluation of pharmacokinetic drug-drug interactions. (1997) *Adv. Pharmacol.* 43 : 103-130.

Lin JH and Lu AYH. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. (1998) *Clin. Pharmacokinet.* 5 (5) : 361-390.

Lin JH and Yamazaki M. Role of Glycoprotein in pharmacokinetics. Clinical implications. (2003) *Clin. Pharmacokinet*. 59-98.

Lin JH. Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein. (2003) *Adv. Drug Deliver Rev.* 55 : 53–81.

Ling S and Jamali F. Effect of early phase adjuvant arthritis on hepatic P 450 enzymes and pharmacokinetics of verapamil: an alternative approach to the use of an animal model of inflammation for pharmacokinetic studies. (2005) *Drug metab. dispos.* 33 : 579-586.

Liston HL, Markowitz JS, and Devane CL. Drug glucoronidation in clinical psychopharmacology. (2001) *J. clin. psychopharm*. 21 : 500-515.

Marquet P. Suivi thérapeutique pharmacologique : pour l'adaptation de posologie des médicaments. (2004) *Elsevier Masson*. 382-388.

McAllister RG And Kirsten EB. The pharmacology of verapamil. IV Kinetic and dynamic effects after single intravenous and oral doses. (1982) *Clin. Pharmacol. Ther*. 31 : 418-426.

McKinnon RA. and Nebert DW. Cytochrome P450 knockout mice : New toxicological models. (1998) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 25 : 783-787.

Meyer UA and Gut J. Genomics and the prediction of xenobiotic toxicity. (2002) *Toxicology*. 182 : 463-466.

Mooy J, Böhm R, van Baak M, van Kemenade J, vd Vet A, and *al*. The influence of antituberculosis drugs on the plasma level of verapamil. (1987) *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 32 (1) : 107-109.

Mori Y, Hanada K, Mori T, Tsukahara Y, Hashiguchi M and Ogata H. Stereoselective pharmacokinetics and pharmacodynamics of vérapamil and norvérapamil in rabbits. (2001) *Biol. Pharm. Bull.* 24 (7) 806-810

Moulin M and Coquerel A. Pharmacologie. Connaissances et pratiques. (2002) *Masson*. 50-61.

Muir WW, Sams RA, and Moïse NS. Pharmacology and pharmacokinetics of antiarrhythmic drugs. In : Fox FR., Sisson DD. Moïse NS. Textbook of Canine and Feline Cardiology. (1999) *WD Saunders Company*. 307-330.

Naas DJ. Valproic Acid. (1998) *S. Rutherfoord Rose*. 3 : 385–386.

Okey AB. Enzyme induction in the cytochrome P450 system. (1990) *Pharmacol. Therap*. 45 : 241-298.

Ono S, Hatanaka T, Miyazawa S, Tsutsui M, Aoyama T, and *al*. Human liver microsomal diazepam metabolism using cDNA-expressed cytochrome P450s : role of CYP2B, 2C19 and the 3A subfamily. (1996) *Xenobiotica*. 26 (11) : 1155–1166.

Organisation mondiale de la Sante. Usage et abus des benzodiazepines. (1983) *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Sante*. 61 (5) : 757-769.

Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL, Pirmohamed M, and Williams DP. The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. (2005) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 45 :177-202.

Paul CJ and Whitehouse LW. Metabolic basis for the supra additive effect of the ethanol-diazepam combination in mice. (1977) *Br. J. Pharmac*. 60 : 83-90.

Perloff MD and von Moltke LL. Fexofenadine transport in Caco-2 cells : inhibition with verapamil and ritonavir. (2002) *J. Clin. Pharmacol.* 42 (11) : 1269-1274.

Petersen KU. Omeprazole and the cytochrome P450 system. (1995) *Alim.Pharmacol. Therap*. 9 : 1-9.

Pons G, Tréluyer JM, and Rey E. Pharmacologie et tolérance des anti-épileptiques. (2001) *Médecine thérapeutique / Pédiatrie*. 4 : 29-40.

Ray WA, Murray KT, Meredith S, Suguna Narasimhulu Hall SK, and *al*. Oral erythromycin and the risk of sudden death from cardiac causes. (2004) *New Engl. J. Med*. 351 : 1089-1096.

Remmer H and Merker HJ. Drug-induced changes in the liver endoplasmic reticulum: association with drug-metabolizing enzymes. (1963) *Science.* 142 : 1657-1658.

Rodrigues AD and Wong SL. Application of human liver microsomes in metabolism-based drug-drug interactions. (1997) *Adv. Pharmacol.* 43 : 65-101.

Rossetti AO and Seeck M. Traitement médicamenteux actuel de l’épilepsie. (2010) *Revue Médicale Suisse*. 247 : 901-906.

Rouillon F. Les troubles dépressifs récurrents. (2004) *John Libbey Eurotext.* 55-62.

Rousselot JF. Traitement des troubles du rythme in : Laforge H. Encyclopédie Vétérinaire. (2001) *Elsevier*. 1-14.

Sandstrom R and Lennernas H. Related oral Rifampicin decreases the jejunal permeability of R/S vérapamil in rats. (1999) *Drug Metab. Dispos.* 27 (8) : 951-955.

Schwartz JB, Abernethy DR, Taylor AA, and Mitchell JR. An investigation of the cause of accumulation of vérapamil during regular dosing in patients. (1985) *Br. J. Clin. Pharmacol.* 19 : 512-516.

Singlas E. Fixation protéique des médicaments. (1986) *Publication des laboratoires roche*. 86.

Sinz, MW. *In vitro* metabolism : Hepatocytes. In : Handbook of Drug Metabolism (1999) *Marcel Dekker, Inc.* 401-424.

Somogyi A, Albrecht M, Kliems G, Schafer K, and Eichelbaum M. Pharmacokinetics, bioavailability and ECG response of verapamil in patients with liver cirrhosis. (1981) *Br. J. Clin. Pharmac.* 12 : 51-60.

Sonoda J, Rosenfeld JM, Xu L, Evans RM, and Xie W, A nuclear receptor-mediated xenobiotic response and its implication in drug metabolism and host protection. (2003) *Curr. Drug Metab.* 4 : 59-72.

Souidi M, Dubrac S, and Parquet M. Oxysterols : metabolism, biological role and associated diseases. (2004) *Gastroenterol. Clin. Biol.* 28 : 279-293.

Spahn-Langguth H, and Langguth P. Grapefruit juice enhances intestinal absorption of the P-glycoprotein substrate talinolol. (2001) *Eur. J. Pharm. Sci.* 12 (4) : 361- 367.

Sugatani J, Kojima H, Ueda A, Kakizaki S, Yoshinari K, and *al*. The phenobarbital response enhancer mod ule in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR. (2001) *Hepatology*. 33 : 1232-1238.

Sun H. Population pharmacokinetics. (1999) *Clin. Pharmacokinet.* 37 (1) : 41-58.

Synold TW, Dussault I, and Forman BM. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. (2001) *Nat. Med*. 7 : 584-590.

Tartara A, Galimberti CA, Manni R. Differential effects of valproic acid and enzyme-inducing anticonvulsants on nimodipine pharmacokinetics in epileptic patients. (1991) *Br. J. Clin. Pharmacol.* 32 : 335-340.

Thiebault JJ. Inhibiteurs calciques: réalité ou espoir thérapeutique? (1987) *Rec. Méd. Vét.* 163 : 781-792.

Thummel KE and O'Shea D. Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism. (1996) *Clin. Pharmacol. Ther.* 59 (5) : 491-502.

Tisdale JE and Miller DA. Drug induced diseases: prevention detection, and management. Magnitude / significance of drug induced diseases : impact on the health care system. (2010) *American society of health system pharmacist*. 26.

Urquhart BL, Tirona RG, and Kim RB. Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters : implications for interindividual variability in response to drugs. (2007) *J. Clin. Pharmacol.*, 47 : 566–578.

Vauboudrolle M. Toxicologie, sciences mathématiques, physiques et chimiques. (2007) *Wolters Kluwer SA*. 224-233.

Voskoboinik I, Drew R, and Ahokas JT. Differential effect of peroxisome proliferators on rat glutathione S-transferase isoenzymes. (1996) *Toxicol. Lett.* 87 : 147-155.

Wandel C, Kim RB, Guenguerich FP, and Wood AJJ. Milbefradil is a P-glycoprotein substrate and a potent inhibitor of both P-glycoprotein and CYP3A *in vitro*. (2000) *Drug Metab. Dispos*. 28 (8) : 895-898.

Wen X, Wang JS, Kivisto KT, Neuvonen PJ, and Backman JT. *In vitro* evaluation of valproic acid as an inhibitor of human cytochrome P450 isoforms : preferential inhibition of cytochrome P450 2C9 (CYP2C9). (2001) *Br. J. Clin. Pharmacol.* 52 : 547-553.

Woodcock BG, Reitbrock I, Vohringer HF, and Reitbroch N. Verapamil disposition in liver disease and intensive care patients: kinetics, clearance, and apparent blood flow relationships. (1981) *Clin. Pharmacol. Ther.* 29 : 27–34.

Wu CY and Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS : transport / absorption / elimination interplay and development of abiopharmaceutics drug disposition classification system. (2005) *Pharm. Res.* 22 (1) : 11-12.

Yang TJ, Shou M., Korzewka KR, Gonzalez FJ, Gelboin HV, and *al*. Role of cDNA-expressed human cytochromes P450 in the metabolism of diazepam. (1998) *Biochem. Pharmacol.* 55 (6) : 889–896.

Yong CL, Kunka RL, and Bates TR. Factors affecting the plasma protein binding of verapamil and norverapamil in man. (1980) *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 30 (2) : 329-339.

Yu DK. The contribution of P-glycoprotein to pharmacokinetic Drug-Drug interaction. (1999) *J. Clin. Pharmacol.* 39 : 1203-1211.

Yuen AW, Land G, Weatherley BC, and Peck AW. Sodium valproate acutely inhibits lamotrigine metabolism. (1992) *Br. J. Clin. Pharmacol.* 33 : 511-513.

Zetlaoui P and Lenoble M. Intoxications aux urgences. (2004) *Elsevier*. 25-26.

Zimniak P, Awasthi S, and Awasthi YC. Phase III detoxification system. (1993) *Biochem. Sci.* 18 : 164-166.

Nom : RECHAK H. **Encadreur** : Pr HAMDI A. **Date de soutenance** 06/2012

Contribution à l'étude in vivo de l'influence de l'acide valproïque et du diazépam sur la toxicocinétique du vérapamil chez le rat

Résumé

La polymédication est un problème fréquent, en particulier chez les personnes âgées. Le risque majeur de la polymédication est lié aux interactions toxicocinétiques. Le vérapamil, un inhibiteur des canaux calciques, est sujet à ce type d'interactions lorsqu'il est co-administré avec l'acide valproïque ou le diazépam. Le présent travail avait pour objectif l'étude de l'effet de l'acide valproïque et du diazépam sur la toxicocinétique du vérapamil chez les rats après administration orale et intraveineuse du vérapamil en présence ou en absence de l'acide valproïque ou du diazépam. L'acide valproïque et le diazépam ont modifié la pharmacocinétique du vérapamil comparativement au vérapamil seul. La présence de l'acide valproïque et du diazépam a augmenté de manière significative ($p<0,05$) la biodisponibilité (AUC, Cmax) du vérapamil et a aussi diminué significativement sa clairance. L'acide **v**alproïque et le diazépam augmentent la biodisponibilité orale et intraveineuse du vérapamil par un déplacement des sites de liaison aux protéines plasmatiques. L'inhibition du métabolisme médié par le CYP2C9 et l'inhibition de l'UGT par l'acide valproïque pourrait également être à l'origine de cette augmentation. Par conséquent, la co-administration du vérapamil et de l'acide valproïque/diazépam devrait être surveillée dans le traitement des patients en clinique.

Mots clés : Vérapamil, acide valproïque, diazépam, toxicocinétique, interactions médicamenteuses, CYP 450, récepteurs nucléaires.

Abstract

The polymedication is a frequent problem, in particular for the old people. The major risk is related to the toxicokinetic interactions. The vérapamil, an inhibitor of the calcium channels, is prone to this type of interactions when it is taken in combination with the valproate or with the diazepam. This study investigated the effect of valproate and diazepam on the toxicokinetics of vérapamil in rats after oral and intravenous administration of vérapamil in the presence or in the absence of valproate or diazepam. Valproate and diazepam altered verapamil pharmacokinetics compared to verapamil alone. The presence of valproate and diazepam significantly ($p<0,05$) increased the bioavailability (AUC, Cmax) of vérapamil and deceased its plasma clearance (Cl). Valproate and diazepam enhance the oral and intravenous bioavailability of verapamil through a displacement from protein binding sites. Valproate may also enhance the bioavailability of verapamil by inhibiting the CYP2C9-mediated metabolism and UGT inhibition. Therefore, concurrent use of verapamil and valproate/diazepam should be monitored closely in the treatment of patients.

Key words: Verapamil, valproate, diazepam, toxicokinetics, drug-drug interaction, CYP 450, nuclear receptors.

مـــلـــخـص :

يعد تناول عدة أدوية مع بعضها من المشاكل التي يمكن مصادفتها خاصة عند الكبار في السن. و يرجع السبب الأكبر الى التداخلات الدوائية. الفيراباميل, و هو مثبط لقنوات الكالسيوم, عرضة لمثل هذه التداخلات لذى استعماله مع حمض الفالبرويك و الديازيبام. الهدف من هذه الدراسة هو دراسة تأثير حمض الفالبرويك و الديازيبام على الحركية السمية للفيراباميل عند الفئران بعد مناولة هذا الأخير عن طريق الفم أو عن طريق الحقن الوريدي وذلك في وجود أو غياب حمض الفالبرويك و الديازيبام. حمض االفالبرويك و الديازيبام قاما بتغيير حركية الفيراباميل بالمقارنة مع حالة إعطاء الفيراباميل لوحده. وجود حمض الفالبرويك والديازيبام رفعا بصفة معتبرة ($P<0.05$) الكميات الحيوية biodisponibilité (Cmax, AUC) للفيراباميل وخفضا أيضا بصفة معتبرة قدرة الجسم على تصفيته (Clairance).يرجع السبب في رفع الكميات الحيوية للفيراباميل في وجود حمض الفالبرويك والدياريبام إلى تحريكه من مواقع الارتباط على البروتينات البلازمية من طرف هذين الأخيرين. يمكن لحمض الفالبرويك ان يرفع الكميات الحيوية للفيراباميل عن طريق تثبيط الUGT و الCYP2C9. وتبعا لذلك يجب مراقبة الاستعمال المتزامن للفيراباميل و حمض الفالبرويك/ الديازيبام عند معالجة المرضى.

الكلمات المفتاحية : الفيراباميل، الديازيبام، حمض الفالبرويك، الحركية السمية، تأثيرات دوائية، CYP450، المستقبلات النووية.