

50376  
1992

65111

50376  
1992  
115

115 N° d'ordre : 916

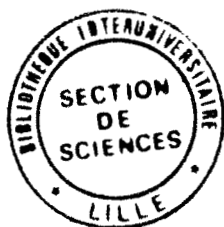
Année Universitaire 1991-1992

UNIVERSITE D

UNIVERSITE D'ARTS ET DE SCIENCES DE LILLE-FLANDRES-ARTOIS

THESE DE DOCTORAT  
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

**LE METABOLISME DE LA MEXILETINE  
ET DE SES ENANTIOMERES :  
RELATION AU POLYMORPHISME GENETIQUE DE  
TYPE DEBRISOQUINE/SPARTEINE**



soutenue le 13 mai 1992

par

Nathalie VANDAMME-CUBADDA



JURY: M. le Pr. P. ROUSSEL  
M. le Pr. P. BECHTEL, Rapporteur  
M. le Pr. B. FOURNET, Rapporteur  
M. le Pr. A. VERBERT  
M. le Pr. C. LIBERSA  
M. le Pr. M. LHERMITTE

**A Jean-Marie,  
à ma famille,  
à mes amis,  
pour leurs encouragements  
tout au long de ma thèse.**

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé sous la direction de M. le Pr. M.LHERMITTE dans le Secteur Toxicologie du Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Calmette de Lille dirigé par M.le Pr. P.ROUSSEL . Je tiens à les remercier vivement pour leur accueil et leur encadrement au cours de ma thèse.

Je tiens à remercier tout le personnel du Laboratoire de Biochimie et particulièrement celui du Secteur Toxicologie pour leur sympathie et leur aide technique.

Mes remerciements vont également à M.le Pr. C.LIBERSA pour son aide et ses conseils.

Toute ma gratitude s'adresse aussi à M. le Pr. P.BECHTEL, M.le Pr. B.FOURNET et M. le Pr. A.VERBERT qui ont eu la gentillesse d'accepter de faire partie de mon jury de thèse.

Ce travail a été soutenu par la Société Boehringer Ingelheim France que je remercie et en particulier Mme C.COURSEAU pour son aide et l'attention qu'elle a portée à mon travail.

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
REVUE GENERALE	4
PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DE LA MEXILETINE	5
Propriétés antiarythmiques cardiaques	5
<i>Effets électrophysiologiques</i>	5
<i>Effets hémodynamiques</i>	6
Autres propriétés de la mexilétine	7
<i>Propriétés anticonvulsivantes</i>	7
<i>Propriétés anesthésiques locales</i>	7
<i>Action sur le système nerveux autonome</i>	7
Indications thérapeutiques et précautions d'emploi	7
Effets indésirables de la mexilétine	7
PROPRIETES PHARMACOCINETIQUES	9
Absorption	9
Distribution	9
Élimination	9
Métabolisme	10
Interactions médicamenteuses	10
Pharmacocinétique des énantiomères de la mexilétine	12
FACTEURS DE VARIATION DES PARAMETRES PHARMACOCINETIQUES DE LA MEXILETINE	13
Tabac	13
Pathologies	13
<i>Insuffisance rénale</i>	13
<i>Infarctus du myocarde</i>	13
<i>Insuffisance hépatique</i>	14
Physiologie	14
<i>pH urinaire</i>	14
<i>Age</i>	14
LES CYTOCHROMES P450	15
Rôle	15
Structure et mécanisme	15
<i>Structure</i>	15
<i>Mécanisme d'une réaction d'oxydation</i>	16
Nomenclature des cytochromes P450	17
Autres caractéristiques	17

LE CYTOCHROME P450IID6 ET LE POLYMORPHISME GENETIQUE DE TYPE DEBRISOQUINE/SPARTEINE	19
Le cytochrome P450IID6	19
Le polymorphisme génétique de type débrisoquine/spartéine	19
<i>Définition</i>	19
<i>Bases moléculaires</i>	23
<i>Conséquences cliniques</i>	25
<i>Relation avec des maladies</i>	26
<i>Phylogénèse du P450IID6</i>	27
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	29
<b>ARTICLE 1</b>	36
RESUME	37
THE METABOLISM OF MEXILETINE IN RELATION TO THE DEBRISOQUINE/ SPARTEINE-TYPE POLYMORPHISM OF DRUG OXIDATION	38
Introduction	38
Methods	39
Results	41
Discussion	43
References	44
<b>ARTICLE 2</b>	46
RESUME	47
SINGLE-DOSE QUINIDINE TREATMENT INHIBITS MEXILETINE OXIDATION IN EXTENSIVE METABOLIZERS OF DEBRISOQUINE	48
Introduction	48
Methods	49
Results	50
Discussion	53
References	56
<b>ARTICLE 3</b>	58
RESUME	59
INHIBITION <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i> DU METABOLISME OXYDATIF DE LA MEXILETINE PAR LA QUINIDINE	60
References	61
Abstract	63

<b>ARTICLE 4</b>	<b>64</b>
<b>RESUME</b>	<b>65</b>
<b>STEREOSELECTIVE HYDROXYLATION OF MEXILETINE IN HUMAN LIVER     MICROSOMES : IMPLICATION OF P450IID6</b>	<b>66</b>
<b>Abstract</b>	<b>66</b>
<b>Introduction</b>	<b>66</b>
<b>Materials and methods</b>	<b>67</b>
<b>Results</b>	<b>69</b>
<b>Discussion</b>	<b>73</b>
<b>References</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>78</b>

# **INTRODUCTION**

La mexilétine est un antiarythmique cardiaque de type 1b selon la classification de Vaughan-Williams. Elle est utilisée dans le traitement et la prévention des troubles du rythme cardiaque à type d'extrasystoles ventriculaires et de tachycardie ventriculaire, y compris au stade aigu de l'infarctus du myocarde.

L'index thérapeutique de la mexilétine est étroit, de plus aussi bien son activité antiarythmique que sa toxicité sont liées à sa concentration plasmatique. De nombreuses études ont montré que le comportement pharmacocinétique de la mexilétine est soumis à des variations interindividuelles importantes. Par conséquent, la relation entre la dose administrée et la concentration plasmatique de mexilétine est difficile à prévoir. Il est donc recommandé d'effectuer un suivi des concentrations plasmatiques de mexilétine afin d'adapter la posologie pour une meilleure efficacité du traitement et pour la sécurité du patient. Mais pour prévoir ces variations des paramètres pharmacocinétiques, il serait souhaitable d'en déterminer les causes.

La mexilétine est éliminée sous forme inchangée par voie rénale, mais subit également un métabolisme hépatique important. Les voies métaboliques majeures du métabolisme de la mexilétine sont l'hydroxylation aromatique et aliphatique permettant la formation respectivement de *p*-hydroxymexilétine (PHM) et d'hydroxyméthylmexilétine (HMM). La *N*-glucuroconjugaison de la mexilétine est également une voie importante. Le métabolisme de nombreux médicaments est catalysé par le système microsomal multienzymatique des cytochromes P450. L'un des cytochromes P450 les plus étudiés est le cytochrome P450IID6. Il est la cible d'un polymorphisme génétique.

Le but de ce travail est donc d'explorer l'hypothèse de l'implication du cytochrome P450IID6 dans les hydroxylations de la mexilétine qui pourrait expliquer en partie des fluctuations de ses paramètres pharmacocinétiques.

Des études préliminaires sur des microsomes de foie humain ont montré que la formation de PHM et HMM était catalysée de façon prédominante par un cytochrome génétiquement variable, le P450IID6.

Nous avons étudié, *in vitro* sur des microsomes de foie humain et *in vivo* sur des sujets sains, la relation entre le métabolisme de la mexilétine et le polymorphisme de type débrisoquine/spartéine. Les données obtenues *in vitro* montrent que le cytochrome P450IID6 est responsable de la formation de PHM et HMM. Ces résultats ont été confirmés *in vivo*. Les deux voies majeures d'hydroxylation de la mexilétine sont donc fortement liées à la capacité d'hydroxylation de la débrisoquine (Article 1).

L'association de quinidine (antiarythmique de type 1c) et de mexilétine est recommandée et effective dans les cas d'arythmie ventriculaire chez des patients réfractaires à l'une ou l'autre thérapie. L'effet d'une dose de quinidine, puissant inhibiteur du P450IID6, sur l'oxydation de la mexilétine a été étudié chez des sujets métaboliseurs extensifs pour l'hydroxylation de la débrisoquine. Cette étude *in vivo* a permis de montrer que la quinidine inhibe considérablement



l'oxydation de la mexilétine entraînant une diminution importante de l'élimination totale de la mexilétine. Ces résultats apportent une confirmation supplémentaire de l'implication du cytochrome P450IID6 dans le métabolisme oxydatif de la mexilétine (article 2). Les effets de la quinidine sur le métabolisme d'hydroxylation de la mexilétine ont été également étudiés *in vitro*. Ces résultats ont été mis en parallèle de ceux obtenus *in vivo* (Article 3).

Ces différentes études *in vitro* et *in vivo* apportent autant de preuves en faveur de l'implication du cytochrome P450IID6 dans l'hydroxylation aromatique et aliphatique de la mexilétine. Le P450IID6 est stéréosélectif pour certains de ses substrats. La mexilétine étant administrée sous forme de racémique, mélange équimolaire de deux stéréoisomères (ou énantiomères), la métabolisation préférentielle de l'une ou l'autre forme par le cytochrome P450IID6 pourrait également contribuer aux variations pharmacocinétiques. Nous avons donc étudié *in vitro* la formation de PHM et HMM à partir de chaque stéréoisomère. Nous avons ainsi pu montrer qu'il existe une stéréosélectivité du métabolisme d'hydroxylation de la mexilétine et que le P450IID6 est responsable de l'hydroxylation de chaque énantiomère (Article 4).

## **REVUE GENERALE**

# PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DE LA MEXILETINE

## PROPRIETES ANTIARYTHMIQUES CARDIAQUES

### EFFETS ELECTROPHYSIOLOGIQUES

La mexilétine (Fig.1) appartient au groupe 1b de la classification de Vaughan-Williams (1).

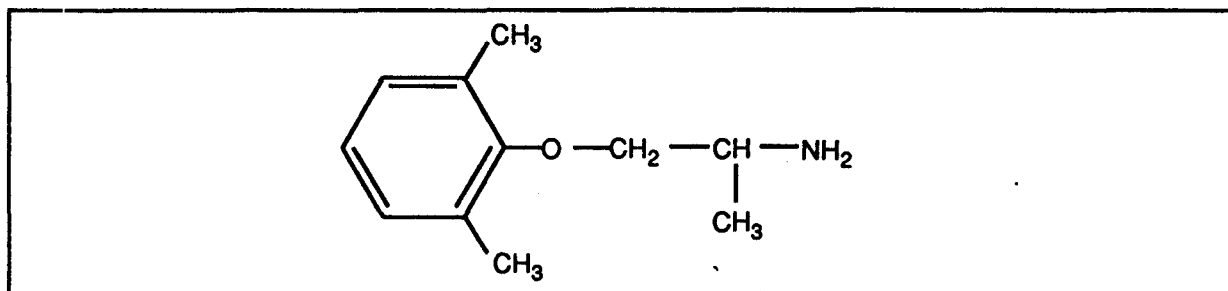


Fig.1 : La mexilétine

Elle réduit la vitesse maximale ( $V_{max}$ ) de dépolarisation (phase 0) du potentiel d'action myocardique. Elle n'a pas d'effet sur la fréquence cardiaque et possède un léger effet inotrope négatif.

La mexilétine augmente le seuil d'excitabilité et le rapport période réfractaire effective / durée du potentiel d'action expliquant ainsi une partie de l'effet antiarythmique. Comme tous les antiarythmiques de classe 1, la mexilétine est un bloqueur des canaux sodiques rapides. En raison de son caractère amphiphile, elle est caractérisée par l'existence d'un bloc de repos. Le bloc de repos (bloc tonique) est mis en évidence lorsque dès le premier potentiel d'action d'une préparation myocardique isolée et perfusée par une solution contenant la mexilétine, on observe une diminution de la  $V_{max}$  de ce potentiel d'action. Lorsqu'on continue à stimuler la préparation, un bloc d'utilisation est également mis en évidence car on assiste à une diminution exponentielle de la  $V_{max}$  du potentiel d'action jusqu'à établissement d'un plateau (Fig.2). Une des caractéristiques de la mexilétine est de posséder un bloc d'utilisation présentant une cinétique d'installation et de retrait rapide (2).

Ce bloc d'utilisation peut s'expliquer par le blocage progressif du canal sodique rapide. Ce canal sodique, schématiquement représenté par une protéine transmembranaire munie d'une "porte" externe  $m$ , d'une "porte" interne  $h$  ainsi que d'une structure "filtre" (Fig.3), possède selon la théorie de Hodgkin et Huxley trois états distincts durant le potentiel d'action. Lorsque le canal est à l'état de repos (fermé mais capable d'être activé), la mexilétine pénètre la bicouche phospholipidique entraînant une déformation du canal responsable du bloc de repos. Lors de la stimulation, la mexilétine emprunte le canal sodique ouvert (état activé) et vient s'y fixer gênant alors l'irruption des ions sodium ( $Na^+$ ).

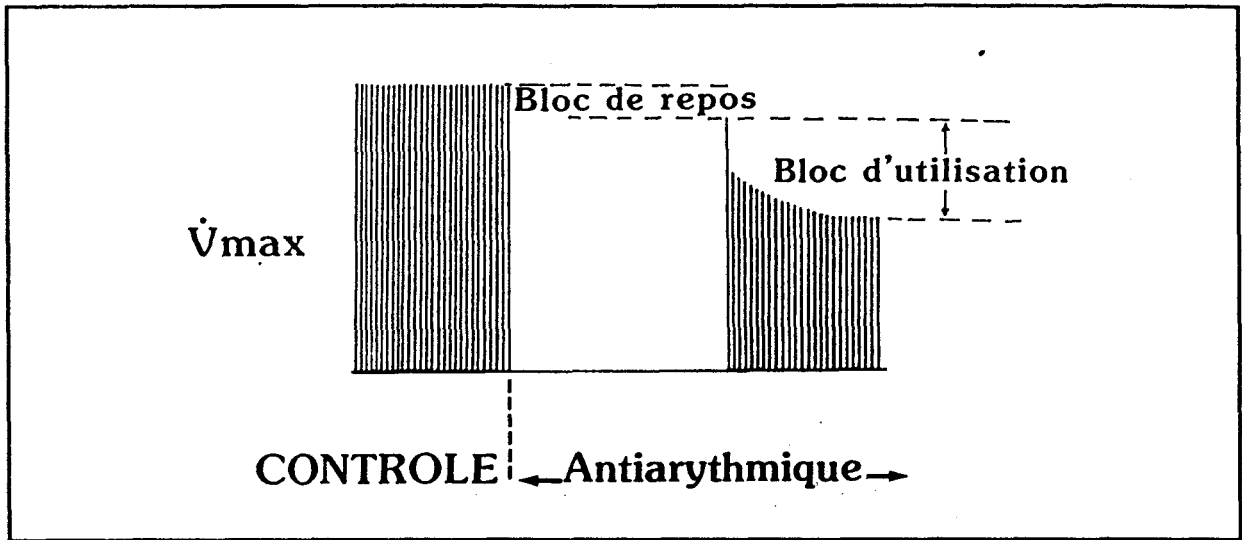


Fig.2 : Diminution de la  $V_{max}$  d'un potentiel d'action sous l'effet de la mexilétine (2).

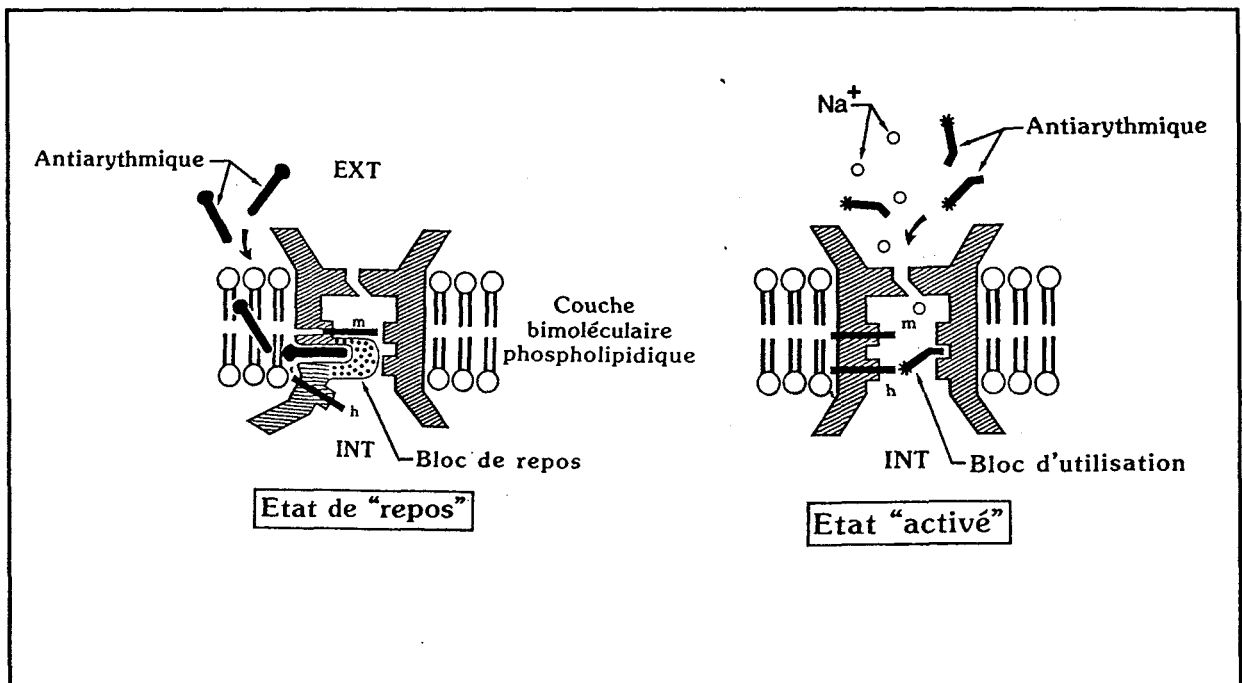


Fig.3 : Fonctionnement schématique d'un canal sodique en présence de mexilétine (2).

Les caractéristiques électrophysiologiques de la mexilétine permettent d'expliquer son retentissement électrocardiographique (pas d'élargissement du complexe QRS en rythme sinusal). En effet, la mexilétine (comme les antiarythmiques du sous-groupe 1b), qui a une cinétique de retrait très rapide, a le temps de libérer le canal sodique à chaque diastole. Elle n'entraîne donc pas de trouble de conduction en rythme sinusal mais par contre altère la conduction d'un complexe trop prématuré permettant ainsi l'arrêt des troubles du rythme (2).

#### EFFETS HEMODYNAMIQUES

Que ce soit par voie orale ou intraveineuse, la mexilétine entraîne peu d'altération hémodynamique chez des patients à cœur "sain" ou souffrant de troubles cardiaques (3).

## **AUTRES PROPRIETES DE LA MEXILETINE**

### **PROPRIETES ANTICONVULSIVANTES**

La mexilétine a été initialement développée pour ses propriétés anticonvulsivantes. Ces effets anticonvulsivants dépendent de la dose administrée. A faible dose (1 à 3 mg/kg), la mexilétine possède une activité anticonvulsivante; à forte dose (10 mg/kg), apparaissent des signes de dépression du système nerveux central (4).

Bien que son mode d'action anticonvulsivant soit mal connu, il semblerait que la mexilétine inhibe la recapture de l'acide  $\gamma$ -amino butyrique (GABA) au niveau du système nerveux central (4).

### **PROPRIETES ANESTHESIQUES LOCALES**

Le pouvoir anesthésique local de la mexilétine a d'abord été mis en évidence sur le nerf sciatique de grenouille en obtenant une réduction des potentiels d'action recueillis après stimulation (5). L'instillation d'une solution à 1% de mexilétine dans le sac conjonctival de l'œil de lapin provoque une anesthésie locale de la cornée durant 25 minutes (4).

### **ACTION SUR LE SYSTEME NERVEUX AUTONOME**

La mexilétine n'a pas d'effet sur le système  $\alpha$ - ou  $\beta$ -adrénergique ni sur le système nerveux cholinergique (4-6).

### **INDICATIONS THERAPEUTIQUES ET PRECAUTIONS D'EMPLOI**

La mexilétine est indiquée dans le traitement et la prévention des troubles du rythme cardiaque à type d'extrasystoles ventriculaires et de tachycardie ventriculaire, y compris au stade aigu de l'infarctus du myocarde (6).

En cas d'insuffisance hépatique ou rénale, de dysfonctionnement sinusal, de troubles de la conduction auriculo-ventriculaire ou intracardiaque et d'insuffisance cardiaque, il conviendra de débiter le traitement avec précaution et sous contrôle électrocardiographique et tensionnel.

Bien que la mexilétine soit dépourvue de toxicité fœtale, l'administration est déconseillée en cas de présomption de grossesse et durant les trois premiers mois de celle-ci, à moins que le traitement ne soit considéré comme essentiel. Pendant la période d'allaitement, la surveillance du nouveau-né est conseillée car la mexilétine passe dans le lait maternel.

### **EFFETS INDESIRABLES DE LA MEXILETINE**

La survenue d'effets indésirables est assez courante lors d'une administration intraveineuse de la mexilétine ou en cas d'administration orale à long terme. Cependant, la plupart de ces effets

indésirables sont peu importants, réversibles et peuvent être contrôlés par une réduction de la posologie ou par la prise de nourriture (6). La plupart des effets indésirables sont des dérangements gastro-intestinaux (nausées, vomissements, douleurs) et des effets neurologiques (principalement des tremblements mais aussi des vertiges ou une simple fatigue). La prise d'un antagoniste  $\beta$ -adrénergique en même temps que la mexilétine peut réduire l'incidence des tremblements tout en améliorant l'activité antiarythmique (6). Comme pour tous les antiarythmiques du groupe 1, il existe des effets indésirables de type cardio-vasculaire liés au blocage du canal sodique : risques de décompensation hémodynamique nécessitant une mise en route du traitement sous stricte surveillance en particulier chez l'insuffisant cardiaque, et risque arythmogène.

## PROPRIETES PHARMACOCINETIQUES

Le comportement pharmacocinétique de la mexilétine est bien établi chez des individus sains et des patients présentant différentes pathologies après administration intraveineuse ou orale.

### ABSORPTION

Après administration orale, la biodisponibilité de la mexilétine est d'environ 90% chez des individus sains (3). Le pic de concentration plasmatique est atteint entre 2 et 4 heures (3). L'effet de premier passage hépatique est faible (de l'ordre de 10%). La pharmacocinétique de la mexilétine est inchangée chez les patients atteints d'arythmie. Cependant, lors d'infarctus du myocarde, le délai d'absorption de la mexilétine est augmenté (3).

### DISTRIBUTION

Après administration intraveineuse, la concentration plasmatique en mexilétine chute rapidement reflétant l'importante distribution et la fixation du produit aux tissus (3). La cinétique de la mexilétine est décrite par un modèle à trois compartiments comprenant une phase de distribution rapide, une phase de distribution lente et une phase d'élimination encore plus lente (3). L'intensité de la fixation tissulaire de la mexilétine est reflétée par un volume apparent de distribution élevé (supérieur à 500 litres) (3). La fixation aux protéines plasmatiques est d'environ 70%. Le taux de mexilétine dans le sang est de l'ordre de 1% par rapport à la dose administrée, ce qui est négligeable par rapport à la quantité totale de mexilétine dans le corps. Le risque d'interaction médicamenteuse par déplacement de la quantité de mexilétine fixée aux protéines plasmatiques est donc très réduit (7).

### ELIMINATION

A pH physiologique, la demi-vie d'élimination de la mexilétine est de 10 heures en moyenne mais peut varier de façon importante (6 à 24 heures) (3). L'élimination de la mexilétine est diminuée si l'urine est alcaline (3).

L'élimination de la mexilétine se fait essentiellement par métabolisation au niveau du foie. Seulement 10% de la dose administrée sont excrétés dans les fèces sous forme de métabolites et 90% dans les urines dont moins de 10% sous forme inchangée (3). Il n'existe pas de phénomène d'accumulation et le métabolisme de la mexilétine ne semble pas dépendant de la dose administrée (3). La clairance rénale de la mexilétine à pH acide est supérieure au débit de filtration glomérulaire. Il semblerait donc que la mexilétine puisse être sécrétée activement au niveau du tubule rénal (7).

## METABOLISME

Le métabolisme de la mexilétine consiste principalement en des processus d'hydroxylation aliphatique et aromatique aboutissant à la formation respectivement d'hydroxymethylmexilétine (HMM) et de *p*-hydroxymexilétine (PHM) (3). Ces deux métabolites majeurs ne possèdent pas d'activité antiarythmique (8). Ils peuvent ensuite être désaminés puis réduits en leurs alcools correspondants ou bien glucuronoconjugués. La conjugaison de la mexilétine, elle-même, par l'acide glucuronique est également une voie métabolique importante. D'autres voies métaboliques ont été identifiées (*N*-oxydation, désamination en cétone suivie d'une réduction, *N*-méthylation et méta-hydroxylation). Elles ne représentent qu'une faible part du métabolisme total (environ 5%) (7-10) (Fig.4).

L'implication du cytochrome P450IID6 dans la formation des deux métabolites hydroxylés de la mexilétine a été démontrée *in vitro* sur des microsomes de foies humains (11-12). Cet enzyme hépatique humain est un isoenzyme de la superfamille des cytochromes P450s, responsable du polymorphisme génétique de type débrisoquine.

## INTERACTIONS MEDICAMENTEUSES

La mexilétine est métabolisée de façon importante au niveau hépatique et son élimination dépend donc étroitement des capacités enzymatiques du foie. Les paramètres pharmacocinétiques de la mexilétine pourraient donc être modifiés par des substances capables d'interférer avec les enzymes hépatiques.

La rifampicine et la phénytoïne diminuent la demi-vie d'élimination de la mexilétine; ce phénomène est probablement lié à un mécanisme d'induction enzymatique de son métabolisme hépatique (3). La cimétidine, qui inhibe le métabolisme de la lidocaïne, n'a pas d'effet sur la pharmacocinétique de la mexilétine. La fréquence des effets indésirables de type gastro-intestinaux est importante lors de l'administration de mexilétine; il n'est donc pas rare de lui administrer conjointement de la cimétidine. L'absence d'interaction pharmacocinétique a donc une grande importance (3).

Plusieurs cas d'élévation de la concentration sérique de théophylline sous l'action de la mexilétine ont été reportés (3). Une étude récente démontre que la mexilétine inhibe la *N*-déméthylation de la théophylline provoquant ainsi une augmentation des effets indésirables tels que des arythmies. Les taux de théophylline reviennent à la normale après arrêt du traitement par la mexilétine. Un suivi des taux de théophylline sérique lors de la coadministration de mexilétine est conseillée afin de limiter la survenue d'arythmies (13). La mexilétine diminue également la clairance et donc augmente la demi-vie d'élimination de la caféine, une autre méthylxanthine (3).

Les analgésiques morphiniques (7), les anti-acides (14) ainsi que l'atropine (15) diminuent la vitesse de résorption digestive de la mexilétine alors que le métoprolol l'augmente (15).



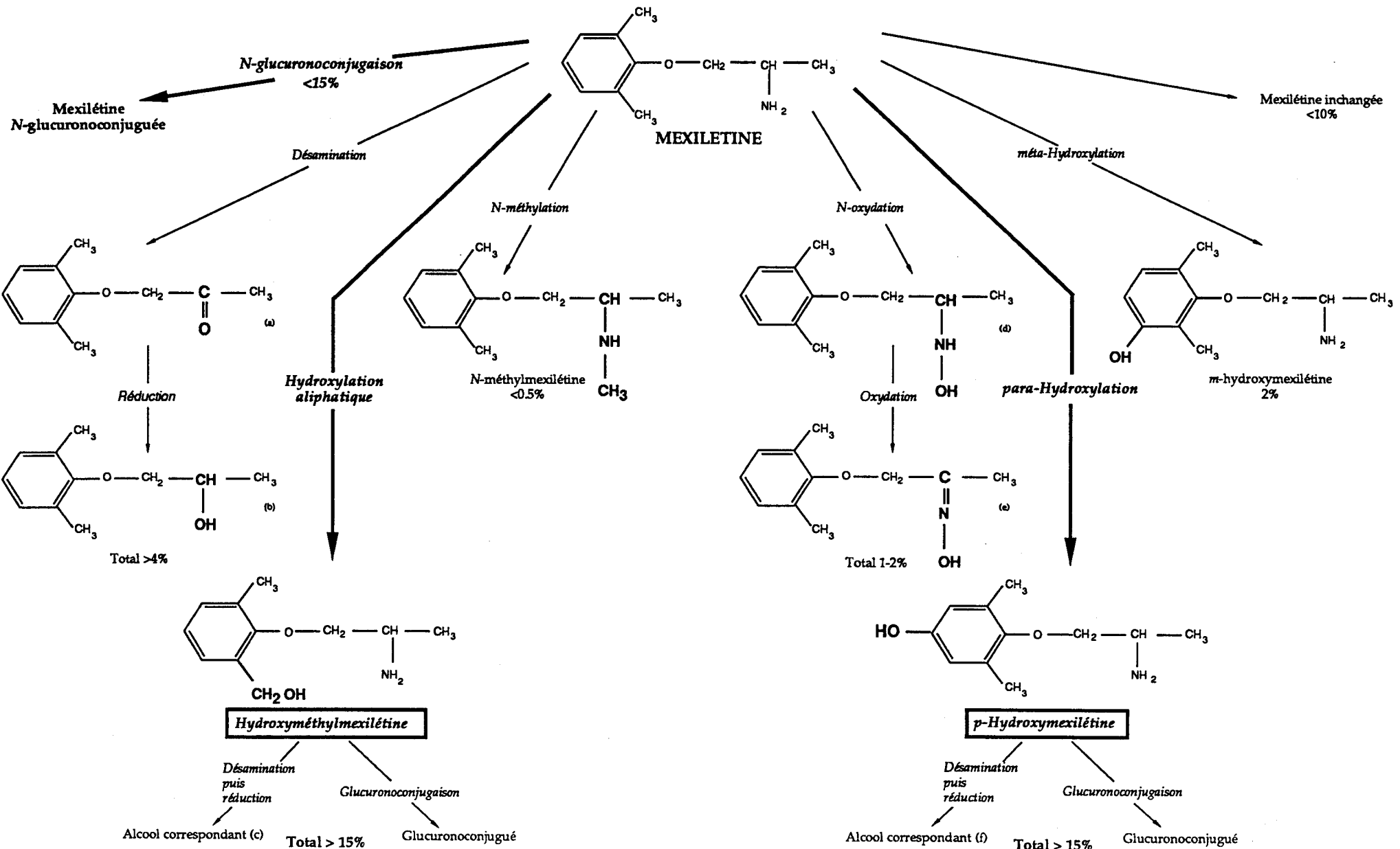


Fig.4: Schéma métabolique de la mexilétine. Structure chimique de la mexilétine et de ses métabolites.

Fig.4 : Schéma métabolique de la mexilétine. Structure chimique de la mexilétine (1-(2',6'-diméthyl)phénoxy-2-aminopropane) et de ses métabolites. De gauche à droite :

- Mexilétine *N*-glucuroconjuguée
- (a): 1-(2',6'-diméthyl)phénoxypropane-2-one.
- (b): 1-(2',6'-diméthyl)phénoxypropane-2-ol.
- Hydroxyméthylmexilétine : 1-(2'hydroxyméthyl,6'-méthyl)phénoxy-2-aminopropane.
- (c): 1-(2'hydroxyméthyl,6'-méthyl)phénoxypropane-2-ol.
- *N*-méthylmexilétine : 1-(2',6'-diméthyl)phénoxy-2-(méthyl)aminopropane.
- (d): *N*-hydroxymexilétine : 1-(2',6'-diméthyl)phénoxy-2-(hydroxy)aminopropane.
- (e): 1-(2',6'-diméthyl)phénoxypropane-2-one oxime.
- *para*-hydroxymexilétine : 1-(4'-hydroxy, 2',6'-diméthyl)phénoxy-2-aminopropane.
- (f): 1-(4'-hydroxy, 2',6'-diméthyl)phénoxy-2-ol.
- *mé*ta-hydroxymexilétine : 1-(5'-hydroxy, 2',6'-diméthyl)phénoxy-2-aminopropane.

#### PHARMACOCINETIQUE DES ENANTIOMERES DE LA MEXILETINE

La mexilétine contient un carbone asymétrique, centre chiral de la molécule. Elle existe donc sous deux formes stéréoisomères (ou énantiomères) constituant le racémique. En clinique, la mexilétine est administrée sous forme de racémique, mélange équimolaire de la R(-) et de la S(+)-mexilétine. Actuellement, les propriétés pharmacologiques de chaque énantiomère ne sont pas connues. Trois études ont été effectuées sur le comportement pharmacocinétique respectif des énantiomères de la mexilétine.

La première étude indique une stéréosélectivité de la disposition de la mexilétine chez 6 volontaires sains (16). L'aire sous la courbe de la S(+)-mexilétine est significativement plus élevée que celle de la R(-)-mexilétine. Cette différence s'expliquerait par le fait que l'excrétion urinaire de la R(-)-mexilétine glucuroconjuguée serait plus élevée que celle de la S(+)-mexilétine (16).

La seconde étude indiquait également une stéréosélectivité de la disposition de la mexilétine chez 5 volontaires sains. Celle-ci serait principalement due à une stéréosélectivité de la fixation de la mexilétine aux protéines plasmatiques (17).

Une étude de la distribution tissulaire des énantiomères de la mexilétine a été effectuée chez le rat (18). La distribution des énantiomères de la mexilétine au niveau du tissu cible, le cœur n'est pas stéréosélective, les concentrations cardiaques de R(-) et de S(+)-mexilétine étant respectivement 8 et 7 fois plus élevées que les concentrations sériques. La stéréosélectivité de la distribution des énantiomères de la mexilétine n'est évidente qu'au niveau du foie (2,4 fois plus élevée pour la S(+)-mexilétine). D'autre part, l'accumulation relativement élevée des énantiomères de la mexilétine au niveau cérébral pourrait expliquer l'apparition de certains effets neurologiques indésirables communément associés au traitement par la mexilétine (18).

## FACTEURS DE VARIATION DES PARAMETRES PHARMACOCINETIQUES DE LA MEXILETINE

Le comportement pharmacocinétique de la mexilétine est caractérisé par de larges variations interindividuelles (9). Pour une dose donnée et quelle que soit la voie d'administration, les taux plasmatiques obtenus à l'état d'équilibre varient de façon importante et rendent délicat le maniement de ce médicament dont l'index thérapeutique est étroit.

Divers facteurs de variations du comportement pharmacocinétique de la mexilétine ont été mis en évidence. Il s'agit de l'influence de l'environnement (tabac), des pathologies et de la physiologie.

### TABAC

Chez les fumeurs, la demi-vie d'élimination de la mexilétine est significativement diminuée sans que le volume de distribution ni la résorption digestive ne soient altérés. L'étude des concentrations urinaires des trois métabolites majeurs de la mexilétine (glucuronoconjuguée, *p*-hydroxymexilétine et hydroxyméthylmexilétine) indique que les constituants de la fumée de cigarette induisent sélectivement la glucuronoconjugaison et l'hydroxylation aliphatique sans modifier l'hydroxylation aromatique (19). Cet effet a été attribué à une induction enzymatique du métabolisme enzymatique de la mexilétine par les hydrocarbures aromatiques polycycliques de la fumée de cigarette.

### PATHOLOGIES

#### INSUFFISANCE RENALE

La clairance totale de la mexilétine est peu diminuée chez des patients dont la clairance de la créatinine est inférieure à 10 ml/min (3). Cependant, il ne semble pas exister de corrélation entre la gravité de l'insuffisance rénale et la clairance de la créatinine (3). De plus, il n'a pas été observé de différence de la concentration plasmatique de mexilétine entre des patients "contrôle" ayant une fonction rénale normale et des patients atteints d'insuffisance rénale (3). Il ne semble donc pas nécessaire d'ajuster la dose de mexilétine chez les patients atteints d'insuffisance rénale (3).

#### INFARCTUS DU MYOCARDE

L'absorption de mexilétine semble ralentie chez des patients atteints d'infarctus du myocarde comparativement à des sujets sains (7). Cet effet serait dû à un ralentissement de la vidange gastrique associée à l'infarctus du myocarde et à l'administration d'analgésiques morphiniques. Après administration intra-veineuse, le volume de distribution est significativement diminué. Ceci pourrait donc expliquer l'augmentation de la demi-vie d'élimination observée chez

les patients peu après l'infarctus du myocarde (3). Cependant, une autre étude montre que le volume de distribution et la demi-vie d'élimination sont plus élevés dans les premières 48 heures suivant l'infarctus que dans les 5 jours qui suivent (3).

## INSUFFISANCE HEPATIQUE

Chez des patients présentant une cirrhose, on note une augmentation très significative de la demi-vie d'élimination de la mexilétine. Sa clairance totale est fortement diminuée alors que le volume de distribution et la fixation aux protéines ne sont pas modifiés (3). Les taux plus élevés de mexilétine chez les sujets cirrhotiques seraient dûs à une diminution des activités enzymatiques. De ce fait, il est recommandé de réduire les doses de mexilétine à un tiers ou un quart de la dose normale (3).

## PHYSIOLOGIE

### pH URINAIRE

La mexilétine est une base faible dont le pKa est de 8.75 (50 % du produit est ionisé en solution aqueuse à pH 8.75). En milieu acide, la fraction ionisée augmente. L'excrétion urinaire de la mexilétine sous forme inchangée est ainsi fortement dépendante du pH urinaire. Elle s'accroît dans des proportions très importantes lorsque le pH urinaire est acide (7-9). L'effet des variations physiologiques du pH urinaire (généralement entre 5.5 et 6.5) est cependant discuté (7). Elles ne semblent pas, en effet, modifier sa demi-vie d'élimination et sa concentration plasmatique (20). De plus, lorsque le pH urinaire est maintenu artificiellement en dehors des valeurs physiologiques (à pH 5 ou 8), le comportement pharmacocinétique de la mexilétine varie de façon imprévisible (20).

### AGE

Les paramètres pharmacocinétiques étudiés chez des sujets "jeunes" (23 à 30 ans) et des sujets "âgés" (50 à 77 ans) ne présentent pas de variation (3).

## LES CYTOCHROMES P450

Les cytochromes P450 sont des enzymes transmembranaires qui catalysent le métabolisme oxydatif de nombreux substrats lipophiles de structures diverses. Ils constituent une "superfamille" de cytochromes produits d'une centaine de gènes différents (21). Ce sont des monooxygénases mais qui ont la possibilité de fonctionner en tant que peroxydases et réductases (21).

Animaux, végétaux et microorganismes contiennent des P450s (22). Chez les mammifères, ce système enzymatique a été mis en évidence dans tous les tissus étudiés (23) mais c'est dans les membranes du réticulum endoplasmique des hépatocytes (microsomes après fractionnement cellulaire) qu'il est le plus abondant.

### ROLE

L'intervention des cytochromes P450 permet de transformer des substrats lipophiles en des composés plus polaires facilitant ainsi leur élimination par des excréctions aqueuses telles que la bile ou l'urine, soit directement, soit après conjugaison avec des agents solubles dans l'eau comme l'acide glucuronique ou le glutathion (24). Ils interviennent dans le métabolisme de nombreux composés endogènes (stéroïdes, acides gras, vitamines, sels biliaires) ainsi que dans celui des xénobiotiques (nombreux médicaments, carcinogènes, herbicides, polluants, etc...) (24). Généralement, les P450 contribuent à ces processus de détoxification principalement par des réactions de monooxygénation (réactions de phase I) (Fig.5). Cependant, dans certains cas, des composés étrangers sont transformés en des produits beaucoup plus cytotoxiques, mutagènes ou carcinogènes (22).

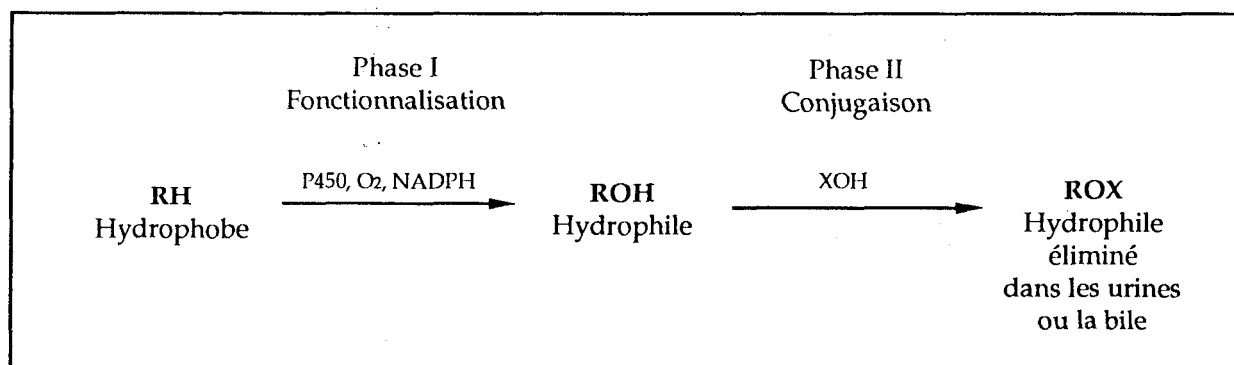


Fig.5 : Schéma général du métabolisme des xénobiotiques (23).

### STRUCTURE ET MECANISME

#### STRUCTURE

Les cytochromes P450 sont des hémoprotéines. Leur site actif est constitué d'un domaine largement hydrophobe dans lequel vient s'enchâsser le groupement prosthétique c.à.d. l'hème (25). Les P450 sont associés à une flavoprotéine (NADPH cytochrome P450 réductase) et peut-être au cytochrome b<sub>5</sub> responsables du transfert d'électrons du NADPH vers le cytochrome P450

(26). L'extrémité N-terminale transmembranaire constituée de 20 à 30 acides aminés en hélice est responsable de l'ancrage du cytochrome P450 au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. La partie globulaire du P450 se trouve dans le cytoplasme et l'hème serait perpendiculaire (ou presque) au plan de la membrane. Ce modèle a été mis en évidence par des études de liaison avec des anticorps anti-peptides et permet le mouvement intramoléculaire libre du P450 durant la catalyse

(27). L'hème, constitué d'un atome de fer lié à une protoporphyrine IX, est capable de fixer l'oxygène (Fig.6). Le cinquième ligand du fer est le groupement thiol d'un résidu de cystéine : caractéristique qui contribue au spectre d'absorption inhabituel et aux propriétés catalytiques des cytochromes P450

(22). Le sixième ligand est une molécule d'eau échangeable (Fig.6). Par réduction de l'atome de fer ( $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$ ), une molécule d' $O_2$  (ou de manière compétitive de CO) peut se lier à la sixième position en *trans* du groupement thiol.

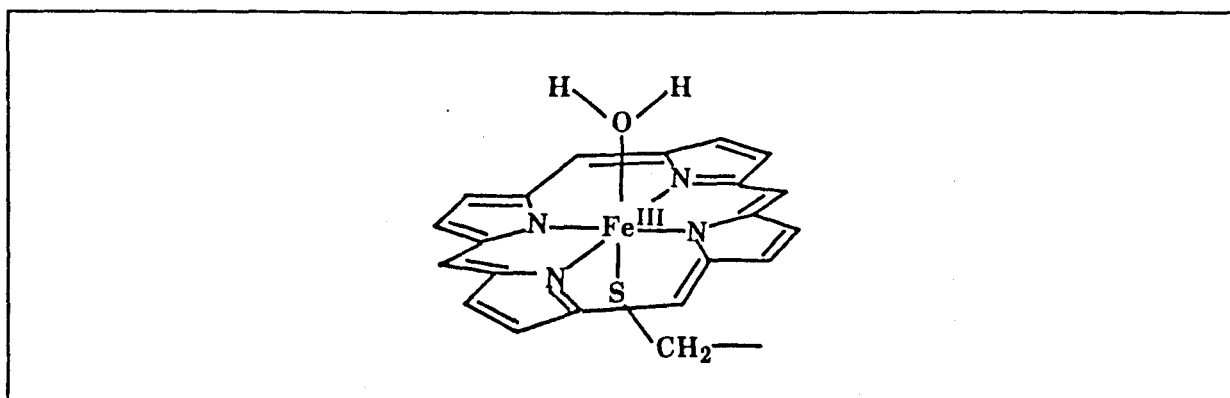


Fig.6 : Structure chimique du centre catalytique d'un cytochrome P450 : hème-fer-groupement thiol. Pour plus de clarté, les chaînes latérales de la porphyrine n'ont pas été représentées. (25)

#### MECANISME D'UNE REACTION D'OXYDATION (Fig.7) (28)

- La liaison du substrat perturbe l'état d'équilibre du P450 et facilite la capture d'un premier électron permettant la réduction du fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) (Etapes 1 et 2)
- Lorsqu'il est sous forme  $Fe^{2+}$ , le fer est capable de fixer une molécule d' $O_2$ . Par résonance, cet intermédiaire peut s'écrire  $Fe^{3+}(O_2^-)$  (Etape 3)
- Le transfert d'un deuxième électron précède la rupture de la liaison oxygène-oxygène associée à la capture de deux protons. Cette réaction résulte en la formation d'une molécule d' $H_2O$  (Etapes 4 et 5).
- L'insertion d'un atome d'oxygène au niveau du substrat implique "l'abstraction" d'un atome d'hydrogène du substrat. La recombinaison des radicaux carboné et hydroxyle donne le substrat hydroxylé (Etapes 6 et 7).
- La libération du produit restaure le cytochrome P450 dans son état de départ c.à.d. l'atome de fer étant sous forme ferrique (Etape 8).

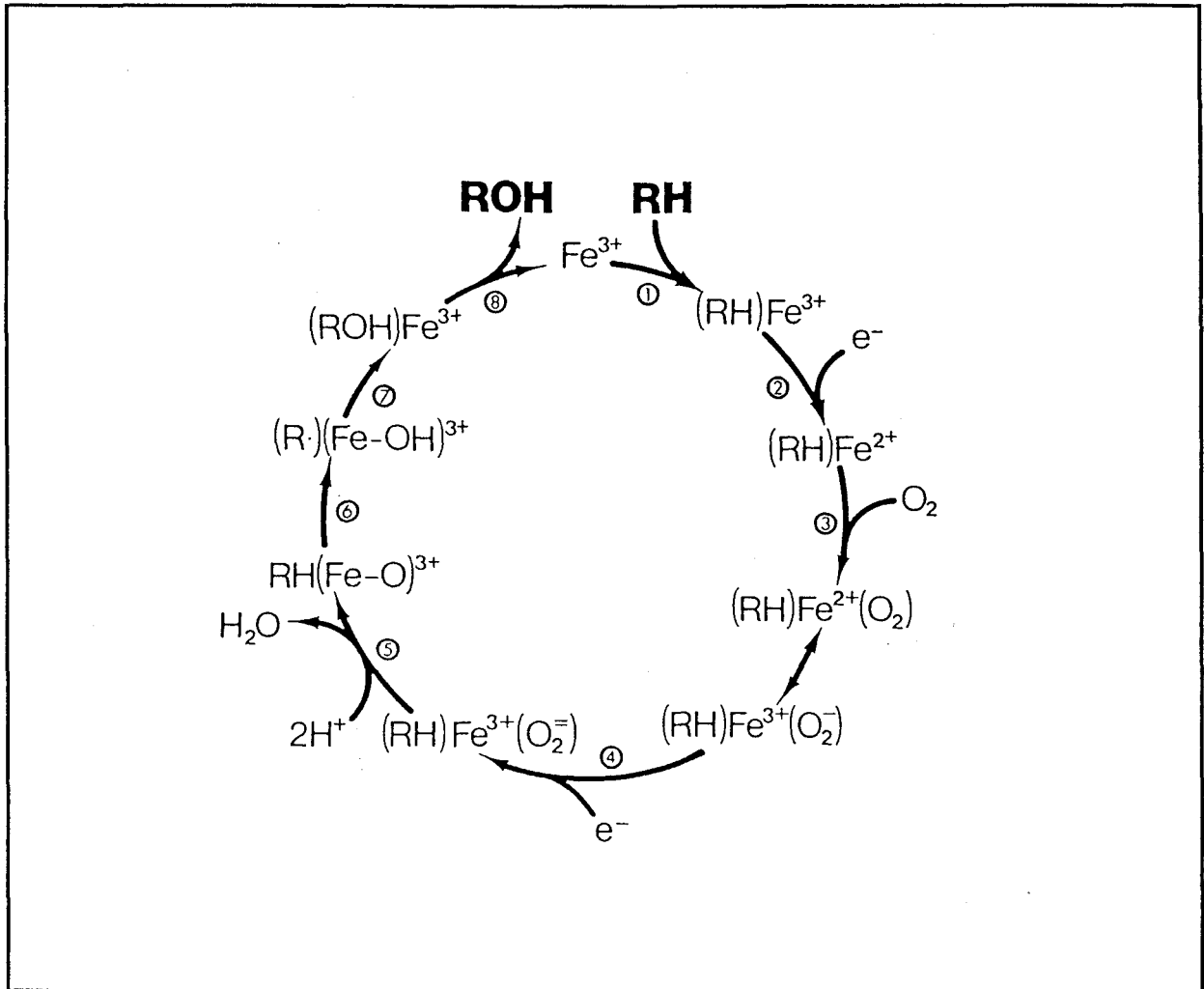


Fig.7 : Schéma du cycle catalytique du cytochrome P450 lors d'une réaction d'hydroxylation (28).

#### NOMENCLATURE DES CYTOCHROMES P450

La nomenclature des cytochromes P450 (29-30) regroupe les cytochromes P450 en famille et sous-famille sur la base de similitudes structurales. Les gènes humains de P450 sont nommés CYP suivi d'un chiffre arabe désignant la famille, d'une lettre désignant la sous-famille et enfin un chiffre arabe représentant le gène considéré au sein de sa famille et sous-famille (30). La protéine correspondant à un gène donné sera désignée de la même façon; la famille sera alors désignée par des chiffres romains. Les séquences protéiques présentent plus de 40% de similitude au sein d'une même famille de P450, et 60% dans une sous-famille (30).

#### AUTRES CARACTERISTIQUES

Certains P450 sont inductibles. En effet, l'administration ou la mise en contact avec certaines substances (hydrocarbures aromatiques polycycliques, phénobarbital, éthanol, etc...) ou les habitudes alimentaires augmente la concentration hépatique de certains P450 (31) modifiant ainsi les capacités de métabolisation du foie (Tableau 1).

Tableau 1 : Substrats-type et inducteurs des principaux cytochromes P450 humains (d'après F.P. Guengerich) (31)

	Substrats-type	Inducteurs
P450 1A1	Hydrocarbures polycycliques	Fumée de cigarette
P450 1A2	Phénacétine, arylamines, arylamides	Fumée de cigarette, viande grillée, légumes crucifères
P450 2C8, 9, 10	Méphénytoïne, tolbutamide, hexobarbital	Rifampicine, barbituriques
P450 2E1	Ethanol, chlorzoxazone, N-nitrosodialkylamines,	Ethanol, isoniazide?
P450 3A4	Nifédipine, certains stéroïdes, cyclosporine	Rifampicine, barbituriques, troléandomycine

Certaines substances, dont des médicaments, sont inhibitrices des cytochromes P450 (Tableau 2).

Tableau 2 : Inhibiteurs-type des principaux P450 humains (d'après F.P. Guengerich) (31)

	Inhibiteurs
P450 1A1	7,8-benzoflavone, ellipticine
P450 1A2	7,8-benzoflavone
P450 2C8, 9, 10	Sulfaphénazole
P450 2D6	Quinidine, autres alcaloïdes
P450 2E1	Disulfiram, 4-méthylpyrazole
P450 3A3, 4, 5, 7	Gestodène, troléandomycine, naringénine, cimétidine



# LE CYTOCHROME P450IID6 ET LE POLYMORPHISME GENETIQUE DE TYPE DEBRISOQUINE

## LE CYTOCHROME P450IID6

L'un des cytochromes P450 humains les plus étudiés est le cytochrome P450IID6. Cet isoenzyme de la "superfamille" des cytochromes P450 catalyse en effet le métabolisme de nombreux médicaments (tableau 3) : antiarythmiques, antidépresseurs tricycliques,  $\beta$ -bloquants, etc....

Les enzymes de la sous-famille IID dont fait partie le cytochrome P450IID6 présentent une fonction acide permettant la liaison avec un atome d'azote basique du substrat (37). Les substrats sont hydroxylés à 5 Å de l'atome d'azote en général sur un cycle aromatique ou sur un substituant alkyle proche du cycle aromatique. Le cytochrome P450IID6 est un enzyme possédant un caractère de haute affinité et de faible capacité : il est donc rapidement saturable (37). Pour certains de ses substrats (tableau 4), le P450IID6 présente une stéréosélectivité du métabolisme. Pour d'autres, on observe une disposition stéréosélective (tableau 4) chez les métaboliseurs extensifs que l'on ne retrouve pas chez les métaboliseurs limités (voir polymorphisme génétique) : c'est le cas du flécaïnide par exemple.

Le P450IID6 est absent ou indétectable chez le fœtus et apparaît durant la première semaine après la naissance quelque soit l'âge gestationnel (50).

Le cytochrome P450IID6 est non inductible et est responsable du polymorphisme génétique de type débrisoquine / spartéine.

## LE POLYMORPHISME GENETIQUE DE TYPE DEBRISOQUINE / SPARTEINE

### DEFINITION

Un polymorphisme génétique est un trait monogénique qui se manifeste par deux ou plusieurs phénotypes. Il est le résultat de l'existence de différents allèles au niveau d'un locus génique. L'influence d'un facteur génétique sur la variabilité interindividuelle peut être visualisée par un histogramme de distribution de fréquence (34).

Deux polymorphismes d'oxydation des médicaments ont, pour l'instant, été mis en évidence : le polymorphisme de type débrisoquine/spartéine et le polymorphisme de type méphénytoïne. La débrisoquine est un antihypertenseur, qui était prescrit en Grande-Bretagne et dont le métabolisme est sujet à de larges variations dans la population générale. Après la prise d'une dose thérapeutique normale de débrisoquine, certains sujets présentent une réponse clinique exagérée se manifestant par une hypotension orthostatique (24).

La capacité d'hydroxylation de la débrisoquine peut aisément être mesurée par la méthode de phénotypage de la débrisoquine. Après administration orale d'une dose de débrisoquine (ou d'une autre substance test) à dose subthérapeutique, on recueille les urines pendant 8 à 12 heures. Les quantités du composé administré et de ses métabolites sont déterminées. Le rapport composé initial / métabolites, appelé rapport métabolique, permet la réalisation d'un histogramme de

Tableau 3: Substrats du P450IID6 - Conséquences pharmacocinétiques et cliniques potentielles du polymorphisme génétique de type débrisoquine chez les sujets métaboliseurs limités.

<i>Médicament</i>	<i>Substrats du P450IID6</i> <i>Conséquences cliniques potentielles du polymorphisme de type débrisoquine</i> <i>chez les métaboliseurs limités</i>	<i>Références</i>
<b>Antiarythmiques cardiaques</b>		
encaïnide	Diminution de la formation des métabolites actifs: O-déméthylencaïnide Concentrations sériques élevées - Mauvaise suppression des arythmies	32-33
flécaïnide	Accumulation du médicament - Augmentation des effets indésirables	33-34
mexilétine		11
N-propylajmaline	Accumulation du médicament	34
propafénone	Accumulation du médicament - réactions neurotoxiques (vertiges, paresthésie) Augmentation des effets $\beta$ -bloquants même à faible dose	33-34
spartéine	Accumulation du médicament - Augmentation des contractions utérines - Troubles visuels	34-35
<b>Antihypertenseurs</b>		
débrisoquine	Accumulation du médicament - hypotension excessive	33-34
guanoxan	Accumulation du médicament - hypotension	33-34
indoramine	Accumulation du médicament - Augmentation des effets indésirables: sédation, nausées, vertiges	33-34
<b>Antidépresseurs tricycliques</b>		
amitriptyline	Accumulation du médicament et de son métabolite: nortriptyline	33-34
clomipramine	Accumulation du médicament	33-34
désipramine	Accumulation du médicament - effets toxiques sur le système nerveux central	33-34-35
imipramine	Accumulation du métabolite actif: Désipramine Augmentation des effets toxiques sur le système nerveux central	33-34-35
nortriptyline	Accumulation du médicament - effets toxiques sur le système nerveux central (sédation,...) Hypotension posturale	33-34-35
tomoxétine		36
<b>Inhibiteurs de MAO</b>		
methoxyphénamine	Accumulation du médicament	33
amiflamine	Accumulation du médicament	33

Tableau 3 (suite): Substrats du P450IID6 - Conséquences pharmacocinétiques et cliniques potentielles du polymorphisme génétique de type débrisoquine chez les sujets métaboliseurs limités.

Médicament	Substrats du P450IID6 Conséquences potentielles du polymorphisme de type débrisoquine chez les métaboliseurs limités	Références
<b>β-Bloquants</b>		
alprénolol	Accumulation du médicament - Métabolite actif - Effets β-bloquants excessifs	34
bopindolol		36
bufuralol	Augmentation des taux plasmatiques - Effets β-bloquants excessifs	34-35
métoprolol	Hypotension modérée - Nausées et vomissements - Effets cholinergiques Accumulation du médicament	33-34
penbutolol	Activité β-bloquante excessive - Hépatite	36
propranolol	Effets β-bloquants excessifs	34-35
timolol	Accumulation du médicament - Augmentation des effets β-bloquants: bradycardie Perte de cardioselectivité: bronchoconstriction - Troubles du sommeil	33-34-35
<b>Neuroleptiques</b>		
perphénazine	Accumulation du médicament	34
thioridazine	Accumulation du médicament	34
zuclopentixol	Accumulation du médicament	34
<b>Opiacés</b>		
codéine	Diminution de formation du métabolite actif: morphine	33-34-35
dextrometorphan	Diminution de l'effet thérapeutique - Symptômes gastrointestinaux	33-34
éthylmorphine (O-déméthylation)	Accumulation du médicament - Létargie - Psychose après overdose	37
<b>Divers</b>		
perhexiline	Accumulation du médicament - Atteinte hépatique	33-34
phenformine	Accumulation du médicament - Hypoglycémie - Acidose lactique	33-34
4-méthoxyamphétamine	Accumulation du médicament	36

Tableau 4 : Substrats du P450IID6 dont l'activité, la disposition ou le métabolisme présentent un aspect stéréosélectif

<i>Médicament</i>	<i>Aspects stéréosélectifs des substrats du P450IID6</i>	<i>Références</i>
<b>Antiarythmiques cardiaques</b>		
encainide	Métabolisme stéréosélectif chez le rat "in vitro"	38
flécaïnide	Disposition stéréosélective chez les ME, absente chez les ML - Activité antiarythmique identique	39-40
mexilétine	Disposition stéréosélective (glucuroconjugaison - fixation aux protéines plasmatiques)	16-17
	Distribution stéréosélective uniquement au niveau du foie (étude chez le rat)	18
N-propylajmaline	Disposition stéréosélective chez les ME, absente chez les ML	41
propafénone	Disposition stéréosélective - Activité antiarythmique identique	40
	Interaction énantiomère/énantiomère pour la 5-hydroxylation "in vitro"	42
	Distribution stéréosélective dans les hématies	43
spartéine	Métabolisme stéréosélectif chez le rat "in vitro"	44
<b>Antihypertenseurs</b>		
débrisoquine	Métabolisme stéréosélectif (stéréosélectivité de produit c.à.d. création d'un centre chiral) chez les ME, absent chez les ML	45
<b>Antidépresseurs tricycliques</b>		
nortriptyline	Hydroxylation énantiosélective "in vitro" et "in vivo"	46
<b>β-Bloquants</b>		
bufuralol	Hydroxylation stéréosélective "in vitro" chez le rat et l'homme ainsi que "in vivo" diastéréosélective in vitro	47
métoprolol	Métabolisme stéréosélectif et diastéréosélectif "in vitro" chez le rat et l'homme ainsi que "in vivo"	48
penbutolol	4-Hydroxylation stéréosélective	40
propranolol	Métabolisme stéréosélectif et régiosélectif	49
<b>Divers</b>		
perhexiline	Hydroxylation stéréosélective	40

ME: métaboliseur extensif; ML: métaboliseur limité.

distribution de fréquence. Le polymorphisme de type débrisoquine a été mis en évidence par la bimodalité de la courbe de distribution de fréquence. On définit l'antimode comme étant la valeur de rapport métabolique permettant de séparer deux populations. La valeur de l'antimode a été fixée pour un rapport métabolique de 12.6 (Fig.8). La majorité des individus excrètent de grandes quantités de débrisoquine hydroxylée : ce sont les métaboliseurs extensifs. Environ 7% de la population européenne excrète en majorité de la débrisoquine inchangée : ils sont appelés métaboliseurs limités.

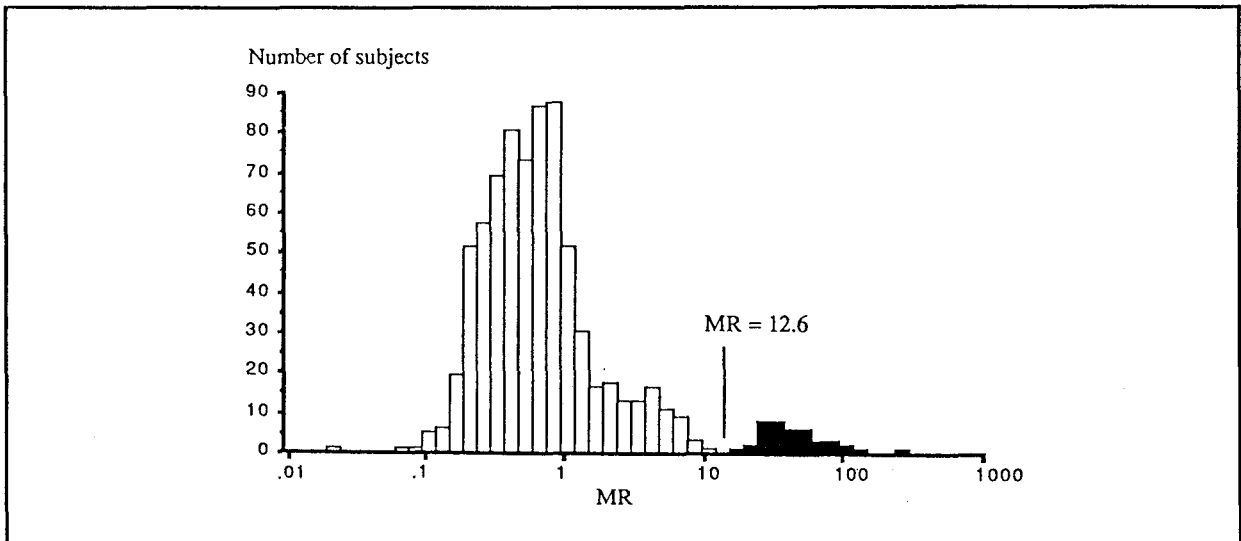


Fig.8 : Distribution du rapport métabolique urinaire de la débrisoquine chez 757 sujets suédois (51).

La nature génétique de ce polymorphisme a ensuite été confirmée par des études familiales. La fréquence élevée du nombre de métaboliseurs limités (7,4% dans la population européenne) permet d'opposer ce polymorphisme génétique (excepté lorsque les individus atteints sont exposés à certains médicaments) aux maladies héréditaires (34).

## BASES MOLECULAIRES

Le polymorphisme de type débrisoquine / spartéine est provoqué par une anomalie génétique monogénique autosomale récessive. Chez les métaboliseurs limités, on observe une protéine modifiée ou l'absence de protéine P450IID6 (52).

Le gène est désigné sous le terme *CYP2D6* et la protéine *CYP2D6* selon la classification de Nebert (29). Le locus *CYP2D* est situé sur le bras long du chromosome 22 (q11.2-q ter). Il comprend trois gènes en tandem contenant chacun neuf exons et mesurant environ 7 kb. Le gène *CYP2D6* est accompagné de deux pseudogènes appelés *CYP2D8P* et *CYP2D7* (Fig.9) (52).

L'identification du génotype par analyse "PCR" (Polymerase Chain Reaction) et "RFLP" (Restriction Fragment Length Polymorphism) est basée sur la détection de quatre mutations inactivant le gène *CYP2D6* : D6-A, D6-B, D6-C et D6-D. Les sujets homozygotes pour les mutations D6-A et D6-B ou hétérozygotes D6-A/D6-B possèdent le génotype métaboliseur limité. La mutation D6-C est supposée être associée à ce génotype également. Cependant, à l'heure actuelle, elle n'a été mise en évidence que chez des métaboliseurs extensifs hétérozygotes (Fig.9).

Tableau 5 : Fréquences des différents allèles du *CYP2D6* chez les individus phénotypés métaboliseurs extensifs (ME) métaboliseurs limités (ML) déterminées en combinant analyse PCR et *Xba I* RFLP (d'après Broly *et al* ) (53).

Mutation ou séquence wt	Fréquence des allèles (%)	
	ML (n=150)	ME (n=470)
D6-wt/D6-wt		74
D6-wt/D6-A		1
D6-wt/D6-B		18
D6-wt/D6-C		2 (n=345)
D6-wt/D6-D		5
D6-A/D6-A	5	
D6-B/D6-B	76	
D6-C/D6-C	0 (n=16)	
D6-D/D6-D	14	

La mutation D6-A est caractérisée par la délétion d'un seul nucléotide (A en 2637) dans le cinquième exon du gène *CYP2D6* provoquant un décalage du cadre de lecture. La mutation D6-B se manifeste par le remplacement de G en A en 1934 modifiant ainsi la séquence consensus 3' du site d'épissage du troisième intron du gène *CYP2D6* (Fig.9) (54). Ces deux mutations D6-A et D6-B ainsi qu'une délétion complète du gène (mutation D6-D) sont responsables d'une absence totale de cytochrome P450IID6. La mutation D6-C consiste en une délétion de 3 pb (AGA en 2701-3) à l'extrémité 3' du cinquième exon. Elle est présente sur un allèle mutant du gène *CYP2D6* qui coderait pour une protéine catalytiquement active mais possédant une *Vmax* plus élevée alors que le *Km* est semblable à celui de l'enzyme non muté (55).

L'utilisation des méthodes de *Xba I* RFLP et PCR combinées permettent actuellement de déterminer le génotype de 95% des métaboliseurs limités et 100% des métaboliseurs extensifs (53).

## CONSEQUENCES CLINIQUES

Le métabolisme oxydatif de nombreuses substances est corégulé avec celui de la débrisoquine (tableau 3). Ces différents médicaments sont des substrats du cytochrome P450IID6. Chez les sujets "métaboliseurs limités", le cytochrome P450IID6 est absent ou modifié. Le métabolisme des substrats du P450IID6 est donc fortement troublé chez ces sujets.

Un des facteurs importants de la découverte du polymorphisme d'hydroxylation de la débrisoquine était sa grande spécificité pour le P450IID6. Mais, les autres substrats varient dans leur degré de sélectivité pour le P450IID6. Pour certaines substances, la (ou les) voie(s) métabolique(s) impliquant le P450IID6 peuvent être de moindre importance dans le métabolisme global et l'élimination du médicament considéré (34). Cet aspect n'est pas à négliger lorsque l'on veut estimer les risques encourus par un métaboliseur limité lors de la prise d'un médicament, substrat du P450IID6. En effet, les concentrations plasmatiques de médicament peuvent être élevées chez les sujets métaboliseurs limités, si celui-ci est un substrat du cytochrome P450IID6, c'est le cas pour de nombreux médicaments (tableau 3). Les conséquences cliniques pouvant affectées le métaboliseur limité peuvent alors être graves (tableau 3).

Lors de l'administration de débrisoquine, les sujets atteints d'hypotension orthostatique étaient des métaboliseurs limités. Après administration de perhexiline, un antiangineux, les métaboliseurs limités souffraient de neuropathie périphérique. Si le métabolite est responsable de l'activité, l'absence ou la diminution de métabolisation du médicament aboutira à une absence ou une diminution de l'effet escompté. C'est le cas, par exemple, de la codéine qui est normalement transformée en morphine (tableau 3). Il peut y avoir également une accumulation du médicament et de son métabolite actif (exemple : amitriptyline et nortriptyline). Mais dans ces cas, des phénomènes de compensation de la réaction déficiente peuvent se produire. Par exemple, l'hydroxylation de l'imipramine déficiente chez les métaboliseurs limités est compensée par la déméthylation dont est responsable un autre cytochrome P450.

Certaines substances comme la quinidine sont, même à faible dose, des inhibiteurs puissants du P450IID6, bien qu'elle ne soit pas métabolisée par ce P450. Elle est capable de transformer un métaboliseur extensif en métaboliseur limité en inhibant les réactions catalysées par le P450IID6. D'autre part, la propafénone, ainsi que des neuroleptiques (perphénazine, chlorpromazine, thioridazine) ont la capacité d'inhiber par compétition le métabolisme d'un autre substrat du P450IID6 coadministré (34). S'il s'agit de voies métaboliques majeures, des interactions importantes peuvent alors survenir. Par conséquent, les métaboliseurs extensifs peuvent y être exposés.

Récemment, le cas d'une femme traitée d'abord par la fluoxétine puis par l'amitriptyline a été reporté (56). Après 4 jours d'administration d'amitriptyline, la patiente a montré des symptômes anticholinergiques. La concentration en amitriptyline était très élevée alors que son phénotypage (déterminé en dehors de toute thérapeutique) et son génotypage indiquait qu'elle était métaboliseur extensif. Or des patients ayant des taux plasmatiques élevés

d'antidépresseurs tricycliques sont habituellement métaboliseurs limités. En fait, la fluoxétine est un inhibiteur *in vitro* du cytochrome P450IID6. L'augmentation des taux plasmatiques d'amitriptyline et ses effets indésirables pourrait donc s'expliquer par une interaction entre fluoxétine et P450IID6 (56).

Certains substrats du cytochrome P450IID6 sont administrés sous forme de racémique, mélange équimolaire de deux stéréoisomères ou énantiomères. Pour certains d'entre eux, la disposition de certains substrats racémiques est stéréosélective chez les métaboliseurs extensifs et pas chez les métaboliseurs limités. C'est le cas du flécaïnide ou de la N-propylajmaline (tableau 4). Dans le cas de la débrisoquine, la 4-hydroxylation est stéréosélective chez les métaboliseurs extensifs et ne l'est pas chez les métaboliseurs limités. Le phénotype et sans doute le génotype influence donc pour certains médicaments le métabolisme ou la distribution des énantiomères.

## RELATION AVEC DES MALADIES

La relation entre le développement de certaines maladies et le phénotype des sujets atteints est discuté.

### *Cancer du poumon*

Plusieurs études ont été réalisées afin de déterminer s'il existait un lien entre le développement d'un cancer du poumon et le polymorphisme de type débrisoquine. En 1984, Ayesh étudiait la distribution du rapport métabolique chez des fumeurs dont 245 avaient développé un cancer du poumon et 234 n'en avaient pas développé (57). Il montrait que les métaboliseurs limités étaient moins nombreux parmi les sujets atteints de cancer du poumon. L'étude de Caporaso en 1989 allait dans ce sens également (58). Puis d'autres études ont démontré qu'il n'existait pas de lien entre le polymorphisme de type débrisoquine et le développement d'un cancer du poumon (59-60). Actuellement, l'influence du phénotype sur le développement d'un cancer du poumon est par conséquent fortement controversée.

### *Maladie de Parkinson*

Une association entre le phénotype métaboliseur limité et la maladie de Parkinson a été suspectée. L'hypothèse apportée est que les métaboliseurs limités seraient exposés à des concentrations plus élevées de "neurotoxines environnementales" que les métaboliseurs extensifs (34). Cependant d'autres études ont démenti cette association (34).

### *Lupus érythémateux systémique*

Deux études ont montré une fréquence élevée des métaboliseurs limités chez des patients atteints de lupus érythémateux systémique. Une association entre le polymorphisme de type débrisoquine et le développement de cette maladie n'est donc pas exclue bien qu'elle soit probablement de faible importance (34).



### *Syndrome de Gilbert*

Le syndrome de Gilbert ne semble pas lié au polymorphisme d'hydroxylation de la débrisoquine (61).

### *Pathologies hépatiques*

Les pathologies hépatiques entraînent une diminution de l'activité dextrométhorphan O-déméthylase, liée au polymorphisme d'hydroxylation de la débrisoquine. Cependant, cette diminution ne modifie pas la détermination du phénotype (62).

### *Hépatite autoimmune chronique de type II*

Le cytochrome P450IID6 est l'antigène cible d'anticorps anti-LKM1 (anti-liver/kidney microsomes). Cet anticorps est présent chez 5 à 10% des sujets atteints d'hépatite autoimmune chronique de type II. Etant donné que la distribution des rapports métaboliques de la débrisoquine est normale chez ses sujets, l'origine de cette anomalie reste incertaine (63).

### *Personnalité*

Une étude de Bertilsson et coll. (64) a suggéré que la personnalité des métaboliseurs limités pouvait être caractérisée par la rapidité et la facilité à prendre des décisions. D'après les auteurs, le cytochrome P450IID6 pourrait être impliqué dans le métabolisme de substances endogènes ayant une importance dans le fonctionnement du système nerveux central.

L'influence du polymorphisme de type débrisoquine sur les goûts alimentaires a également été recherchée (65). Il semblerait que les métaboliseurs limités aimeraient moins le chou-fleur et la noix de coco que les métaboliseurs extensifs. Les métaboliseurs limités pour la méphénytoïne (un autre polymorphisme génétique impliquant le cytochrome P450IIC8) préféreraient moins les épinards et le chou que les métaboliseurs extensifs. Des études supplémentaires seraient souhaitables afin de déterminer les composants chimiques qui pourraient être responsables de ces associations (65).

## PHYLOGENESE DU P450IID6

Les données épidémiologiques actuelles sur le gène humain *CYP2D6* suggèrent que ni le génotype métaboliseur extensif ni le génotype métaboliseur limité ne présentent pas d'avantages pour survivre (66). Il semblerait donc que le gène *CYP2D6* ne soit pas essentiel (66). Cependant, il est intéressant de noter qu'il existe des différences interethniques de la proportion de métaboliseurs limités (Tableau 5). L'existence de tribus possédant différentes alimentations, il y a plusieurs centaines de milliers d'années pourrait expliquer cette variabilité (66). L'absence complète de métaboliseurs limités chez certaines populations peut être due à l'absence d'allèles *CYP2D6* mutants ou à la présence d'autres P450 capables de remplacer la fonction du P450IID6 (66).

Le fait que 40% des allèles *CYP2D6* soient mutants, pourrait indiquer que le gène *CYP2D6* est en train de disparaître ou bien qu'il est en train de se transformer en pseudogène comme le *CYP2D8P* ou le *CYP2D7* (66). Ces deux gènes étaient probablement essentiels à la survie des premiers hommes.

Tableau 6 : Proportion de métaboliseurs limités par rapport à la population générale dans différentes ethnies.

ETHNIES	% DE METABOLISEURS LIMITES	SUBSTANCE-TEST	REFERENCES
<b>Amérindiens</b>			
Cunas de Panama	0	spartéine	67-68
Ngawbé Guaymi	5,2	"	69
<b>Orientaux</b>			
Chinois	0	métoprolol	70
Coréens	0,5	"	70
Japonais	0,7	"	70
<b>Africains</b>			
Arabie Saoudite	1	débrisoquine	71
Egyptiens	1	"	72
Nigériens	0-8,1	"	73-74
Venda	0	spartéine	75
(tribu noire-Afrique du Sud)	4	débrisoquine	76
	7,4	métoprolol	76
Ghanéens	7,1	débrisoquine	77
	0	spartéine	77-78
<b>Américains</b>			
Noirs	1,9	dextrometorphan	79
Blancs	7,7	"	79
<b>Canadiens</b>	8,3	spartéine	80
<b>Australiens caucasiens</b>	6	débrisoquine	81
<b>Européens</b>			
moyenne de toutes les données	7,33	débrisoquine	82
obtenues pour des populations européennes	7,26	spartéine	
(jusqu'à janvier 1990)	8,03	dextrometorphan	
	7,4	moyenne	
<b>Groenlandais</b>			
Est	3,3	spartéine	83
Ouest	2,3	"	83
Vivant au Danemark	3,2	"	84
Finlandais	5	débrisoquine	85
	3,2	"	86
Lapons	8,6	"	86

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Vaughan-Williams EM. 1984. A classification of antiarrhythmic actions redressed after a decade of new drugs. *J.Clin.Pharmacol.* **24** : 129-147.
- 2- C.Libersa et J.Caron. 1990. Médicaments en pathologie cardio-vasculaire. Editions Masson, Paris. 111-158.
- 3- J.P.Monk & R.N.Brogden. 1990. Mexiletine : a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in the treatment of arrhythmias. *Drugs.* **40** (3): 374-411.
- 4- P.B.Danneberg & J.H.Shelley. 1977. The pharmacology of mexiletine. *Postgrad. Med. J.* **53** (1): 25-29.
- 5- B.H.Singh & E.M.Vaughan Williams. 1972. Investigations of the mode of action of a new antidysrhythmic drug Kö 1173. *Br.J.Pharmacol.* **44** : 1-9.
- 6- C.Y.C.Chew, J.Collett & B.N.Singh. 1979. Mexiletine : a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in arrhythmias. *Drugs.* **17** : 161-181.
- 7- L.F.Prescott, A.Pottage, J.A.Clement. 1977. Absorption, distribution and elimination of mexiletine. *Postgrad. Med. J.* **53** (1): 50-55.
- 8- R.L.Woosley, T.Wang, W.Stone, L.Siddoway, K.Thompson, H.J.Duff, I.Cerskus & D.Roden. 1984. Pharmacology, electrophysiology and pharmacokinetics of mexiletine. *Am.Heart J.* **107** : 1053-1057.
- 9- A.H.Beckett & E.C.Chidomere. 1977. The distribution, metabolism and excretion of mexiletine in man. *Postgrad. Med. J.* **53** (1): 60-66.
- 10- O.Grech-Bélanger, J.Turgeon, M.Lalande & P.Bélanger. 1991. *Meta*-hydroxymexiletine, a new metabolite of mexiletine. Isolation, characterization, and species differences in its formation. *Drug Metab. Dispos.* **19** (2): 458-461.
- 11- F. Broly, C.Libersa, M.Lhermitte. 1990. Mexiletine metabolism *in vitro* by human liver. *Drug Metab. Dispos.* **18** : 362-369.
- 12- F.Broly, C.Libersa, M.Lhermitte & B.Dupuis. 1990. Inhibitory studies of mexiletine and dextrometorphan oxidation in human liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **39** : 1045-1053.
- 13- A.Hurwitz, J.L.Vacek, G.W.Botteron, M.I.Sztern, E.M.Hughes & A.Jayaraj. 1991. Mexiletine effects on theophylline disposition. *Clin.Pharmacol.Ther.* **50** : 299-307.
- 14- P.Herzog, K.H.Holtermüller, T.Kasper, T.Meinertz, D.Trenk & E.Jänchen. 1982. Absorption of mexiletine after treatment with gastric antiacids. *Br.J.clin.Pharmac.* **14** : 746-747.
- 15- L.H.M.Wing, P.J.Meffin, J.J.Grygiel, K.J.Smith. 1980. The effect of metoclopramide and atropine on the absorption of orally administered mexiletine. *Br.J.clin.Pharmac.* **9** : 505-509.

- 16- O.Grech-Belanger, J.Turgeon & M.Gilbert. 1986. Stereoselective disposition of mexiletine in man. *Br.J.clin.Pharmac.* **21** : 481-487.
- 17- L.Igwemezie, C.R.Kerr & K.M.McErlane. 1989. The pharmacokinetics of the enantiomers of mexiletine in humans. *Xenobiotica* **19** (6): 677-682.
- 18- L.Igwemezie, G.N.Beatch, M.J.A.Walker & K.M.McErlane. 1991. Tissue distribution of mexiletine enantiomers in rats. *Xenobiotica* **21** (9):1153-1158.
- 19- O.Grech-Bélanger, M.Gilbert, J.Turgeon & P-P.LeBlanc. 1985. Effect of cigarette smoking on mexiletine kinetics. *Clin.Pharmacol.Ther.* **37** : 638-643.
- 20- B.G.Mitchell, J.A.Clements, A.Pottage & L.F.Prescott. 1983. Mexiletine disposition : individual variation in response to urine acidification and alkalinisation. *Br.J.clin.Pharmac.* **16** : 281-284.
- 21- D.V.Parke, C.Ioannides & D.F.V.Lewis. 1991. The roles of the cytochromes P450 in the detoxication and activation of drugs and other chemicals. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* **69** : 537-549.
- 22- T.D.Porter & M.J.Coon. 1991. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulation mechanisms. *J.Biol.Chem.* **266** (21): 13469-13472.
- 23- P.H.Beaune. 1986. Les cytochromes hépatiques humains. *Médecine/Sciences* **2** : 358-363.
- 24- J.George & G.C.Farell. 1991. Role of human hepatic cytochromes P450 in drug metabolism and toxicity. *Aust.NZ J.Med.* **21** : 356-362.
- 25- R.E.White. 1991. The involvement of free radicals in the mechanisms of monooxygenases. *Pharmac.Ther.* **49** : 21-42.
- 26- G.S.Shahi, N.P.Das & S.M.Moochhala. 1990. Parkinson's disease and cytochrome P450 : a possible link ? *Medical Hypotheses* **32** : 277-282.
- 27- R.J.Edwards, B.P.Murray, A.M.Singleton & A.R.Boobis. 1991. Orientation of cytochromes P450 in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* **30** : 71-76.
- 28- R.E.White & M.J.Coon. 1980. Oxygen activation by cytochrome P-450. *Ann.Rev.Biochem.* **49** : 315-356.
- 29- D.W.Nebert, M.Adesnik, M.J.Coon, R.W.Estabrook, F.J.Gonzalez, F.P.Guengerich, I.C.Gunsalus, E.F.Johnson, B.Kemper, W.Levin, I.R.Phillips, R.Sato & M.R.Waterman. 1987. The P450 gene superfamily : recommended nomenclature. *DNA* **6** : 1-11.
- 30- D.W.Nebert, D.R.Nelson, M.Adesnik, M.J.Coon, R.W.Estabrook, F.J.Gonzalez, F.P.Guengerich, I.C.Gunsalus, E.F.Johnson, B.Kemper, W.Levin, I.R.Phillips, R.Sato & M.R.Waterman. 1989. The P450 superfamily : updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA*. **8** (1): 1-13.

- 31- F.P. Guengerich. 1992. Characterization of human cytochrome P450 enzymes. *FASEB J.* 6: 745-748.
- 32- U.A.Meyer. 1990. Clinical importance of genetics in drug effects in : *Clinical Pharmacology, basic principles in therapeutics*, 3rd edition, Melmon and Morelli Eds. p 1-90.
- 33- N.E.Caporaso & G.L.Shaw. 1991. Clinical implications of the competitive inhibition of the debrisoquin-metabolizing isozyme by quinidine. *Arch.Intern.Med.* 151 : 1985-1992.
- 34- G.Alvan. 1991. Clinical consequences of polymorphic drug oxidation. *Fundam.Clin.Pharmacol.* 5 : 209-228.
- 35- I.Szorady & A.Santa. Pharmacogenetically hazardous drugs : a proposed new scoring method. *Acta Physiologica Hungarica.* 77 (3-4): 305-318.
- 36- P.Dayer. Advantages and drawbacks of probe drugs for the assessment of phenotypic expression of cytochrome P450db1 (P450IID6). European Consensus Conference on Pharmacogenetics, European cooperation in the field of scientific and technical research, 24-25 Oct 1989, Besançon, France. Eds G.Alvan, L.P.Balant, P.R.Bechtel, A.R.Boobis, L.F.Gram, K.Pithan, Commission of the European Communities, Brussels, Belgium.
- 37- D.A.Smith. 1991. Species differences in metabolism and pharmacokinetics : are we close to an understanding ? *Drug Metabolism Reviews.* 23 (3&4): 355-373.
- 38- H.K.Jajoo, C.Prakash, R.F.Mayol, I.A.Blair. 1990. Enantioselective metabolism of encainide by rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 40 (4): 893-895.
- 39- A.S.Gross, G.Mikus, C.Fisher, R.Hertrampf, U.Gundert-Remy and M.Eichelbaum. 1989. Stereoselective disposition of flecainide in relation to the sparteine/debrisoquine metaboliser phenotype. *Br.J.Clin.Pharmac.* 28 : 555-566.
- 40- F.Jamali, R.Mehvar and F.M.Pasutto. 1989. Enantioselective aspects of drug action and disposition : therapeutic pitfalls. *J. Pharm. Sci.* 78 (9): 695-715.
- 41- C.Zekorn, G.Achtert, H.J.Hausleiter, C.H.Moon and M.Eichelbaum. 1985. Pharmacokinetics of N-propylajmaline in relation to polymorphic sparteine oxidation. *Klin.Wochenschr.* 63 : 1180-1186.
- 42- H.K.Kroemer, C.Fischer, C.O.Meese and M.Eichelbaum. 1991. Enantiomer/enantiomer interaction of (S)- and (R)-propafenone for cytochrome P450IID6-catalysed 5-hydroxylation : *in vitro* evaluation of the mechanism. *Mol. Pharmacol.* 40 : 135-142.
- 43- R.Mehvar. 1991. Apparent stereoselectivity in propafenone uptake by human and rat erythrocytes. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 12 : 299-310.
- 44- T.Ebner, C.O.Meese and M.Eichelbaum. 1991. Regioselectivity and stereoselectivity of the metabolism of the chiral quinolizidine alkaloids sparteine and pachycarpine in the rat. *Xenobiotica* 21 (7) 847-857.

- 45- M.Eichelbaum, L.Bertilsson, A.Küpfer, E.Steiner and C.O.Meese. 1988. Enantioselectivity of 4-hydroxylation in extensive and poor metabolizers of debrisoquine. *Br.J.Clin.Pharmac.* **25** : 505-508.
- 46- M-L. Dahl, C.Nordin & L.Bertilsson. 1991. Enantioselective hydroxylation of Nortriptyline in human liver microsomes, intestinal homogenate, and patients treated with Nortriptyline. *Ther. Drug Monitoring.* **13** (3): 189-194.
- 47- S.A.Weerawarna, S.M.Geisshüsler, S.S.Murthy and W.L.Nelson. 1991. Enantioselective and diastereoselective hydroxylation of bufuralol. Absolute configuration of the 7-(1-Hydroxyethyl)-2-[1-hydroxy-2-(tert-butylamino)ethyl] benzofurans, the benzylic hydroxylation metabolites. *J. Med. Chem.* **34** (10): 3091-3097.
- 48- S.S.Murthy, H.U.Shetty, W.L.Nelson, P.R.Jackson and M.S.Lennard. 1990. Enantioselective and diastereoselective aspects of the oxidative metabolism of metoprolol. *Biochem. Pharmacol.* **40** (7): 1637-1644.
- 49- S.V.Otton, E.M.J.Gillem, M.S.Lennard, G.T.Tucker & H.F.Woods. 1990. Propranolol oxidation by human liver microsomes - the use of cumene hydroperoxide to probe isoenzyme specificity and regio- and stereoselectivity. *Br.J.Clin.Pharmac.* **30** : 751-760.
- 50- J.M.Treluyer, E.Jacqz-Aigrain, F.Alvarez & T.Cresteil. 1991. Expression of CYP2D6 in developing human liver. *Eur. J.Biochem.* **202** : 583-588.
- 51- E.Steiner, L.Bertilsson, J.Säwe, I.Bertling, F.Sjöqvist. 1988. Polymorphic debrisoquine hydroxylation in 757 Swedish subjects. *Clin. Pharmac. Ther.* **44** : 431-435.
- 52- F.J.Gonzalez & U.A.Meyer. 1991. Molecular genetics of the debrisoquin-sparteine polymorphism. *Clin.Pharmacol.Ther.* **50** (3): 233-238; 1991.
- 53- F.Broly, A.Gaedigk, M.Heim, M.Eichelbaum, K.Morike & U.A.Meyer. 1991. Debrisoquine/sparteine hydroxylation genotype and phenotype : analysis of common mutations and alleles of CYP2D6 in a European population. *DNA Cell Biol.* **10** (8): 545-558.
- 54- M.Kagimoto, M.Heim, K.Kagimoto, T.Zeugin & U.A.Meyer. 1990. Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine. *J.Biol.Chem.* **265** (28): 17209-17214.
- 55- R.Tyndale, T.AOyama, F.Broly, T.Matsunaga, T.Inaba, W.Kalow, H.V.Gelboin, U.A.Meyer & F.J.Gonzalez. 1991. Identification of a new variant CYP2D6 allele lacking the codon encoding Lys-281 : possible association with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics* . **1** :26-32.
- 56- N.Müller, J.Brockmöller & I.Roots. 1991. Extremely long plasma half-life of amitriptyline in a woman with the cytochrome P450IID6 29/29-kilobase wild-type allele — a slowly reversible interaction with fluoxetine. *Ther.Drug Monitoring.* **13** : 533-536.

- 57- R.Ayesh, J.R.Idle, J.C.Ritchie, M.J.Crothers & M.R.Hetzel. 1984. Metabolic oxidation phenotypes as markers for susceptibility to lung cancer. *Nature*. **312** : 169-170.
- 58- N.Caporaso, R.B.Hayes, M.Dosemeci, R.Hoover, R.Ayesh, M.Hetzel & J.Idle. 1989. Lung cancer risk, occupational exposure, and the debrisoquine metabolic phenotype. *Cancer Res*. **49** : 3675-3679.
- 59- J.C.Duche, C.Joanne, J.Barre, H. de Crémoux, J.C.Dalphin, A.Depierre, P.Brochard, J.P.Tillement & P.Bechtel. 1991. Lack of a relationship between the polymorphism of debrisoquine oxidation and lung cancer. *Br.J.Clin.Pharmacol*. **31** : 533-536.
- 60- Y.Horsmans, J.P.Desager & C.Harvengt. 1991. Is there a link between debrisoquine oxidation phenotype and lung cancer susceptibility ? *Biomed. & Pharmacother*. **45** : 359-362.
- 61- W.Siegmund, J.D.Fengler, G.Franke, M.Zschiesche, O.Eike, E.Eike, P.Meisel & R.Wulkow. 1991. N-Acetylation and debrisoquine hydroxylation polymorphisms in patients with Gilbert's syndrome. *Br.J.Clin.Pharmacol*. **32** : 467-472.
- 62- D.Larrey, G.Babany, M.Tinel, E.Freneaux, G.Amouyal, F.Habersetzer, P.Letteron & D.Pessayre. 1989. Effect of liver disease on dextrometorphan oxidation capacity and phenotype : a study in 107 patients. *Br.J.Clin.Pharmacol*. **28** : 297-304.
- 63- M.Gueguen, A.M.Yamamoto, O.Bernard, F.Alvarez. 1989. Anti-liver kidney microsomes antibody type I recognises human cytochrome P450db1. *Biochem.Biophys.Res. Commun*. **159** : 542-547.
- 64- L.Bertilsson, C.Alm, C.de las Carreras, J.Widén, G.Edman, D.Schalling. 1989. Debrisoquine hydroxylation polymorphism and personality. *Lancet* **i**, 555.
- 65- M.R.Britto, H.E. McKean, G.G.Bruckner & P.J.Wedlund. 1991. Polymorphisms in oxidative drug metabolism : relationship to food preference. *Br.J.Clin.Pharmacol*. **32** : 235-237.
- 66- F.J.Gonzalez & D.W.Nebert. 1990. Evolution of the P450 gene superfamily : animal-plant warfare, molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet*. **6** (6) : 182-186.
- 67- T.D.Arias, L.F.Jorge and T.Inaba. 1986. No evidence for the presence of poor metabolizers of sparteine in an Amerindian group : the Cunas of Panama. *Br.J.Clin.Pharmacol*. **21** : 547-548.
- 68- T.D.Arias, L.F.Jorge, D.Lee, R.Barrantes and T.Inaba. 1988. The oxidative metabolism of sparteine in the Cuna Amerindians of Panama : absence of evidence for deficient metabolizers. *Clin.Pharmacol.Ther*. **43** : 456-465.
- 69- T.D.Arias, T.Inaba, R.G.Cooke and L.F.Jorge. 1988. A preliminary note on the transient polymorphic oxidation of sparteine in the Ngawbé Guaymi Amerindians : a case of genetic divergence with tentative phylogenetic time frame for the pathway. *Clin.Pharmacol.Ther*. **44** : 343-352.

- 70- D.R.Sohn, S-G. Shin, C-W. Park, M.Kusaka, K.Chiba and T.Ishizaki. 1991. Metoprolol oxidation polymorphism in a Korean population : comparison with native Japanese and Chinese populations. *Br.J.Clin.Pharmacol.* **32** : 504-507.
- 71- S.I.Islam, J.R.Idle and R.L.Smith. 1980. The polymorphic 4-hydroxylation of debrisoquine in a Saudi arab population. *Xenobiotica.* **10** (11): 819-825.
- 72- A.Mahgoub, J.R.Idle and R.L.Smith. 1979. A population and familial study of the defective alicyclic hydroxylation of debrisoquine among Egyptians. *Xenobiotica.* **9** (1):51-56.
- 73- A.O.Iyun, M.S.Lennard, G.T.Tucker, H.F.Woods. 1986. Metoprolol and debrisoquin metabolism in Nigerians : lack of evidence for polymorphic oxidation. *Clin.Pharmacol.Ther.* **40** : 387-394.
- 74- C.Mbanefo, E.A.Bababunmi, A.Mahgoub,T.P.Sloan,J.R.Idle and R.L.Smith. 1980. A study of the debrisoquine hydroxylation polymorphism in a Nigerian population. *Xenobiotica.* **10** (11): 811-818.
- 75- De K.Sommers, J.Moncrieff and J.C.Avenant. 1991. Absence of polymorphism of sparteine oxidation in the South African Venda. *Human and Experimental Toxicology.* **10** : 175-178.
- 76- De K.Sommers, J.Moncrieff and J. Avenant. 1989. Non-correlation between debrisoquine and metoprolol polymorphisms in the Venda. *Human Toxicology.* **8** : 365-368.
- 77- N.M.Woolhouse, M.Eichelbaum, N.S.Oates, J.R.Idle and R.L.Smith. 1985. Dissociation of co-regulatory control of debrisoquine / phenformin and sparteine oxidation in Ghanaians. *Clin.Pharmacol.Ther.* **37** : 512-521.
- 78- M.Eichelbaum and N.M.Woolhouse. 1985. Inter-ethnic difference in sparteine oxidation among Ghanaians and Germans. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* **28** : 79-83.
- 79- M.V.Relling, J.Cherrrie, M.J.Schell, W.P.Petros, W.H.Meyer and W.E.Evans. 1991. Lower prevalence of the debrisoquine oxidative poor metabolizer phenotype in American black versus white subjects. *Clin.Pharmacol.Ther.* **50** (3): 308-313.
- 80- A.Vinks, T.Inaba, S.V.Otton and W.Kalow. 1982. Sparteine metabolism in Canadian Caucasians. *Clin.Pharmacol.Ther.* **31** (1): 23-29.
- 81- G.F.Peart, J.Boutagy and G.M.Shenfield. 1986. Debrisoquine oxidation in an Australian population. *Br.J.Clin.Pharmacol.* **21** : 465-471.
- 82- G.Alvan, P.Bechtel, L.Iselius and U.Gundert-Remy. 1990. Hydroxylation polymorphisms of debrisoquine and mephenytoin in European populations. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* **39** : 533-537.
- 83- K.Clasen, L.Madsen, K.Brosen, K.Alboge, S.Misfeldt and L.F.Gram. 1991. Sparteine and mephenytoin oxidation : genetic polymorphisms in East and West Greenland. *Clin.Pharmacol.Ther.* **49** (6): 624-631.
- 84- K.Brosen. 1986. Sparteine oxidation polymorphism in Greenlanders living in Denmark. *Br.J.Clin.Pharmacol.* **22** : 415-419.



- 85- J.Kallio, R.Lindberg, R.Huupponen and E.Iisalo. 1988. Debrisoquine oxidation in a Finnish population : the effect of oral contraceptives on the metabolic ratio. *Br.J.Clin.Pharmacol.* **26** : 791-795.
- 86- P.Arvela, M.Kirjarinta, N.Karki and O.Pelkonen. 1988. Polymorphism of debrisoquine hydroxylation among Finns and Lapps. *Br.J.Clin.Pharmacol.* **26** : 601-603.

## **ARTICLE 1**

La mexilétine est un antiarythmique cardiaque possédant un index thérapeutique étroit et dont le comportement pharmacocinétique est soumis à de larges variations interindividuelles. L'activité antiarythmique de la mexilétine et sa toxicité sont liées à sa concentration plasmatique. Par conséquent, le maniement de ce médicament s'avère donc quelque peu délicat.

La mexilétine subit un métabolisme hépatique important dont les voies majeures sont l'hydroxylation aromatique et aliphatique conduisant à la formation respectivement de *p*-hydroxymexilétine (PHM) et d'hydroxyméthylmexilétine (HMM). La N-glucuronoconjugaison de la mexilétine est aussi une voie métabolique importante.

L'existence de variations interindividuelles du comportement pharmacocinétique de la mexilétine pouvait laisser penser à une relation avec un polymorphisme génétique d'oxydation des médicaments. Pour explorer cette hypothèse, des études préliminaires sur des microsomes de foies humains ont été entreprises. Elles ont permis de déterminer que le cytochrome P450IID6 catalysait de façon prédominante l'hydroxylation aromatique et aliphatique de la mexilétine. Ce cytochrome P450 est en effet responsable d'un des principaux polymorphismes génétiques d'oxydation des médicaments connu actuellement : le polymorphisme génétique de type débrisoquine/spartéine.

Dans ce premier article, la relation avec le polymorphisme de type débrisoquine a été explorée de façon plus approfondie:

- d'une part, *in vitro* sur les microsomes de 6 foies humains;
- d'autre part, *in vivo* chez 9 sujets sains représentant une large gamme de valeurs du rapport métabolique de la débrisoquine.

Les résultats obtenus *in vitro* ont permis de montrer une forte corrélation entre la formation de PHM et HMM et la composante de haute affinité de l'activité dextrométhorphan O-déméthylase, substrat du P450IID6.

Les résultats *in vivo* mettent en évidence de larges variations interindividuelles des concentrations urinaires de PHM et HMM qui sont plus faibles chez les métaboliseurs limités. Les rapports mexilétine/PHM et mexilétine/HMM sont fortement corrélés au rapport métabolique D/HD. De plus, après prétraitement par la mexilétine, ce rapport métabolique est augmenté chez les métaboliseurs extensifs mais pas chez les métaboliseurs limités.

Ces données permettent de conclure que les deux voies majeures d'hydroxylation de la mexilétine sont catalysées de façon prédominante par le cytochrome P450IID6 génétiquement variable, responsable du polymorphisme de type débrisoquine/spartéine. Les deux métabolites étudiés (PHM et HMM) représentent chez les métaboliseurs extensifs environ 40% de la dose administrée. Le polymorphisme génétique de ces deux voies métaboliques contribue donc probablement de façon importante aux variations interindividuelles de la disposition de la mexilétine.

# The metabolism of mexiletine in relation to the debrisoquine/sparteine-type polymorphism of drug oxidation

F. BROLY<sup>1</sup>, N. VANDAMME<sup>2</sup>, C. LIBERSA<sup>1</sup> & M. LHERMITTE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine de Lille, 1 Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, <sup>2</sup>Laboratoire de Biochimie du département de Biochimie, Hôpital Calmette, rue du Pr. J. Leclercq, 59045 Lille Cedex and <sup>3</sup>Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie de Lille, 59045 Lille Cedex and Laboratoire de Biochimie du département de Biochimie, Hôpital Calmette, rue du Pr. J. Leclercq, 59045 Lille Cedex, France

- 1 The relationship between the metabolism of the antiarrhythmic drug mexiletine and the debrisoquine/sparteine-type polymorphism was studied *in vitro*, using microsomes from six human livers, and *in vivo*, in nine healthy drug-free volunteers with wide variation in their ability to hydroxylate debrisoquine.
- 2 There was a strong and similar correlation between the formation rate of both major mexiletine metabolites, *p*-hydroxymexiletine (PHM) and hydroxymethylmexiletine (HMM), and the high affinity component of dextromethorphan *O*-demethylase activity in human liver microsomes ( $r_s = 0.94$ ;  $P < 0.01$ ).
- 3 There were marked interindividual differences in the amounts of PHM and HMM excreted in the urine over 48 h after a single 200 mg oral dose of mexiletine hydrochloride. Recoveries of both metabolites were correlated inversely with the debrisoquine/4-hydroxydebrisoquine (D/HD) urinary metabolic ratio ( $r_s = -0.83$ ;  $P = 0.006$  and  $r_s = -0.85$ ;  $P = 0.004$ , respectively) and were lower in poor metabolisers of debrisoquine (PM) than in extensive metabolisers (EM). Moreover, PM had the highest values of mexiletine/PHM and mexiletine/HMM urinary ratios. In addition, there was a strong correlation between these two indices of mexiletine hydroxylation and the D/HD metabolic ratios ( $r_s = 0.92$ ;  $P = 0.001$  and  $r_s = 0.90$ ;  $P = 0.001$ , respectively).
- 4 After mexiletine pretreatment, the values for D/HD ratio were significantly increased in EM while corresponding values in PM were similar.
- 5 These findings are in accordance with previous *in vitro* data suggesting that PHM and HMM formation is predominantly catalyzed by the genetically variable human liver cytochrome P450IID6 isoenzyme responsible for the debrisoquine/sparteine-type polymorphism of drug oxidation.
- 6 It is concluded that two major routes of mexiletine metabolism are closely related to debrisoquine hydroxylation capacity. Therefore, impairment of these pathways may be anticipated in subjects of PM phenotype for debrisoquine.

**Keywords** mexiletine metabolism drug oxidation  
debrisoquine/sparteine-type polymorphism genetic polymorphism

## Introduction

Mexiletine is a type 1B agent for the treatment and prophylaxis of ventricular arrhythmias. It can be given intravenously for the control of acute arrhythmias such as those complicating myocardial infarction and it is also

given orally over long period to patients with chronic ventricular arrhythmias (Talbot *et al.*, 1973, 1976).

The therapeutic index of mexiletine is narrow and both its antiarrhythmic activity and toxicity are correlated

with its plasma concentration (Campbell *et al.*, 1978a; Peyrieux *et al.*, 1987). However, numerous studies have shown that, following all routes of administration, there is pronounced interindividual variation in mexiletine kinetics (Beckett & Chidomere, 1977a; Campbell *et al.*, 1978a; Häselbarth *et al.*, 1981; Johnston *et al.*, 1982; Kaye *et al.*, 1977; Prescott *et al.*, 1977). Thus, the relationship between the dose and the plasma concentration of mexiletine is difficult to predict in an individual. Therefore, monitoring of the plasma drug concentration and, in some cases, adjustment of the dose may be required to ensure efficacy and safety.

Mexiletine is eliminated by both renal excretion of the unchanged compound and extensive hepatic metabolism (Beckett & Chidomere, 1977a; Gillis & Kates, 1984; Grech-Bélanger *et al.*, 1985; Häselbarth *et al.*, 1981; Prescott *et al.*, 1977; Scott *et al.*, 1973). The major metabolic routes are aromatic hydroxylation, forming *p*-hydroxymexiletine (PHM), and aliphatic hydroxylation, forming hydroxymethylmexiletine (HMM) (Beckett & Chidomere, 1977a; Scott *et al.*, 1973). These metabolites, which do not seem to possess significant antiarrhythmic activity (Gillis & Kates, 1984; Pentikainen *et al.*, 1982; Woosley *et al.*, 1984) are partially or totally excreted in urine as conjugates (Beckett & Chidomere, 1977a; Scott *et al.*, 1973). Conjugation of mexiletine with glucuronic acid to form an *N*-glucuronide (MGC) is also a major pathway of elimination (Beckett & Chidomere, 1977a; Grech-Bélanger *et al.*, 1985; Prescott *et al.*, 1977; Scott *et al.*, 1973). Previous *in vitro* studies with human liver (Broly *et al.*, 1990a,b) indicated that the hydroxylation of mexiletine to PHM and HMM is predominantly catalyzed by cytochrome P450IID6 which is responsible for the debrisoquine/sparteine-type polymorphism of drug oxidation (Gonzalez *et al.*, 1988). Therefore, a polymorphism of two major metabolic pathways of mexiletine was suggested.

We now report the results of *in vitro* and *in vivo* studies of the relationship between mexiletine metabolism and the debrisoquine/sparteine-type polymorphism in man.

## Methods

### Chemicals and reagents

Mexiletine (hydrochloride) [racemic 1-(2', 6'-dimethylphenoxy) - 2-aminopropane], its metabolites, hydroxymethylmexiletine (Kö 2259, oxalate) [1-(2'-hydroxymethyl-6'-methylphenoxy) - 2-aminopropane], *p*-hydroxymexiletine (Kö 2127, hydrochloride) [1-(4'-hydroxy-2', 6'-dimethylphenoxy) - 2-aminopropane], as well as the internal standards [Kö 1307, hydrochloride (1-(2', 4', 6'-trimethylphenoxy)-2-aminopropane) and Kö 5271, oxalate (1-(2'-hydroxymethyl-4', 6'-dimethylphenoxy) - 2-aminopropane)] were obtained from Boehringer Ingelheim (Reims, France).  $\beta$ -glucuronidase/aryl-sulphatase from *Helix pomatia* (type HP-2) was purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). All organic solvents and other chemicals were analytical-reagent grade.

### In vitro studies

Histologically normal human liver samples were obtained from patients shortly after circulatory arrest. Approval of the University Ethics Committee was obtained to use such tissues for drug metabolism studies. Microsomal fractions were prepared by differential ultracentrifugation as described previously (Broly *et al.*, 1989) and stored at  $-80^{\circ}$  C until use. To ensure that these fractions reflect the drug metabolizing capacity of non-diseased livers, they were characterized by electron microscopy, by the measurement of the specific activity of enzyme markers, and by cytochrome  $b_5$  and cytochrome P450 content (unpublished data, F. Broly). Protein concentration (Lowry *et al.*, 1951), dextromethorphan *O*-demethylase activity (Broly *et al.*, 1990b), and HMM and PHM formation (Broly *et al.*, 1990a) were determined by previously published methods. Dextromethorphan *O*-demethylation exhibits biphasic kinetics with a high and low affinity component of activity (Broly *et al.*, 1989; Kronbach *et al.*, 1987). The kinetic parameters of both components were estimated assuming two independent enzymatic activities for dextromethorphan *O*-demethylation and using an iterative method for non-linear regression analysis (Broly *et al.*, 1989). Kinetic parameters for PHM and HMM formation were determined as described previously (Broly *et al.*, 1990a). The formation rates of PHM and HMM were compared with the activity of both components of dextromethorphan *O*-demethylase.

### In vivo studies

Nine healthy drug-free volunteers (two females, seven males) were selected on the basis of their debrisoquine oxidation phenotype. They gave their written informed consent to participate in the study, which was approved by the University Ethics Committee. Their average age was  $31.6 \pm 4.8$  years ( $\pm$  s.d.), with an average body weight of  $69.1 \pm 15.2$  kg and an average height  $1.78 \pm 0.08$  m. No subjects showed clinical signs of cardiac, liver or renal function impairment. Seven were EM and two PM of debrisoquine. The study was performed in three phases, each separated by at least 2 weeks.

In the first phase, each subject received a single oral dose of 200 mg mexiletine hydrochloride (one capsule of Mexitil, Boehringer Ingleheim, Reims, France) corresponding to 930  $\mu$ mol mexiletine base, after an overnight fast. Blood pressure, heart rate and ECG were monitored over the first 4 h after administration. No solid food was allowed during the subsequent 3 h. Urine was collected in fractions for 48 h. Volume and pH of urine were recorded immediately after each micturition. Aliquots of each fraction were stored at  $-20^{\circ}$  C until analyzed. The concentrations of unchanged mexiletine, unconjugated HMM and unconjugated PHM as well as the concentration of total (unconjugated plus conjugated) mexiletine, total HMM and total PHM were measured in each urine sample.

For the analysis of HMM and PHM excreted as the unconjugated form in urine, 100  $\mu$ l urine was diluted with 100  $\mu$ l borate buffer (pH 13.0). After the addition of 100  $\mu$ l Kö 5271 solution (10  $\mu$ g ml $^{-1}$  in

water) as internal standard, the mixture was extracted twice with 5 ml of diisopropylether containing 20% v/v dichloromethane. The combined organic layers were removed and taken to dryness under nitrogen at 45° C. Each residue was resuspended in 100 µl of mobile phase solvent for high performance liquid chromatographic (h.p.l.c.) analysis. Both metabolites were measured by h.p.l.c. with fluorescence detection as described previously (Broly *et al.*, 1990a) with minor modifications. Briefly, an HP liquid chromatograph 1090 equipped with an automatic injector connected to a HP 85 b computer (Hewlett-Packard, Orsay, France), an Ifelec T5C recorder (Courbevoie, France) and a Shimadzu fluorescence h.p.l.c. monitor RF 530 (Kyoto, Japan) was used. The mobile phase composition was 5% v/v methanol and 10% v/v acetonitrile in phosphate buffer (0.01 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 4.2).

The flow rate was 0.75 ml min<sup>-1</sup> from 0 to 7.5 min, increased slowly to 1.5 ml min<sup>-1</sup> at 9.5 min, then decreased at 17 min and was 0.75 ml min<sup>-1</sup> at 18 min. Detection was at excitation and emission wavelengths of 270 nm and 312 nm, respectively. Sample volumes (25 µl) were injected onto a reverse phase XL 3 µm ODS column (4.6 × 7.5 mm i.d.) (Beckman, Gagny, France). These conditions resulted in retention times of 2.8, 5.5 and 10.7 min for PHM, HMM and internal standard, respectively.

Unchanged mexiletine excreted in urine was measured as described above except that the borate buffer was pH 10.0, the concentration of the internal standard solution was 3 µg ml<sup>-1</sup>, the acetonitrile fraction of the mobile phase was 20%, and the flow rate was 0.75 ml min<sup>-1</sup> from 0 to the end of analysis at 11 min. Under these conditions, the retention times of internal standard and mexiletine were 4.2 and 7.5 min, respectively.

Mexiletine, HMM and PHM are eliminated in urine as conjugates (Beckett & Chidomere, 1977a; Grech-Bélanger *et al.*, 1985; Scott *et al.*, 1973). Therefore, total urinary concentrations of these compounds were determined after enzymatic hydrolysis of urine samples. To 1 ml of urine diluted in 1 ml acetate buffer (0.1 M, pH 5.0), 20 µl (2000 Fishman units) of β-glucuronidase/aryl-sulphatase was added. Incubation was performed in capped tubes at 37° C for 24 h in a shaking water bath, conditions shown to produce complete cleavage of the conjugation products.

To determine the total urinary concentration of HMM and PHM, 100 µl of mixture was assayed as described for the analysis of unchanged HMM and unchanged PHM except that the concentration of aqueous internal standard solution was 100 µg ml<sup>-1</sup>.

Endogenous products after enzymatic hydrolysis interfered with mexiletine analysis under the above h.p.l.c. conditions. Therefore, total urinary concentration of mexiletine was determined after derivatization with acetylacetone by a modification of a previously described gas-liquid chromatography (g.l.c.) method (Beckett & Chidomere, 1977b). 500 µl of mixture was incubated for 16 h in a water bath at 50° C with saturated borate buffer pH 10 (500 µl), methanol (500 µl), acetylacetone (500 µl) and 100 µl of an aqueous solution of Kö1307 (100 µg ml<sup>-1</sup>) as internal standard. The reaction mixture was then extracted with diethyl ether (5 ml) and the aqueous

layer was discarded. Mexiletine and Kö1307 derivatives were then back-extracted into hydrochloric acid (250 µl, 4 M). Sodium hydroxide (400 µl, 4 M) was added and the derivatives were finally extracted into 50 µl cyclohexane containing 5% v/v isoamyl alcohol. After centrifuging to separate the organic layer, 2 µl of the extracts were analyzed. A Hewlett-Packard Model 1084b gas chromatograph equipped with a flame ionization detector was used. The glass column (100 × 2 mm i.d.) was packed with Carbowax 20 M (5%) on Chromosorb W-AW DMCS, 80–100 mesh (Hewlett-Packard, Les Ulis, France). The carrier gas was nitrogen at a flow-rate of 50 ml min<sup>-1</sup>, the hydrogen flow-rate was 45 ml min<sup>-1</sup>, and the air flow-rate was 150 ml min<sup>-1</sup>. The temperature of the column was maintained at 200° C and the injection port and detector temperatures at 250° C. Under these conditions, the retention times of mexiletine and internal standard derivatives were 2.8 and 3.9 min, respectively.

All of the h.p.l.c. and g.l.c. procedures described above involved control analyses of blank urine samples which were collected from the subjects immediately before the administration of mexiletine. Identification of measured compounds was confirmed by h.p.l.c.-mass spectroscopy and g.l.c.-mass spectroscopy (unpublished results). Calibration curves were constructed with blank urine spiked with the reference compounds and processed as described for the samples. Concentrations of mexiletine and its metabolites used were those found in urine after oral administration of mexiletine (Analysis for the unconjugated products: HMM, 5–100 nmol ml<sup>-1</sup>; PHM, 1–15 nmol ml<sup>-1</sup>; mexiletine, 10–150 nmol ml<sup>-1</sup>. Analysis for unconjugated products: HMM, 10–150 nmol ml<sup>-1</sup>; PHM, 10–150 nmol ml<sup>-1</sup>; mexiletine, 30–500 nmol ml<sup>-1</sup>). The inter- and intra-day coefficients of variation did not exceed 10% for any standard in the above concentration ranges. The lower limits of detection of the assays with a signal to noise ratio of 4:1 were 0.35 nmol ml<sup>-1</sup> for free and total HMM, 0.08 nmol ml<sup>-1</sup> for free and total PHM, 5 nmol ml<sup>-1</sup> for unchanged mexiletine and 4 nmol ml<sup>-1</sup> for total mexiletine.

The amounts of mexiletine and its metabolites eliminated as glucuronide conjugates in urine were estimated by subtracting the amount of each compound eliminated from the respective amount obtained after enzymatic hydrolysis of the urine samples.

Detailed plasma mexiletine kinetics were studied in three subjects with different patterns of metabolism: two were EM (one smoker and the other non-smoker); one was a PM of debrisoquine (smoker). Blood (10 ml) for mexiletine estimation was drawn from an indwelling cannula immediately before dosing and at 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15 and 24 h thereafter. Blood samples were spun immediately and plasma was stored at -20° C until assay. Mexiletine in plasma was assayed by h.p.l.c. with fluorescence detection after derivatization with fluorescamine (Andarelli *et al.*, 1982). The minimum measurable concentration was 1 ng ml<sup>-1</sup> and the inter- and intra-day coefficients of variation were < 5.2%.

In the second phase of the study, the debrisoquine hydroxylation phenotype of the subjects was determined by measuring debrisoquine (D) and 4-hydroxydebrisoquine (HD) in an 8 h urine sample collected following a 10 mg single oral dose of debrisoquine (Lennard *et al.*,

1977). The D/HD ratio was calculated and the subjects were phenotyped as extensive metaboliser (EM) or poor metaboliser (PM) of debrisoquine based on ratios of less or greater than 12.6, respectively (Evans *et al.*, 1980).

In the third phase, the phenotype testing was repeated exactly as above but subjects received a single oral dose of 200 mg mexiletine hydrochloride, one hour before the administration of debrisoquine. To assess the effect of mexiletine on debrisoquine 4-hydroxylation, D/HD urinary ratios obtained without and after mexiletine pretreatment were compared.

#### Data analysis

The apparent first-order elimination rate constant ( $\lambda_z$ ) was determined by linear regression analysis of the slope of the terminal phase of the log plasma drug concentration-time curve. The terminal elimination half-life ( $t_{1/2,z}$ ) was calculated from the relationship  $0.693/\lambda_z$ . The plasma AUC was calculated by the linear trapezoidal rule with extrapolation to infinity. Total clearance (CL) was calculated from:  $\text{Dose} \cdot F/\text{AUC}$ , where  $F$  was assumed to be 0.88 (Campbell *et al.*, 1978b; Häselbarth *et al.*, 1981; Prescott *et al.*, 1977). Mexiletine renal clearance ( $\text{CL}_R$ ) was calculated from the urinary recovery of mexiletine from 0 to 24 h/AUC. Based on the assumption that mexiletine is eliminated solely by renal and metabolic pathways, metabolic clearance ( $\text{CL}_m$ ) was estimated by subtracting the value of  $\text{CL}_R$  from CL. The rate of formation of each metabolite was obtained by dividing the y-intercept of the terminal linear portion of a plot of the log urinary excretion rate of the metabolite against time by the administered dose multiplied by  $F$  (Penno *et al.*, 1981).

Relationships between variables were assessed by the Spearman rank correlation coefficient ( $r_s$ ). A  $P$  value of less than 0.05 was considered significant. Mean data are presented  $\pm$  s.d.

## Results

### In vitro studies

The activity of the two components of dextromethorphan *O*-demethylase activity and the rate of formation of both major hydroxylated metabolites from mexiletine were determined in microsomal preparations from six human livers. Formation rates of both PHM and of HMM showed a highly significant correlation with the high affinity component of dextromethorphan *O*-demethylase activity, as shown by the values of  $V_{\max}$  ( $r_s = 0.94$ ;  $P < 0.01$ ; Figure 1), but there was no correlation with the low affinity component of this activity.

### In vivo studies

Individual 48 h urinary recoveries (% of dose) of unchanged mexiletine as well as of its three major metabolites following an oral dose of mexiletine hydrochloride are listed in Table 1. PHM and HMM values represent the totals of unconjugated and conjugated compounds.

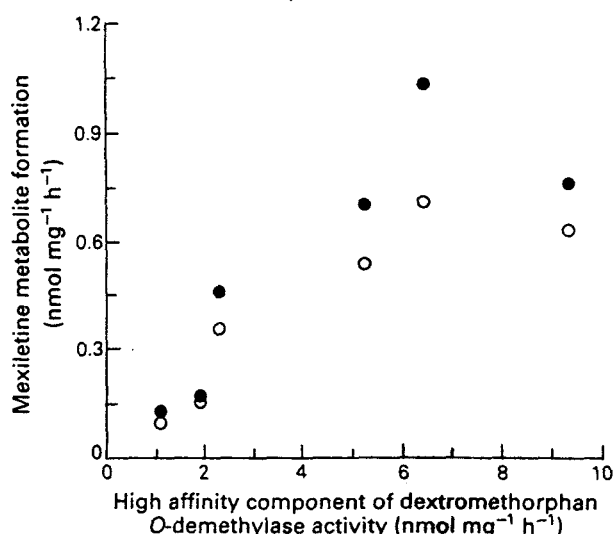


Figure 1 Relationship between the high affinity component of dextromethorphan *O*-demethylase activity and the formation rates of hydroxymethylmexiletine (○) and *p*-hydroxymexiletine (●) from mexiletine in human liver microsomes. ( $r_s = 0.94$  ( $P = 0.006$ ) and  $r_s = 0.94$  ( $P = 0.006$ ), respectively.)

Means of  $97.5 \pm 1.2\%$  and  $41.2 \pm 12.7\%$  of these metabolites were excreted as conjugate, respectively.

There were consistent inter-subject variations in the excretion of unchanged mexiletine, PHM, HMM, and to a lesser extent of MGC (Table 1) with coefficients of variation of 58.5, 51.7, 41.3 and 29.7%, respectively. The two hydroxylated metabolites, PHM ( $25.3 \pm 13.1\%$ ) and HMM ( $11.6 \pm 3.9\%$ ), accounted for a major part of the dose (36.9%) while recoveries of mexiletine and MGC were  $9.4 \pm 5.5\%$  and  $13.1 \pm 3.9\%$  of the dose, respectively.

Values for ratios constructed from the recoveries of mexiletine and its metabolites are listed in Table 2. Considerable inter-subject variation was observed in mexiletine/PHM and mexiletine/HMM ratios. Corresponding values for coefficients of variation were 126% and 112%, respectively. Moreover, the ratios between mexiletine and PHM and between mexiletine and HMM were highly correlated ( $r_s = 0.98$ ;  $P < 0.001$ ).

Seven subjects were of the EM phenotype and two were PM of debrisoquine (Table 1). Values of individual D/HD metabolic ratio are listed in Table 2. The phenotype of the subjects was taken into account in analysing the results. Representative cumulative urinary excretion patterns of mexiletine and its metabolites for one EM (no 2) and one PM subject (no 9) are shown in Figure 2. Values of the amounts of PHM and HMM excreted in the urine were much lower in PM than in EM subjects (Table 1) and correlated inversely with the D/HD ratio ( $r_s = -0.83$ ;  $P = 0.006$  and  $r_s = -0.85$ ;  $P = 0.004$ , respectively). In contrast, values of the amount of unchanged mexiletine were higher in PM than in EM subjects (Table 1) and correlated positively with the D/HD ratio ( $r_s = 0.90$ ;  $P = 0.001$ ). In addition, the amount of unchanged mexiletine corresponded inversely with the amount of PHM and HMM ( $r_s = -0.91$ ;  $P = 0.001$  and  $r_s = -0.77$ ;  $P = 0.01$ , respectively). Moreover, the

**Table 1** Urinary recovery over 48 h of mexiletine and its three major metabolites after a single oral dose of 200 mg mexiletine hydrochloride in healthy subjects. Values are expressed as % of the dose

Subjects	Mexiletine	PHM	HMM	MGC	Sum
1* EM	4.6	48.1	18.3	9.1	80.2
2 EM	5.9	23.7	13.6	13.5	56.9
3 EM	2.3	37.2	13.1	14.4	66.9
4* EM	4.9	29.8	14.5	13.4	62.5
5 EM	7.8	28.1	15.6	11.2	62.7
6* EM	11.7	26.1	11.2	11.3	60.3
7 EM	14.0	19.4	9.6	14.1	57.0
8 PM	18.6	9.8	4.7	9.0	42.2
9* PM	14.8	5.5	4.0	22.0	46.3
Mean ± s.d.	9.4 ± 5.5	25.3 ± 13.1	11.6 ± 4.8	13.1 ± 3.9	59.5 ± 11.0
Mean ± s.d., EM	7.3 ± 4.2	30.3 ± 9.5	13.7 ± 2.8	12.4 ± 1.9	63.7 ± 7.9
Mean ± s.d., PM	16.7 ± 2.7	7.6 ± 3.0	4.4 ± 0.5	15.5 ± 9.1	44.2 ± 2.9

\*Smokers; EM, extensive metabolisers of debrisoquine; PM, poor metabolisers of debrisoquine; PHM, *p*-hydroxymexiletine; HMM, hydroxymethylmexiletine; MGC, mexiletine *N*-glucuronide conjugate.

**Table 2** Debrisoquine metabolic ratio and urinary recovery ratios of mexiletine and metabolites

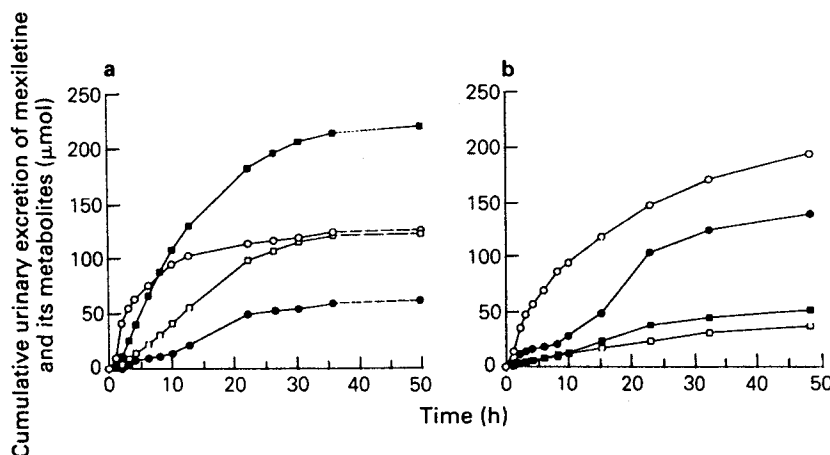
Subjects	D/HD	Mex/PHM	Mex/HMM	Mex/MGC
	0.14	0.10	0.25	0.51
	0.27	0.25	0.43	0.44
	0.43	0.06	0.17	0.16
	0.55	0.16	0.34	0.36
	0.66	0.28	0.50	0.70
	0.93	0.44	1.04	1.04
	1.20	0.72	1.46	0.99
	66.7	1.90	3.92	2.05
	87.4	2.69	3.70	0.67

D/HD, debrisoquine metabolic ratio; Mex, mexiletine; PHM, *p*-hydroxymexiletine; HMM, hydroxymethylmexiletine; MGC, mexiletine *N*-glucuronide conjugate.

amount of MGC accounted for the major part of the dose in PM and was slightly higher than that found in EM, but did not correlate with the D/HD ratio. Finally the sum of the 48 h urinary excretion of mexiletine and its metabolites was reduced by 30% in PM subjects.

The urinary ratios of mexiletine and its metabolites were compared with the D/HD ratio (Figure 3). There were strong correlations between the two indices of mexiletine hydroxylation and the D/HD metabolic ratios ( $r_s = 0.92$ ;  $P = 0.001$  and  $r_s = 0.90$ ;  $P = 0.001$  for mexiletine/PHM and mexiletine/HMM ratios, respectively). It should be noted that the mexiletine/HMM and mexiletine/PHM ratios clearly separated the rapid and slow hydroxylation phenotypes of debrisoquine. In addition, the two PM had the highest mexiletine/PHM and mexiletine/HMM ratios (Table 2).

Inter-individual variability in mexiletine disposition was evaluated for three subjects. Two of them were EM ([no 2 (non-smoker) and no 6 (smoker)]) and one was a PM (smoker) (no 9). The results are listed in Table 3. As expected from the urinary data, the formation rate constants of PHM and HMM were much lower in PM than in EM, whereas the formation rate constant of MGC was slightly higher. Moreover, the plasma concentrations of mexiletine were higher in the PM than in the EM throughout the 24 h study period. The mean AUC value was more than two-fold higher in the PM and the



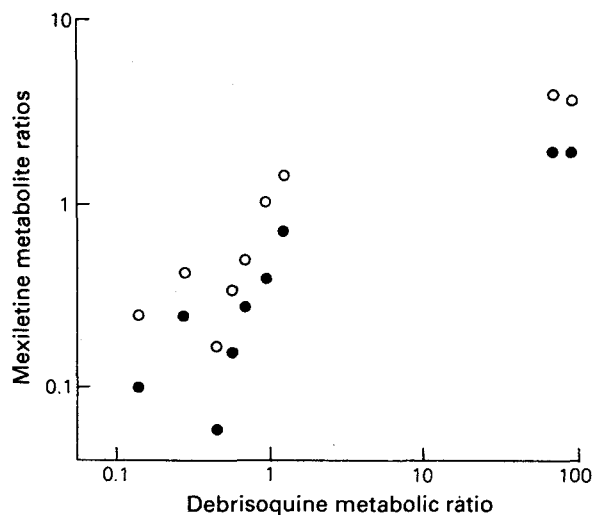
**Figure 2** Representative cumulative urinary excretion profile of mexiletine (●) and its three major metabolites, *p*-hydroxymexiletine (■), hydroxymethylmexiletine (□) and mexiletine *N*-glucuronide conjugate (○) in (a) a debrisoquine extensive metaboliser (subject no 2) and (b) a poor metaboliser (subject no 9) after oral administration of 200 mg mexiletine hydrochloride (930 µmol mexiletine base).



$t_{1/2}$  was longer than in EM. Total clearance was lower in PM than in EM as was metabolic clearance.

The effects of smoking (more than 10 cigarettes/day) on mexiletine hydroxylation were investigated. No significant differences in the urinary recoveries of either hydroxylated metabolite nor of mexiletine metabolic ratios were found between the smokers (including three EM and one PM) and the nonsmokers (including four EM and one PM) (Table 1). In addition, the formation rate constants of PHM and HMM were (i) similar within an individual, (ii) higher for the nonsmoking EM<sub>2</sub> subject than for the smoking EM<sub>6</sub> subject.

Pretreatment with mexiletine resulted in a significant change in D/HD ratios (Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test  $n = 8$ ;  $P = 0.006$ ) (Figure 4). Mean D/HD ratio in the EM subjects was increased by over two-fold after mexiletine pretreatment as compared with debrisoquine alone (from  $0.65 \pm 0.37$  to  $1.47 \pm 0.87$ ), while it was similar for PM subjects (from  $80.0 \pm 13.3$  to  $77.1 \pm 14.6$ ). Moreover, the individual debrisoquine ratios obtained without mexiletine correlated strongly with the corresponding values after mexiletine pretreatment ( $r_s = 0.97$ ;  $P < 0.001$ ).

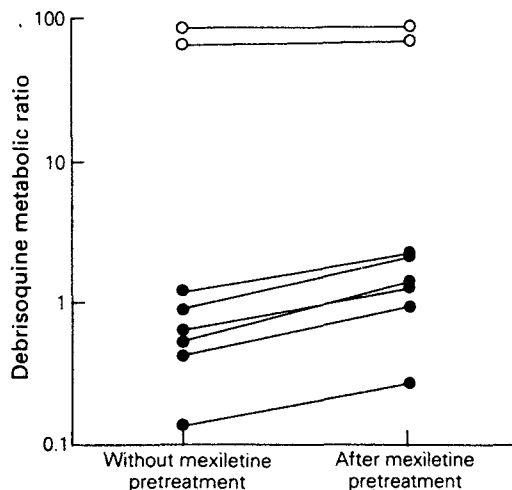


**Figure 3** Relationship between urinary debrisoquine/4-hydroxydebrisoquine and mexiletine/*p*-hydroxymexiletine ratios (●), and between urinary debrisoquine/4-hydroxydebrisoquine and mexiletine/hydroxymethylmexiletine ratios (○). ( $r_s = 0.92$  ( $P = 0.001$ ) and  $r_s = 0.90$  ( $P = 0.001$ ), respectively.)

**Discussion**

Previous studies of mexiletine biotransformation have shown that the formation of PHM and HMM is catalyzed predominantly by the genetically variable cytochrome P450IID6 system in human liver microsomes (Broly *et al.*, 1990a,b). A relationship between this polymorphism and mexiletine metabolism was therefore suggested. Dextromethorphan *O*-demethylation has been used as a prototype marker of P450IID6 activity (Küpfer *et al.*, 1986), since a high affinity enzymatic component of the reaction parallels debrisoquine 4-hydroxylation (Broly *et al.*, 1989; Kronbach *et al.*, 1987). The kinetics and Michaelis-Menten parameters of dextromethorphan *O*-demethylation and the formation of both of the mexiletine metabolites studied are in agreement with earlier *in vitro* data (Broly *et al.*, 1989, 1990a; Kronbach *et al.*, 1987). The close correlation between rate of mexiletine hydroxylation to PHM and HMM and the capacity of the high affinity component of dextromethorphan *O*-demethylase provides additional support for the hypothesis derived from *in vitro* studies.

Our present urinary results following mexiletine administration agree with previously reported data. Moreover, they indicate that the ability to hydroxylate



**Figure 4** Debrisoquine metabolic ratio before and after mexiletine pretreatment in extensive hydroxylators (●) and poor hydroxylators (○) of debrisoquine. (Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test  $n = 8$ ;  $P = 0.006$ .)

**Table 3** Pharmacokinetic parameters deciding the fate of mexiletine after oral administration of 200 mg mexiletine hydrochloride to two debrisoquine EM subjects and a single PM subject

$t_{max}$ (min)	$C_{max}$ (ng $ml^{-1}$ )	C (24 h) (ng $ml^{-1}$ )	AUC (ng $ml^{-1} h$ )	$t_{1/2,z}$ (h)	V ( $l kg^{-1}$ )	Ae (24) (%)	CL ( $ml min^{-1}$ $kg^{-1}$ )	$CL_m$ ( $ml min^{-1}$ $kg^{-1}$ )	Formation rate constant of metabolites			
									PHM ( $h^{-1}$ $\times 10^2$ )	HMM ( $h^{-1}$ $\times 10^2$ )	MGC ( $h^{-1}$ $\times 10^2$ )	
EM <sub>2</sub>	120	398	47	4148	7.6	4.9	5.8	7.5	7.02	2.32	1.94	1.17
EM <sub>6</sub>	120	250	41	3530	7.0	4.9	9.9	8.2	7.23	1.40	1.45	1.03
PM <sub>9</sub>	180	608	128	8925	10.8	4.7	11.5	4.8	3.95	0.14	0.14	1.68

$t_{max}$ , time to maximum plasma concentration;  $C_{max}$ , maximum plasma concentration; C(24 h), plasma concentration at 24 h; Ae (24), 24 h urinary recovery (% dose); CL, total body clearance;  $CL_m$ , metabolic clearance; PHM, *p*-hydroxymexiletine; HMM, hydroxymethylmexiletine; MGC, mexiletine *N*-glucuronide conjugate.

mexiletine to HMM and to PHM exhibits considerable interindividual variability and that both are closely linked *in vivo*, as previously suggested by *in vitro* studies (Broly *et al.*, 1990a,b). In addition, they appear to be closely related to debrisoquine hydroxylation capacity.

Conjugation of PHM and HMM has been reported (Beckett & Chidomere, 1977a; Scott *et al.*, 1973) but has never been quantified. HMM is excreted largely in the non-conjugated form, P-M is almost completely excreted as the conjugate. We have found that the correlations between D/HD ratio and mexiletine/PHM or mexiletine/HMM ratio are similar as are the correlations between D/HD ratio and the amount of PHM or HMM excreted in urine.

A common form of cytochrome P450 catalyzes the formation of HMM and PHM. In previous *in vivo* human volunteer studies, Grech-Bélanger *et al.* (1985) indicated, that the formation of these metabolites are differentially affected by cigarette smoking, suggesting that they are catalyzed by different isoenzymes of cytochrome P450. HMM was selectively induced by cigarette smoking. The discrepancy between these data and our previous *in vitro* results has already been discussed (Broly *et al.*, 1990b). The *in vivo* involvement of an additional isoenzyme to P450IID6 in the formation of HMM was suggested.

Our study was not designed to assess any effect of smoking on hydroxylation processes. Although the numbers of smoking and nonsmoking subjects were small, no significant difference was found between the two groups in the amount of either metabolite excreted in urine or in mexiletine metabolic ratios. The smoking habit did not appear to influence the formation rate of the metabolites. Our present findings are in accordance with the previous *in vitro* results (Broly *et al.*, 1990a;b) as well as with the absence of significant correlation between debrisoquine hydroxylation capacity and smoking habits already reported by Steiner *et al.* (1985) and Kahn *et al.* (1985). The low detectable excretion of PHM and HMM in both PM subjects indicates that P450IID6 is predominantly, but not the sole isoenzyme mediating the formation of these metabolites.

Polymorphic debrisoquine hydroxylation reflects the activity of P450IID6. As the urinary D/HD was increased in EM when the debrisoquine phenotype test was per-

formed after pretreatment, this finding suggests that *in vivo* mexiletine inhibits the activity of P450IID6, as previously reported *in vitro* for other P450IID6 reactions (Broly *et al.*, 1990b; Inaba *et al.*, 1985; Otton *et al.*, 1984). This phenomenon should be considered when phenotyping subjects during mexiletine treatment.

All of the present *in vitro* and *in vivo* findings are in agreement. The PM phenotype for debrisoquine hydroxylation is an impaired ability to carry out two of the primary routes of mexiletine metabolism (aromatic and aliphatic hydroxylation), as shown by the values of formation rate constants of PHM and HMM in PM subjects. This has been shown for several other drugs (Dayer *et al.*, 1984; Samir *et al.*, 1985). There is an apparent discrepancy between the results of the *in vivo* inhibition studies and those *in vitro*. Given the likely concentration of mexiletine *in vivo*, it would appear to be a more potent inhibitor than its  $K_m$  value would suggest.

If the main metabolic route of a drug is subject to polymorphism, high levels of the drug may be expected after standard doses in the minority of patients with low metabolic capacity. PHM and HMM are major urinary metabolites of mexiletine, accounting for 44% of the dose in EM subjects. Therefore, when these oxidation pathways are impaired this should exert an appreciable influence on the kinetics of the parent drug. As a consequence, the recovery of mexiletine is greater in the urine of PM subjects, as is that of MGC. The high plasma mexiletine concentrations in PM, with a resultant two-fold increase in total AUC relative to EM subjects, may be due to the impaired ability to form PHM and HMM. The other metabolic pathways were not investigated. Polymorphism in both major metabolic pathways of mexiletine will contribute to large interindividual differences in mexiletine disposition (Beckett & Chidomere, 1977a; Campbell *et al.*, 1978a; Häselbarth *et al.*, 1981; Johnston *et al.*, 1982; Kaye *et al.*, 1977; Prescott *et al.*, 1977). This may have clinical implications because of the correlation between the effect and toxicity of mexiletine and its plasma concentration.

This work was supported in part from 'Fondation pour la Recherche Médicale'.

## References

- Andarelli, M. A., Farinotti, R. & Dauphin, A. (1982). HPLC determination of mexiletine in plasma, after derivatization with fluorescamine. *J. Pharm. Clin.*, **1**, 113-122.
- Beckett, A. H. & Chidomere, E. C. (1977a). The distribution, metabolism and excretion of mexiletine in man. *Postgrad. med. J.*, **53** (Suppl. I), 60-66.
- Beckett, A. H. & Chidomere, E. C. (1977b). The identification and analysis of mexiletine and its metabolic products in man. *J. Pharm. Pharmac.*, **29**, 281-285.
- Broly, F., Libersa, C., Lhermitte, M., Bechtel, P. & Dupuis, B. (1989). Effect of quinidine on the dextromethorphan *O*-demethylase activity of microsomal fractions from human liver. *Br. J. clin. Pharmac.*, **28**, 29-36.
- Broly, F., Libersa, C. & Lhermitte, M. (1990a). Mexiletine metabolism *in vitro* by human liver. *Drug Metab. Disp.*, **18**, 362-369.
- Broly, F., Libersa, C., Lhermitte, M. & Dupuis, B. (1990b). Inhibitory studies of mexiletine and dextromethorphan oxidation in human liver microsomes. *Biochem. Pharmac.*, **39**, 1045-1053.
- Campbell, N. P. S., Kelly, J. G., Adgey, A. A. J. & Shanks, R. G. (1978a). The clinical pharmacology of mexiletine. *Br. J. clin. Pharmac.*, **6**, 103-108.
- Campbell, N. P. S., Kelly, J. G., Adgey, A. A. J. & Shanks, R. G. (1978b). Mexiletine in normal volunteers. *Br. J. clin. Pharmac.*, **6**, 372-373.
- Dayer, P., Leeman, T., Kupfer, A., Francis, R. & Meyer, U. A. (1984). Debrisoquine-type polymorphism: Aliphatic

- and aromatic bufuralol oxidation are under the same genetic control but display opposite stereoselectivity. Presented at the *Sixth International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations*, Brighton, England, Aug. 9–10, (Abst. p4/17).
- Evans, D. A. P., Maghoub, A., Sloan, T. P., Idle, J. R. & Smith, R. L. (1980). A family and population study of the genetic polymorphism of debrisoquine oxidation in a white British population. *J. med. Genet.*, **17**, 102–105.
- Gillis, A. M. & Kates, R. E. (1984). Clinical pharmacokinetics of the newer antiarrhythmic agents. *Clin. Pharmacokin.*, **9**, 375–403.
- Gonzalez, F. J., Skoda, R. C., Kimura, S., Umeno, M., Zanger, U. M., Nebert, D. W., Gelboin, H. V., Hardwick, J. P. & Meyer, U. A. (1988). Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature*, **331**, 442–446.
- Grech-Bélanger, O., Gilbert, M., Turgeon, J. & LeBlanc, P. (1985). Effect of cigarette smoking on mexiletine kinetics. *Clin. Pharmac. Ther.*, **37**, 638–643.
- Häselbarth, V., Doevedans, J. E. & Wolf, M. (1981). Kinetics and bioavailability of mexiletine in healthy subjects. *Clin. Pharmac. Ther.*, **29**, 729–736.
- Inaba, T., Jurima, M., William, A., Mahon, W. A. & Kalow, W. (1985). In vitro inhibition studies of two isoenzymes of human liver cytochrome P-450. Mephenytoin P-hydroxylase and sparteine monooxygenase. *Drug Metab. Disp.*, **13**, 443–448.
- Johnston, A., Burgess, C. D., Warrington, S. J., Wadsworth, J. & Hamer, N. A. J. (1982). The effect of spontaneous changes in urinary pH on mexiletine plasma concentrations and excretion during chronic administration to healthy volunteers. *Br. J. clin. Pharmac.*, **8**, 349–52.
- Kahn, G. C., Boobis, A. R., Brodie, M. J., Toverud, E. L., Murray, S. & Davies, D. S. (1985). Phenacetin O-deethylase: an activity of a cytochrome P-450 showing linkage with that catalysing the 4-hydroxylation of debrisoquine? *Br. J. clin. Pharmac.*, **20**, 67–76.
- Kaye, C. M., Kiddie, M. A. & Turner, P. (1977). Variable pharmacokinetics of mexiletine. *Postgrad. med. J.*, **53** (suppl. I), 56–58.
- Kronbach, T., Mathys, D., Gut, J., Catin, T. & Meyer, U. A. (1987). High performance liquid chromatography assays for bufuralol 1'-hydroxylase, debrisoquine 4-hydroxylase, and dextromethorphan O-demethylase in microsomes and purified cytochrome P-450 isozymes of human liver. *Anal. Biochem.*, **162**, 24–32.
- Küpfer, A., Schmid, B. & Pfaff, G. (1986). Pharmacogenetics of dextromethorphan O-demethylation in man. *Xenobiotica*, **16**, 421–433.
- Lennard, M. S., Silas, J. H., Smith, A. J. & Tucker, G. T. (1977). Determination of debrisoquine and its 4-hydroxy metabolites in biological fluids by gas chromatography with flame ionization and nitrogen selective detection. *J. Chromatogr.*, **133**, 161–166.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randa, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- Otton, S. V., Inaba, T. & Kalow, W. (1984). Competitive inhibition of sparteine oxidation in human liver by beta-adrenoreceptor antagonists and other cardiovascular drugs. *Life Sci.*, **34**, 73–80.
- Penno, M. B., Dvorchik, B. H. & Vessell, E.S. (1981). Genetic variation in rates of antipyrine metabolite formation: A study in uninduced twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 5193–5196.
- Pentikäinen, P. J., Koivula, I. H. & Hiltunen, A. H. (1982). Effect of rifampicin treatment on the kinetics of mexiletine. *Eur. J. clin. Pharmac.*, **23**, 261–266.
- Peyrieux, J. C., Boissel, J. P., Leizorovicz, A., IMPACT Research Group. (1987). Relationship between plasma mexiletine levels at steady-state. Presence of ventricular arrhythmias and side effects. *Fundam. clin. Pharmac.*, **1**, 45–57.
- Prescott, L. F., Clements, J. A. & Pottage, A. (1977). Absorption, distribution and elimination of mexiletine. *Postgrad. med. J.*, **53** (Suppl. I), 50–55.
- Samir, D. R., Hawes, E. M., McKay, G., Korczynski, E. D. & Midha, K.K. (1985). Metabolism of methoxyphenamine in extensive and poor metabolizers of debrisoquine. *Clin. Pharmac. Ther.*, **38**, 128–133.
- Scott, K. N., Cough, M. E., Wilder, B. J. & Williams, C. M. (1973). The use of mass spectroscopy and <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance in the characterization of 1-methyl-(2, 6-xilyloxy) ethylamine metabolites. *Drug Metab. Disp.*, **1**, 506–515.
- Steiner, E., Iselius, L., Alvan, G., Lindsten, J. & Sjöqvist, F. (1985). A family study of genetic and environmental factors determining polymorphic hydroxylation of debrisoquine. *Clin. Pharmac. Ther.*, **38**, 394–401.
- Talbot, R. G., Clark, R. A., Nimmo, J., Neilson, J. M., Julian, D. G. & Prescott, L. F. (1973). Treatment of ventricular arrhythmias with mexiletine (Kö 1173). *Lancet*, **ii**, 399–403.
- Talbot, R. G., Julian, D. G. & Prescott, L. F. (1976). Long-term treatment of ventricular arrhythmias with oral mexiletine. *Am. Heart J.*, **91**, 58–62.
- Woolley, R. L., Wang, T., Stone, W. (1984). Pharmacology, electrophysiology and pharmacokinetics of mexiletine. *Am. Heart J.*, **107**, 1086–980.

(Received 29 January 1990,  
accepted 17 May 1991)

## **ARTICLE 2**

L'association quinidine (antiarythmique de type 1a)-mexilétine (type 1b) est recommandée et effective dans les cas où les patients sont réfractaires au traitement par l'une ou l'autre drogue. La quinidine est connue pour être un puissant inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du cytochrome P450IID6. De précédentes études *in vitro* ont montré qu'il suffisait d'une très faible dose de quinidine pour inhiber presque complètement la formation de PHM et HMM dans des microsomes de foies humains. On peut donc supposer qu'une telle interaction existe *in vivo* chez l'homme lors de l'association de ces deux thérapies.

Afin d'explorer cette hypothèse, le métabolisme de la mexilétine a été étudié *in vivo* chez 6 volontaires sains de phénotype métaboliseur extensif, après prétraitement à dose subthérapeutique par la quinidine.

Les résultats obtenus *in vivo* reportés dans l'article 2 ont montré une nette diminution de l'excrétion des métabolites hydroxylés de la mexilétine après traitement par la quinidine. Les taux de mexilétine inchangée et de mexilétine N-glucuroconjuguée (MGC) sont par contre légèrement augmentés. Cependant l'élimination globale de la mexilétine et de ses métabolites est diminuée d'environ 30%.

L'association quinidine-mexilétine peut entraîner des modifications significatives de la disposition de la mexilétine. Cela pourrait expliquer en partie pourquoi l'administration simultanée de faibles doses des deux drogues en même temps est plus efficace qu'une administration isolée même à forte dose de l'un ou l'autre de ces composés. Cette interaction est donc probablement due à l'inhibition du cytochrome P450IID6 qui catalyse ces réactions d'hydroxylation, par la quinidine.

Cette étude apporte une preuve supplémentaire au fait que le métabolisme oxydatif de la mexilétine *in vivo* est lié au polymorphisme génétique de type débrisoquine/spartéine.

PHARMACOLOGY LETTERS

*Accelerated Communication*

**SINGLE-DOSE QUINIDINE TREATMENT INHIBITS MEXILETINE  
OXIDATION IN EXTENSIVE METABOLIZERS OF DEBRISOQUINE**

Franck Broly, Nathalie Vandamme, Jacques Caron, Christian Libersa and Michel Lhermitte

Laboratoire de Pharmacologie Hospitalière, Faculté de Médecine de Lille et  
Laboratoire de Toxicologie du Département de Biochimie, Hôpital Calmette,  
1 Place de Verdun, 59045 Lille Cedex (France),

(Submitted January 24, 1991; accepted February 6, 1991; received in final form April 19, 1991)

---

**ABSTRACT:** Urinary elimination of unchanged mexiletine, *p*-hydroxymexiletine (PHM), hydroxymethylmexiletine (HMM) and mexiletine N-glucuronide conjugate (MGC) was investigated before and after treatment with quinidine. All subjects were phenotyped as extensive metabolizers for debrisoquine oxidation. The total recovery of mexiletine and metabolites was significantly reduced after quinidine pre-treatment. It is concluded that pretreatment with a very low dose of quinidine inhibits markedly the elimination of both major mexiletine metabolites (PHM and HMM) and likely decreases the overall elimination of mexiletine. That should lead to changes in mexiletine disposition and have clinical consequences during combination therapy with both drugs.

---

INTRODUCTION

Clinically significant drug interactions are often feared in cardiovascular therapy, especially with drugs used for the prophylaxis or treatment of potentially serious dysarrhythmias. The combination of quinidine (type IA agent) and mexiletine (type IB agent) has been shown to be effective in controlling ventricular arrhythmias in some patients who are refractory to monotherapy with either drug, while producing fewer side effects (1).

The therapeutic index of mexiletine is narrow and a clear relationship exists between the plasma concentration of the drug and both its therapeutic and toxic effects (2). Mexiletine is eliminated by hepatic metabolism and by renal excretion of the unchanged molecule. The major metabolic routes have been reported to be aromatic hydroxylation forming *p*-hydroxymexiletine (PHM) and aliphatic hydroxylation forming hydroxymethylmexiletine (HMM) (3). These metabolites, which do not seem to possess significant antiarrhythmic activity (4), are partially or

totally excreted in urine as conjugates (3). Conjugation of mexiletine with glucuronic acid into mexiletine N-glucuronide conjugate (MGC) is also a major pathway of elimination (3). Quinidine is known to be a potent *in vitro* and *in vivo* inhibitor of the P-450db1 enzymatic system (5-9). Investigations on possible quinidine interaction on mexiletine metabolism during combination therapy are lacking. Nevertheless, such interaction is likely since recent *in vitro* studies indicated that enzymatic hydroxylation processes forming HMM and PHM in human liver microsomes were almost completely abolished by very low dose of quinidine (6-7).

In order to investigate this hypothesis, we have evaluated the effect of pretreatment with a subpharmacological dose of quinidine on the urinary excretion profile of the unchanged form and of the three major metabolites of mexiletine in healthy volunteers.

### METHODS

*Subjects:* Six healthy, drug-free volunteers with normal electrocardiograms gave their written informed consent to participate in the study which was approved by the University Ethics Committee. No subjects showed biological or clinical signs of cardiac, liver or renal function impairment. Sex, age, size, weight and smoking habits of subjects are given in Table I.

*Protocols and analytical procedures:* Debrisoquine hydroxylation capacity of subjects was determined at least two weeks before entering or after completing the study. Urine was collected for 8 hrs after a single oral 10 mg dose of debrisoquine and a 20 ml aliquot was stored at -20°C until analyzed. Urinary debrisoquine (D) and 4-hydroxy-debrisoquine (HD) concentrations were then measured, according to the procedure of Lennard *et al.* (10). The D/HD metabolic ratio was calculated, allowing phenotype determination of the subjects as previously described (11).

The study was performed in two periods separated by at least 2 weeks. During the control period each subject received a single oral dose of 200 mg mexiletine hydrochloride (one capsule of Mexitil, Boehringer Ingelheim, Reims, France) corresponding to 930 µmol mexiletine base, after an overnight fast. Blood pressure, heart rate and ECG were monitored over the first 4 hr after administration. No solid food was allowed during the subsequent 3 hr. Urine samples were collected prior to drug administration, each hour during the first 12 hr following drug administration and about each 3 hr after. Volume and pH of urine were recorded immediately after each micturation. Urine samples, collected during the 0-8, 8-24 and 24-48 hr periods after dosing, were pooled and a 20 ml aliquot of each pool stored at -20°C until analyzed. The study was then repeated exactly as described above, but one hour before the administration of mexiletine the subjects received 1/4 tablet of quinidine polygalacturonate (Cardioquine, Laboratoires Sarget, Mérignac, France) corresponding to 41.5 mg quinidine base (128 µmol) (12).

The contents of unchanged mexiletine, total (free plus conjugated) HMM, total PHM and total mexiletine in each urine sample were analyzed by high performance liquid chromatography

(h.p.l.c.) with fluorescence detection and by g.l.c. with flame ionization detector, as previously described (13). Because mexiletine, HMM and PHM were eliminated in urine as conjugates (3), total urinary concentration of these compounds were determined after previous enzymatic hydrolysis of urine samples. All these h.p.l.c. and g.l.c. analytical procedures had appropriate control analyses of blank urine samples which were collected from the subjects immediately before the administration of mexiletine. By these methods, the inter- and intra-day coefficients of variation did not exceed 10% for all of the assays and the limit of detection with a signal to noise ratio of 4:1 was 5 nmol/ml for unchanged mexiletine, 4 nmol/ml for total mexiletine, 0.35 nmol/ml for total HMM and 0.08 nmol/ml for total PHM.

*Analysis of results:* The amount of MGC was determined by subtracting the amount of unchanged mexiletine from the amount of total mexiletine obtained after enzymatic hydrolysis of urine samples. A two-tailed paired Student t test was used to compare the recoveries of mexiletine and its metabolic products in urine without and after pretreatment with quinidine. Metabolic ratio for each mexiletine metabolite was calculated as  $\mu$ moles of unchanged mexiletine divided by  $\mu$ moles of metabolite recovered in the 48 hr urines. The Mann-Whitney U test was used to compare these ratios before and after pre-treatment with quinidine. Relationships between variables were assessed according to the value of the calculated Spearman rank correlation coefficient ( $r_s$ ). A p value less than 0.05 was considered significant. Mean data was presented with the SD of the sample.

## RESULTS

No significant change in blood pressure or any ECG parameter were observed after administration of mexiletine alone or with quinidine pretreatment. Subjects were classified from n°1 to n°6 according to the D/HD ratio values obtained.

All subjects were phenotyped as extensive metabolisers of debrisoquine (metabolic ratio values in the range of 0.14 to 1.20). Mean urinary pH and flow-rate values were not significantly changed after quinidine pretreatment (Table I). Moreover, a similar variability of these parameters was observed in each subject during both steps of the study, as shown typically for subject n°1 in Figure 1.

**TABLE I : Characteristics of the healthy subjects taking part in the study**

Subjects	Debrisoquine metabolic ratio	Sex	Age (yr)	Size (m)/ Weight (kg)	Smoker	Mean 48 hr Urinary pH		Mean 48 hr Urinary flow-rate (ml/hr)	
						a	b	a	b
1	0.14	M	33	1.87 / 85	Yes	5.8	6.0	53.3	50.5
2	0.43	M	38	1.80 / 74	No	6.3	6.4	62.9	74.8
3	0.55	M	36	1.80 / 72	Yes	6.0	5.8	43.8	47.1
4	0.66	M	25	1.82 / 77	No	5.8	5.9	57.9	57.2
5	0.93	M	33	1.88 / 85	Yes	6.0	6.0	36.9	39.0
6	1.20	F	34	1.76 / 56	No	6.1	6.0	57.4	54.4

*a, without quinidine pretreatment; b, after quinidine pretreatment  
n > 26 for each mean value reported of urinary pH or flow-rate*



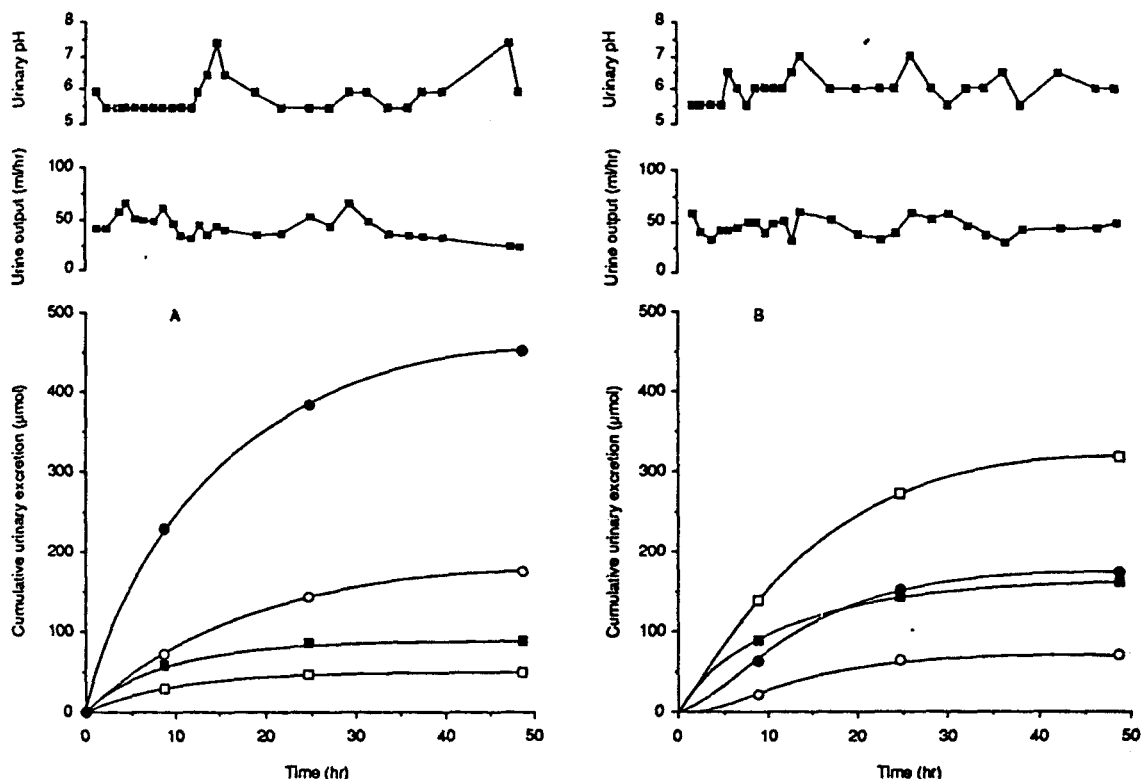


Figure 1 : Typical cumulative urinary excretion profile of mexiletine (□) and its three major metabolites, *p*-hydroxymexiletine (●) hydroxymethylmexiletine (○) and mexiletine N-glucuronide (■) in a debrisoquine extensive metabolizer (subject n°1) during 48 hours after oral administration of 200 mg mexiletine hydrochloride (930 μmol mexiletine base) without (A) and with (B) quinidine pretreatment. Variations in urinary pH and flow-rate are also shown.

*During control experiment:* Individual values for 48 hr urinary excretion of mexiletine as well as of its three major metabolites are listed in Table 2. Consistent inter-subject variations were obtained in the excretion of unchanged mexiletine, PHM, HMM, and to a lesser extent of MGC (Table II). The corresponding variation coefficients were 60.1, 30.1, 22.8 and 17.0%, respectively. The sum of the urinary excretion of mexiletine, PHM, HMM and MGC, expressed as the percentage of the dose recovered in the 48 hr urine, was in the range of 80.2-57.2% (Table II). The hydroxylated metabolites, PHM and HMM, constituted the major fractions of the recovered dose (mean,  $32.1 \pm 9.7$  and  $13.8 \pm 3.1\%$ , respectively) whereas recoveries of unchanged mexiletine and MGC accounted for lower fractions ( $7.5 \pm 4.5$  and  $12.2 \pm 2.0\%$ , respectively). Moreover, the greater part of mexiletine and its metabolites was excreted during the first 8 hr ( $28.2 \pm 7.9\%$ ). The 8-24 and 24-48 hr urines contained a mean of  $25.9 \pm 1.5$  and  $13.2 \pm 3.8\%$  of the dose respectively. Individual values for mexiletine metabolic ratios are reported in Table 3. Marked inter-subject variations were observed for mexiletine/PHM and mexiletine/HMM ratio values with corresponding coefficients of variation of 85.7 and 82.2%. A strong and significant positive correlation was found between mexiletine/ PHM and mexiletine/HMM ratios ( $r_s: 1.00$ ,  $p < 0.001$ ). In addition D/HD ratios correlated strongly with mexiletine/PHM and mexiletine/HMM ratios ( $r_s: 0.94$ ,  $p: 0.006$  and  $r_s: 1.00$ ,  $p < 0.001$ , respectively).

*After pretreatment with quinidine :* As shown typically for subject n°1 in Figure 1, excretion patterns in urines collected during the first 0-8, 8-24 and 24-48 hours varied considerably after

quinidine pretreatment. There were significant differences in the mean 48 hr excretion of mexiletine, PHM, HMM and MGC after quinidine pretreatment (Table II). Total recoveries of PHM and HMM were strongly and similarly reduced by  $61.5 \pm 5.0$  and  $60.7 \pm 8.7\%$  whereas recoveries of mexiletine and MGC were 1.7 and 1.2-fold higher after quinidine pretreatment, respectively. These changes led to a mean decrease of the sum of mexiletine and its metabolites excreted in urine by  $30.9 \pm 5.2\%$  after quinidine pretreatment.

**TABLE II : Urinary excretion of mexiletine and its metabolites during the first 48 hours after a single oral dose of 200 mg mexiletine hydrochloride (930 mmol of base)**

Subjects	Mex ( $\mu\text{mol}$ )		PHM ( $\mu\text{mol}$ )		HMM ( $\mu\text{mol}$ )		MGC ( $\mu\text{mol}$ )		Total fraction of the recovered dose	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
1	42.7	156.7	447.1	167.3	169.9	62.8	84.3	155.5	80.2	58.4
2	21.0	30.0	345.3	147.9	122.3	67.5	133.7	164.1	67.0	44.1
3	45.4	116.3	276.6	87.2	134.7	44.9	124.9	139.4	62.7	41.7
4	72.5	111.8	261.6	97.1	145.1	44.1	104.4	105.4	62.8	38.6
5	109.1	159.0	279.5	127.7	104.5	39.8	105.7	119.5	64.5	48.0
6	130.1	135.2	180.6	65.6	89.5	37.7	131.7	153.3	57.2	42.0
Mean	70.1	118.1	298.3	115.3	127.6	49.4	114.1	139.5	65.7	45.5
SD	42.1	106.0	89.8	86.6	28.8	28.0	19.3	51.0	7.7	15.7
t-statistic	2.8		8.0		7.9		2.5		13.5	
Significance	0.034		0.001		0.001		0.050		< 0.001	

PHM, *p*-hydroxymexiletine; HMM, hydroxymethylmexiletine, Mex, mexiletine; MGC, mexiletine *N*-glucuronide conjugate  
a, without quinidine pretreatment; b, after quinidine pretreatment.

The mean percentage of the dose excreted as PHM and HMM decrease from  $32.1 \pm 9.7$  to  $12.4 \pm 4.1\%$  and from  $13.8 \pm 3.1$  to  $5.2 \pm 1.3\%$  after quinidine pretreatment, respectively. Corresponding values for unchanged mexiletine and MGC increased from  $7.5 \pm 4.5$  to  $12.7 \pm 5.1\%$  and from  $12.2 \pm 2.0$  to  $15.0 \pm 2.4\%$ , respectively.

Individual values for mexiletine metabolic ratios are listed in Table III. Co-administration of 41.5 mg quinidine resulted in a significant increase in mexiletine/PHM and mexiletine/HMM ratios of every subject. The corresponding fold increase of ratios ranged from 9.8 to 2.8 and from 9.9 to 2.5, with a same mean of 5.2 (Table III). Compared to control experiment, mexiletine/MGC ratio was not significantly changed after quinidine pretreatment.

**TABLE III : Effect of 41.5 mg quinidine on the urinary metabolic ratios of mexiletine**

Subjects	MR		MR b	MR		MR b	MR		MR b
	Mex / PHM		MR a	Mex / HMM		MR a	Mex / MGC		MR a
	a	b		a	b		a	b	
1	0.10	0.94	9.81	0.25	2.50	9.93	0.51	1.01	1.99
2	0.06	0.20	3.34	0.17	0.44	2.59	0.16	0.18	1.16
3	0.16	1.33	8.13	0.34	2.59	7.69	0.36	0.83	2.30
4	0.28	1.15	4.15	0.50	2.54	5.07	0.70	1.06	1.52
5	0.39	1.25	3.19	1.04	3.99	3.83	1.04	1.33	1.28
6	0.72	2.08	2.88	1.46	3.65	2.50	0.99	0.88	0.89
Mean	0.28	1.15	5.25	0.62	2.61	5.26	0.62	0.88	1.52
SD	0.24	0.60	2.96	0.51	1.24	2.98	0.34	0.38	0.53
t-statistic	3.0			3.0			10.0		
Significance	0.008			0.008			0.100		

MR, metabolic ratio; Mex, mexiletine; PHM, *p*-hydroxymexiletine; HMM, hydroxymethylmexiletine; MGC, mexiletine *N*-glucuronide conjugate; a, without quinidine pretreatment; b, after quinidine pretreatment.

## DISCUSSION

The present study demonstrates that pretreatment with quinidine markedly changed the excretion profile of mexiletine and its three major metabolites in healthy volunteers previously phenotyped as extensive metabolizers of debrisoquine. Under conditions of normal urinary pH, less than 10% of mexiletine was recovered unchanged in urine over 48 hr indicating that the elimination of the drug mainly occurs by metabolism (3, 14). Three major metabolic routes have been described : aromatic hydroxylation forming PHM, aliphatic hydroxylation forming HMM and conjugation with glucuronic acid into MGC (3, 15). Moreover, consistent inter-subject variations have been observed in the excretion of mexiletine and its metabolites. Our findings during control experiment are closely consistent with these previously reported data (3, 15). In our study, there was no significant differences of the mean values of urinary pH and flow-rate between the two steps and a similar variability of these two parameters was observed in each subject before and after quinidine pretreatment. Therefore, consistent variations in the urinary excretion of unchanged mexiletine and of metabolites between both parts of the study were unlikely due to physiological or quinidine-induced changes of these parameters.

The major changes observed after quinidine pretreatment consisted of a marked decrease in the urinary excretion of both mexiletine hydroxylated metabolites. In addition, mexiletine/PHM and mexiletine/HMM ratios were strongly increased. Such ratios in urine are determined mainly by the meta-bolic clearance of mexiletine.

Quinidine has been shown to be the strongest competitive *in vitro* inhibitor of enzymatic hydroxylation processes leading to PHM and HMM formation in human liver microsomes (inhibitory constant: 0.03  $\mu\text{mol}$ ) (6, 7). In addition, *in vitro* inhibitory properties of quinidine on the microsomal oxidation of drugs are also reflected by *in vivo* findings (8). Therefore, the increase in the mexiletine metabolic ratios is very likely to be due to the *in vivo* inhibition by quinidine of mexiletine hydroxylation processes forming PHM and HMM. The significance of the inhibition of both major metabolic pathways of mexiletine on its overall elimination depends on the presence and the extent of alternative routes of elimination of the drug other than those inhibited. This included elimination of mexiletine as unchanged form and MGC.

Unchanged mexiletine excretion increased accordingly to the decrease of PHM and HMM excretion after quinidine pretreatment. These findings suggest that the elimination of the parent drug increased to compensate for the fall in its major metabolite formation as previously reported for other drug oxidations inhibited by quinidine (9, 16). The amount of MGC eliminated in the urine after quinidine pretreatment increases, but there is no a significant change of mexiletine/MGC ratio, probably due to the parallell increase of the amount of mexiletine eliminated in urine. HMM and PHM have been reported to be further metabolized to their corresponding alcohols (3). Although the extent of these metabolic pathways are not known, the recoveries of these produced

metabolites were not taken into account in the total recovery of HMM and PHM found in our study. The discrepancy of the *in vivo* and *in vitro* results between HMM and PHM could also be explained by partial reabsorption of HMM. Consequently, the inhibition of hydroxylation pathways forming HMM and PHM probably lead to an even more pronounced decrease of total fraction of recovered drug after quinidine pretreatment.

Other metabolic routes of mexiletine, including N-oxidation, deamination to a ketone, reduction to the alcohol and N-methylation were not investigated in this study. Although they occur to a very minor extent in the overall elimination of the drug (about 5%)(3), they could be increased after quinidine pretreatment as mexiletine glucuronidation.

Previous report suggested that the rate of mexiletine metabolism forming PHM and HMM is a factor which determines the blood levels of the drug achieved in healthy subjects (3). Therefore, quinidine-mexiletine may lead to changes in mexiletine disposition and these changes can be expected to have clinical significances, since the therapeutic index of the drug is narrow and a strong correlation exists between its serum concentration and both its antiarrhythmic and toxic effects (2).

Combination therapy with mexiletine and quinidine was reported as an important addition to therapy of life threatening ventricular arrhythmias because the addition of low dosage of both drugs seemed to be more effective and better tolerated than was single therapy alone (1). With regard to the results obtained in the present study after pretreatment with a single very low dose of quinidine (about 24 times lower than an average daily dose), quinidine when administered together repeatedly with mexiletine might change its overall elimination to an extent which is likely to be significant. This could in turn partly explain, in addition to the reported synergistic electrophysiologic effect of the two agents (17), why administration of low dosage of both drugs was more effective than higher dose of each of them during single therapy. The cytochrome P-450 is a family of isozymes that have a central role for the hepatic oxidation of drugs (18). The quantitatively minor and genetically variable human liver cytochrome P-450 isozyme (P-450db1, also called P-450IID6) has recently been recognized as the target of the common genetic sparteine/debrisoquine-type polymorphism (19). For drugs whose metabolic transformation depends largely on this cytochrome P-450 isozyme, differences in disposition and in the pharmacological effect between "extensive metabolizers" (EM) and "poor metabolizers" (PM) subjects may be observed (20). It would be thus of value to identify the drugs which depend largely on the affected isozyme for their elimination.

Previous studies, indicated that a common form of P-450 catalyzed the formation of both major hydroxylated metabolites of mexiletine, HMM and PHM, and that the involved P-450 is P-450db1 (6, 7). It was therefore suggested that mexiletine metabolism was affected by the sparteine/debrisoquine-type polymorphism.

In the present study, all six subjects were EM. There was a strong correlation between both rates of hydroxylation of mexiletine into PHM and HMM during control experiments. In addition, the effect of quinidine on the excretion of HMM and PHM and on the mexiletine/PHM and mexiletine/HMM ratios was very similar suggesting that *in vivo* formation of both metabolites was linked. Furthermore, the rate of both hydroxylations of mexiletine were strongly correlated with the debrisoquine hydroxylation index, an indicator of P-450db1 activity. Changes were observed in the excretion of mexiletine, HMM and PHM, and in the mexiletine/PHM and mexiletine/HMM ratios as for other inhibitor studies of P-450db1-dependent biotransformation using similar low dose of quinidine (8, 16). Moreover, the extent of changes in these parameters produced by quinidine P-450db1 inhibition was highly correlated to the degree of metabolic activity. The complete concordance of the present findings and previous data provides thus additional support for the hypothesis that mexiletine joins a growing list of antiarrhythmic agents whose *in vivo* metabolism is affected by the debrisoquine/sparteine-type polymorphism (20). In addition, it may be assumed that impairment of both major metabolic pathways of mexiletine forming PHM and HMM as well as its consequences on the overall elimination and disposition of the drug are at least similar in PM subjects of debrisoquine than after quinidine pretreatment in EM subjects.

Several possible consequences of the present findings, as for drugs which share the same metabolic polymorphism, may be considered: (i) a possible misinterpretation of mexiletine pharmacokinetic parameters or pharmacodynamic effects from studies performed in unphenotyped subjects, (ii) a possible misclassification of EM subjects with a phenotypic value close to the antimode and who are taking mexiletine while being phenotyped and (iii) beside quinidine-mexiletine interaction, other possible drug-drug interactions when mexiletine is prescribed together with drugs (e. g. propafenone, flecainide, encainide, ajmaline, several b-blockers, antidepressants) implicated in the same metabolic polymorphism (20).

Moreover, numerous studies have shown that, with all routes of administration, there are pronounced interindividual variations of the mexiletine kinetics after a given dose as reflected by large variations in the plasma concentrations (3). As the antiarrhythmic activity and toxicity of mexiletine is strongly correlated with its plasma concentration, a monitoring of the plasma concentration and, in some cases, an adjustment of the dose are required to ensure efficacy and safety. Beside other factors (15), the genetic variability of mexiletine metabolism should play a role in the variations observed.

In conclusion, pretreatment with a very low dose of quinidine inhibits markedly the excretion of both major mexiletine metabolites in 6 extensive metabolizers of debrisoquine. In addition, there is strong evidence that the mechanism of this drug-drug interaction is a potent and selective inhibition by quinidine of the genetically variable human liver cytochrome P-450db1 catalysing the formation of both major metabolites of mexiletine. These findings confirm thus the hypothesis

that *in vivo* metabolism of mexiletine is affected by the debrisoquine/sparteine-type polymorphism of drug oxidation. However, further complete plasma kinetic studies of mexiletine in EM and PM subjects are required to assess interphenotype changes in mexiletine disposition and its clinical significance.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported in part by grants from "Fondation pour la Recherche Médicale" and by Boehringer Ingelheim Laboratories, Reims, France.

#### REFERENCES

1. H.J. DUFF, D. RODEN, R.K. PRIMM, J.A. OATES and R.L.WOOSLEY, *Circulation*. 67 1124-1128 (1983).
2. J.C. PEYRIEUX, J.P. BOISSEL, A. LEIZOROVICZ and IMPACT Research Group, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1 45-57 (1987).
3. A.H. BECKETT and E.C. CHIDOMERE, *Postgrad. med. J.* 53 (Suppl. I) 60-66 (1977).
4. R.L.WOOSLEY, T. TANG and W. STONE, *Am. Heart. J.* 107 1086-1090.(1984).
5. S.V. OTTON, T. INABA, and W. KALOW, *LIFE SCI.* 34, 73-80 (1984).
6. F. BROLY, C. LIBERSA and M. LHERMITTE, *Drug. Metab. Disp.* 18 362-368 (1990)
7. F. BROLY, C. LIBERSA and M. LHERMITTE, *Biochem. Pharmacol.* 39 1054-1063 (1990)
8. T. INABA, R. E. TYNDALE and W. A. MAHON, *Br.J.Clin.Pharmac.* 22 199-200.(1986).
9. R. BRINN, K. BROSEN, L. F. GRAM, T. HAGHFELT and V. OTTON, *Br. J. Clin. Pharmac.* 22 194-197.(1986).
10. M.S. LENNARD, J. H. SILAS, A. J. SMITH and G.T. TUCKER, *J. Chromatog.* 133 161-166 (1977).
11. D. A. P. EVANS, A. MAGHOUB, T. P.SLOAN, J. R. IDLE and R. L. SMITH, *J. Med. Genet.* 17 102-105.(1980).
12. C. SPEIRS , S. MURRAY, A. BOOBIS, C. SEDDON and D. DAVIES, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 22, 739-743 (1986).
13. F. BROLY, N. VANDAMME, C. LIBERSA and M. LHERMITTE, *Mexiletine metabolism : relation to the debrisoquine/sparteine - type polymorphism of drug oxidation*, submitted.
14. C. M. KAYE, Kiddie M. A. KIDDIE and P. TURNER, *Postgrad. med. J.* 53 (suppl. I) 56-58.(1977).
15. O. GRECH-BELANGER, M. GILBERT, J. TURGEON and P. LEBLANC, *Clin. Pharmacol. Ther.* 37 638-643 (1985).
16. K. BROSEN, L. F. GRAM, T. HAGHFELT and L.BERTILSSON, *Pharmacol. & Toxicol.* 60 312-314.(1987).
17. H.J. DUFF and N J GAULT, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8.847-857.(1986).

18. F. P. GUENGERICH, L. M. DISTLERATH, P. E. B. REILLY, T. WOLFF, T. SHIMADA, D. R. UMBENHAUER and M. V. MARTIN, *Xenobiotica*. 16 367-378.(1986).
19. U. A. MEYER, T. CATIN, A. DEMIERRE, R. FONNE, T. KRONBACH, U. T. MEIER, R. SKODA, F. VILBOIS, U. ZANGER and F. J. GONZALES, *Microsomes and Drug Oxidations*, J. Miners, D. J. Birkett, R. Drew and M. McManus. (eds), 209-215, Taylor & Francis, London (1988).
20. A. KÜPFER, *Drug metabolism. Molecular approaches and pharmacological implications*, G. Siest, 25-33, Pergamon Press, Oxford (1985).

**ARTICLE 3**



Cet article présente de façon concise les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* concernant l'effet de la quinidine sur le métabolisme de la mexilétine.

*In vitro*, la quinidine inhibe de façon compétitive la formation des deux métabolites hydroxylés majeurs de la mexilétine (PHM et HMM).

*In vivo*, les résultats rapportés sont ceux rapportés dans l'article 2.

L'association des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* permet d'avoir une vue globale de l'inhibition du métabolisme oxydatif de la mexilétine par la quinidine.

## Inhibition *in vitro* et *in vivo* du métabolisme oxydatif de la mexilétine par la quinidine

F. BROLY, N. VANDAMME, M. LHERMITTE (1), J. CARON, C. LIBERSA (2)

(1) Laboratoire de Toxicologie, Hôpital Calmette, CHRU de Lille, 59037 Lille Cedex, France.

(2) Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France.

L'association de quinidine (Q) (anti-arythmique de classe 1A) et de mexilétine (M) (anti-arythmique de classe 1B) est volontiers utilisée dans certains troubles du rythme ventriculaire en raison d'une efficacité apparemment meilleure que l'utilisation en monothérapie de chacun de ces antiarythmiques (AA) et avec une incidence moindre d'effets indésirables (1). Cette augmentation de l'efficacité est généralement mise sur le compte de propriétés électrophysiologiques spécifiques liées à leur appartenance respective à des sous-groupes différents d'AA (2).

Le but de cette étude, pratiquée d'une part *in vitro*, d'autre part *in vivo* est de vérifier si des facteurs d'ordre cinétique et métabolique peuvent également être incriminés.

- *In vitro*, la M est transformée en 2 métabolites hydroxylés l'hydroxyméthylmexilétine (HMM) et la parahydroxymexilétine (pHM) par des préparations enzymatiques microsomiales hépatiques, contenant les monooxygénases à cytochrome P 450, maintenues à 37° dans une solution tampon, en présence d'un système de régénération du NADPH<sub>2</sub>. La production des métabolites a été mesurée par HPLC et les constantes enzymatiques (V<sub>m</sub> et K<sub>m</sub>) ont été définies par chacune des réactions. La quantité de métabolites produits est comparable à celle retrouvée chez l'homme et est corrélée au temps d'incubation, à la concentration de protéines microsomiales et à la quantité de substrats (M).

L'adjonction de quinidine, qui est un inhibiteur puissant du cytochrome P 450IID6 (3), à la préparation pendant l'incubation inhibe de façon compétitive la formation des métabolites hydroxylés de la M avec des constantes d'inhibition comparables pour les 2 métabolites (0,03 µM) (Figure 1).

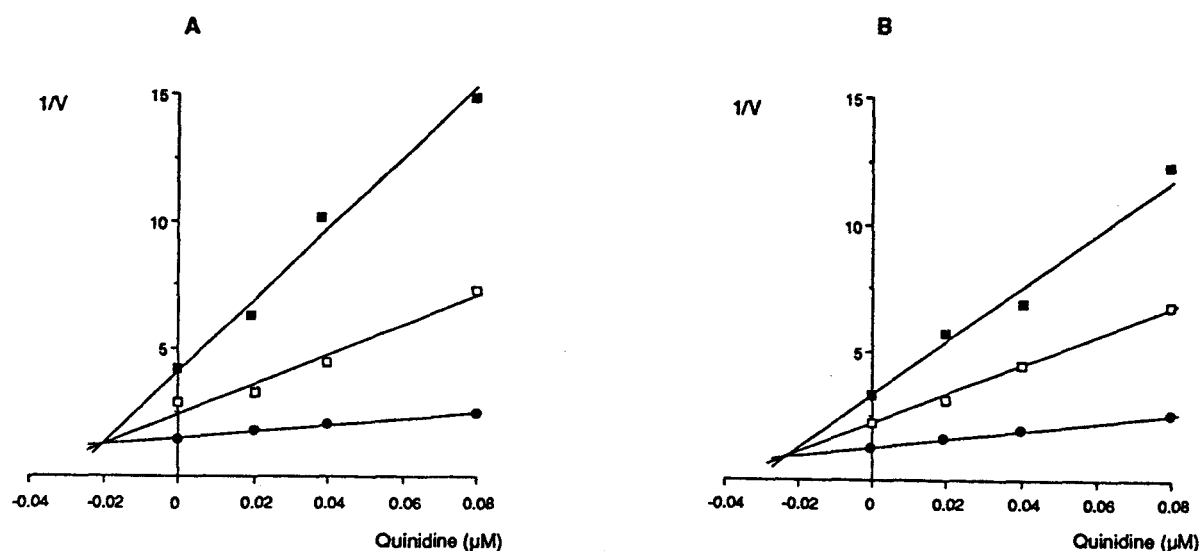


Figure 1 : Effet de trois concentrations de quinidine sur la vitesse de formation (V), nmol/mg protéine/heure de l'HMM (A) et du pHM (B).

- *In vivo*, l'excrétion urinaire de M, de HMM et de pHM ainsi que leurs dérivés glucuroconjugués a été déterminée à deux reprises pendant 48 heures après administration de 200 mg de M, chez 6 volontaires sains préalablement phénotypés et considérés comme hydroxyleurs extensifs.

La 1ère détermination a été effectuée en dehors de toute autre thérapeutique.

La 2ème détermination a été effectuée dans les mêmes conditions basales après prise unique de 41,5 mg de Q.

Ce prétraitement par la Q entraîne une réduction majeure des concentrations urinaires de HMM et de pHM (respectivement - 60,7 ± 8 % et - 61,5 ± 5 %) et une augmentation de la concentration de M inchangée (+ 7,5 ± 4,5 %) ainsi que de sa forme glucuroconjuguée (± 12,2 ± 2 %) (Figure 2), comme cela a été mis en évidence avec la spartéine et la débrisoquine (4,5).

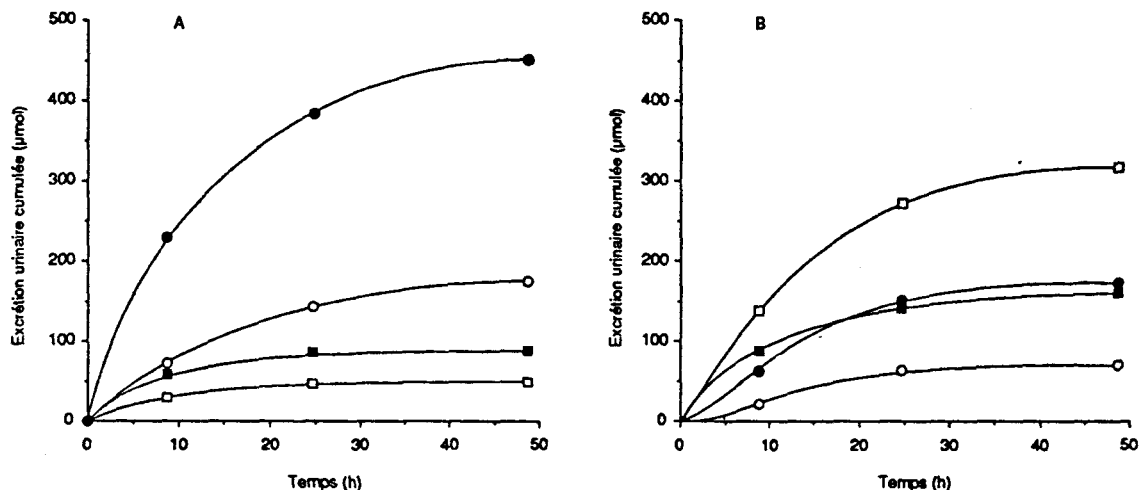


Figure 2 : Excrétion urinaire cumulée de mexiletine (□) et de ses trois principaux métabolites, pHM (●) HMM (○) et mexiletine N-glucuronide (■) chez un sujet hydroxyleur extensif avant (A) et après (B) quinidine.

En conclusion, ces résultats *in vitro* et *in vivo* suggèrent une inhibition sélective du métabolisme de la M par la Q, et donc un passage par la voie du cytochrome P 450IID6, pourrait expliquer en partie la potentialisation de l'effet anti-arythmique par l'association de ces deux produits et les grandes variations inter et intraindividuelles liées au polymorphisme génétique du métabolisme de la M.

## REFERENCES

1. Duff, H.J., Primm, R.K., Oates, J.A., Woosley, R.L. (1983) : Mexiletine in the treatment of resistant ventricular arrhythmias : enhancement of efficacy and reduction of dose related side effects by combinaison with quinidine. *Circulation*. 67, 1124-8.
2. Duff, H.H., Rahmberg, M., Sheldon, R.S. (1990) : Role of quinidine in the mexiletine-quinidine interaction : electrophysiologic correlates of enhanced anti-arrhythmic efficacy. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16, 685-692.
3. Guengerich, F.P., Muller-Enoch, D., Blair, I.A. (1986) : Oxidation of quinidine by human liver CP 450. *Molecular Pharmacol.* 30, 287-295.
4. Brinn, R., Brosen, K., Gram, L.F., Haghfelt, T., Otton, V. (1986) : Sparteine oxidation is practically abolished in quinidine treated patients. *Br. J. Clin.Pharmacol.* 22, 194-197.

**5. Brose, K., Gram, L.F., Haghfelt, T., Bertilsson, L. (1987) : Extensive metabolizers of debrisoquine become poor metabolizers during quinidine treatment. Pharmacol. & Toxicol. 60, 312-14.**

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine whether quinidine (Q) induces kinetic or metabolic alterations of mexiletine (M) degradation.

*In vitro*, enzymatic preparations transform M into the principle metabolites hydroxymethylmexiletine (HMM) and parahydroxymexiletine (PHM). The quantities of the two metabolites produced *in vitro* are comparable to the quantities produced *in vivo*. Production of these two metabolites is completely inhibited by the presence of Q, which is a potent inhibitor of the cytochrome P450IID6.

*In vivo*, using 6 healthy volunteers who were known to be extensive hydroxylators as subjects, production of HMM, PHM, and their respective glucuronoconjugates was assayed throughout a 48 hour period following administration of 200 mg of M. The first assay was done following administration of only M. The second assay was then done under the same conditions after a dministration of a single 41,5 mg dose of Q. The association of Q and M led to a major reduction of the urinary concentrations of HMM and PHM (60,7 and 61,5 % respectively), as well as an increase in the urinary level of unchanged M and its glucuronoconjugate (+ 7,5 %).

These *in vitro* and *in vivo* alterations of M metabolism in the presence of Q strongly suggest genetically polymorphic M metabolism controls linked to the P450IID6 cytochrome system.

**ARTICLE 4**

Les études précédentes ont démontrées que les deux voies majeures du métabolisme de la mexilétine c'est à dire la formation de PHM et HMM sont catalysées principalement par le cytochrome P450IID6. Ce cytochrome, génétiquement variable, est responsable du polymorphisme génétique de type débrisoquine/spartéine. Le métabolisme de plusieurs substrats du cytochrome P450IID6 présente un aspect stéréosélectif (voir tableau 2 de la revue générale). Comme ces substrats, la mexilétine est un racémique, mélange équimolaire de deux énantiomères.

Dans cette étude, nous avons voulu déterminer si la mexilétine subissait également un métabolisme stéréosélectif et si le P450IID6 était responsable de l'hydroxylation de chaque énantiomère.

Les résultats obtenus *in vitro* sur des microsomes de foies humains ont mis en évidence:

- que la *p*-hydroxylation de la S(+)-mexilétine (formation de PHM) est plus importante que pour la R(-)-mexilétine et que la *Vmax* de l'hydroxylation aliphatique (formation de HMM) de la R(-)-mexilétine est trois fois plus importante que celle de la S(+)-mexilétine.

- que la composante de haute affinité de l'activité dextrométhorphan O-déméthylase est inhibée compétitivement par la R(-) et la S(+)-mexilétine et que les hydroxylation des deux énantiomères sont très fortement inhibées par la quinidine.

Les résultats rapportés dans l'article 4 ont permis de mettre en évidence l'aspect stéréosélectif des deux réactions majeures d'hydroxylation de la mexilétine dont le cytochrome P450IID6 est responsable au moins en partie pour chaque énantiomère.

## STEREOSELECTIVE HYDROXYLATION OF MEXILETINE IN HUMAN LIVER MICROSOMES: IMPLICATION OF P450IID6

N.VANDAMME <sup>1</sup>, C.LIBERSA <sup>2</sup>, C.COURSEAU <sup>3</sup> and M.LHERMITTE <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Secteur Toxicologie du Laboratoire de Biochimie, Hôpital Calmette, CHRU de Lille, Bd du Pr. J.Leclercq, 59037 Lille Cedex, France.

<sup>2</sup> Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France.

<sup>3</sup> Laboratoires Boehringer Ingelheim France, 12 rue André Huet, BP 292, 51060 Reims Cedex, France.

Correspondence: M.Lhermitte, Secteur Toxicologie du Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Calmette, CHRU de Lille, Bd du Pr. J.Leclercq, 59037 Lille Cedex, France ; telephone 20-44-49-66.

Key-words: Mexiletine - Enantiomer - P450IID6 - Hydroxylation - Human liver.

---

### ABSTRACT

Mexiletine, a type 1b antiarrhythmic drug, is used clinically as a racemic mixture of two enantiomers. Aromatic and aliphatic hydroxylation are the two major metabolic steps. In the liver, this metabolism is catalyzed by the cytochrome P450IID6, an isoenzyme of cytochrome P450 responsible of genetic polymorphism in humans. In the present study, the metabolism of the two stereoisomers was compared *in vitro* in human liver microsomes. Parahydroxylation (aromatic hydroxylation) is favored for the S(+)-mexiletine with a mean intrinsic clearance value higher than for R(-)-mexiletine. R(-)-enantiomer exhibits a three fold higher mean V<sub>max</sub> value for aliphatic hydroxylation than S(+)-mexiletine. In a second part, we showed (i) that the high affinity component of dextrometorphan O-demethylation was competitively inhibited by R(-) and S(+)-mexiletine ; (ii) hydroxylations of the two enantiomers were very strongly competitively inhibited by quinidine. Hydroxylation reactions of mexiletine exhibit stereoselectivity *in vitro* in human liver microsomes and are catalyzed by P450IID6.

### INTRODUCTION

Mexiletine, a type 1b antiarrhythmic drug, shows a narrow therapeutic index. Therapeutic and especially toxic effects are related to the plasmatic concentration of mexiletine (therapeutic plasma levels : 0,75 - 2,00 µg/ml) (1-2). Mexiletine is extensively metabolized in humans by various pathways, principally by oxidative processes. Aliphatic hydroxylation and aromatic hydroxylation are the two major metabolic pathways, leading to formation of hydroxymethylmexiletine (HMM) and *p*-hydroxymexiletine (PHM) respectively.

Unchanged mexiletine in urine corresponds, only, to 10% of the administered dose (3). Aromatic and aliphatic mexiletine hydroxylations are related to debrisoquine 4-hydroxylation ability which exhibits genetic polymorphism in humans (4). Two phenotypes are observed: extensive metabolizers (EM) and poor metabolizers (PM) (5). About 10% of Caucasians belong to the PM phenotype (6) which is inherited as an autosomal recessive trait (7) and results from an



abnormality or an absence of a particular cytochrome P 450 isozyme (P450IID6) (8). It catalyses 4-hydroxylation of debrisoquine, mexiletine hydroxylation and the oxidation of more than 20 commonly prescribed drugs (4-9).

Many drugs are chiral compounds and are administered as racemates. They often exhibit stereoselectivity of absorption, distribution, receptor binding, metabolism or excretion (10). Mexiletine is administered as a racemic drug : equimolar mixture of two enantiomers. Three studies have been reported about the enantiomers of mexiletine. One showed glucuronidation stereoselectivity (11), an other serum-protein binding enantioselectivity in man (12), and recently, differential tissue distribution of mexiletine enantiomers has been demonstrated in rats (13).

In this work, we used human liver microsomes (i) to study *in vitro* the oxidation of mexiletine enantiomers searching an eventual stereoselectivity and (ii) to determine the relation between enantiomers oxidation and debrisoquine-type genetic polymorphism.

## MATERIALS AND METHODS

### *Chemicals*

Racemic mexiletine (hydrochloride), S(+) and R(-) mexiletine (hydrochloride) and the synthetic references metabolites : *p*-hydroxymexiletine (Kö 2127, hydrochloride) and hydroxymethylmexiletine (Kö 2259, oxalate) as well as the internal standard (Kö 5271, oxalate) were generously provided by Boehringer Ingelheim (Reims, France). Dextrometorphan bromohydrate was a gift from the Laboratoires Norgan (Paris, France). Dextrorphan tartrate was generously provided by Hoffman-La Roche (Basle, Switzerland).

Anhydrous quinidine,  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (sodium salt) (NADP), DL-isocitrate (trisodium salt), isocitrate deshydrogenase (type 4) and bovine serum albumin (fraction V) were supplied by Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA). All other chemicals were analytical-reagent grade and obtained from common commercial sources.

### *Source of human livers and preparation of microsomal fractions*

Histologically normal human liver samples were obtained from patients shortly after circulatory arrest. Samples were cut into small pieces and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The approval of the local University Ethics Committee was previously obtained to use human liver samples for drug metabolism studies.

Liver microsomes were obtained after differential ultracentrifugation as previously described (14). Liver samples were washed with cold 0,9% NaCl solution and homogenized in ice cold buffer (0,1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1mM EDTA, 1mM ( $\pm$ )-dithiothreitol, pH7.4) using an Ultra-Turrax homogenizer. All manipulations were carried out in a cold chamber. Post-mitochondrial supernatant was obtained by centrifugation of the homogenate during 1 minute and then 20 minutes at 10500g (Sigma 2K15 centrifuge, Bioblock, Illkirch, France) at 4°C. Microsomes were sedimented

by ultracentrifugation at 103000 g (Beckman centrifuge L8-55M; Beckman rotor SW 60TI, Gagny, France) for 60 minutes at 4°C. This ultracentrifugation is carried 2 more times. Pellets were resuspended in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing 20% v/v glycerol and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Proteins concentrations of the microsomal preparations were measured by the method of Lowry *et al.* using crystalline bovine serum albumine (fraction V) as standard (15).

#### *Assay conditions of mexiletine hydroxylation in human liver microsomes*

Incubation mixtures with racemate, S(+) or R(-)-mexiletine as substrates were carried out as previously described (16). Briefly, reaction mixtures (total volume 1.2 ml) contained an NADPH-generating system and racemate or S(+) or R(-)-mexiletine at concentrations from 3.3 to 133.3 µM in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4. After a 15 min preincubation period, reaction was started by addition of liver microsomal preparation (1.6 mg protein / ml). After 30 min at 37°C, the reaction was stopped by the addition of 200 µl of 1M NaOH, 5 ml of ethylacetate and 200 µl of internal standard solution (3 µg.ml<sup>-1</sup> Kö 5271).

The *p*-hydroxymexiletine and hydroxymethylmexiletine were extracted and assayed by high performance liquid chromatography with fluorescence detection (16).

In experiments investigating the effect of quinidine on mexiletine enantiomers oxidation, S(+) or R(-)-mexiletine at 6.6, 13.3 and 41.6 µM were incubated without or with quinidine (0.02, 0.04 and 0.06 µM) in the conditions described above.

#### *Assay conditions of dextrometorphan O-demethylation in human liver microsomes*

Incubations for dextrometorphan O-demethylation were carried out as previously described (17). Briefly, the incubation mixture contained dextrometorphan between 0.82 and 310.2 µM and an NADPH-generating system in 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4. After a period of 15 min of preincubation, the reaction was started by addition of 100 µg of microsomal proteins in a total incubation volume of 245 µl. After 30 min at 37°C, the reaction was stopped by 15 µl of 60% perchloric acid. The external standard (100 µl of Kö 1307 (25 µg/ml)) was added and the mixture was centrifuged. Dextrophan was determined by high performance liquid chromatography in the same conditions than for mexiletine metabolism (16).

In inhibition experiments, S(+) or R(-)-mexiletine was added to the incubation mixture, at a final concentration of 10.2, 20.4 and 40.8 µM.

#### *CYP2D6 Genotyping*

CYP2D6 genotype of liver C was determined using Heim & Meyer method for D6-A and D6-B mutations (18) and Tyndale *et al* method (19) for D6-C mutation.

### Statistical analysis of the data

Maximum velocity ( $V_{max}$ ) and the Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) values for mexiletine hydroxylation were determined by regression analysis of Eadie-Hofstee plots. Mean  $\pm$  mean standard error (SE) of three determinations of  $V_{max}$  and  $K_m$  was calculated for each substrate and metabolic reaction. Intrinsic clearance was calculated by ratio  $V_{max}/K_m$ . Ratio of R(-)-mexiletine  $V_{max}$  / S(+)-mexiletine  $V_{max}$  is noted (-)/(+). Statistical difference between mexiletine enantiomers was tested using an unpaired t-test ( $p < 0.05$ ). For inhibition of mexiletine metabolism by quinidine,  $K_i$  values were obtained by graphical analysis of Dixon plots.

For dextrometorphan O-demethylation, kinetic parameters  $V_{max}$  and  $K_m$  were initially obtained by graphical analysis of Eadie-Hofstee plots. These values were used as first estimates in an iterative program based on non-linear regression analysis (20) to calculate values of  $K_m$  and  $V_{max}$  to fit the equation

$$V = \frac{V_{max_1} \cdot S}{K_{m_1} + S} + \frac{V_{max_2} \cdot S}{K_{m_2} + S}$$

$K_i$  values of dextrometorphan O-demethylation inhibition by mexiletine enantiomers were obtained by replacing estimated  $K_m$  and  $V_{max}$  values in equation of competitive inhibition.

## RESULTS

### Oxidation of mexiletine enantiomers.

PHM and HMM formation were studied in three human livers. Oxidation of R(-) and S(+)-mexiletine in PHM and HMM followed a Michaelis-Menten kinetics in each case (Fig.1). Enzymatic parameters  $K_m$  ( $\mu\text{M}$ ) and  $V_{max}$  (nmol of metabolite formed per mg of protein and per hour) of the two oxidations are presented in table I. The hydroxylations of racemate (16), R(-) and S(+)-mexiletine in human liver microsomes are described by single-site Michaelis-Menten kinetics over the range of concentration studied.

Results obtained with liver C microsomes were not included in the mean value.  $V_{max}$  value was 10-15 less important than others  $V_{max}$  values. This liver presents a weak activity. Genotype of liver C using primers to detect D6-A, D6-B and D6-C mutations was D6-wt/D6-B.

For parahydroxylation reaction,  $K_m$  values of S(+)-mexiletine are smaller than R(-)-mexiletine  $K_m$  values.  $V_{max}$  values of the two stereoisomers are similar for the experiments A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> and B. Considering mean values, there is no significative difference between the two enantiomers for  $K_m$  and  $V_{max}$  using an unpaired t-test :  $K_m$  S(+)-mexiletine  $10.317 \pm 2.044$  ;  $K_m$  R(-)-mexiletine  $19.529 \pm 4.950$  ;  $V_{max}$  S(+)-mexiletine  $1.795 \pm 0.399$  and  $V_{max}$  R(-)-mexiletine  $1.629 \pm 0.444$  (mean  $\pm$  SE) (SE is standard error of mean) (table I).

Table I

Enzymatic parameters of *in vitro* mexiletine enantiomers hydroxylations

	Human Livers	$K_m^*$			$V_{max}^*$		
		R(-)	S(+)	rac	R(-)	S(+)	rac
PHM	A1	10.555	7.625	23.495	0.741	1.025	1.908
	A2	27.636	14.327	13.464	2.049	1.996	1.037
	B	20.396	9.000	14.120	2.098	2.365	2.009
	mean	19.529	10.317	17.026	1.629	1.795	1.651
	SE	4.950	2.044	3.239	0.444	0.399	0.308
	C	15.354	32.360	29.808	0.136	0.178	0.177
HMM	A1	10.898	17.114	14.702	1.140	0.603	1.225
	A2	19.039	18.320	12.572	1.777	0.644	0.725
	B	9.526	2.917	5.048	1.724	0.512	0.963
	mean	13.514	12.783	10.774	1.547	0.586	0.971
	SE	2.968	4.945	2.928	0.204	0.039	0.144
	C	8.812	5.240	28.545	0.194	0.424	0.171

\*  $K_m$  is expressed in  $\mu\text{M}$  and  $V_{max}$  in nmol of product per mg of protein and per hour. rac, racemate; PHM, *p*-hydroxymexiletine; HMM, hydroxymethylmexiletine. Two experiments were carried out on liver A ( $A_1$  and  $A_2$ ). For each other liver one experiment was made.

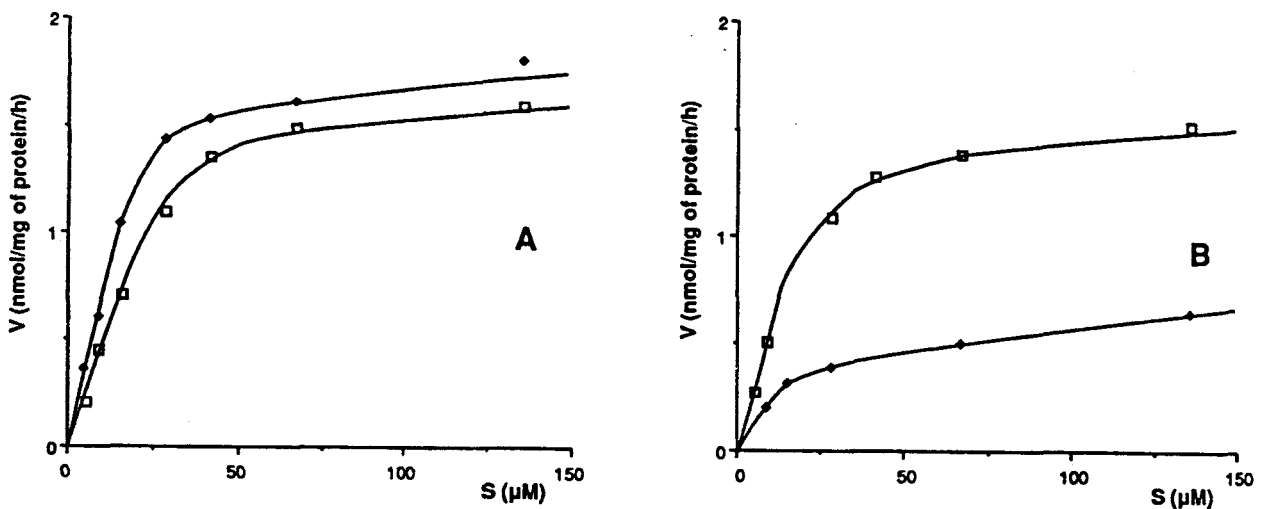


Fig.1: Formation of PHM (A) and HMM (B) from R(-) and S(+)-mexiletine in human liver A microsomes (experiment n 2).

□ R(-)-mexiletine    ♦ S(+)-mexiletine

Mean intrinsic clearance of S(+)-mexiletine is higher than mean clearance of R(-)-mexiletine ( $p < 0.05$ ) (Table II).

**Table II**

Intrinsic clearances and ratio (-)/(+) of mexiletine enantiomers hydroxylation.

	Human Livers	CLi*			Ratio (-)/(+)*
		R(-)	S(+)	rac	
PHM	A1	0.070	0.134	0.081	0.723
	A2	0.074	0.139	0.077	1.026
	B	0.103	0.262	0.142	0.887
	mean	0.082	0.178	0.100	0.878
	SE	0.010	0.041	0.021	0.087
	C	0.008	0.005	0.006	0.764
HMM	A1	0.104	0.035	0.083	1.890
	A2	0.093	0.035	0.057	2.759
	B	0.181	0.175	0.191	3.367
	mean	0.126	0.081	0.110	2.672
	SE	0.027	0.046	0.041	0.428
	C	0.022	0.081	0.006	0.457

\* CLi is ratio  $V_{max}/K_m$  (ml/h/mg of protein). Ratio (-)/(+) is  $V_{max} R(-)/V_{max} S(+)$ . rac, racemate; PHM, *p*-hydroxymexiletine; HMM, hydroxymethylmexiletine.

For aliphatic hydroxylation,  $K_m$  mean values present no significant difference between the stereoisomers :  $13.154 \pm 2.968$  for R(-)-mexiletine and  $12.783 \pm 4.945$  for S(+)-mexiletine (mean  $\pm$  SE) (Table I).  $V_{max}$  values of R(-)-mexiletine are higher than  $V_{max}$  values of S(+)-mexiletine for the experiments A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> and B. Unpaired t-test showed that  $V_{max}$  of R(-)-mexiletine ( $1.547 \pm 0.204$  ; mean  $\pm$  SE) is two to three fold higher than S(+)-mexiletine  $V_{max}$  ( $0.586 \pm 0.039$ ) ( $p < 0.05$ ) (Table I).

Ratio (-)/(+) was  $2.672 \pm 0.428$  (mean  $\pm$  SE) (Table II).

S(+)-mexiletine clearance for parahydroxylation  $0.178 \pm 0.041$  (mean  $\pm$  SE) is similar to R(-)-mexiletine clearance for aliphatic hydroxylation  $0.126 \pm 0.027$ . R(-)-mexiletine clearance for PHM  $0.082 \pm 0.01$  is similar to S(+)-mexiletine clearance for HMM  $0.081 \pm 0.046$  (Table II).

#### Relation of enantiomers oxidation with debrisoquine type genetic polymorphism

##### *Dextrometorphan metabolism inhibition by mexiletine enantiomers.*

Dextrometorphan O-demethylation studied in microsomes of human liver A exhibits biphasic kinetics (Fig.2). R(-) and S(+)-mexiletine selectively inhibit the high affinity component of dextrometorphan O-demethylation but had no effect on the low affinity component (Fig.2 and table III).

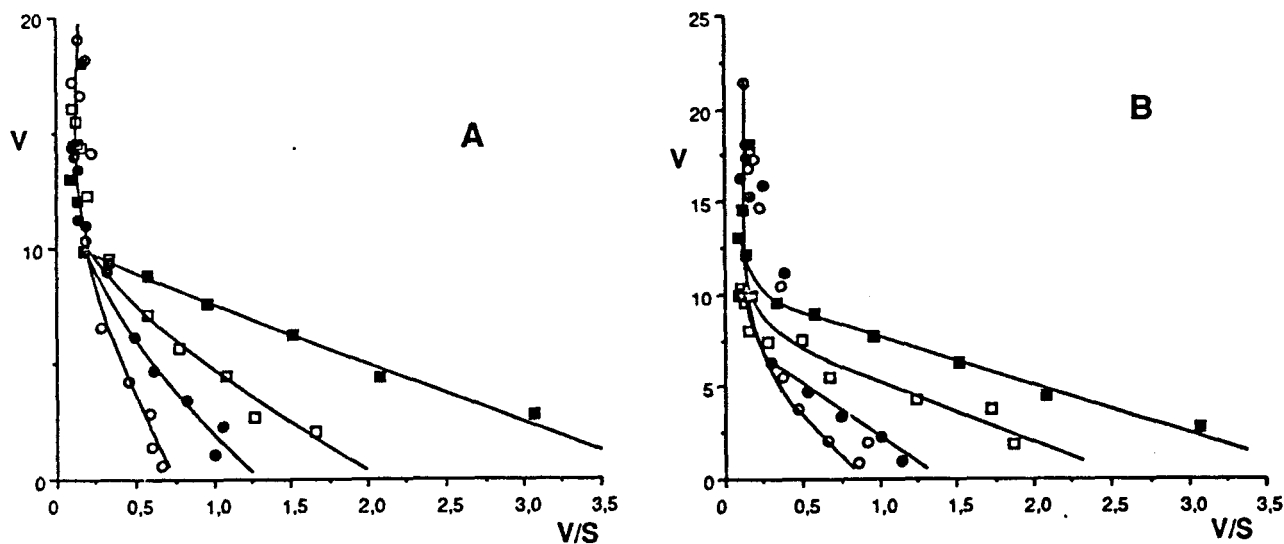


Fig. 2: Eadie-Hofstee plots of dextrometorphan O-demethylation by human liver microsomes (A) in absence and presence of R(-)-mexiletine (A) and S(+)-mexiletine (B). The lines are best fits of the data.

■ absence of mexiletine    □ mexiletine 10,2 M    ● mexiletine 20,4 M  
 ○ mexiletine 40,8 M

Table III

Michaelis-Menten parameters for dextrometorphan O-demethylation and inhibition constants ( $K_i$ ) by mexiletine enantiomers

	$K_m$ ( $\mu M$ )	$V_{max}$ (nmol/mg/h)	Inhibitor	$K_i$ ( $\mu M$ )
high affinity component	1,9	8,2	R(-)-mexiletine S(+)-mexiletine	4,8 17,8
low affinity component	140	10,4	-	-

*Mexiletine enantiomers oxidation inhibition by quinidine.*

Effect of quinidine on R(-) and S(+)-mexiletine was studied in microsomes of human liver A. Dixon plots of PHM and HMM formation by mexiletine enantiomers with and without quinidine are presented in Fig.3. The inhibition values  $K_i$  found in each case are :

$K_i$ ( $\mu M$ )	R(-)	S(+)
PHM	0.008	0.003
HMM	0.007	0.006

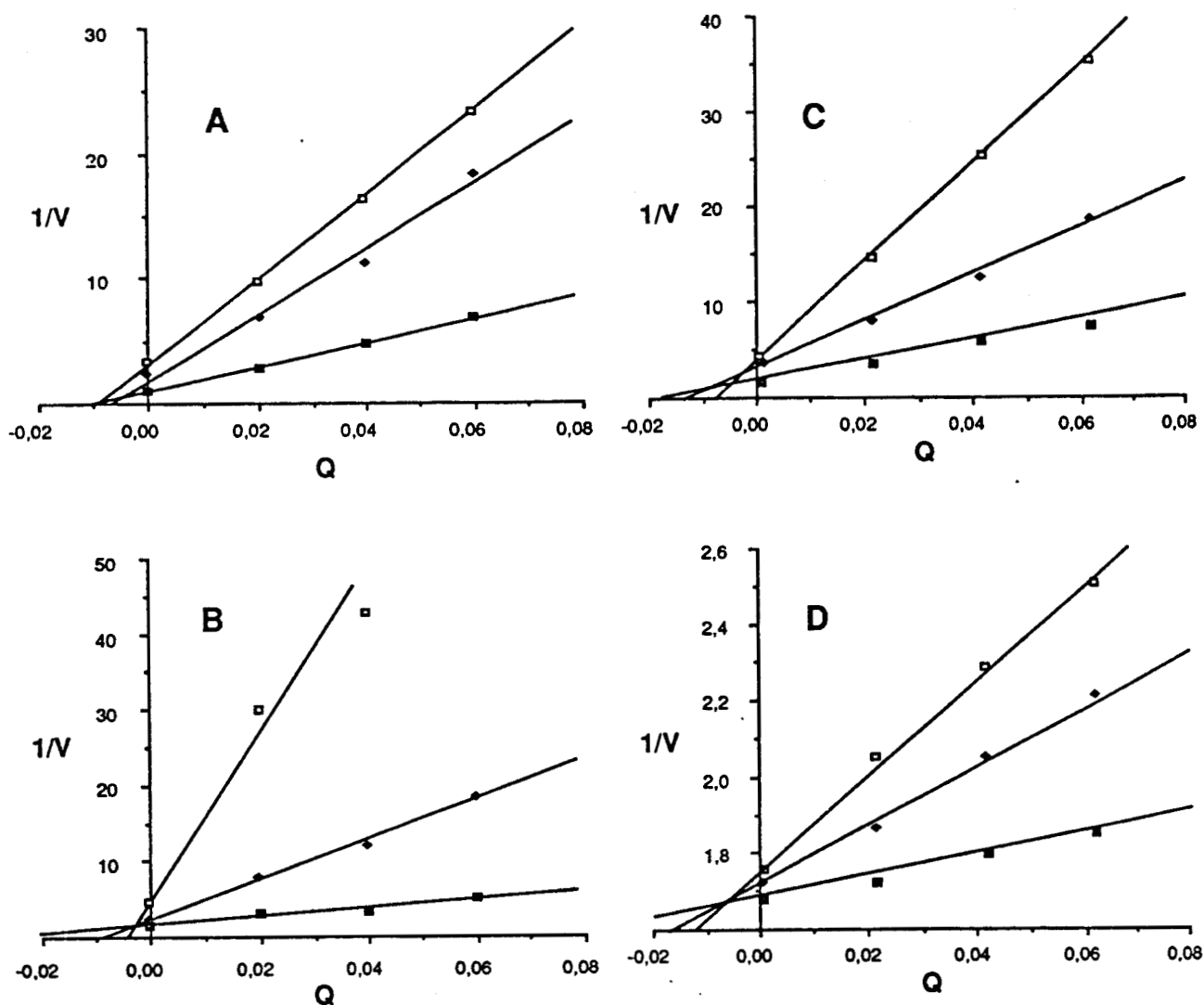


Fig.3 : Dixon plots of mexiletine hydroxylation inhibition by quinidine (Q) in human liver microsomes (Liver A).

A - Formation of PHM by R(-)-mexiletine

B - Formation of PHM by S(+)-mexiletine

C - Formation of HMM by R(-)-mexiletine

D - Formation of HMM by S(+)-mexiletine

■ 6,6 M,    ♦ 13,3 M,    □ 41,6 M of mexiletine.

## DISCUSSION

Mexiletine, a type 1b antiarrhythmic drug, is administered as a racemate. It is extensively metabolized in human liver microsomes principally by aliphatic and aromatic hydroxylation forming hydroxymethylmexiletine (HMM) and *p*-hydroxymexiletine (PHM) respectively (16). In

*vitro*, the formation of the two major metabolites of racemic mexiletine is predominantly catalysed by the genetically variable P450IID6 (14). The relationship of racemic mexiletine metabolism to the debrisoquine/sparteine type polymorphism of drug oxidation has also been demonstrated *in vivo* (4).

In this *in vitro* study, stereoselectivity of mexiletine hydroxylations was demonstrated in two human livers (A and B).

Hydroxylations of mexiletine enantiomers and racemate were described by single-site Michaelis-Menten kinetics over the range of concentration studied. This suggests the implication of one enzyme in each hydroxylation (16).

Results obtained with liver C microsomes were not included in the mean value.  $V_{max}$  value was 10 to 15 less important than others  $V_{max}$  values. Liver C genotype for P450IID6 was D6-wt/D6-B. The debrisoquine/sparteine type polymorphism corresponds to abnormalities of the CYP2D6 gene which transmission is autosomal recessive. This liver shows, consequently, an extensive metabolizer genotype. In most cases, extensive metabolizer genotype means extensive metabolizer phenotype. However, 5% of the D6-wt/D6-wt subjects are poor metabolizers suggesting the existence of unidentified mutations (21). Liver C could correspond to a D6-wt/D6-B genotype with unidentified mutations on wild type allele and could also possess a poor metabolizer phenotype although this pattern has not been already described. Weak  $V_{max}$  values could also be explained by a weak P450 amount or by a too long delay between congelation and prelevement.

Parahydroxylation in human liver microsomes (A and B) of S(+)-mexiletine is more rapid than R(-)-mexiletine. No significative differences were found for the Michaelis-Menten parameters  $V_{max}$  and  $K_m$  although intrinsic clearance of S(+)-mexiletine is higher than for R(-)-mexiletine ( $p < 0.05$ ). More experiments would be necessary to prove any differences between enzymatic parameters, although parahydroxylation seems to be in favour of S(+)-mexiletine.

R(-)-mexiletine clearance of aliphatic hydroxylation is higher than S(+)-mexiletine clearance in human livers A and B. This stereoselectivity is caused by a significative difference between the  $V_{max}$  of the two enantiomers. These results showed a marked stereoselectivity of the aliphatic hydroxylation of mexiletine in the livers studied. Such stereoselectivity could be explained by a difference of enantiomer behaviour at the catalytic site of the enzyme (22). Aliphatic hydroxylation seems to be in favour of R(-)-mexiletine.

Stereoselectivity of aliphatic hydroxylation appears opposite and more pronounced than stereoselectivity of parahydroxylation.

In this study, we demonstrate stereoselectivity of two metabolic processes of mexiletine in two human livers. It is also important to consider others metabolic pathways (deamination, *N*-methylation, *N*-oxydation (2), conjugation by glucuronic acid (1), metahydroxylation (23)) and to study respective electrophysiologic activity and tissue distribution of mexiletine enantiomers.



Tissue distribution of mexiletine enantiomers was studied in rats. Stereoselective uptake was evident only in the liver and was 2.4 fold greater for S(+)-mexiletine (13).

Investigation of the relationship between mexiletine enantiomers hydroxylations and debrisoquine-type genetic polymorphism was performed by inhibition experiments. R(-) and S(+)-mexiletine selectively inhibit the high affinity component of dextrometorphan O-demethylation which parallels debrisoquine 4-hydroxylation. These reactions are prototype reaction of P450IID6 activity. Mexiletine enantiomers have no effect on the low affinity component of dextrometorphan O-demethylation which is not under the control of the sparteine/debrisoquine type genetic polymorphism of drug oxidation and exhibits much higher kinetic parameters. Competitive inhibition of dextrometorphan O-demethylation by R(-) and S(+)-mexiletine is a proof that the two enantiomers specifically bind to P450IID6 catalytic site.

Quinidine was a very potent inhibitor of PHM and HMM formation by R(-) and S(+)-mexiletine *in vitro*. These results provide evidence of the P450IID6 implication in hydroxylations of the two enantiomers. Numerous studies showed that quinidine was a very potent inhibitor of P450IID6 activity, particularly of racemic mexiletine hydroxylation (16-24).

P450IID6 role in aliphatic and aromatic hydroxylation of racemate was previously demonstrated (16) in human liver microsomes and also *in vivo* (4, ). This study showed the existence of a stereoselectivity of mexiletine oxidation *in vitro*. Oxidation stereoselectivity by P450IID6 was demonstrated for others drugs such as propranolol (25), bufuralol (26), metoprolol, propafenone and debrisoquine (27).

In conclusion, stereoselectivity of aromatic and aliphatic hydroxylations of mexiletine in microsomes of two human livers has been demonstrated. The implication of the polymorphic cytochrome P450IID6 in the aromatic and aliphatic hydroxylations of R(-) and S(+)-mexiletine has also been established.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Boehringer Ingelheim Laboratories, Reims, France.

#### REFERENCES

- 1- Prescott LF, Clements JA, Pottage A. Absorption, distribution and elimination of mexiletine. *Postgrad. Med. J.* 1977; 53 (1): 50-55.
- 2- Beckett AH, Chidomere EC. The distribution, metabolism and excretion of mexiletine in man. *Postgrad. Med. J.* 1977; 53 (1): 60-66.
- 3- Campbell NPS, Kelly JG, Adgey AAJ, Shanks RG. The clinical pharmacology of mexiletine. *Br.J.clin.Pharmac.* 1978; 6: 103-108.

- 4- Broly F, Vandamme N, Libersa C, Lhermitte M. The metabolism of mexiletine in relationship to the debrisoquine/sparteine-type polymorphism of drug oxidation. *Br.J.clin.Pharmac.* 1991; 32: 459-466.
- 5- Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet* 1977; II: 584-86.
- 6- Steiner E, Iselius L, Alvan G, Lindstenand J, Sjöqvist F. A family study of genetic and environmental factors determining polymorphic hydroxylation of debrisoquine. *Clin.Pharmacol.Ther.* 1985; 38: 394-401.
- 7- Evans DAP, Mahgoub A, Sloan TP, Idle JR, Smith RL. A family and population study of the genetic polymorphism of debrisoquine oxidation in a white british population. *J.Med.Genet.* 1980; 17: 102-105.
- 8- Gonzalez FJ, Meyer UA. Molecular genetics of the debrisoquine-sparteine polymorphism. *Clin.Pharmacol.Ther.* 1991; 50 (3) 233-38.
- 9- Alvan G. Clinical consequences of polymorphic drug oxidation. *Fundam.Clin.Pharmacol.* 1991; 5: 209-28.
- 10- Jamali F, Mehvar R, Pasutto FM. Enantioselective aspects of drug action and disposition: therapeutic pitfalls. *J.Pharm.Sci.* 1989; 78 (9) 695-715.
- 11- Grech-Belanger O, Turgeon J, Gilbert M. Stereoselective disposition of mexiletine in man. *Br.J.clin.Pharmac.* 1986; 21: 481-487.
- 12- Igwemezie L, Kerr CR, McErlane KM. The pharmacokinetics of the enantiomers of mexiletine in humans. *Xenobiotica* 1989; 19 (6): 677-82.
- 13- Igwemezie L, Beatch GN, Walker MJA, McErlane KM. Tissue distribution of mexiletine enantiomers in rats. *Xenobiotica* 1991; 21 (9):1153-58.
- 14- Broly F, Libersa C, Lhermitte M, Bechtel P, Dupuis B. Effect of quinidine on the dextrometorphan O-demethylase activity of microsomal fractions from human liver. *Br.J.clin.Pharmac.* 1989; 28: 29-36.
- 15- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randa RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 1951; 193: 265-75.
- 16- Broly F, Libersa C, Lhermitte M. Mexiletine metabolism *in vitro* by human liver. *Drug Metab. and Dispos.* 1990; 18: 362-69.
- 17- Broly F, Libersa C, Lhermitte M, Dupuis B. Inhibitory studies of mexiletine and dextrometorphan oxidation in human liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 1990; 39: 1045-53.
- 18- Heim M., Meyer U.A. Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele-specific PCR amplification. *Lancet* 1990; 336: 529-32.
- 19- Tyndale R., Aoyama T., Broly F., Matsunaga T., Inaba T., Kalow W., Gelboin H.V., Meyer U.A., Gonzalez F.J. Identification of a new variant CYP2D6 allele lacking the codon encoding Lys-281: possible association with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics* 1991; 1: 26-32.
- 20- Koeppe P, Hamann C. A program for non-linear regression analysis to be used on desk-top computers. *Computer Programs in Biomedicine* 1980; 12: 121-28.

- 21- Broly F, Gaedigk A, Heim M, Eichelbaum M, Morike K, Meyer UA. Debrisoquine/sparteine hydroxylation genotype and phenotype: analysis of common mutations and alleles of *CYP2D6* in a European population. *DNA Cell Biol.* 1991; 10 (8): 545-58.
- 22- Testa B. Substrate and product stereoselectivity in monooxygenase-mediated drug activation and inactivation. *Biochem. Pharmacol.* 1988; 37 (1): 85-92.
- 23- Grech-Bélanger O, Turgeon J, Lalande M, Bélanger PM. Meta-hydroxymexiletine, a new metabolite of mexiletine: isolation characterization and species differences in its formation. *Drug Metab. and Dispos.* 1991; 19: 458-61.
- 24- Broly F, Vandamme N, Lhermitte M, Caron J, Libersa C. Inhibition *in vitro* et *in vivo* du métabolisme oxydatif de la mexilétine par la quinidine. In: Brès J, Panis G, eds. *Pharmacocinétique: de la recherche à la clinique.* John Libbey Eurotext©. 1992: 421-23.
- 25- Otton SV, Gillam EMJ, Lennard MS, Tucker GT, Woods HF. Propranolol oxidation by human liver microsomes - the use of cumene hydroperoxide to probe isoenzyme specificity and regio- and stereoselectivity. *Br.J.clin.Pharmac.* 1990; 30: 751-60.
- 26- Meyer UA, Gut J, Kronbach T, Skoda C, Meier UT, Catin T, Dayer P. The molecular mechanisms of two common polymorphisms of drug oxidation - evidence for functional changes in cytochrome P-450 isozymes catalysing bufuralol and mephenytoin oxidation. *Xenobiotica* 1986; 16(5): 449-64.
- 27- Eichelbaum M. Pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences of stereoselective drug metabolism in man. *Biochem. Pharmacol.* 1988; 37 (1):93-96.

## **CONCLUSION**

La mexilétine est un antiarythmique cardiaque dont le comportement pharmacocinétique est caractérisé par de larges variations interindividuelles. Les concentrations obtenues à l'état d'équilibre chez les patients traités par la mexilétine varient de façon importante et rendent délicate l'utilisation de ce médicament dont l'index thérapeutique est étroit.

Des risques de sous-dosage ou de surdosage, dus à ces fluctuations, peuvent apparaître, posant le problème à la fois de l'efficacité du traitement et de la sécurité du malade. La mesure du taux sanguin du médicament est une aide biologique qui permet d'adapter la posologie *a posteriori*. Pour essayer de comprendre *a priori* les fluctuations pharmacocinétiques de la mexilétine, il est important de connaître tous les facteurs qui peuvent en être la cause. Certains facteurs environnementaux, physiologiques ou pathologiques (voir revue générale) influençant la pharmacocinétique de la mexilétine ont été mis en évidence. Mais leur contribution à ces variations est relativement peu importante.

Le métabolisme hépatique de la mexilétine est un déterminant majeur de son comportement pharmacocinétique. Comme de nombreux médicaments, la mexilétine est métabolisée par la voie des cytochromes P450. Les voies principales de son métabolisme sont l'hydroxylation aromatique et aliphatique. Des études *in vitro* sur des microsomes de foies humains avaient permis de montrer que le P450IID6, cible d'un polymorphisme génétique aujourd'hui bien connu, était responsable des hydroxylations aromatique et aliphatique de la mexilétine. L'existence d'un lien entre le métabolisme oxydatif de la mexilétine et le polymorphisme génétique d'oxydation de type débrisoquine/spartéine a été suspecté pour expliquer ces variations interindividuelles.

Dans un premier temps, des études du métabolisme de la mexilétine *in vivo* chez l'homme ont été réalisées. Elles ont permis de mettre en évidence une relation entre ce polymorphisme génétique et les deux voies métaboliques majeures de la mexilétine. Le cytochrome P450IID6 est donc principalement responsable de la formation de *p*-hydroxymexilétine et d'hydroxyméthylmexilétine.

L'étude *in vitro* de l'association de quinidine, puissant inhibiteur du P450IID6, et de mexilétine a permis de conforter ces résultats et de montrer que la quinidine inhibait de façon importante l'oxydation de la mexilétine. Ce résultat a été retrouvé *in vivo* puisque l'administration de quinidine modifie le phénotype des patients traités. Les sujets métaboliseurs extensifs de la débrisoquine (et de la mexilétine) ont un phénotype métaboliseur limité après administration de quinidine. Ces résultats apportent une confirmation supplémentaire de l'implication du P450IID6 dans les deux voies d'hydroxylation étudiées.

Il est donc clair, à présent, que le cytochrome P450IID6 joue un rôle important dans le métabolisme de la mexilétine puisque les hydroxylations aromatique et aliphatique représentent une part importante de l'élimination de la mexilétine. Le polymorphisme génétique de type débrisoquine/spartéine contribue donc certainement aux variations interindividuelles de l'élimination de la mexilétine.

La mexilétine est administrée sous forme de racémique, mélange équimolaire de deux énantiomères. Le cytochrome P450IID6 étant stéréosélectif pour certains de ses substrats, nous avons donc voulu déterminer si l'hydroxylation de l'un ou l'autre énantiomère par le cytochrome P450IID6 se faisait de façon préférentielle, c'est à dire, si ces réactions sont stéréosélectives. Dans ce cas, une différence de métabolisation des énantiomères pourrait également contribuer aux variations pharmacocinétiques.

*In vitro* sur des microsomes de foies humains, les hydroxylations aromatique et aliphatique de la mexilétine sont stéréosélectives et catalysées par le cytochrome P450IID6. Cependant pour s'assurer de ces résultats, l'expérience devrait être répétée sur d'autres foies et en particulier des foies de sujets métaboliseurs limités. Une étude *in vivo* des hydroxylations des énantiomères de la mexilétine serait également souhaitable pour appuyer les résultats obtenus *in vitro*. D'autres aspects du métabolisme des énantiomères sont également importants à connaître : l'éventuelle existence d'interactions énantiomère/énantiomère (c'est le cas de la propafénone) et la glucuronoconjugaison des énantiomères de la mexilétine puisqu'elle est une voie métabolique importante de la mexilétine racémique. En dehors de l'aspect stéréosélectif du métabolisme de la mexilétine, il serait également intéressant de déterminer les activités électrophysiologiques respectives de ses énantiomères.

Les réactions d'hydroxylations aromatique et aliphatique de la mexilétine qu'elle soit racémique (c'est le cas en clinique) ou sous forme d'énantiomères sont catalysées par le cytochrome P450IID6. Ces réactions sont donc soumises au polymorphisme génétique d'oxydation de type débrisoquine/spartéine.

L'implication de ce polymorphisme dans le métabolisme hépatique de la mexilétine permet d'expliquer, au moins en partie, les variations interindividuelles du comportement pharmacocinétique de la mexilétine.

