

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Implication des interactions médicamenteuses, des transporteurs membranaires,
du sexe et du diabète dans les mécanismes de survenue du syndrome du QT long
médicamenteux**

par

Raymond Hreiche

Faculté de Pharmacie

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

En Sciences Pharmaceutiques

Option Pharmacologie

Juillet 2008



©Raymond Hreiche, 2008

W

4

US8

2009

V¹⁰⁰



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Implication des interactions médicamenteuses, des transporteurs membranaires,
du sexe et du diabète dans les mécanismes de survenue du syndrome du QT long
médicamenteux.**

présentée par :

Raymond Hreiche

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Sylvie Marleau

Président-rapporteur

Jacques Turgeon

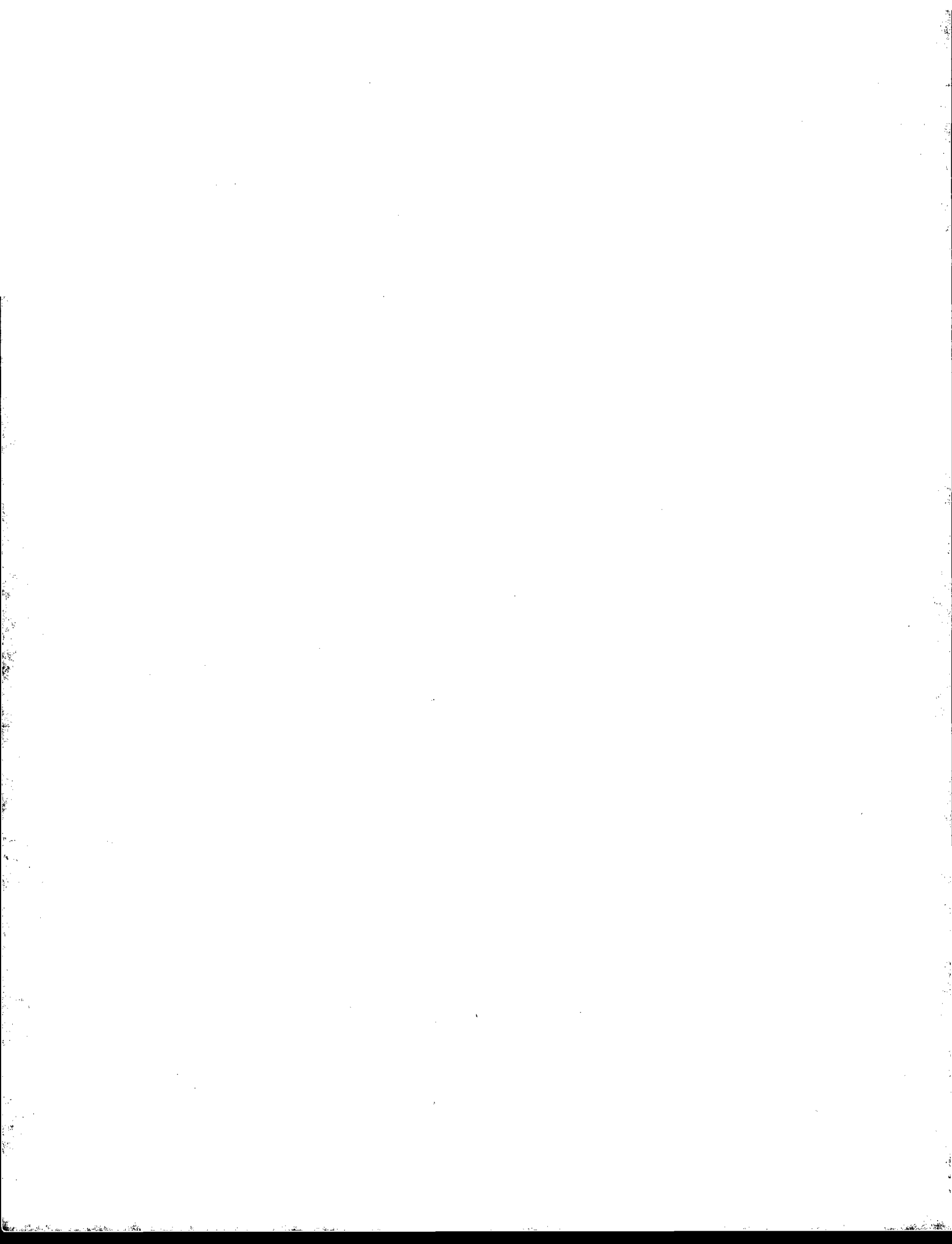
Directeur de recherche

Lucie Parent

Membre du jury

Robert Dumaine

Examineur externe



Résumé français

Plusieurs médicaments de diverses classes pharmacologiques ont été impliqués dans la genèse de phénomènes proarythmiques connus sous le nom de syndrome du QT long (LQTS) médicamenteux. Les manifestations électrophysiologiques principales de ce syndrome sont les torsades de pointes (TdP) qui peuvent être associées à une mort subite. De plus, il existe une variabilité interindividuelle très significative dans la réponse à ces médicaments, avec une prépondérance plus importante chez les femmes, sans que cette variabilité soit bien élucidée pour une meilleure prévention. Ainsi, un médicament connu pour prolonger l'intervalle QT n'induit pas de phénomènes proarythmiques importants que chez une très faible minorité de personnes, ces derniers présentant généralement des facteurs prédisposants. Plusieurs de ces facteurs de risque n'ont pas de mécanisme bien élucidé pouvant expliquer la manière dont ils favorisent l'occurrence de TdP. Pour cela, l'objectif principal de ces travaux de doctorat était de mieux comprendre et de proposer de nouveaux mécanismes concernant le sexe féminin, les interactions médicamenteuses, l'effet des transporteurs membranaires et le diabète comme facteurs prédisposant au LQTS médicamenteux. Pour arriver à cette fin, deux techniques complémentaires d'électrophysiologie ont été utilisées, i.e. la perfusion de cœurs isolés de cobayes, et la technique de patch-clamp en configuration de cellule entière.

Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux différences liées au sexe dans le LQTS médicamenteux, nous avons évalué dans le chapitre II chez des cobayes mâles et femelles en âge pré-pubertaire les différences liées au sexe dans la prolongation de la repolarisation cardiaque sous les conditions de blocage d' I_{Kr} , d' I_{Ks} , et d'un blocage

concomitant d' I_{Kr}/I_{Ks} . Nos résultats ont démontré une différence liée au sexe lors d'un blocage d' I_{Ks} avec l'indapamide et non avec les bloqueurs d' I_{Kr} . Dans le chapitre III, nous avons démontré que l'administration concomitante de deux bloqueurs d' I_{Kr} induisait un effet additif partiel et non synergique. De plus, nous avons démontré pour la première fois que l'ordre d'administration séquentielle de deux bloqueurs d' I_{Kr} était un facteur important de prolongation de la repolarisation cardiaque. Dans le chapitre IV, nous avons trouvé pour la première fois une interaction physique très étroite entre le gène humain ether-a-go-go (HERG) et P-glycoprotéine (P-gp) dans les cardiomyocytes humains et de cobayes. De plus, nous avons démontré que l'expression de P-gp, un transporteur membranaire d'efflux, diminuait l'effet inhibant de la dompéridone sur I_{Kr} . Dans le chapitre V, nous avons conclu que l'hypo- et l'hyperglycémie induisaient une augmentation des effets de la dofétilide, un bloqueur d' I_{Kr} , sur la repolarisation ventriculaire, sans aucun effet significatif observé avec le bloqueur d' I_{Ks} , ni avec l'association du blocage d' I_{Kr}/I_{Ks} . Nous suggérons ainsi pour la première fois que le niveau de glycémie est un déterminant majeur du blocage d' I_{Kr} , et joue donc un rôle important dans le LQTS médicamenteux.

Tous ces résultats nous mènent à une meilleure compréhension des variabilités interindividuelles et des différences reliées aux sexes observées dans le LQTS et les TdP d'origine médicamenteuse. Ceci aboutira à une meilleure gestion/utilisation des médicaments à potentiel arythmogénique connu chez les patients à risque.

Mots clés : LQTS, intervalle QT, sexe, interactions médicamenteuses, P-glycoprotéine, repolarisation cardiaque, transporteurs ABC, diabète, HERG, torsades de pointes.

Résumé anglais

Several drugs from different therapeutic families have been implicated in the genesis of proarrhythmias known as drug-induced long QT syndrome (LQTS). The major clinical manifestation of this syndrome is torsades de pointes (TdP), which could lead to sudden death. Furthermore, a significant, partially explained, interindividual variability exists in the response to these drugs, with a higher occurrence in women. Thus, a QT interval prolonging drug will induce proarrhythmic incidents only in few treated patients; it seems that the latter present some predisposing factors to the drug-induced LQTS. However, many of these factors are poorly or partially understood. Therefore, the main objective of this doctorate is to better understand and to offer innovative mechanisms explaining the role of female gender, drug-drug interactions, membrane transporters and diabetes/glycemia fluctuations as predisposing factors to drug-induced LQTS. Two complementary techniques in cardiac electrophysiology were utilized to assess our objectives, i.e. perfusion of isolated hearts from guinea pigs, and the patch clamp technique in whole cell mode.

In order to better understand the underlying mechanisms in sex-related differences in drug-induced LQTS, we assessed in chapter II in pre-pubertal male and female guinea pigs sex-related differences in the prolongation of cardiac repolarisation under I_{Kr} , I_{Ks} , and I_{Kr}/I_{Ks} blockade. Our results demonstrated that a sex-related difference exists when I_{Ks} is blocked (with indapamide) and not with I_{Kr} blockers. In chapter III, we demonstrated that the concomitant administration of two I_{Kr} blockers induces a partial additive effect, not a synergistic one. Moreover, we showed for the first time that the order of sequential administration of two I_{Kr} blockers was an important factor to be

considered in the prolongation of cardiac repolarisation. In chapter IV, we demonstrated for the first time the existence of a close physical interaction between HERG and P-gp in human and guinea pigs cardiomyocytes. Furthermore, we showed that the expression of P-gp, an efflux membrane transporter, decreases the inhibitory effect of domperidone on I_{Kr} . In chapter V, we concluded that hypo- and hyperglycemia induce an increase in the inhibitory effects of dofetilide on I_{Kr} current, without any significant effects on I_{Ks} blockers, neither under I_{Kr}/I_{Ks} blockade. We therefore suggested, for the first time, that glycemia level is a major determinant in I_{Kr} block and plays therefore an important role in drug-induced LQTS.

These results lead to a better understanding of interindividual variabilities and gender-related differences observed during drug-induced LQTS and TdP. Moreover, these results will help to better manage/utilize drugs with known potential arrhythmogenicity in high risk patients.

Key words: LQTS, QT interval, sex, drug-drug interactions, P-glycoprotein, cardiac repolarization, ABC transporters, diabetes, HERG, torsades de pointes.

Table des matières

Résumé français -----	i
Résumé anglais-----	iii
Table des matières-----	v
Liste des tableaux-----	x
Liste des figures-----	xi
Liste des abréviations-----	xii
Remerciements-----	xiv
CHAPITRE I-----	1
INTRODUCTION-----	1
1. Électrophysiologie cardiaque-----	2
1.1. Potentiel d'action et électrocardiogramme de surface-----	3
1.2. Repolarisation cardiaque -----	6
1.3. Dysrythmies cardiaques -----	8
1.3.1 Les arythmies auriculaires -----	9
1.3.2 Les arythmies jonctionnelles -----	10
1.3.3 Les arythmies ventriculaires -----	10
2. Syndrome du QT long (LQTS)-----	11
2.1. LQTS congénital-----	11
2.1.1 Historique-----	11
2.1.2 Épidémiologie-----	12
2.1.3 Traitement/Gestion des patients LQTS -----	14
2.2. LQTS médicamenteux -----	17
2.2.1. Historique -----	17
2.2.2. Incidence -----	19
2.2.2. Manifestations et complications-----	19
2.2.2.1. <i>Post-dépolariations précoces</i> -----	20
2.2.2.2. <i>Développement des Torsades de Pointes (TdP)</i> -----	23
2.2.3. Facteurs de risque prédisposants -----	26
2.2.3.1. <i>D'origine cardiaque</i> -----	26
2.2.3.2. <i>D'origine non cardiaque</i> -----	29
2.2.4. Traitement du LQTS et TdP d'origine médicamenteuse -----	32
3. Autres facteurs de risque d'intérêt prédisposant au LQTS médicamenteux-----	33
3.1. Le sexe féminin-----	33
3.1.1. Études cliniques-----	33
3.1.2. Mécanismes hormonaux et physiologiques -----	34
3.2. Interactions médicamenteuses de type pharmacocinétique -----	37
3.2.1. Les cytochromes P450-----	37
3.2.1.1. <i>Le métabolisme des médicaments : un petit rappel</i> -----	37
3.2.1.2. <i>Définitions et fonctions des CYPs</i> -----	39

3.2.1.3. La sous-famille CYP3A : substrats, inducteurs et inhibiteurs-----	40
3.2.1.3. Variabilité interindividuelle / Polymorphismes -----	43
3.2.1.4. Modulation des CYPs et interactions médicamenteuses -----	44
3.2.1.5. Modulation des CYPs comme facteur de risque du LQTS médicamenteux-----	47
3.2.2. Les transporteurs membranaires-----	48
3.2.2.1. La superfamille des transporteurs ABC-----	48
3.2.2.2. La superfamille des transporteurs SLC -----	52
3.2.2.3. Variabilité interindividuelle / Polymorphismes -----	55
3.2.2.4. Expression cardiaque des transporteurs ABC et SLC-----	58
3.2.2.5. Modulation des transporteurs : Interactions médicamenteuses et LQTS -----	58
3.3.1. Triple affinité pour I_{Kr} , CYP3A et P-gp : une triade intrigante -----	61
3.3. Interactions médicamenteuses de type pharmacologique -----	63
3.3.1. Prise simultanée de deux ou plusieurs bloqueurs d' I_{Kr} -----	63
3.3.2. Association d'un bloqueur d' I_{Kr} et d'un bloqueur d' I_{Ks} -----	64
3.4. Variations de la glycémie et rôle du diabète -----	65
4. Mise en perspective et objectifs de recherche-----	67
RÉFÉRENCES-----	71
CHAPITRE II-----	100
GENDER-RELATED DIFFERENCES IN DRUG-INDUCED PROLONGATION OF CARDIAC REPOLARIZATION IN PRE-PUBERTAL GUINEA PIGS -----	100
1. Résumé-----	102
2. Abstract-----	104
3. Introduction-----	105
4. Methods-----	108
5. Results-----	111
6. Discussion -----	115
7. Conclusion-----	120
8. References -----	121
9. Figure Legends -----	126
CHAPITRE III -----	132
LENGTHENING OF CARDIAC REPOLARIZATION IN ISOLATED GUINEA PIGS HEARTS BY SEQUENTIAL OR CONCOMITANT ADMINISTRATION OF TWO I_{KR} BLOCKERS-----	132
1. Résumé-----	134

2. Abstract	136
3. Introduction	138
4. Methods	141
5. Results	147
6. Discussion	152
7. Conclusion	152
8. References	159
9. Table Legends	166
10. Figure Legends	169
 CHAPITRE IV	 176
 DEMONSTRATION OF A CLOSE PHYSICAL INTERACTION BETWEEN HERG AND P-GLYCOPROTEIN: A POTENTIAL ROLE IN DRUG-INDUCED LONG QT SYNDROME	 176
1. Résumé	178
2. Abstract	179
3. Introduction	180
4. Methods	182
5. Results	187
6. Discussion	189
7. Conclusion	192
8. References	193
9. Figure Legends	198
 CHAPITRE V	 205
 IMPACT OF GLUCOSE CONCENTRATION ON CARDIAC VENTRICULAR REPOLARIZATION UNDER I_{KR}/I_{KS} BLOCKING AGENTS	 205
1. Résumé	207
2. Abstract	209

3. Introduction	211
5. Results	218
6. Discussion	221
7. Conclusion	229
8. References	230
9. Figure Legends	239
CHAPITRE VI	248
Discussion Générale et Conclusion	248
RÉFÉRENCES	259
ANNEXE 1	261
DRUG-INDUCED LONG QT SYNDROME IN WOMEN: A REVIEW OF CURRENT EVIDENCE AND REMAINING GAPS	261
Abstract	263
Long QT Syndrome: Congenital versus Acquired	265
Predisposing Factors to Drug-Induced LQTS	266
Sex as a Major Risk Factor for Drug-Induced LQTS	268
Conclusions	277
References	278
Figure Legends	291
ANNEXE 2	294
ROLE OF ETHNICITY IN MANAGING CARDIOVASCULAR PATIENTS	294
Introduction	296
Environmental and cultural factors in treatment response	297
Role of genetic factors in treatment efficacy and toxicity	299

Towards an individualized therapy for better management of cardiovascular patients from ethnic minorities?-----	304
References -----	308
Table legends -----	315
Figure legends-----	319
ANNEXE 3-----	322
INTERACTIONS MEDICAMENTEUSES ET RISQUE DE TORSADES DE POINTES-----	322
Résumé -----	324
Présentation du cas clinique-----	325
Le syndrome du QT long médicamenteux et les torsades de pointes -----	325
Facteurs prédisposant au LQTS médicamenteux et aux TdP-----	326
Conclusion -----	335
Références -----	336
Tableaux -----	339
Figures-----	341
ANNEXE IV -----	344
DÉCLARATION DES COAUTEURS-----	344

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux courants ioniques impliqués dans la repolarisation cardiaque	7
Tableau 2 : Bases moléculaires du LQTS congénital.....	13
Tableau 3 : Médicaments non-antiarythmiques qui peuvent prolonger l'intervalle QT.....	18
Tableau 4 : Quelques médicaments inhibiteurs, substrats ou inducteurs du CYP3A4.....	42
Tableau 5 : Classification des transporteurs ABC humains	50
Tableau 6 : Liste des familles de transporteurs SLC	54
Tableau 7 : Polymorphismes décrits dans les transporteurs ABC et SLC	57

Liste des figures

Figure 1 : Variabilité des potentiels d'action selon la région cardiaque	6
Figure 2 : Potentiel d'action ventriculaire et courants de repolarisation	8
Figure 3 : Manifestations cliniques du LQTS médicamenteux	21
Figure 4 : Rôle des EAD et arythmogénèse des Torsades de Pointes	22
Figure 5 : Développement des TdP après un cycle ventriculaire court-long-court	24
Figure 6 : Pharmacocinétique des médicaments au niveau de l'intestin et du foie	44
Figure 7 : Facteurs PK cardiaques pouvant moduler la survenue du LQTS médicamenteux.....	46
Figure 8 : Mécanisme de transport actif des transporteurs ABC.....	51
Figure 9 : Famille des transporteurs SLC	53
Figure 10 : Comparaison structurale des bloqueurs d'I_{Kr} avec le pharmacophore de classe III.....	62

Liste des abréviations

ABC : ATP-binding cassette

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine triphosphate

BCL : Basic Cycle Length ou Durée du cycle de stimulation de base

CYP : Cytochrome P450

CYP3A : Cytochrome P450 de la sous-famille 3A

CYP3A4 : Isoenzymes du cytochrome P450 3A4

EADs : Early After Depolarizations ou Post-dépolarisations précoces

ECG : ÉlectroCardioGramme

FDA : Food and Drug Administration

HEK293 : Human Embryonic Kidney 293 (lignée cellulaire)

HERG (KCNH2): Gène codant pour I_{Kr} (human *ether-a-go-go-related gene*)

IC_{50} : Concentration à laquelle 50 % d'inhibition est observée

I_K : Courant potassique rectifiant retardé

I_{Kr} : Composante rapide de I_K

I_{Ks} : Composante lente de I_K

I_{Kur} : Composante ultra-rapide de I_K

I_{Na} : Courant sodique cardiaque

I_{to} : Courant potassique transitoire

JLN : Syndrome Jervell-Lange-Nielsen

Kv1.5 : gène codant une protéine-canal potassique voltage-dépendant

LQTS : Syndrome du QT long

MAP : Potentiel d'action monophasique

MAPD : Durée du potentiel d'action monophasique

MAPD₉₀ : Durée du potentiel d'action mesurée à 90 % de repolarisation

MDR : MultiDrug Resistance

P-gp : P-glycoprotéine

QTc : Intervalle QT corrigé en fonction de la fréquence cardiaque

TdP : Torsades de pointes

Remerciements

Un grand Merci à toutes les personnes qui ont investi du temps, de l'amitié, de la collaboration, de la confiance, de la patience et de l'amour, afin d'aboutir au fruit de ces 4 années de doctorat qu'est ce manuscrit.

* À DR. JACQUES TURGEON *

Je te remercie Jacques, pour ta confiance en moi tout au long de ces années, pour la clarté et la précision de ton encadrement, pour ta haute rigueur scientifique, pour ta passion à transmettre tes connaissances, pour ton enthousiasme et ta volonté à toujours rester positif. Merci d'avoir favorisé le développement de mon autonomie et de mon esprit critique.

* À MES COLLÈGUES DE LABORATOIRE *

Je tiens à remercier tous les membres de mon laboratoire que j'ai côtoyés durant mes années de formation, particulièrement Pierre Morissette, Véronique Michaud, Marcia Zakrzewski, François Bélanger, Sylvie Poirier Larabie et Isabelle Plante. Votre soutien moral, le partage de vos connaissances et les bons moments passés ensemble ont toujours été appréciés. Le développement de vraies amitiés avec certain(e)s d'entre vous est un don inestimable dans ma vie.

* AUX COLLABORATEURS *

Je veux exprimer ma reconnaissance envers Dr Benoit Drolet, Dr. Chantale Simard, Dr. Hakima Yahi, Mr. Habert Zakrzewski, Mr. Louis-Philippe David pour l'aide et la collaboration apportées lors de la réalisation de ces travaux.

* AUX ORGANISMES SUBVENTIONNAIRES *

Je suis reconnaissant envers les Instituts de la Recherche en Santé du Canada (IRSC) pour la bourse de recherche au doctorat 2005-2008, la fondation Valorisation-Recherche Québec (VRQ) pour leur support financier (2003-2005) ainsi que la Faculté de Pharmacie de l'Université de Montréal pour leur soutien financier.

*** À MA FAMILLE ET MES AMIS ***

Un grand Merci à tous les membres de ma famille et à tous mes amis. Merci pour votre soutien et amour continua.

† À MA MÈRE (in memoriam) †

Mes années de doctorat furent bouleversées en une belle journée d'automne 2007 par la disparition de ma jeune maman, soudain, sans un seul Adieu. Bien que le chagrin et la peine de t'avoir perdue ne disparaîtront jamais, le souvenir de ton beau sourire et l'amour infini et inconditionnel que tu regardais apaiseront un peu ma cicatrice. Grâce à toi maman, je suis aujourd'hui là, armé de connaissance et d'humanité et prêt à affronter la vie. Merci pour la vie que tu m'as soufflée il y a 30 ans. À plus tard...

*** À MON PÈRE ***

Merci papa d'avoir toujours été l'idole pour moi, merci de m'avoir donné la passion de la pharmacie, merci pour ton intérêt constant envers mes projets et merci pour les principes et les valeurs que tu m'as transmis et l'amour infini que tu m'as donné.

*** À MON FRÈRE ***

Merci Antoine pour ton soutien moral, pour le modèle que tu m'as donné d'aller plus loin et plus haut sur l'échelle du savoir, merci pour ton amitié et ton amour inconditionnels.

*** À L'AMOUR DE MA VIE ***

Enfin, à l'amour de ma vie, à Nolla. Tu as été, tu es, et tu seras toujours la lumière et la passion dans ma vie. Merci d'être là, à mes côtés, à me soutenir, à m'encourager. Merci pour ta patience et ta compréhension dans les moments les plus difficiles de ma vie.

CHAPITRE I

Introduction

1. Électrophysiologie cardiaque

L'analyse histologique du cœur de mammifère indique que le cœur est constitué dans sa majeure partie (~80 %) de cellules cardiaques musculaires ou cardiomyocytes formant le tissu musculaire cardiaque ou myocarde. Hormis les cellules endothéliales, fibroblastes ou neurones, il existe deux autres types de cellules qui sont les cellules nodales et les cellules du tissu conducteur^{1,2}.

Les cardiomyocytes sont des cellules de taille moyenne, mononucléées, dont le cytoplasme contient des myofibrilles avec des unités répétitives ou sarcomères, présentant en alternance des filaments d'actine et de myosine.

Les cellules nodales sont des cellules de petite taille à disposition lâche, et contiennent quelques myofilaments (actine et myosine). Elles sont localisées dans deux petits amas cellulaires, le nœud sinusal (ou nœud sinoatrial SA) et le nœud auriculo-ventriculaire (AV). Ces deux nœuds forment le tissu nodal.

Les cellules du tissu conducteur sont des cellules pauvres en myofilaments. Ce tissu est constitué du faisceau de His, qui part du nœud auriculo-ventriculaire, et après un tronc commun, se divise en deux branches, droite et gauche, situées de part et d'autre de la cloison interventriculaire. Chaque branche se ramifie dans le ventricule correspondant pour former le réseau de Purkinje.

Le principe de pompage cardiaque est commandé par un processus électrique complexe qui assure une stimulation harmonieuse des différentes régions cardiaques. L'activation des cellules du nœud sinusal appelées cellules P (Pacemaker) transmettent l'influx pour activer les cardiomyocytes auriculaires droits et gauches avant d'atteindre

le nœud AV. Ce dernier retarde l'activation en ralentissant la vitesse de conduction et transmet la dépolarisation vers les ventricules droit et gauche via le faisceau de His^{1,2}.

1.1. Potentiel d'action et électrocardiogramme de surface

A l'état physiologique, le cœur, doué d'automatisme, pompe le sang régulièrement d'une façon coordonnée grâce à une activité électrique intrinsèque qui représente la somme de toutes les activités électriques cellulaires.

Les cardiomyocytes expriment des différences de concentration des ions sodium, potassium, calcium et chlorure entre les milieux intra- et extracellulaires et toute excitation de la cellule entraîne une variation transitoire de ces ions; ceci explique l'existence de différences de potentiel électrique entre les deux faces de la membrane¹⁻⁴.

Le passage transmembranaire de ces ions est possible selon leurs gradients chimique et électrique respectifs grâce à l'existence de protéines transmembranaires appelées canaux ioniques relativement sélectifs à un ion (ex. canaux potassiques, sodiques ou calciques).

A l'état de repos, on observe un potentiel de repos dans les cellules myocardiques qui est lié au gradient électrochimique du K à travers la membrane plasmique, cette dernière étant perméable au K mais imperméable aux larges protéines anioniques et aux phosphates organiques retrouvés dans le cytosol : ceci établit un équilibre appelé équilibre Gibbs-Donnan dans lequel la concentration de l'ion K^+ intracellulaire est plus élevée que celle extracellulaire avec un cytosol négativement chargé³. Dans cet équilibre, la capacité du gradient de concentration du K à causer un efflux de K est contré par un gradient électrique qui cause l'influx de K.

L'équation de Nernst décrit le potentiel d'équilibre pour un seul ion et indique que le potentiel membranaire établi par une différence de concentration pour un seul ion à travers une membrane semi-perméable est :

$$V_m = RT/zF \ln (P_{a_{ext}}/P_{a_{int}})$$

(V_m étant le potentiel membranaire, R la constante des gaz parfaits, T la température en degrés Kelvin, z la valence de l'ion, F la constante de Faraday, P la perméabilité de l'ion, et a_{ext} et a_{int} les activités des ions à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule).

Dans le cas du K ou du Na, $z = 1$ et pour une membrane perméable $P=1$ à 37°C, donc V_m devient : $V_m = 61.5 \log (a_{ext}/a_{int})$. Ainsi le V_m du K devient ~ -86 mV (celui du Na $\sim +70$ mV).

Hors, la membrane plasmique dans les cardiomyocytes à l'état de repos n'est pas parfaitement sélective au K. Il y a, par exemple, une légère perméabilité au Na, qui, à cause d'une concentration plus élevée de Na à l'extérieur de la cellule, favorise un potentiel membranaire opposé en polarité à celui associé au gradient potassique. Le potentiel membranaire d'équilibre à travers la membrane qui est perméable à ces différents ions est décrit par l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz. Cette dernière prend en considération les perméabilités et les activités de tous les ions, i.e. K^+ , Na^+ et Cl^- , pour lesquels il y a un gradient à travers la membrane. Pour une membrane perméable à tous ces ions, l'équation devient :

$$V_m = RT/zF \ln [P_K(a_{K_{ext}}/P_{a_{K_{int}}}) + P_{Na}(a_{Na_{ext}}/P_{a_{Na_{int}}}) + P_{Cl}(a_{Cl_{ext}}/P_{a_{Cl_{int}}})]$$

La contribution de tout ion au V_m disparaît s'il n'y a pas d'activité au niveau du gradient ou si la perméabilité à cet ion devient nulle³.

Le potentiel d'action cardiaque présente une grande diversité morphologique selon les tissus cardiaques ou les espèces animales. La *figure 1* montre des potentiels d'action

enregistrés dans différentes régions anatomiques du cœur. En effet, la configuration, la durée et les périodes réfractaires des potentiels d'action varient selon les différents types cellulaires du myocarde (Figure 1). Ceci est du à l'expression variable de courants ioniques dans les différents types de cellules cardiaques⁵. Ces différences peuvent causer des hétérogénéités de repolarisation entre les cellules.

Dans tous les cas, le potentiel d'action se caractérise par un changement transitoire du potentiel membranaire V_m : le milieu intracellulaire devient ainsi positif par rapport au milieu extracellulaire. Son amplitude totale est de l'ordre de 80 à 130 mV et sa durée est généralement comprise entre 100 et 200 msec pour un potentiel d'action myocardique auriculaire et entre 200 à 400 msec pour un potentiel d'action myocardique ventriculaire. Le potentiel d'action ventriculaire est représenté sur un électrocardiogramme de surface (ECG) par l'intervalle QT, qui correspond à la durée de dépolarisation et de repolarisation ventriculaire. Cet intervalle correspond donc à la systole ventriculaire. À chaque potentiel d'action ventriculaire, on observe au niveau des myocytes une dépolarisation rapide de la cellule caractérisée principalement par un courant sodique entrant I_{Na} et secondairement par un courant calcique entrant I_{CaL} . La phase de dépolarisation (phase 0) modifie le potentiel membranaire de -90 mV à +30 mV. Cette phase est ensuite suivie de phases de repolarisation (phase 1→3) initiées principalement par divers courants potassiques.

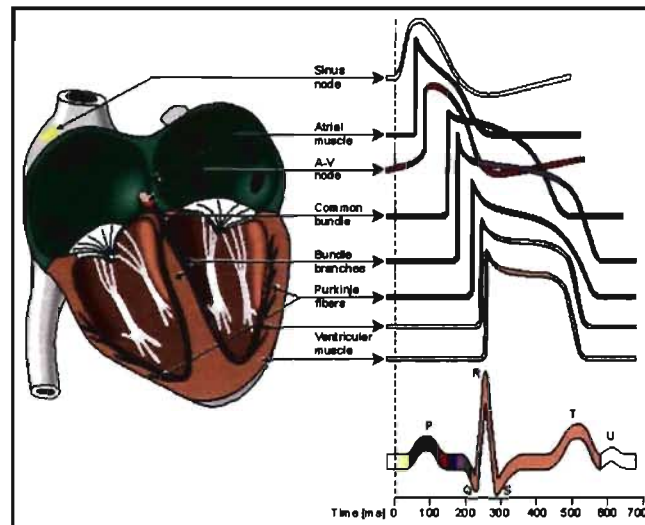


Figure 1 : Variabilité des potentiels d'action selon la région cardiaque
(Adapté de⁶)

1.2. Repolarisation cardiaque

Les principaux courants de repolarisation cardiaque sont, entre autres, les divers courants potassiques sortants¹⁻⁴. En effet, l'amplitude et la durée des potentiels d'action des cœurs de mammifères sont largement déterminées par les canaux potassiques. Les différents courants potassiques du myocarde peuvent être classifiés en deux catégories : 1) les courants potassiques à rectification entrante tels que I_{K1} , I_{KAch} (courant activé par l'acétylcholine) et I_{KATP} (courant sensible à l'ATP); et 2) les courants potassiques voltage-dépendants (canaux Kv) qui comprennent le courant transitoire I_{to} (to : transient outward) et les différentes composantes du courant potassique rectifiant retardé I_K (composantes rapide I_{Kr} , ultra-rapide I_{Kur} et lente I_{Ks})⁷.

Par ailleurs, les propriétés et la densité des différents courants Kv varient selon les espèces et entre les différentes régions du cœur (oreillette, ventricule, nœud sinusal...) au sein de la même espèce (*Tableau 1*). Ces différences contribuent à la variabilité de la forme du potentiel d'action enregistré dans les différents types cellulaires¹⁻⁴.

Principaux courants repolarisants					
Courant	Activation	Inactivation	Bloqueur	Tissu	Espèce
$I_{to,f}$	Rapide (2-10 msec)	Rapide (25-80 msec)	4-AP	Oreillette Ventricule	Chien – Homme – Souris – Lapin – Rat Chat – Chien – Homme – Souris – Rat
$I_{to,s}$	Rapide (2-10 msec)	Lente (80-200 msec)	4-AP	Oreillette Ventricule Nœud SA	Lapin Souris – Lapin Lapin
I_{Kr}	Lente (200 msec)	Rapide (~ 10 msec)	E-4031	Oreillette Ventricule Nœud SA	Chien – Cobaye – Homme – Rat Chien – Cobaye – Homme – Souris – Lapin Lapin – Homme
I_{Ks}	Très lente (~ 800 msec)	N/A	NE-10064	Oreillette Ventricule Nœud SA	Chien – Cobaye – Homme Chien – Cobaye – Homme Cobaye – Homme
I_{Kur}	Rapide (~ 10 msec)	N/A	4-AP	Oreillette	Chien – Homme – Rat

Tableau 1 : Principaux courants ioniques impliqués dans la repolarisation cardiaque⁸

La repolarisation ventriculaire débute à la phase 1, qui correspond à l'ouverture du courant transitoire potassique sortant I_{to} . Ce courant est subdivisé en deux composantes rapide $I_{to,f}$ (f : fast) et lente $I_{to,s}$ (s : slow). La phase 2 correspond au plateau qui représente une balance entre un courant entrant positif I_{Ca-L} voltage-dépendant et un courant sortant positif qui est la composante rapide du courant potassique rectifiant retardé I_{Kr} . La phase 3 correspond à la phase finale de repolarisation du potentiel d'action où I_{Kr} continue d'augmenter avec l'apparition de la composante lente du courant rectifiant retardé appelée I_{Ks} . Ensuite, un autre courant potassique sortant I_{K1} qui présente une rectification dans le sens entrant devient dominant. La phase 4 correspond au potentiel de repos qui est négatif, proche de -90mV. En plus de l'activité repolarisante d' I_{K1} , il existe également une très faible perméabilité aux ions sodium à l'origine d'un courant sodique entrant dénommé courant de fond sodique $I_{b,Na}$ (b pour

background). La stabilité du potentiel de repos impose que la somme algébrique des courants ioniques soit nulle, ce qui signifie que la somme de I_{K1} et $I_{b,Na}$ est nulle.

Signalons que les pompes (**pompe $3Na^+ - 2K^+$** ou pompe à sodium ou **pompe Na^+/K^+ -ATPase**) ainsi que les échangeurs (échangeur $3Na^+ - 1Ca^{++}$) rétablissent les concentrations ioniques des différents ions de part et d'autre de la membrane.

Un autre courant potassique mais ligand-dépendant et sensible à l'ATP (appelé $I_{K(ATP)}$) pourrait contribuer significativement à la repolarisation ventriculaire et ceci dans des conditions particulières. En effet, lorsque la cellule cardiaque se trouve en hypoxie, la concentration en ATP diminue entraînant l'ouverture des canaux K_{ATP} ce qui provoque une repolarisation précoce. Les canaux K_{ATP} joueraient un rôle important dans le phénomène de préconditionnement ischémique⁹.

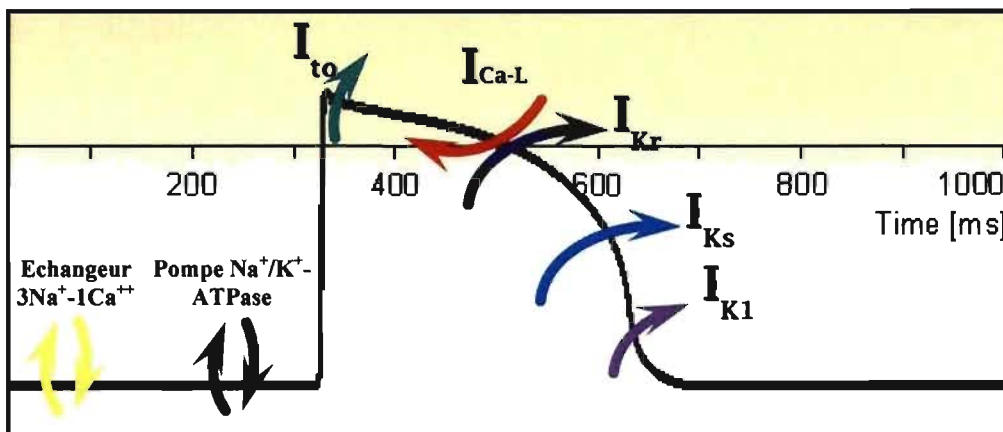


Figure 2 : Potentiel d'action ventriculaire et courants de repolarisation

1.3. Dysrythmies cardiaques

Les dysrythmies (ou arythmies) cardiaques sont définies comme étant une perturbation dans la fréquence normale d'activation des oreillettes, des ventricules ou au niveau d'autres tissus de conduction. Cliniquement, elles peuvent être classées selon 1) le site

d'origine de l'anomalie (i.e. auriculaire, jonctionnelle ou ventriculaire) ou selon que 2) le rythme cardiaque est augmenté (tachycardie) ou diminué (bradycardie). Pour simplifier, nous utiliserons ici le premier type de classification et inclurons les principales arythmies rencontrées en clinique.

1.3.1 Les arythmies auriculaires

Parmi les arythmies auriculaires humaines, on distingue la **bradycardie sinusale** et la **tachycardie sinusale**; ces dernières sont dues à des fréquences régulières inférieures à 60 battements/min ou supérieures à 100 battements/min respectivement^{2, 10, 11}.

On distingue également les **extrasystoles auriculaires** (ou contraction auriculaire prématurée) qui sont des impulsions prenant naissance prématurément dans un foyer auriculaire ectopique. Une autre dysrythmie auriculaire est le **flutter auriculaire** caractérisé par un rythme régulier mais rapide de la cadence auriculaire, s'étalant entre 250 et 350 battements/min; la fréquence ventriculaire varie alors autour de 150 battements/min. Finalement, l'arythmie auriculaire la plus sévère est la **fibrillation auriculaire**; celle-ci est caractérisée par une dépolarisation anarchique et asynchrone des cellules nodales du myocarde auriculaire, ce qui empêche toute contraction efficace des oreillettes puisque les fibres musculaires se contractent indépendamment l'une de l'autre. Cette irrégularité auriculaire peut aboutir à une fréquence ventriculaire irrégulière.

1.3.2 Les arythmies jonctionnelles

Parmi les arythmies jonctionnelles, nous distinguons la **tachycardie supraventriculaire paroxystique (TSVP)** et les **blocs auriculoventriculaires (A-V)** ^{2, 10, 11}. La TSVP est une arythmie impliquant un mécanisme d'automaticité auriculaire ou de réentrée au niveau du nœud A-V, la fréquence pouvant varier entre 150 et 250 battements/min. Les blocs A-V sont caractérisés par une anomalie de la conduction au niveau du nœud A-V entraînant 1) un retard de la conduction A-V (bloc de 1^{er} degré), 2) une interruption intermittente de la conduction A-V (bloc de 2^{ème} degré), ou 3) une interruption totale de la conduction A-V (bloc de 3^{ème} degré).

1.3.3 Les arythmies ventriculaires

Parmi les arythmies ventriculaires, nous distinguons les **extrasystoles ventriculaires** qui sont des impulsions prenant naissance prématurément dans un foyer ventriculaire ectopique^{2, 10, 11}. Il existe également des **tachycardies ventriculaires** qui sont caractérisées par une succession d'au moins trois complexes d'origine ventriculaire ectopique; la fréquence est comprise alors entre 150 et 250 battements/min. Une autre arythmie ventriculaire est la **fibrillation ventriculaire** qui est une dépolarisation anarchique et asynchrone des cardiomyocytes ventriculaires. Celle-ci résulte en une contraction ventriculaire inefficace et peut souvent aboutir à un arrêt cardiaque. Finalement, les **torsades de pointes (TdP)** sont une forme de tachycardie ventriculaire polymorphique parfois observée en association avec le syndrome du QT long (LQTS) ^{2, 10, 11}.

2. Syndrome du QT long (LQTS)

2.1. LQTS congénital

Le LQTS congénital est un désordre cardiaque caractérisé par une prolongation de la repolarisation ventriculaire; cette dernière est représentée par un prolongement de l'intervalle QT sur un ECG¹². Ce désordre peut rester asymptomatique ou développer des TdP qui peuvent dégénérer en fibrillations ventriculaires pouvant être fatales.

2.1.1 Historique

Jervell et Lange-Nielsen ont décrit pour la première fois en 1957 le LQTS congénital chez une famille norvégienne de six enfants dont les 2/3 souffraient de surdité congénitale, de syncope et d'une prolongation de l'intervalle QT sur l'ECG évoluant vers une mort subite¹³. Au début des années soixante, Romano *et al.* et Ward ont décrit un désordre cardiaque similaire mais d'une forme plus légère sans surdité associée^{14, 15}.

Ainsi, deux formes cliniques de LQTS congénital furent désignées, soit le syndrome de Romano-Ward (RW), un désordre autosomal dominant, et le syndrome de Jervell et Lange-Nielsen (JLN), un désordre autosomal récessif. Deux autres syndromes, le syndrome d'Andersen-Tawil et le syndrome de Timothy, sont également définis comme faisant partie de la famille du LQTS congénital, bien qu'ils présentent des manifestations cliniques différentes. Le point commun de tous ces syndromes est donc l'absence d'un gène codant pour un courant ionique cardiaque important ou la traduction de ce gène en protéine (canal ionique) non ou partiellement fonctionnelle. La première localisation chromosomique d'un gène défectueux fut établie en 1995^{16, 17}. Depuis ces premières

publications, plus de 400 mutations dans les gènes de cinq canaux cardiaques ont été reliés à la majorité des patients présentant cliniquement un LQTS congénital¹⁸ (Tableau 2).

2.1.2 Épidémiologie

L'incidence et la prévalence exactes du LQTS congénital sont inconnues; on estime cependant que le syndrome RW survient chez 1 personne sur 5000¹⁹. Par contre, le syndrome JLN est beaucoup plus rare et la prévalence estimée est entre 1,6 et 6 individus par million d'enfants âgés entre 4 et 15 ans²⁰. De plus, le LQTS congénital est une cause importante de mortalité subite chez les enfants^{18, 19}. Ce syndrome est associé à un taux de mortalité élevé, pouvant atteindre les 70 % chez des patients non traités pendant 10 ans²¹.

Type	Gène	Locus	Mode héréditaire	Courant ionique	Effet de la mutation	Déclencheurs communs	Fréquence (%)
Syndrome de Romano-Ward (RW)							
LQT1	<i>KCNQ1/KvLQT1</i>	11p15.5	AD	I _{Ks}	Perte de fonction	Exercice (natation), stress émotionnel	30-35
LQT2	<i>KCNH2/HERG</i>	7q35-36	AD	I _{Kr}	Perte de fonction	Repos, stimuli auditif, stress émotionnel	30-35
LQT3	<i>SCN5A</i>	3p21-p24	AD	I _{Na}	Gain de fonction	Repos/Sommeil	5-10
LQT4	<i>ANKB</i>	4q25-q27	AD	Na/Ca	Perte de fonction	Exercice, stress émotionnel	< 1
LQT5	<i>KCNE1/mink</i>	21q22.1	AD	I _{Ks}	Perte de fonction	???	< 1
LQT6	<i>KCNE2/MiRP1</i>	21q22.1	AD	I _{Ks}	Perte de fonction	???	< 1
Syndrome de Jervell et Lange-Nielsen (JLN)							
JLN1	<i>KCNQ1/KvLQT1</i>	11p15.5	AR	I _{Ks}	Perte de fonction		80
JLN2	<i>KCNE1/mink</i>	21q22.1	AR	I _{Ks}	Perte de fonction		20
Syndrome d'Andersen-Tawil							
ATS1 (LQT7)	<i>KCNJ2</i>	17q23	AD	I _{K1}	Perte de fonction	Altérations dans K+ ???	50
Syndrome de Timothy							
TS1 (LQT8)	<i>CACNA1C</i>	1q42-q43	Sporadique	I _{Ca,L}	Gain de fonction	Hypoglycémie, sepsis ???	?

Tableau 2 : Bases moléculaires du LQTS congénital (Adapté de^{12, 18})

2.1.3 Traitement/Gestion des patients LQTS

Pour une gestion adéquate du LQTS congénital, il est primordial de génotyper les patients diagnostiqués cliniquement comme étant atteints du LQTS. Actuellement, 30 à 35 % des patients cliniquement diagnostiqués n'ont pas été génotypés²². Dans ce cas-ci, l'instauration d'une pharmacothérapie à base de bêtabloquant est fortement recommandée. En effet, dans plus de 12 % des patients, la première manifestation de la maladie est un arrêt cardiaque ou une mort subite et l'instauration rapide d'une thérapie semble primordiale²³.

L'efficacité des bêtabloquants chez les patients atteints de LQTS fut évaluée à partir d'une grande base de données intitulée International Registry for LQTS²⁴; cette dernière incluait 869 patients – dont 69 % étaient asymptomatiques – sous bêtabloquants et dont la mortalité était de 2 %, comparativement à 50 % de mortalité sur 20 ans chez le groupe non traité. L'usage d'une dose complète de bêtabloquant est recommandé en toutes circonstances (3 mg/kg de propranolol ou 1 mg/kg de nadolol; l'aténolol est moins efficace et devrait être évité) sans s'inquiéter si la fréquence cardiaque descend aux alentours de 45 à 55 battements/min²³.

La dénervation sympathique cardiaque gauche est réservée principalement aux patients à haut risque de mortalité, avec des syncopes récidivantes non contrôlées avec les bêtabloquants²⁵. La majorité des patients survivant à un arrêt cardiaque reçoivent un cardiovertteur/défibrillateur implantable qui semble significativement diminuer la prévalence de la mort subite chez les patients atteints de LQTS²⁶.

Certains patients LQTS génotypés présentent un intervalle QT normal. L'existence de ces mutations silencieuses est expliquée par une faible pénétrance génétique²⁷, et la

fréquence de ces mutations silencieuses décroît de 36 % au niveau du LQT1, à 19 % en LQT2, et à 10 % en LQT3²⁸.

Le danger majeur chez les patients atteints de certains LQTS congénitaux portant des mutations silencieuses est la prise de médicaments non-antiarythmiques bloqueurs d'I_{Kr}; ainsi certains LQTS congénitaux deviennent un facteur de risque de survenue du LQTS médicamenteux et vice-versa. Chez les patients génotypés, il est primordial de prévenir et traiter en fonction du type de LQTS. Comme décrit dans le *Tableau 2*, les déclencheurs d'événements cardiaques varient selon le type de LQTS. En effet, pour les patients LQT1 (sous-groupe génétique le plus large), les événements les plus dangereux surviennent lors d'une activation sympathique, principalement par l'exercice physique (natation) ou un stress émotionnel²⁹. Pour cela, les patients LQT1 sont particulièrement bien gérés par une intervention antiadrénergique (bêtabloquants); l'usage des cardioverters/défibrillateurs est moins justifié chez ce groupe de patients. Pour les patients LQT2, les déclencheurs d'événements cardiaques sont principalement les stimuli auditifs pendant le repos ou le sommeil, tel qu'une sonnerie d'alarme ou de téléphone. Pour cela, la réponse de ces patients aux bêtabloquants est moins complète comparativement aux patients LQT1. Mais plusieurs études confirment que la prise de bêtabloquants chez les patients LQT2 serait bénéfique. En effet, dans l'étude de Schwartz *et al.* chez des patients LQT2 symptomatiques prenant des bêtabloquants, aucune mort subite ne fut observée et seulement 4 % ont subi des arrêts cardiaques²⁹. Comparativement, dans l'étude de Priori *et al.* chez des patients LQT2 traités aux bêtabloquants dont 47 % étaient symptomatiques, aucune mort subite ne fut observée et seulement 7 % ont subi des arrêts cardiaques³⁰. De plus, il est primordial d'éviter au maximum les stimuli auditifs dans les chambres de ces patients³¹. Donc, il semblerait

que les patients LQT2 répondraient bien au traitement bêtabloquant, mais l'occurrence d'un arrêt cardiaque avec ce traitement exige l'implantation d'un cardiovertteur/défibrillateur. Par ailleurs, il semblerait que les patients LQT2 soient particulièrement plus vulnérables à des niveaux bas de potassium. Des efforts supplémentaires doivent être faits pour préserver un potassium sérique supérieur à 4 mmol/L²³.

La gestion médicale des patients LQT3 semble très complexe et incertaine. En effet, les patients LQT3 sont significativement moins protégés par les bêtabloquants que les patients LQT1 ou LQT2 et certains suggèrent que les bêtabloquants pourraient être dangereux chez certains de ces patients. En effet, les patients LQT3 à faible fréquence cardiaque semblent avoir un prolongement supplémentaire de l'intervalle QT, ce dernier étant déjà prolongé chez ces patients³². Ceci est également observé pendant la nuit alors que la fréquence cardiaque est physiologiquement diminuée³³. Comme les bêtabloquants diminuent la fréquence cardiaque, la possibilité qu'ils augmentent la probabilité de survenue d'arythmie est à considérer. Bien que la situation reste floue, les recommandations semblent converger vers l'option d'utiliser des bêtabloquants et de la possibilité de l'associer à la méxiletine; cette dernière, en effet, pourrait raccourcir l'intervalle QT. La dénervation sympathique cardiaque gauche semble être une approche rationnelle puisqu'elle prévient le relargage soudain de norépinephrine au niveau ventriculaire sans diminuer la fréquence cardiaque à cause de l'innervation sympathique sélective du côté droit du nœud sinusal³⁴. L'usage d'un cardiovertteur/défibrillateur est également une considération logique²³.

2.2. LQTS médicamenteux

2.2.1. Historique

Dès 1920, le début d'un traitement à la quinidine fut associé à des syncopes importantes; ceci était probablement la première cause décrite du LQTS acquis ou médicamenteux. Grâce à l'avènement du suivi électrocardiographique de type Holter dans les années 60, ces syncopes furent expliquées par des tachycardies ventriculaires polymorphiques pause-dépendantes. En 1964, Selzer et Wray décrivirent pour la première fois ce qui sera plus tard connu sous le terme de LQTS médicamenteux en remarquant que la quinidine pouvait provoquer une prolongation de l'intervalle QT et des arythmies chez des patients sains³⁵. Depuis, les cliniciens se sont rendus très familiers avec cet effet secondaire sévère, particulièrement dans le contexte des traitements antiarythmiques³⁶. Hors, ce phénomène s'est amplifié et a été également observé avec plusieurs agents thérapeutiques à indications non cardiovasculaires; ainsi la liste des médicaments associés avec une prolongation de l'intervalle QT est devenue relativement longue³⁷⁻³⁹. A titre d'exemple, la cause la plus importante de retrait (ou de restriction) d'un médicament du marché pendant la dernière décennie a été une prolongation de l'intervalle QT associée à des proarythmies parfois fatales⁴⁰. Plusieurs médicaments à structures chimiques très variées qui étaient disponibles sur le marché pour des indications non cardiovasculaires ont été retirés du marché ou leur usage a été sévèrement restreint à cause de cette forme rare de toxicité médicamenteuse. Ces médicaments incluent la terfénadine⁴¹, l'astémizole⁴², la gréparfloxacin⁴³, la térolidine⁴⁴, le dropéridol⁴⁵, la lidoflazine⁴⁶, le sertindole⁴⁷, la levomethadyl⁴⁸ et la cisapride⁴⁹. De

plus, plus de 125 médicaments actuellement disponibles sur le marché nord-américain ont été associés au LQTS médicamenteux (<http://www.Torsades.org/>) (Tableau 3).

Classe thérapeutique	Dénomination commune internationale (DCI)	Classe thérapeutique	Dénomination commune internationale (DCI)
Antibiotiques	Clarithromycine	Antiasthmatiques	Fénoltérol
	Érythromycine		Procatérol
	Grepafloxacine		Salbutamol
	Fentamidine		Salmétérol
	Sulfaméthoxazole/ Triméthoprimine		Amisulpride
Anesthésiques	Enflurane	Antipsychotiques	Chlorpromazine
	Fentanyl		Clozapine
	Isoflurane		Dropéridol
	Pentobarbital		Halopéridol
	Propofol		Mésoridazine
	Thiopental		Olanzapine
Anti-dépresseurs	Amitriptyline		Pimozide
	Désipramine		Prochlorperazine
	Doxapine		Rispéridone
	Fluoxétine		Sultopride
	Imipramine		Thioridazine
	Maproline		Dolasétron
	Trazodone		Ondansétron
	Venlafaxine	Granisetron	
		Fluconazole	
Anti-histaminiques	Astémizole	Antifongiques	Kétoconazole
	Azélastine	Diurétiques	Indapamide
	Clémastine		Triamtérene
	Diphenhydramine	Gastrokinétiques	Cisapride
	Fexofénadine		Dompéridone
	Terfénadine		
Bloqueurs calciques	Prenylamine	Immuno- suppresseurs	Tacrolimus
	Bépridil		
	Térodiline		

Tableau 3 : Médicaments non-antiarythmiques qui peuvent prolonger l'intervalle QT (Adapté de⁵⁰)

2.2.2. Incidence

Il est très difficile d'estimer exactement l'incidence du LQTS médicamenteux. En effet, la prise en compte de plusieurs cas publiés sur les proarythmies d'origine médicamenteuse est parfois erronée, étant donné que certains d'entre eux décrivent des cas de surdosage extrêmes et ne peuvent être extrapolés à la pratique clinique de routine⁵¹. De plus, la coadministration de différents médicaments qui peuvent prolonger l'intervalle QT rend impossible l'établissement d'une relation de cause à effet entre un seul médicament et l'occurrence de la prolongation de l'intervalle QT et/ou de TdP. De plus, bien qu'il ait été reconnu que tous les médicaments qui prolongent l'intervalle QT ont le potentiel de bloquer I_{Kr} , ils ne causent pas nécessairement une prolongation significative du QT chez tous les individus (voir les facteurs prédisposants).

Dans une étude effectuée au Royaume-Uni et en Italie, il a été démontré que les médicaments non cardiovasculaires à potentiel proarythmique représentaient 3 % et 2 % du total des prescriptions respectivement dans les 2 pays⁵². Le danger de proarythmie d'origine médicamenteuse est donc très sérieux.

2.2.2. Manifestations et complications

L'intervalle QT – qui reflète la durée du potentiel d'action des myocytes cardiaques – est une résultante de la durée de dépolarisation et de repolarisation ventriculaires. L'intervalle QT est donc contrôlé par un équilibre très étroit entre les différents courants entrants et sortants; ainsi, une diminution des courants repolarisants sortants et/ou une augmentation des courants dépolarisants entrants peut prolonger la repolarisation et la durée de l'intervalle QT. Parmi les courants repolarisants, les courants potassiques I_{Ks} et

tout particulièrement I_{Kr} sont les plus susceptibles à une influence pharmacologique⁵¹. Dans tous les LQTS médicamenteux décrits, le blocage du courant I_{Kr} est responsable au moins en partie de la réduction du courant sortant, d'un ralentissement de la repolarisation, d'une prolongation du potentiel d'action et cliniquement, d'une prolongation de l'intervalle QT et d'un développement d'anomalies sur les ondes T ou U sur l'ECG de surface⁵¹.

Parmi ces anomalies, nous pouvons observer une onde T à base élargie, biphasique ou avec une encoche⁵³. Parmi les caractéristiques structurelles qui peuvent expliquer l'importante susceptibilité des canaux I_{Kr} à être bloqués par une si grande variété de médicaments et agents chimiques, les domaines S6 des canaux I_{Kr} , contrairement aux autres canaux potassiques voltage-dépendants, ont 2 résidus aromatiques qui s'opposent dans la cavité interne⁵⁴; cette cavité peut lier de larges produits aromatiques par une interaction de type π (la liaison π étant un type de liaison chimique créée entre deux atomes)⁵⁵. De plus, l'affinité de liaison des médicaments est augmentée lors de l'inactivation d' I_{Kr} .

2.2.2.1. Post-dépolarisations précoces

La prolongation de la repolarisation peut résulter d'une activation subséquente d'un courant entrant dépolarisant (I_{Ca-L} et I_{Na}), ce qui peut générer des post-dépolarisations précoces (ou Early After Depolarizations (EAD) en anglais) (*Figure 3*). Les EAD sont donc dues à la réactivation des courants calciques de type L, ou à d'autres courants issus de l'échangeur sodium-calcium ou le courant sodique cardiaque⁵⁶.

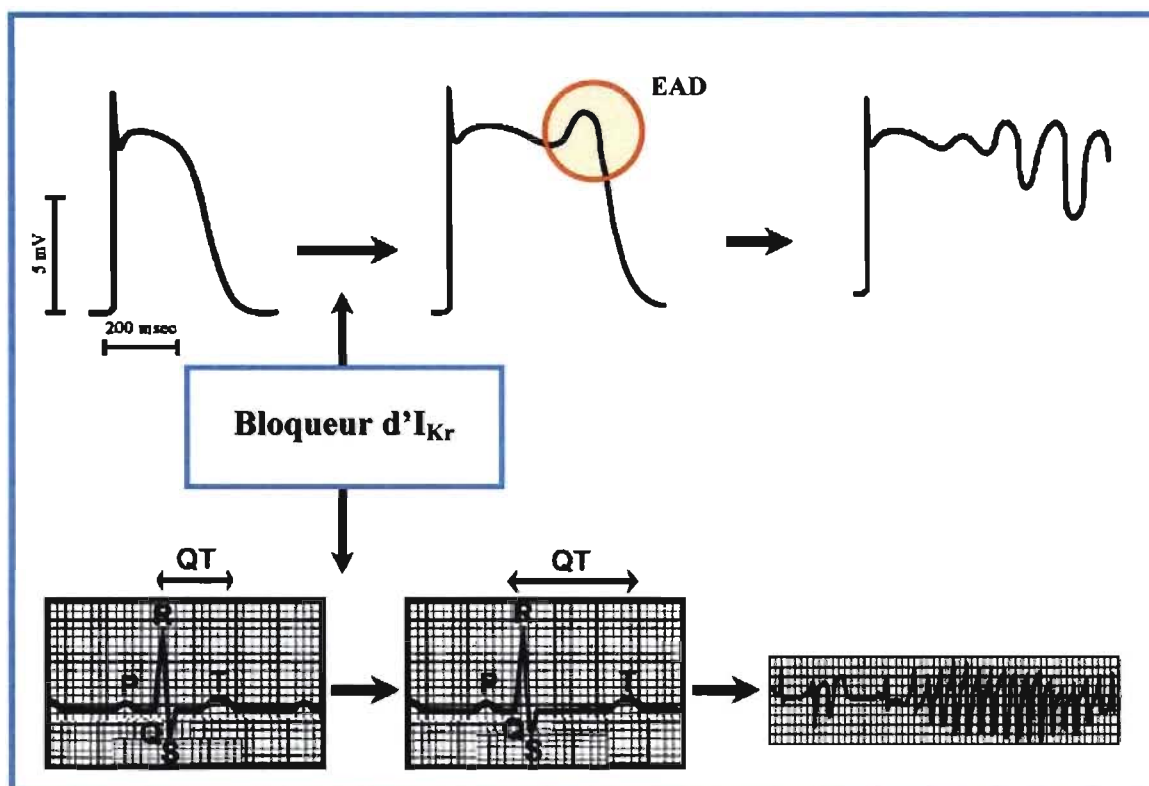


Figure 3 : Manifestations cliniques du LQTS médicamenteux

Les EAD peuvent à leur tour déclencher une activité arythmogénique à la fin de la repolarisation, plus particulièrement au cours des phases 2 et 3 du potentiel d'action; ceci survient préférentiellement dans les fibres de Purkinje et dans la population de cellules myocardiques M (cellules M)⁵⁷. (Les cellules M sont des cellules situées dans les couches intermédiaires du myocarde ventriculaire, entre l'épicarde et l'endocarde⁵⁸. Ces cellules présentent des propriétés électrophysiologiques intermédiaires entre les cellules myocardiques et les cellules de conduction, et une réponse pharmacologique différente des cellules de l'épicarde ou de l'endocarde. De plus, lors d'une diminution de la fréquence cardiaque, les cellules M ont la capacité de prolonger leur potentiel d'action d'une façon beaucoup plus prononcée que les cellules épicaudiques et endocardiques).

Quand il y a une augmentation importante de la dispersion de la repolarisation, nous pouvons observer une réentrée et une survenue de TdP; ces dernières sont entretenues par plus de réentrée ou une activité de « vague spirale ». Ainsi la présence d'EAD et une dispersion significative de la repolarisation sont des prérequis pour l'initiation et le maintien des TdP (*Figure 4*).

Une des raisons pouvant expliquer cette activité proarythmique est due au fait que la durée des potentiels d'action dans les fibres de Purkinje et les cellules M est beaucoup plus longue que les cellules épiscopardiques et endocardiques. Or, comme plusieurs bloqueurs d' I_{Kr} sont plus puissants lorsque le canal est inactivé, le plateau plus long de ces potentiels d'action favorise un blocage plus important.

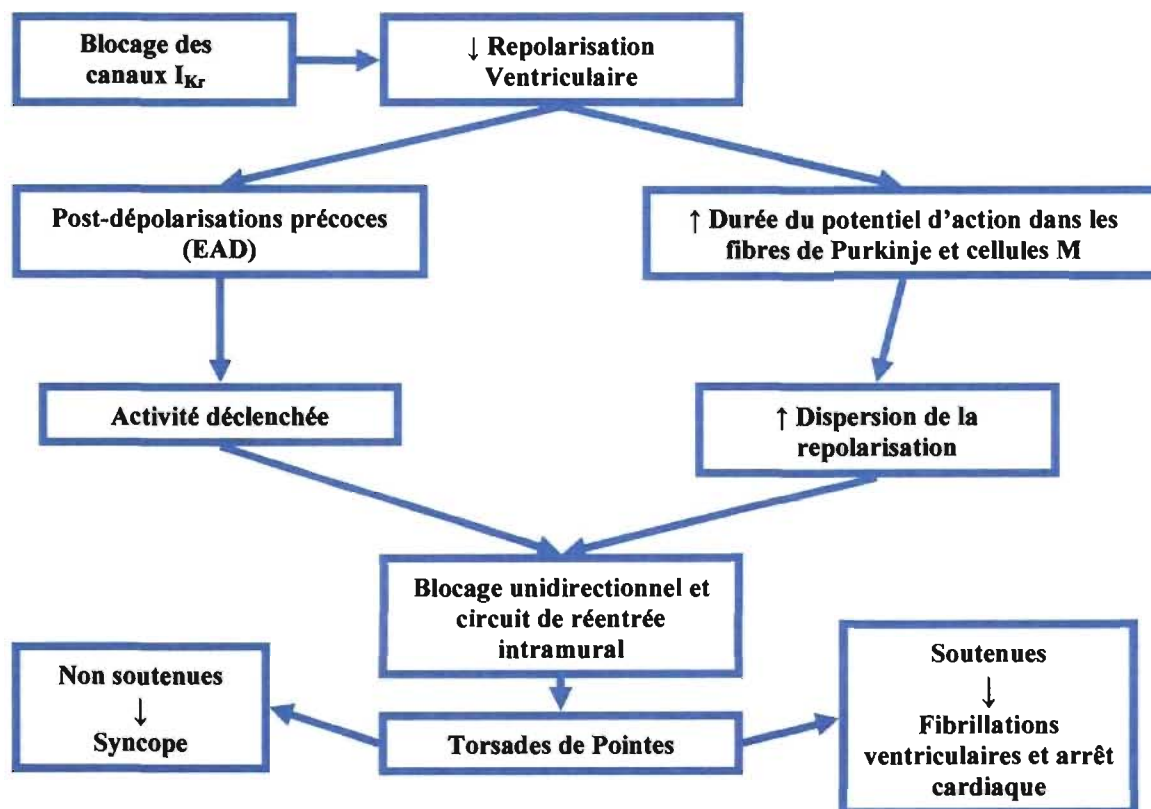


Figure 4 : Rôle des EAD et arythmogénèse des Torsades de Pointes (Adapté de⁵¹)

De la même manière, les cellules M présentent une prolongation du potentiel d'action plus importante en réponse à un bloqueur d'I_{Kr} comparativement aux cellules subendo- et subépicardiques⁵⁸. Ceci peut induire une dispersion plus importante de la repolarisation, créant un potentiel déclencheur de réentrée qui soutient le développement de TdP.

2.2.2.2. Développement des Torsades de Pointes (TdP)

Certains auteurs ont remarqué la présence d'une séquence ventriculaire courte-longue-courte précédant le déclenchement de TdP, et ce particulièrement dans le LQTS médicamenteux⁵⁹ (*Figure 5*). Le premier complexe ventriculaire de la séquence est généralement un battement ventriculaire ectopique ou le dernier battement d'une série de battements ventriculaires prématurés. Ce complexe est suivi par une pause postectopique et un battement sinusal subséquent, connu sous le terme de pause sinusale compensatoire. Ce battement sinusal possède généralement une onde U exagérée. Un battement ventriculaire prématuré apparaît de cette onde U exagérée et précipite la survenue de TdP. Ce cycle caractéristique court-long-court et la présence d'une onde post-pause U constituent le modèle typique d'une initiation de TdP. Cette observation fut confirmée plus tard par Roden *et al.* qui définit ce modèle par « court cycle – long cycle – long QT – complexe ventriculaire prématuré retardé »^{60, 61}.

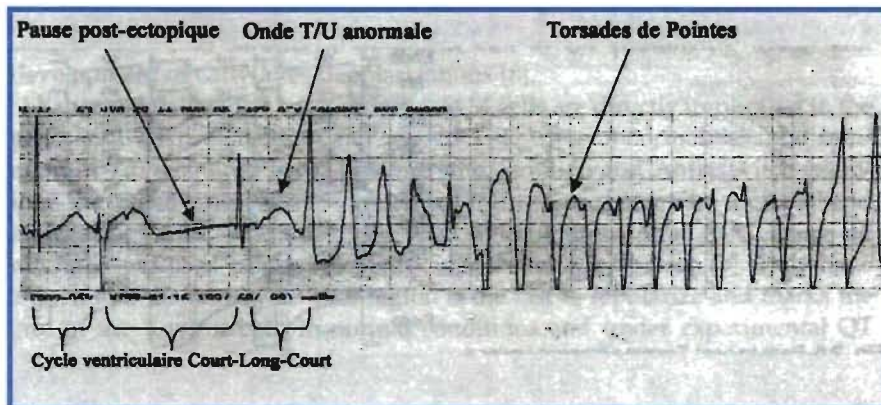


Figure 5 : Développement des TdP après un cycle ventriculaire court-long-court (Adapté de⁵⁹)

L'origine du terme TdP date de 1966 lorsque François Dessertenne décrit la forme électrocardiographique d'une tachycardie ventriculaire polymorphe^{62, 63}. Cette dénomination était due au fait que ces tachycardies étaient caractérisées par des complexes QRS changeant progressivement d'amplitude et de forme et qui apparaissent pivoter autour d'une ligne isoélectrique. Cette forme typique des TdP est due à une variation de la polarité qui varie d'un état positif à négatif sur le plan frontal (dérivation périphérique) de l'ECG. Les TdP disparaissent le plus souvent par elles-mêmes, mais elles peuvent également dégénérer en fibrillation ventriculaire. Dans ce cas-ci, elles peuvent causer un arrêt cardiaque et une mort subite.

Bien que la séquence court-long-court déclenchant des TdP soit bien établie, le mécanisme électrophysiologique de la transition périodique de l'axe QRS durant les TdP n'est encore pas bien élucidé. Les premières hypothèses de Dessertenne avaient conclu que le mécanisme du polymorphisme des TdP était probablement dû à la présence de deux foyers automatiques qui se compétitionnent pour l'excitation du ventricule, créant ainsi la morphologie changeante des complexes QRS⁶⁴. Cette hypothèse fut ensuite rejetée expérimentalement et théoriquement. Dessertenne postula ensuite que les TdP

étaient dues à un seul foyer stable qui a accès au ventricule par plusieurs voies. Avec ce mécanisme, les ventricules avaient un large circuit de réentrée faisant en sorte que la conduction dans les ventricules était significativement réduite pendant les périodes réfractaires de manière qu'un circuit stable de réentrée ne pouvait pas être maintenu. Par conséquent, la voie de réentrée change progressivement, ce qui explique les changements continus de l'axe électrique des TdP. D'autres mécanismes ont été formulés mais ceux-ci ne semblent expliquer que partiellement le mécanisme de transition périodique de l'axe QRS dans les TdP.

L'incidence des TdP est relativement faible et seulement un certain nombre de médicaments qui bloquent I_{Kr} ont un potentiel arythmogénique important. De plus, certaines évidences montrent que les patients subissant un LQTS médicamenteux présentent une certaine prédisposition intrinsèque à la proarythmie et aux TdP. Par exemple, les patients ayant subi des TdP d'origine médicamenteuse sembleraient avoir une prolongation de l'intervalle QT plus importante comparativement à d'autres patients recevant le même bloqueur d' I_{Kr} mais n'ayant pas développé des TdP, cette différence n'étant pas corrélée au dosage du médicament administré⁶⁵. De plus, il semblerait que les patients ayant un LQTS médicamenteux ont un risque plus élevé de subir des arythmies récurrentes s'ils sont réexposés au même médicament⁶⁶.

En bref, plusieurs marqueurs électrophysiologiques ont été associés aux TdP et peuvent aider à prédire leur survenue; en effet, nous pouvons citer 1) une prolongation excessive du potentiel d'action ventriculaire, 2) l'apparition de post-dépolarisations précoces, 3) une augmentation de la dispersion de la repolarisation ventriculaire et 4) la présence

d'un ou de plusieurs facteurs de risque prédisposants qui seront élaborés plus en profondeur ci-dessous.

2.2.3. Facteurs de risque prédisposants

Comme on l'a vu précédemment, l'apparition de TdP suite à l'administration de médicaments qui peuvent prolonger l'intervalle QT et provoquer des EADs, et la dégénération de ces TdP en fibrillations ventriculaires est très rare. En effet, plusieurs facteurs de risque prédisposants intrinsèques et extrinsèques doivent être présents pour précipiter la survenue de ces arythmies dangereuses. Parmi ces facteurs de risque, nous pouvons les diviser en deux catégories, i.e. des facteurs d'origine cardiaque et des facteurs d'origine non cardiaque. Notons que certains de ces facteurs de risque peuvent par eux-mêmes provoquer des TdP, d'où une attention encore plus importante doit être apportée lorsque ces facteurs sont associés à la prise de médicaments connus pour prolonger l'intervalle QT.

2.2.3.1. D'origine cardiaque

a) Infarctus du myocarde

Schwartz et Wolf ont démontré en 1978 que l'intervalle QT était significativement prolongé après un infarctus du myocarde (IM) comparativement à des sujets contrôles⁶⁷.

De plus, les patients atteints d'IM qui sont morts subitement avaient plus de chance d'avoir eu une prolongation de l'intervalle QT comparativement aux survivants.

D'autres chercheurs ont confirmé que la prolongation de l'intervalle QT après un IM aigu pouvait prédire l'occurrence d'une fibrillation ventriculaire et/ou d'une

tachycardie⁶⁸. La prolongation de la durée du potentiel d'action après un IM a été attribué surtout à une diminution de la densité de deux courants potassiques sortants, i.e. $I_{to-fast}$ (I_{to-f}) et $I_{to-slow}$ (I_{to-s}), plutôt qu'à un changement de la densité des courants calciques de type L⁶⁹.

b) Cardiomyopathie dilatée et Insuffisance cardiaque congestive

Les patients atteints de cardiomyopathie dilatée ont souvent une prolongation de l'intervalle QT⁷⁰. Le mécanisme sous-jacent est du à une réduction des courants potassiques I_{to} et I_{K1} dans les myocytes déficientes^{71, 72}. De plus, des études ont démontré que l'ARNm de I_{Kr} et I_{to} étaient réduits au niveau du ventricule gauche chez les patients atteints d'une insuffisance cardiaque importante⁷³.

L'insuffisance cardiaque congestive est un facteur de risque majeur de survenue de TdP suite à une prise de bloqueurs d' I_{Kr} . À titre d'exemple, l'incidence de TdP induites par la dofétilide était de 2,1 % chez les patients présentant une réduction de la fraction d'éjection ventriculaire gauche. Parmi ces 2,1 %, les patients ayant subi un IM récent développaient moins souvent des TdP comparativement aux patients atteints d'une insuffisance cardiaque chronique⁷⁴.

c) Hypertension

Certains auteurs ont remarqué que les patients atteints d'une hypertension essentielle présentaient un prolongement de l'intervalle QT, surtout chez ceux atteints d'une hypertrophie ventriculaire gauche^{75, 76}. De plus, les patients hypertendus présentant une hypertrophie ventriculaire gauche ont une mécanistique de repolarisation altérée, puisqu'un changement de la fréquence cardiaque induit une réponse rapide et exagérée

de l'intervalle QT⁷⁷; ceci peut induire un risque élevé chez des patients similaires prenant des médicaments qui prolongent l'intervalle QT.

e) Bradycardie

La fréquence cardiaque est inversement proportionnelle à la durée de repolarisation cardiaque⁵⁰; en effet, quand la fréquence diminue, ceci induit une augmentation de la durée de repolarisation. De plus, il a été démontré que la bradycardie augmente l'amplitude des EAD et peut produire une repolarisation anormale, augmentant le risque de TdP⁷⁸. Il est également bien établi que la majorité des bloqueurs d'I_{Kr} prolongent préférentiellement le temps de repolarisation à de basses fréquences cardiaques. Cette caractéristique de blocage fréquence-dépendante (reverse-rate dependence) des bloqueurs d'I_{Kr} est un facteur important prédisposant la survenue de TdP à de basses fréquences cardiaques. Ainsi, les bloqueurs d'I_{Kr} augmentent le risque de TdP majoritairement dans une situation de bradycardie dans la mesure où aucune accumulation d'I_{Ks} à de basses fréquences n'est possible⁷⁹. En effet, bien que le courant I_{Ks} a une désactivation lente, il s'accumule peu à basses fréquences. De plus, les pauses provoquées par les extrasystoles peuvent être plus importantes que la bradycardie elle-même dans l'initiation de plusieurs cas de TdP⁸⁰. Notons qu'une bradycardie peut être causée, *inter alia*, par un rythme sinusal lent, une hypothyroïdie ou une hypothermie.

f) Syndrome de Kawasaki et myocardite

D'autres pathologies cardiaques plus rares peuvent être citées comme facteurs prédisposant la survenue d'arythmies importantes d'origine médicamenteuse; celles-ci peuvent inclure le syndrome de Kawasaki et la myocardite^{81, 82}. Il semblerait que la

prolongation de l'intervalle QT chez les patients atteints du syndrome de Kawasaki serait due à une morphologie anormale de l'onde T alors que chez les patients atteints de myocardite, la prolongation serait due à l'insuffisance cardiaque sous-jacente.

2.2.3.2. D'origine non cardiaque

a) Les facteurs génétiques

Parmi les patients atteints de LQTS congénital, nombreux restent toute leur vie asymptomatiques et ne sont jamais détectés. Ces personnes sont particulièrement à risque puisqu'ils ne savent pas qu'ils doivent prendre des précautions très sévères, surtout en ce qui concerne la prise de médicaments potentiellement arythmogènes. Ainsi, le LQTS congénital peut être considéré comme un facteur de risque du LQTS et TdP d'origine médicamenteuse. De plus, Roden *et al.* ont découvert l'existence de plusieurs variations dans la région codante de l'ADN des gènes impliqués dans le LQTS congénital⁸³. Ces variations ne causent pas par elles-mêmes le LQTS congénital mais peuvent prédisposer certaines personnes à une prolongation exagérée de l'intervalle QT, pouvant aboutir à des TdP graves.

b) Troubles électrolytiques

L'hypokaliémie est de loin la cause métabolique la plus commune favorisant le LQTS médicamenteux et les TdP, principalement résultant de la prise de diurétiques⁸⁴. Plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer la relation entre l'hypokaliémie et l'induction d'arythmies. En effet, 1) la présence d'une hypokaliémie peut entraîner une augmentation de l'automatisme ou une diminution de la conduction; une conduction

lente peut prédisposer ces patients à des cycles de réentrée puisque une déficience sévère en ion potassium extracellulaire implique une dépolarisation de la membrane cellulaire⁵⁰. Par ailleurs, 2) il a été décrit qu'une faible concentration extracellulaire en potassium réduirait I_{Kr} et favoriserait la prolongation de l'intervalle QT; ceci fut expliqué par une inactivation rapide plus importante d' I_{Kr} en situation d'hypokaliémie⁸⁵ ou par un blocage d' I_{Kr} compétitif induit par le sodium⁸⁶. 3) L'hypokaliémie agit également en augmentant la liaison du médicament au canal, résultant en une prolongation excessive de la repolarisation⁸⁷. Hormis l'effet hypokaliémiant des diurétiques, il est intéressant de noter que certains d'entre eux, tels que l'indapamide et le triamtérène, bloquent I_{Ks} , et peuvent être directement responsables d'une prolongation de la repolarisation et de l'augmentation du risque d'apparition de TdP^{88, 89}.

La *déplétion en magnésium ou hypomagnésémie* a été également décrite comme un facteur important qui peut précipiter la survenue de LQTS médicamenteux et de TdP. Une faible concentration de magnésium extracellulaire, à l'instar du potassium, a été associée à des troubles de la dépolarisation, de la repolarisation et de l'automaticité. Cependant, et contrairement au potassium, le mécanisme par lequel de faibles niveaux de magnésium génèrent des potentiels d'action anormaux est encore mal compris^{90, 91}. Néanmoins, il est bien établi qu'un supplément de magnésium est protecteur⁹⁰.

Une *hypocalcémie* peut être également un facteur prédisposant aux TdP, telle que décrite dans certains cas cliniques⁹². Par ailleurs, une surcharge calcique intracellulaire peut induire des arythmies; un des mécanismes décrits étant l'activation du courant transitoire entrant I_{ti} ^{93, 94}. Cette activation provoquerait l'apparition de post-dépolarisations

retardées (delayed afterdepolarizations DAD) qui peuvent déclencher des arythmies⁹⁴. Ce phénomène pourrait expliquer, entre autres, l'incidence plus importante des TdP d'origine médicamenteuse chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque congestive⁹⁵.

c) Troubles hépatiques

La prolongation de l'intervalle QT et des TdP d'origine médicamenteuse est significativement accentuée chez les patients atteints de troubles ou de pathologies hépatiques^{96, 97}. En effet, une diminution de l'activité métabolique de l'organisme induirait une faible élimination des médicaments métabolisés principalement par le foie; ceci induit alors une accumulation de ces médicaments, une augmentation des concentrations sériques, et un risque accru de prolonger l'intervalle QT.

d) Maladies cérébrovasculaires

Certains auteurs ont remarqué qu'une prolongation importante de l'intervalle QT était présente chez des patients atteints d'hémorragies sub-arachnoïdiennes, d'encéphalite, d'ischémie cérébrale et de traumatismes crâniens^{98, 99}. Un trouble du système sympathique causé par une hémorragie intracrânienne serait probablement à l'origine du mécanisme d'induction de la prolongation de l'intervalle QT et des TdP. Cependant, cette prolongation disparaît en moins de quelques semaines après l'accident cérébrovasculaire.

2.2.4. Traitement du LQTS et TdP d'origine médicamenteuse

La thérapie initiale de choix lors d'un épisode de battements ectopiques et TdP liés à l'allongement de l'intervalle QT est l'administration immédiate de sulfate de magnésium par voie IV (2 g en dose unique suivi par une perfusion de 2-4 mg/min)¹⁰⁰. Si les TdP ne disparaissent pas, des tachycardies ventriculaires polymorphiques et hémodynamiquement instables ainsi que des fibrillations ventriculaires peuvent se développer : à ce stade, une défibrillation non synchronisée immédiate est recommandée. Le potassium sérique doit être maintenu à de hautes concentrations (4,5 - 5 mmol/L). De plus, il est primordial de suspendre tout médicament qui peut prolonger l'intervalle QT ainsi que les médicaments qui peuvent interférer avec le métabolisme des médicaments qui prolongent le QT. Il est également important de déceler tout facteur de risque présent en essayant de l'éliminer ou de le gérer adéquatement.

La stimulation endoveineuse rapide du myocarde (ou overdrive transvenous pacing) est un traitement très efficace pour prévenir les récurrences¹⁰¹. Cette stimulation est également recommandée dans des cas résistants au magnésium, et lorsque les TdP sont précipitées par une pause ou une bradycardie. Des stimulations cardiaques de l'ordre de 90 - 110 battements/min sont utilisées. L'isoprotérénol, titré de façon à avoir une fréquence cardiaque supérieure à 90 battements/min, est utilisé lorsqu'il est impossible d'effectuer une stimulation temporaire ou lors de la préparation de l'insertion d'un cathéter transveineux¹⁰². L'isoproterenol est contre-indiqué chez les patients atteints de LQTS congénital ou d'une insuffisance cardiaque ischémique.

Hormis la prise en charge aiguë et à moyen terme, le traitement à long terme consiste à éliminer (ou remplacer) les agents responsables du prolongement de l'intervalle QT. Les conditions qui prédisposent à un trouble électrolytique doivent être corrigées.

3. Autres facteurs de risque d'intérêt prédisposant au LQTS médicamenteux

Nous avons vu précédemment quelques facteurs de risque qui favorisent le développement d'une prolongation de l'intervalle QT et/ou de TdP. Dans cette partie, nous allons exposer en détail quatre autres facteurs de risque qui forment le noyau de la recherche effectuée tout au long de ce doctorat. Ces quatre facteurs sont 1) le sexe féminin, 2) les interactions médicamenteuses de type pharmacocinétique (les transporteurs membranaires et les cytochromes), 3) les interactions médicamenteuses de type pharmacodynamique (antagonisme, synergie...) et 4) le diabète et la variation de la glycémie.

3.1. Le sexe féminin

3.1.1. Études cliniques

Au début des années 1920, Bazett décrit pour la première fois la présence d'une différence liée au sexe au niveau de l'électrophysiologie cardiaque, en observant un intervalle QT plus long chez la femme¹⁰³. Une soixantaine d'années plus tard, Abinader *et al.* reconnurent pour leur part que les femmes étaient à plus haut risque de développer des TdP suite à l'administration de médicaments tels que la prenylamine¹⁰⁴. En 1986, Roden *et al.* décrivaient les circonstances cliniques et les mécanismes associés à l'apparition de TdP et de LQTS induits par la quinidine: parmi les 24 patients étudiés, 16 étaient des femmes (66%)⁶⁰. En 1993, l'analyse de Makkar *et al.* de 332 cas de TdP induits par des antiarythmiques démontra que 70 % des cas étaient observés chez les femmes¹⁰⁵. Dans une autre étude, 15 des 25 cas associés à des TdP suite à la prise de terfénaire

(antihistaminique non sédatif) survenaient chez des femmes¹⁰⁶. L'étude SWORD (Survival with Oral *d*-Sotalol) impliquant un antiarythmique de classe III, le *d*-sotalol, décrit le genre féminin comme facteur de risque majeur associé à une augmentation du risque de morts arythmiques dans une population en post-infarctus du myocarde¹⁰⁷. De plus, une grande étude de cas tirés des rapports de la FDA sur 346 cas d'effets cardiaques sérieux observés avec l'érythromycine (antibiotique macrolide) conclut que 65 % de la cohorte était des femmes¹⁰⁸.

3.1.2. Mécanismes hormonaux et physiologiques

Il est bien établi qu'une diminution de l'intervalle QT est observée à la puberté chez les hommes alors qu'aucun changement notable ne s'observe chez les femmes. Par la suite, l'intervalle QT augmente graduellement chez les hommes de la puberté jusqu'à l'âge de 50 ans, moment où il redevient similaire à celui des femmes¹⁰⁹. La diminution de l'intervalle QT observée durant la puberté chez les hommes serait due aux androgènes (spécifiquement à la testostérone) plutôt qu'aux estrogènes. En effet, une étude effectuée chez des hommes castrés montre que ces derniers ont un intervalle JT plus long par rapport aux hommes non-castrés (*l'intervalle JT reflète la repolarisation ventriculaire et correspond à l'intervalle compris entre la fin du complexe QRS et la fin de l'onde T*)¹¹⁰. La même étude montre que des femmes ayant un syndrome de virilisation auraient des intervalles JT plus courts comparativement aux hommes castrés et aux femmes normales. De plus, il a été démontré que des athlètes ayant pris de grandes doses de stéroïdes anabolisants androgéniques avaient des intervalles QT plus courts¹¹¹. Par ailleurs, une étude rétrospective ne démontre aucun effet significatif d'une hormonothérapie de remplacement (estrogène) sur l'intervalle

QT chez les femmes post-ménopausées, démontrant ainsi l'absence d'effet des estrogènes sur le QT¹¹². Dans un autre ordre d'idées, les femmes sous contraception orale ont un plus grand risque de subir des extrasystoles ventriculaires comparativement aux femmes non traitées¹¹³, suggérant ainsi que l'estrogène ou la progestérone pourraient être arythmogéniques.

Les récepteurs à l'estrogène et à l'androgène se retrouvent dans le myocarde et plusieurs études ont démontré le rôle modulateur de ces hormones sur les niveaux d'ARNm de canaux cardiaques calciques et potassiques chez le lapin et la souris^{114, 115}. Une étude de Hara *et al.* a évalué les effets de la dihydrotestostérone (DHT) et de l'estradiol sur le potentiel d'action des muscles papillaires de lapin et conclut que l'estradiol augmente significativement le potentiel d'action alors que la DHT le diminue significativement¹¹⁶. Drici *et al.* ont démontré que la quinidine prolonge l'intervalle QT chez des lapins traités par l'estradiol d'une façon plus prononcée que les animaux traités par la DHT¹¹⁵. Cette étude a aussi démontré que l'effet chronique de l'estradiol et de la DHT diminue l'expression des ARNm des canaux potassiques responsables du courant ultra-rapide I_{Kur} sans effet significatif sur la composante rapide I_{Kr} . Les différences liées au sexe dans la densité des courants ioniques intrinsèques ont également été décrites par Liu *et al.*¹¹⁷. En effet, les densités d' I_{Kr} et du courant potassique entrant I_{K1} étaient inférieures chez les lapins femelles comparativement aux lapins mâles. Ceci induisait une repolarisation plus lente et une prédisposition au LQTS chez les femelles. Une étude plus récente a analysé l'effet de la déficience en androgène sur la repolarisation ventriculaire chez la souris^{114, 118}. Une déficience en androgène entraîne une réduction de la densité d' I_{Kur} dans les ventricules, ce qui provoque un allongement du potentiel d'action et de l'intervalle QT. Ces

résultats suggèrent alors que les hormones mâles contribuent à la différence liée au sexe dans la repolarisation cardiaque.

Tous ces résultats suggèrent que les hommes possèdent un facteur de protection contre les effets nocifs des médicaments sur la repolarisation cardiaque grâce à un taux d'androgène supérieur, alors que les estrogènes chez la femme pourraient prédisposer aux arythmies. De plus, les hormones sembleraient avoir un effet direct sur les canaux ioniques. Cependant, l'ordre de grandeur des différences notées suggère que ces observations ne procurent qu'une partie du mécanisme expliquant les variations liées au sexe en ce qui a trait à la repolarisation ventriculaire et les arythmies. En effet, les différences hormono-dépendantes observées dans ces études restent très faibles par rapport aux grandes différences observées en clinique. De plus, les concentrations hormonales utilisées ex-vivo et in vitro sont largement supérieures à celles observées chez l'humain en situation physiologique normale. Par ailleurs, bien que le courant potassique repolarisant I_{Kur} soit important chez la souris, le rôle de ce courant reste discutable chez les humains dans la mesure où le courant majeur de repolarisation ventriculaire est le courant potassique rectifiant retardé (I_K). Il faut de plus se rappeler que les mutations au niveau du gène codant pour I_K (et non pour I_{Kur}) sont principalement responsables de l'apparition de LQTS congénital.

Il est important de réaliser que les éléments décrits jusqu'à maintenant ne considèrent pas nécessairement le médicament dans le LQTS d'origine médicamenteuse. En effet, elles ne prennent pas en considération l'effet des hormones ou du genre sur les changements dans l'affinité du médicament à se lier aux canaux ioniques. Également, elles ne considèrent pas d'autres facteurs hormono-sensibles tels que les transporteurs

membranaires ou les enzymes qui métabolisent ces médicaments et qui peuvent moduler indirectement leurs actions.

3.2. Interactions médicamenteuses de type pharmacocinétique

Le risque de survenue d'un prolongement de l'intervalle QT et/ou de TdP d'origine médicamenteuse dépend généralement de la concentration du médicament disponible au site de fixation, i.e. le site de liaison à I_{Kr} principalement (ou à d'autres canaux ioniques). Cet effet de blocage concentration-dépendant met en relief l'importance de la pharmacocinétique du médicament et les différents facteurs qui peuvent moduler cette pharmacocinétique. Parmi ces facteurs, nous pouvons distinguer deux paramètres importants, qui sont le métabolisme des médicaments (médié principalement par les cytochromes P450 (CYP)) et le transport transmembranaire (d'influx et d'efflux). Dans cette partie, nous allons revoir et décrire ces deux paramètres dans l'organisme en général, puis nous nous attarderons sur leurs implications au niveau cardiaque.

3.2.1. Les cytochromes P450

3.2.1.1. Le métabolisme des médicaments : un petit rappel

Le métabolisme *per se* fait référence à la transformation, via une réaction enzymatique, d'un médicament en un ou plusieurs autres composés actifs ou inactifs au plan pharmacologique¹¹⁹. De nombreux organes peuvent réaliser cette transformation : peau, poumon, rein, intestin... Cependant, le principal site de biotransformation est localisé au niveau hépatique. Cette concentration du métabolisme est favorisée par un flux sanguin

très important au niveau du foie, comparativement aux autres organes : en effet, il reçoit environ 1,5 L de sang par minute. Les hépatocytes contiennent un grand nombre d'enzymes impliquées dans la transformation des médicaments, en particulier les réactions d'oxydo-réduction, les hydroxylations... Nous pouvons distinguer d'une façon schématique deux phases de métabolisme selon les processus de transformation induits par ces enzymes : les réactions de phase I et celles de phase II¹⁹.

1) Les *réactions de phase I* sont des réactions essentiellement cataboliques et comportent :

- Les réactions d'oxydation qui sont majoritairement localisées dans les cellules hépatiques et intestinales. Elles consomment du NADPH (nicotinamide phosphate réduit), de l'oxygène moléculaire et sont médiées par les **CYPs**.
- Les réactions de réduction sont beaucoup moins fréquentes et sont présentes principalement au niveau hépatique mais également dans l'intestin via la flore bactérienne.
- L'hydrolyse est une réaction simple qui intervient un peu partout, dans le foie, les différents organes et même dans le plasma. Elle sert à cliver diverses formes chimiques, tels que les esters ou les amides.

Les réactions de phase I conduisent à des dérivés plus polaires (donc plus facilement éliminables par l'organisme) dont les groupements fonctionnels sont le plus souvent des hydroxyles (-OH), des amines (-NH₂) ou des carboxyles (-COOH).

2) Les *réactions de phase II* sont des réactions synthétiques et sont, *inter alia*, des réactions de conjugaison qui s'effectuent sur des groupements fonctionnels issus des réactions de phase I; les réactions de phase II permettent d'ajouter à la molécule un

groupement hydrophile qui peut être l'acide glucuronique, un groupement sulfate, un acide aminé (e.g. glycine, taurine), le glutathion...

3.2.1.2. Définitions et fonctions des CYPs

Les CYPs forment une superfamille d'hématoprotéines qui furent identifiés à l'origine comme des pigments dans des microsomes de foie de rat¹²⁰; en effet, le nom de cytochrome P450 provient de la propriété de ces pigments d'émettre un spectre d'absorbance à 450 nm, spécifique à ces hémoprotéines¹²¹.

Les CYPs permettent un grand nombre de réactions chimiques, dont la plus importante est l'hydroxylation. Pour être fonctionnels, les CYPs ont besoin d'une source d'électrons qui sont apportés par une autre protéine : cette dernière serait la NADP cytochrome P450 réductase si le CYP est localisé dans le réticulum endoplasmique, ou la ferrédoxine si le CYP est situé dans les mitochondries. Il est bien établi que le NADPH est la source majeure d'électrons dans ce système¹²². Les CYPs sont des enzymes appelées mono-oxygénases puisqu'elles incorporent un atome d'oxygène à partir de l'oxygène moléculaire. Elles transforment une grande variété de médicaments et de composés chimiques (plus de 200 000 produits chimiques ont été répertoriés)¹²³. Certains CYPs sont responsables du métabolisme d'un nombre limité de structures chimiques (e.g. les stéroïdes ou les acides gras), alors que d'autres CYPs présentent une spécificité de substrats plus large.

Il existe plus de 3000 séquences de gènes de CYPs connus appartenant à toutes les espèces. Chez l'homme, 57 gènes et 47 pseudogènes ont été séquencés¹²⁴. La variété des propriétés catalytiques présente dans le système des mono-oxygénases trouve son

origine dans la diversité de structure de la partie apoprotéique du CYP. Ainsi, les CYPs ont été classés en familles et sous-familles selon le degré d'homologie entre les séquences primaires des acides aminés constitutifs, les critères phylogénétiques et l'organisation génétique. En règle générale, les CYPs qui appartiennent à une même famille possèdent plus de 40 % d'homologie de séquence; à l'intérieur d'une même sous-famille, l'identité peut être supérieure à 55 %. Les gènes qui appartiennent à une même sous-famille sont groupés sur un même chromosome sous forme de clusters¹²⁵.

Les CYPs des familles 1, 2 et 3 sont en général impliqués dans les réactions de phase I du métabolisme des médicaments et d'autres xénobiotiques, alors que les autres familles possèdent des fonctions endogènes. Différentes proportions des différents CYPs sont retrouvées dans le foie. En effet, le CYP3A4 constitue 20 à 50 % des isoformes retrouvés, le CYP2C8/9 de 10 à 30 %, le CYP2D6 de 2 à 6 %, le CYP2C19 de 1 à 10 %, le CYP1A2 de 1 à 13 % et les CYP2E1, 2A6 et 4A forment 7 %¹²⁶. Ces enzymes représentent plus de 90 % des enzymes impliqués dans le métabolisme oxydatif des médicaments. Parmi les 57 CYPs humains, nous distinguons 15 qui sont impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques; ceux-ci appartiennent essentiellement aux familles 1, 2 et 3. Enfin, plus de 90 % du métabolisme des médicaments est médié par l'activité des CYPs et plus de 2000 substrats/médicaments ont été identifiés à ce jour¹²⁷.

3.2.1.3. La sous-famille CYP3A : substrats, inducteurs et inhibiteurs

Nous distinguons 4 gènes dans la sous-famille 3A, i.e. 3A4, 3A5, 3A7 et 3A43¹²⁸. Cependant l'expression tissulaire de ces 4 isoformes diffère; en effet, CYP3A4 est exprimé principalement dans le foie, CYP3A5 dans les tissus extrahépatiques, et

CYP3A7 dans le foie fœtal alors que le CYP3A43 est très faiblement exprimé. Le CYP3A4 a un rôle fondamental puisqu'il métabolise plus de 50 % des médicaments issus de diverses classes thérapeutiques (antihistaminiques, anesthésiques, statines, corticostéroïdes, immunosuppresseurs...) (*Tableau 4*). Compte tenu de sa large implication dans tous ces médicaments, le CYP3A4 est impliqué dans de nombreuses interactions médicamenteuses en clinique. Des stéroïdes naturels tels que la testostérone et la progestérone sont également métabolisés par cet enzyme.

Il existe un important système de régulation – induction et inhibition – qui contrôle l'expression de cet enzyme, notamment par l'activation de facteurs de transcription par des ligands spécifiques¹²⁹.

Inhibiteurs	Substrats Forts	Substrats Moyens	Substrats Faibles	Inducteurs
Chloramphénicol	Amiodarone	Almotriptan	Alfentanil	Bosentan
Cimetidine	Amprénavir	Amlodipine	Alfuzosine	Butalbital
Clarithromycine	Atazanavir	Atorvastatine	Alprazolam	Carbamazépine
Érythromycine	Delavirdine	Bicalutamide	Astémizole	Éfavirenz
Fluconazole	Dihydroergotamine	Bosentan	Bromocriptine	Millepertuis
Isoniazide	Diltiazem	Buspirone	Carbamazépine	Modafinil
Itraconazole	Fosamprenavir	Chlorpromazine	Chloroquine	Névirapine
Jus de pamplemousse	Imatinib mésylate	Cinacalcet	Cisapride	Pentobarbital
Kétoconazole	Indinavir	Cyclophosphamide	Clindamycine	Phénobarbital
Miconazole	Méthysergide	Cyclosporine	Clonazépam	Phénytoïne
Orphénadrine	Nelfinavir	Dapsone	Clopidogrel	Primidone
Oxiconazole	Ritonavir	Doxycycline	Codéine	Rifabutine
Phénothiazine	Saquinavir	Élériptan	Colchicine	Rifampicine
Télicycline	Vérapamil	Erlotinib	Dexaméthasone	Topiramate
Tétracycline	Voriconazole	Étoposide	Diazépam	Troglitazone
Tétracycline	Warfarine	Félodipine	Dompéridone	
		Isradipine	Donépézil	
		Lopéramide	Doxorubicine	
		Loratadine	Fentanyl	
		Lovastatine	Flupenthixol	
		Mevacor	Flurazépam	
		Méfloquine	Gransétron	
		Méthadone	Hydrocodone	
		Montélukast	Hydrocortisone	
		Néfazodone	Lidocaïne	
		Nicardipine	Lopinavir/ritonavir	
		Nifédipine	Losartan	
		Nimodipine	Midazolam	
		Paclitaxel	Nitrazépam	
		Pioglitazone	Ondansétron	
		Praziquantel	Oxycodone	
		Propranolol	Pimozide	
		Repaglinide	Pravastatine	
		Rispéridone	Prednisolone	

		Sertraline Simvastatine Sirolimus Tamoxifène	Quétiapine Quinidine Sildénafil Tacrolimus Terfénadine Testostérone Vardénafil Zopiclone	
--	--	---	---	--

Tableau 4 : Quelques médicaments inhibiteurs, substrats ou inducteurs du CYP3A4
 (Adapté de www.intermed-rx.ca)

Un inducteur enzymatique du CYP3A4 par exemple entraîne l'augmentation de l'activité de l'enzyme en augmentant généralement la concentration intracellulaire de CYP3A4, donc son expression. Ceci est effectué par une augmentation de la transcription du gène associé à cette protéine¹³⁰. Il a été également démontré que l'induction enzymatique peut être due à une diminution du taux de dégradation de la protéine, plutôt qu'à des mécanismes transcriptionnels¹³¹. Pour mieux comprendre le mécanisme d'induction enzymatique, nous pouvons envisager la prise d'un substrat quelconque du CYP3A4 en concomitance avec un inducteur enzymatique. Ce dernier induira une augmentation du métabolisme du substrat en question, une augmentation de son élimination et une diminution de ses taux plasmatiques.

Un inhibiteur enzymatique est un produit capable de réduire l'activité catalytique d'une enzyme. Cet inhibiteur peut être ou non un substrat de l'enzyme en question. Cependant, tout substrat est un inhibiteur relatif vis-à-vis d'un autre substrat. En effet, le substrat avec la plus forte affinité pour l'enzyme va effectuer une compétition inhibitrice du métabolisme du substrat à affinité plus faible. Si on prend pour exemple l'association du vérapamil, substrat fort du CYP3A4, avec le losartan, un substrat faible du même enzyme. Dans ce cas-ci, le métabolisme du losartan sera diminué à cause de la compétition du vérapamil, ce qui induira une diminution de l'élimination du losartan et une augmentation de ses concentrations plasmatiques.

3.2.1.3. Variabilité interindividuelle / Polymorphismes

Comme on l'a vu précédemment, le métabolisme des médicaments est une étape cruciale dans leur détoxification et leur élimination. Ce métabolisme est principalement médié par quelques CYPs qui sont les CYPs 1A2, 2A6, 2B6, 2C9/19, 2D6, 2E1 et 3A4. Cependant, il existe une forte variabilité interindividuelle des activités basales et induites de certaines de ces enzymes. Lorsque la variabilité génétique en question est présente dans plus de 1 % de la population, cette variabilité est définie comme étant un polymorphisme. Dans certains cas, ces variations génétiques (changement au niveau du génotype) peuvent être associées à des modifications de l'activité enzymatique (changement au niveau du phénotype).

Parmi les phénotypes les plus étudiés, nous distinguons le polymorphisme d'activité du CYP2D6. L'effet de ce polymorphisme peut être une augmentation de l'activité (défini comme « métaboliseur rapide ») ou une diminution de celle-ci (défini comme « métaboliseur lent »)¹³². En ce qui concerne le CYP2C9, les variations génétiques affectant l'efficacité de l'enzyme représentent jusqu'à 32 % de la population¹³³. En revanche, et pour ce qui est du CYP3A – notre sous-famille d'intérêt –, l'impact clinique a été longtemps controversé. Des études récentes ont démontré clairement un lien entre certains polymorphismes de CYP3A5 et une variation de la pharmacocinétique de certains médicaments. Les médicaments dont le métabolisme est affecté par les polymorphismes de CYP3A5 sont le midazolam¹³⁴, le sirolimus¹³⁵, le tacrolimus¹³⁶, la ciclosporine¹³⁷, la simvastatine, l'atorvastatine¹³⁸ et la majorité des substrats de CYP3A4/3A5.

3.2.1.4. Modulation des CYPs et interactions médicamenteuses

A- Modulation des concentrations extracellulaires via les CYP hépatiques et intestinaux

Selon la pharmacocinétique classique d'une substance (substrat du CYP3A4) administrée par voie orale, un médicament est absorbé par diffusion passive dans les entérocytes (*Figure 6*). Une partie est ensuite rejetée dans la lumière intestinale par les transporteurs membranaires d'efflux tel que la P-glycoprotéine (P-gp) ou métabolisée par le CYP3A4 intestinal. Le médicament et ses métabolites sont ensuite véhiculés par la veine porte vers le foie où ils peuvent également être métabolisés. Ils sont ensuite sécrétés dans le canal biliaire par les P-gp ou diffusent dans la circulation systémique afin de produire l'effet pharmacologique recherché et/ou l'effet toxique indésirable.

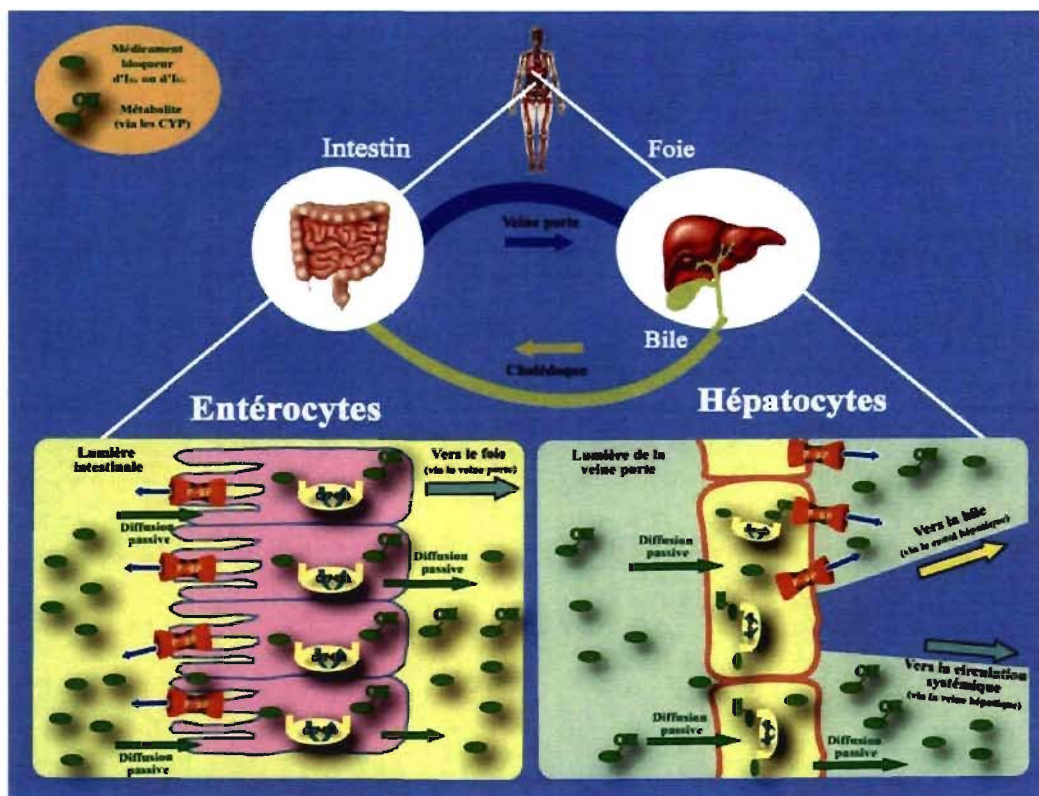


Figure 6 : Pharmacocinétique des médicaments au niveau de l'intestin et du foie¹³⁹

Nous pouvons ainsi prédire que l'inhibition du CYP3A4 par un inhibiteur spécifique va inévitablement aboutir à la diminution du métabolisme d'un médicament substrat du CYP3A4, par conséquent la diminution de son élimination. Ceci induit une augmentation de la concentration de ce médicament déversé dans la circulation systémique pour se distribuer dans tout l'organisme. En revanche, si le même médicament est administré en même temps (ou après) qu'un inducteur enzymatique du CYP3A4, nous observerons une augmentation de l'élimination, et une diminution des concentrations plasmatiques.

B- Modulation des concentrations intracellulaires via les CYPs cardiaques

Mis à part le métabolisme hépatique et en moindre partie intestinal, des études récentes ont démontré la présence d'un métabolisme oxydatif CYP-dépendant au niveau cardiaque¹⁴⁰. En effet, l'expression de 8 isoformes de CYP (CYP1A1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2J2 et CYP4B1) au niveau cardiaque a été bien établie^{141, 142}. Il est intéressant de remarquer que les isoformes de la sous-famille CYP3A (CYP3A4 et CYP3A5), qui sont les plus exprimés au niveau hépatique et intestinal, ne sont pas exprimés dans le coeur^{141, 143}. Cependant, il semblerait que les substrats de CYP3A seraient métabolisés par le CYP2J2, ce dernier étant abondamment exprimé dans le cœur. Une autre étude effectuée au sein de notre laboratoire suggère que le CYP2C8 situé au niveau cardiaque serait responsable du métabolisme du vérapamil *in situ*¹⁴⁴.

Par conséquent, et comme décrit schématiquement dans la *Figure 7*, les cardiomyocytes semblent être équipés en facteurs de détoxification que sont les CYPs et peuvent métaboliser des substrats respectifs *in situ* au sein des cardiomyocytes^{141, 145}. Ceci rajoute un risque supplémentaire d'interactions médicamenteuses au sein du cœur.



Figure 7 : Facteurs PK cardiaques pouvant moduler la survenue du LQTS médicamenteux

3.2.1.5. Modulation des CYPs comme facteur de risque du LQTS médicamenteux

Des études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques ont démontré que plusieurs substrats des CYP3A possédaient également une conformation structurale démontrant une capacité à se lier à I_{Kr} . En utilisant cette relation, notre laboratoire a identifié plusieurs bloqueurs d' I_{Kr} qui sont des substrats de CYP3A, dont l'érythromycine¹⁴⁶, le cisapride⁴⁹, le droperidol⁴⁵, le pimozide¹⁴⁷, le sildéfanil¹⁴⁸, la dompéridone¹⁴⁹ et la rispéridone¹⁵⁰.

Selon les principes connus de pharmacocinétique, on peut prédire que la co-administration de deux ou de plusieurs substrats des CYP3A conduirait à une interaction médicamenteuse avec cette enzyme. En effet, une inhibition compétitive de l'activité des CYP3A lors de l'usage concomitant de substrats de CYP3A provoque une augmentation des concentrations plasmatiques libres et totales de l'un de ces médicaments. Il devient ainsi possible de prédire que les concentrations tissulaires de l'un de ces médicaments seront augmentées. Si ce médicament s'accumule dans la région cardiaque et qu'il possède une affinité pour le blocage d' I_{Kr} , on pourrait observer une prolongation plus importante du potentiel d'action et un risque élevé de TdP.

Par exemple, il a été démontré que la co-administration de terfénadine et d'érythromycine conduisait à une accumulation critique de terfénadine dans le plasma et dans le cœur secondairement à l'inhibition des CYP3A par l'érythromycine. Ainsi, la terfénadine, connue pour bloquer I_{Kr} , s'accumulait et provoquait une prolongation importante de la repolarisation cardiaque et un risque augmenté de TdP¹⁰⁶. Pour cela, les interactions médicamenteuses de type pharmacocinétique qui sont médiées par les CYPs

– exprimés aussi bien au niveau hépatique et intestinal mais également *in situ* au niveau cardiaque – sont un facteur de risque majeur prédisposant au LQTS médicamenteux.

3.2.2. Les transporteurs membranaires

La distribution des xénobiotiques vers les tissus dépend principalement de leur capacité à entrer dans la cellule et de leur capacité à en sortir¹⁵¹. Cette distribution est médiée par plusieurs facteurs, i.e. 1) les propriétés physico-chimiques du médicament (pour un passage transmembranaire par diffusion passive), 2) son affinité pour les transporteurs d'influx et finalement 3) son affinité pour les transporteurs d'efflux.

Les propriétés physico-chimiques du médicament – qui favorisent la diffusion passive transmembranaire – sont des caractéristiques internes à la molécule elle-même et ne sont généralement pas modulables. Pour cela, nous ne nous attarderons pas ici sur ces propriétés. En revanche, notre grand intérêt se concentre sur le transport actif des médicaments induit par les transporteurs membranaires. Ces derniers sont actuellement classés en 2 grandes superfamilles, i.e. 1) la famille des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) et 2) la famille des transporteurs SLC (solute carriers). Chacune de ces 2 familles incluent des transporteurs d'influx et d'efflux.

3.2.2.1. La superfamille des transporteurs ABC

Ce n'est qu'en 1973 que certains chercheurs se rendirent compte que l'accumulation des xénobiotiques dépendait également de la capacité des cellules à les expulser¹⁵¹. Quelques années plus tard, Juliano et Ling isolèrent une large glycoprotéine dans la membrane plasmique de cellules CHO résistantes à la colchicine; cette protéine fut

nommée alors P-glycoprotéine (P-gp)¹⁵². Ce fut officiellement le premier transporteur de la famille des transporteurs ABC. Le gène codant pour P-gp fut identifié en 1987 sous le nom de *MDR1* (Multidrug Resistant)¹⁵³. Depuis, plusieurs transporteurs ABC ont été isolés et identifiés; en effet, nous retrouvons aujourd'hui ces transporteurs chez toutes les espèces. A titre d'exemple, 28 transporteurs ABC sont exprimés chez les *Saccharomyces*, 51 chez la *Drosophila* et 69 chez *E. coli*¹⁵⁴. Chez l'homme, plus de 48 transporteurs ABC ont été identifiés et classifiés.

A. Classification

La classification des transporteurs ABC est basée sur la séquence et l'organisation de leurs sites de liaison aux nucléotides (nucleotide binding domain ou NBD) et la similarité de la structure du gène. Les transporteurs ABC sont divisés en 7 sous-familles comme décrit dans le *Tableau 5*¹⁵⁵. Deux de ces sous-familles sont particulièrement identifiées comme étant responsables du transport des xénobiotiques; ce sont la sous-famille B avec les protéines MDR et la sous-famille C avec les protéines multidrug resistance-associated (MRP).

ABC1 (A)	MDR/TAP (B)	MRP/CFTR (C)	ALD (D)	OABP (E)	GCN20 (F)	White (G)
ABCA1	ABCB1 (MDR1)	ABCC1 (MRP1)	ABCD1 (ALDP)	ABCE1 (OABP)	ABCF1	ABCG1
ABCA2	ABCB2 (TAP1)	ABCC2 (MRP2)	ABCD2 (ALDR)		ABCF2	ABCG2 (BCRP)
ABCA3	ABCB3 (TAP2)	ABCC3 (MRP3)	ABCD3		ABCF3	ABCG4
ABCA4	ABCB4 (MDR3)	ABCC4 (MRP4)	ABCD4			ABCG5
ABCA5	ABCB5	ABCC5 (MRP5)				ABCG8
ABCA6	ABCB6	ABCC6 (MRP6)				
ABCA7	ABCB7	ABCC7 (CFTR)				
ABCA8	ABCB8	ABCC8 (SUR1)				
ABCA9	ABCB9	ABCC9 (SUR2)				
ABCA10	ABCB10	ABCC10 (MRP7)				
ABCA12	ABCB11 (BSEP)	ABCC11 (MRP8)				
ABCA13		ABCC12 (MRP9)				
		ABCC13				

Tableau 5 : Classification des transporteurs ABC humains (Adapté de¹⁵⁵)
(Les transporteurs en foncé représentent ceux qui sont reconnus pour transporter des médicaments)

B- Structure et Mécanisme d'action

Pour assurer leur activité de transport, les transporteurs ABC ont besoin d'un minimum de quatre domaines. Deux de ces domaines sont des domaines transmembranaires (TMD pour transmembrane domain) qui forment le site de liaison et procurent la spécificité, alors que les deux autres sont des NBD qui lient et hydrolysent l'ATP pour aboutir à la translocation de la molécule liée¹⁵⁶.

Le mécanisme d'action des transporteurs ABC n'est pas encore complètement élucidé. Cependant, les auteurs s'entendent sur un mécanisme commun qui est décrit dans la

Figure 8¹⁵⁶; la liaison d'une molécule à une poche de haute affinité formée par les TMD induit un changement conformationnel des NBD; ceci résulte en une affinité plus importante envers l'ATP. Deux molécules d'ATP se lient aux NBD. L'énergie relarguée grâce à la formation du dimère NBD fermé cause un changement conformationnel au niveau des TMD. L'hydrolyse de l'ATP – qui est une conséquence de la conformation fermée – déclenche la dissolution du dimère NBD fermé; ce qui résulte en des changements conformationnels supplémentaires dans les TMD. Finalement, le phosphate et l'ADP relargués restaurent le transporteur en un dimère NBD ouvert, prêt à un autre cycle.

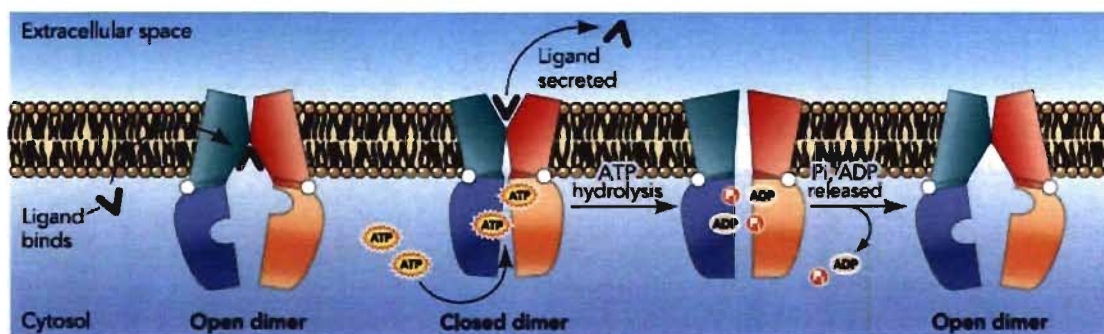


Figure 8 : Mécanisme de transport actif des transporteurs ABC (Extrait de¹⁴⁵)

C. Rôle physiologique

Les transporteurs ABC peuvent être des transporteurs d'influx ou d'efflux, selon leur positionnement du côté apical ou baso-latéral. Les transporteurs d'efflux, tels que la P-gp, jouent un rôle très important dans la régulation de l'absorption des médicaments. À titre d'exemple, la P-gp est hautement exprimée sur la bordure en brosse des entérocytes (Figure 6). Dans ce milieu, la P-gp est une pompe active qui lie et transporte activement

des médicaments (substrats de P-gp) contre un gradient de concentration. Ce processus joue un rôle primordial dans l'efflux de xénobiotiques vers la lumière intestinale, exposant ainsi le médicament à moins d'absorption et à plus de métabolisme. Il est en de même dans les hépatocytes qui expriment des transporteurs membranaires tels que la P-gp et qui jouent un rôle de sécrétion des xénobiotiques vers la bile, empêchant ainsi la libération du médicament dans la circulation systémique. De plus, les transporteurs ABC sont exprimés dans plusieurs organismes, tel que la barrière hémato-encéphalique, la barrière placentaire, les testicules, les tubules rénaux... Donc, le rôle de transport que jouent les transporteurs ABC est souvent un rôle de protection et de détoxification de l'organisme en général, et de certains organes spécifiques en particulier.

3.2.2.2. La superfamille des transporteurs SLC

Contrairement aux transporteurs ABC qui hydrolysent l'ATP pour transporter les substrats, les transporteurs SLC utilisent le gradient électrochimique des solutés inorganiques (ou organiques) comme force de transport. Les protéines SLC sont des transporteurs indispensables à l'absorption cellulaire et à l'homéostasie de plusieurs nutriments essentiels¹⁵⁷. De plus, il est devenu de plus en plus établi durant la dernière décennie qu'un nombre important de médicaments partagent les mêmes voies de transport que les nutriments. Un rôle important a été attribué à ces transporteurs dans l'absorption, l'excrétion et la toxicité de plusieurs médicaments, ainsi que dans la modulation de leur profil pharmacocinétique et pharmacodynamique.

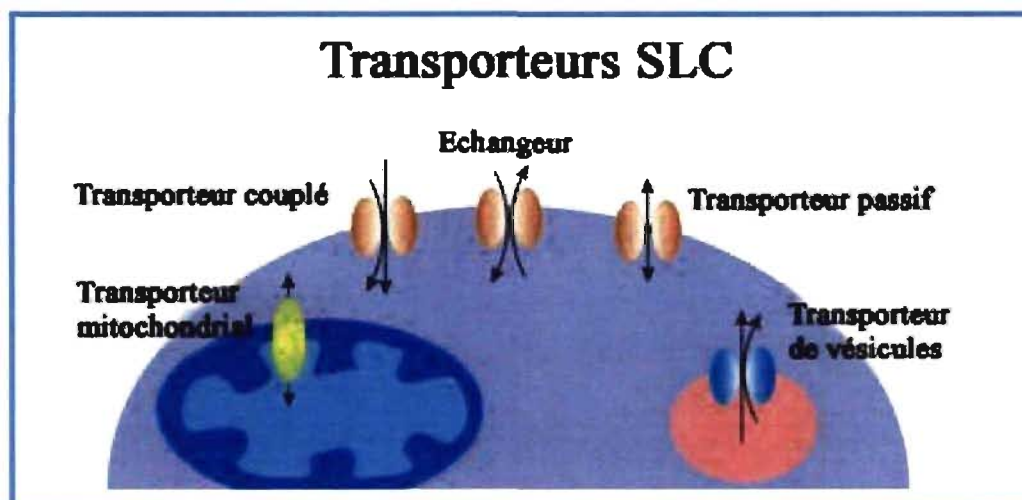


Figure 9 : Famille des transporteurs SLC (Adapté de¹⁵⁸)

A. Classification

Contrairement aux transporteurs ABC qui effectuent un transport actif médié par une source d'énergie (l'ATP), les transporteurs SLC comportent des transporteurs passifs, des transporteurs ioniques couplés et des échangeurs (*Figure 9*)¹⁵⁸. Un transporteur peut être assigné à une famille SLC spécifique s'il possède au moins 20 à 25 % de la séquence d'acides aminés par rapport aux autres membres de cette famille. La liste des familles SLC qui existe actuellement est citée dans le *Tableau 6*. Les familles SLC incluent, *inter alia*, les transporteurs organiques d'anions (OATP), les transporteurs organiques de cations (OCT) et les transporteurs organiques de cation/carnitine (OCTN).

Familles de transporteurs SLC		Total
SLC1	The high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family	7
SLC2	The facilitative GLUT transporter family	14
SLC3	The heavy subunits of the heteromeric amino acid transporters	2
SLC4	The bicarbonate transporter family	10
SLC5	The sodium glucose cotransporter family	8
SLC6	The sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family	16
SLC7	The cationic amino acid transporter/glycoprotein-associated amino-acid transporter family	14
SLC8	The Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger family	3
SLC9	The Na ⁺ /H ⁺ exchanger family	8
SLC10	The sodium bile salt cotransport family	6
SLC11	The proton coupled metal ion transporter family	2
SLC12	The electroneutral cation-Cl cotransporter family	9
SLC13	The human Na ⁺ -sulfate/carboxylate cotransporter family	5
SLC14	The urea transporter family	2
SLC15	The proton oligopeptide cotransporter family	4
SLC16	The monocarboxylate transporter family	14
SLC17	The vesicular glutamate transporter family	8
SLC18	The vesicular amine transporter family	3
SLC19	The folate/thiamine transporter family	3
SLC20	The type-III Na ⁺ -phosphate cotransporter family	2
SLC21/SLCO	The organic anion transporting family	11
SLC22	The organic cation/anion/zwitterion transporter family	18
SLC23	The Na ⁺ -dependent ascorbic acid transporter family	4
SLC24	The Na ⁺ /(Ca ²⁺ -K ⁺) exchanger family	5
SLC25	The mitochondrial carrier family	27
SLC26	The multifunctional anion exchanger family	10
SLC27	The fatty acid transport protein family	6
SLC28	The Na ⁺ -coupled nucleoside transport family	3
SLC29	The facilitative nucleoside transporter family	4
SLC30	The zinc efflux family	9
SLC31	The copper transporter family	2
SLC32	The vesicular inhibitory amino acid transporter family	1
SLC33	The acetyl-CoA transporter family	1
SLC34	The type-II Na ⁺ -phosphate cotransporter family	3
SLC35	The nucleoside-sugar transporter family	17
SLC36	The proton-coupled amino acid transporter family	4
SLC37	The sugar-phosphate/phosphate exchanger family	4
SLC38	The System A and N, sodium-coupled neutral amino acid transporter family	6
SLC39	The metal ion transporter family	14
SLC40	The basolateral iron transporter family	1
SLC41	The MgtE-like magnesium transporter family	3
SLC42	The Rh ammonium transporter family (pending)	3
SLC43	The Na ⁺ -independent, system-L-like amino acid transporter family	2
Total		298

Tableau 6 : Liste des familles de transporteurs SLC (Adapté de¹⁵⁸)

B. Rôle physiologique et pharmacologique

D'après le tableau précédent, on remarque que les différentes familles SLC incluent des transporteurs physiologiques de divers ions et nutriments nécessaires au bon fonctionnement des cellules (échangeur d'ions, transporteurs de glucose...). En association avec ces propriétés physiologiques, les transporteurs SLC jouent un rôle très important en pharmacologie clinique. En effet, plusieurs médicaments issus de diverses classes thérapeutiques partagent cette voie de transport qu'offrent les transporteurs SLC avec les divers nutriments¹⁵⁷. En effet, un rôle substantiel a été attribué à ces protéines dans l'absorption orale et la biodisponibilité des médicaments¹⁵⁹, dans la résistance aux médicaments¹⁶⁰, dans l'excrétion de médicaments et de leurs métabolites par des transporteurs SLC du rein et du foie, et dans la toxicité de ces médicaments¹⁶¹⁻¹⁶³.

3.2.2.3. Variabilité interindividuelle / Polymorphismes

A- Les transporteurs ABC

Il est bien établi que la variabilité interindividuelle de la réponse d'un médicament est due, entre autres, à l'expression des transporteurs médicamenteux dans les divers tissus humains. En effet, plusieurs polymorphismes de gènes codant pour différents transporteurs ABC ont été détectés, et ces polymorphismes font en sorte qu'une personne est déficiente en P-gp par exemple comparativement à un autre individu. Actuellement, la mutation silencieuse à la position 3435 de l'exon 26 (C3435T) est le seul polymorphisme qui affecte l'expression de P-gp dans les tissus humains identifiés¹⁶⁴. Ainsi, les individus portant le génotype TT avaient 1,5 fois moins de P-gp

exprimé dans le rein, et 2 fois moins exprimé dans l'intestin grêle comparativement au génotype CC^{165, 166}. De plus, des concentrations élevées de digoxine – un substrat de P-gp – furent détectées chez les patients à génotype TT¹⁶⁴. Cependant, plusieurs études qui avaient pour but de corrélérer le polymorphisme de P-gp avec les changements de l'expression et de la fonction de cette dernière, ont abouti à des études contradictoires¹⁵⁵. Une explication possible de ces contradictions réside dans le fait que toutes ces études se concentrent sur le seul polymorphisme C3435T alors qu'il semblerait que ce sont des haplotypes – un haplotype étant une combinaison de 2 ou plusieurs SNP (single nucleotide polymorphism) potentiellement liés – qui seraient responsables du changement phénotypique. D'autres polymorphismes ont été trouvés sur d'autres transporteurs ABC, tel que MRP2, BCRP... (*Tableau 7*)^{167, 168}. Comme l'intérêt des scientifiques sur les transporteurs ABC s'est surtout développé au cours des dix dernières années, un certain temps est encore nécessaire avant de pouvoir détecter tous les polymorphismes impliqués et ceux qui jouent un rôle significatif en clinique.

B- Les transporteurs SLC

Plusieurs mutations ont été détectées dans les transporteurs SLC et ont été impliquées comme étant la cause de plusieurs pathologies humaines. A titre d'exemple, des mutations dans le transporteur des acides aminés cationiques SLC7A7 ou SLC7A9 résultent en une intolérance à la protéine lysinurique et à la cystinurie respectivement¹⁵⁸. Deux différents types d'hypertension résultent de mutations dans les gènes SLC12: le co-transporteur rénal Na-K-2Cl (SLC12A1) pour le syndrome de Bartter¹⁶⁹ et le co-transporteur rénal NaCl (SLC12A3) pour le syndrome de Gitelman¹⁷⁰. Des altérations dans le transporteur du glucose-6-phosphate (SLC37A4) causent une accumulation de

glycogène et des altérations dans le transporteur ferroportin (SLC40A1) induisent une hémochromatose¹⁷¹.

Mis à part les pathologies induites par les mutations au niveau de certains des transporteurs SLC, certaines mutations dans les transporteurs de médicaments peuvent aboutir à des variations significatives de leurs propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Par exemple, la famille des OATP (transporteurs d'influx), qui est responsable de l'entrée de plusieurs médicaments anioniques à l'intérieur de la cellule, comprend plusieurs polymorphismes qui peuvent altérer ce transport¹⁷². En effet, la pravastatine, un inhibiteur de la HMG-CoA réductase (enzyme responsable de la synthèse du cholestérol), est un substrat connu de l'OATP1B1 (SLCO1B1). Niemi *et al.* ont remarqué que les individus présentant un génotype 521 TC avaient en moyenne une concentration plasmatique de pravastatine 106 % plus élevée comparativement aux individus à génotype 521 TT¹⁷³.

Familles de Transporteurs	Nom du Transporteur	SNP	Activité	Références
Transporteurs d'Efflux	MDR1 (ABCB1)	C3435T (exon 26)	↓	164
	MRP1 (ABCC1)	W1246C G1299T (exon 10)	↓ ↓	174 175, 176
	MRP4 (ABCC4)	???		
	MRP5 (ABCC5)	???		
	MRP7 (ABCC10)	???		177
	BCRP (ABCG2)	P269S Q141K (exon 5)	↓ ↓	168 178
	ABCA8	???		
Transporteurs d'Influx	OCT3 (SLC22A3)	rs4709426 and rs3106164	???	179
	OCTN2 (SLC22A5)	G-207C	↓ (???)	180

Tableau 7 : Polymorphismes décrits dans les transporteurs ABC et SLC

3.2.2.4. Expression cardiaque des transporteurs ABC et SLC

Plusieurs membres des familles de transporteurs ABC et SLC sont exprimés dans de nombreux tissus, dont le cœur^{155, 181, 182}.

Parmi les membres de la superfamille des transporteurs ABC, au moins 13 protéines montrent des niveaux d'expression très élevés dans le cœur (P-gp, MRP1, MRP4, MRP5, MRP7, BCRP, ABCD2, ABCA1, ABCA5, ABCA6, ABCA8, ABCA9 et ABCA10)¹⁵⁵. Les sept transporteurs en souligné sont impliqués dans le transport de médicaments; seulement 3 de ces transporteurs, i.e. P-gp, MRP1 et BCRP, semblent jouer un rôle majeur.

Parmi les membres des transporteurs SLC, OATP1A2 (OATP-A), OATP2B1 (OATP-B), OATP1B1 (OATP-C), OATP-D et OATP-E sont exprimés dans le cœur et sont capables de transporter des médicaments^{183, 184}. OCT3 et OCTN2 sont également exprimés à des niveaux élevés dans le cœur¹⁸⁵⁻¹⁸⁷.

3.2.2.5. Modulation des transporteurs : Interactions médicamenteuses et LQTS

Les transporteurs ABC et SLC, comme les CYPs, peuvent jouer un rôle majeur dans les interactions médicamenteuses observées en clinique, impliquant divers scénarios de toxicité médicamenteuse, de surdosage ou d'inefficacité thérapeutique. La multitude de transporteurs existant dans chacune des 2 superfamilles et leur manque de spécificité envers les différents substrats rend impossible de citer toutes les interactions possibles. Nous prendrons ici la P-gp comme exemple typique et extrêmement étudié de transporteur impliqué dans les interactions médicamenteuses.

Plusieurs interactions médicamenteuses – désirables (en traitement oncologique) et indésirables – ont été décrites. La P-gp, comme les CYPs, peut être induite ou inhibée. Plusieurs agents pharmacologiques sont connus pour être inhibiteurs de la P-gp et sont utilisés pour traiter la résistance aux anticancéreux; ceci aboutit à une interaction médicamenteuse désirable et recherchée. Le vérapamil fut le premier agent modulateur utilisé à cette fin, mais son usage clinique comme adjuvant anticancéreux fut décevant¹⁸⁸. D'autres agents de 2ème et 3ème génération qui furent développés plus tard s'avérèrent plus efficaces.

Au niveau de l'intestin, la P-gp est exprimée au niveau de la bordure en brosse des cellules épithéliales intestinales et a pour rôle d'empêcher les médicaments substrats d'arriver à la circulation systémique (*Figure 6*). Une interaction importante a été décrite par Greiner *et al.* entre la rifampicine et la digoxine¹⁸⁹. En effet, la rifampicine – comme le millepertuis – est un inducteur connu de l'expression de la P-gp et son administration induit une augmentation de l'expression de ce transporteur, résultant en une diminution de l'absorption de digoxine. Un autre exemple clinique d'interaction médicamenteuse fut observé avec l'apparition de rhabdmyolyse chez un patient traité avec l'esoméprazole, l'atorvastatine et la clarithromycine¹⁹⁰. Les auteurs conclurent que le mécanisme de cette interaction était probablement une inhibition du fonctionnement des P-gp et des CYP3A4 par la clarithromycine et moindrement par l'esoméprazole, aboutissant à une accumulation d'atorvastatine et une rhabdmyolyse consécutive.

La modulation des P-gp (ou transporteurs ABC ou SLC) intestinaux et hépatiques aboutit à une modulation des concentrations plasmatiques des médicaments substrats administrés par voie orale par exemple. Ceci peut avoir des effets majeurs sur

l'efficacité / toxicité des médicaments qui doivent se distribuer dans les organes cibles (selon la famille thérapeutique). Cependant, les transporteurs exprimés à la barrière des organes cibles jouent un rôle encore plus important; ceci est le cas par exemple de la P-gp exprimée au niveau de la barrière hémato-encéphalique et qui a pour rôle de protéger le système nerveux central de divers xénobiotiques lipophiles. Encore plus important, les transporteurs ABC et SLC exprimés au niveau cardiaque ont un rôle primordial dans le transport des médicaments à l'intérieur des cardiomyocytes. Donc ces transporteurs ne modulent pas seulement les concentrations plasmatiques mais également les concentrations intracellulaires des médicaments. L'inhibition d'un transporteur d'efflux comme la P-gp cardiaque par exemple pourrait aboutir à une augmentation de la concentration intra-cardiomyocytaire du médicament substrat. L'induction d'un transporteur d'influx (OCTN2) exprimé au niveau cardiaque aboutirait à la même conséquence clinique. Et comme le site de fixation à I_{Kr} est intracellulaire, ceci indique que le médicament doit rentrer dans la cellule pour bloquer I_{Kr} . Donc les transporteurs membranaires d'influx et d'efflux exprimés *in situ* au niveau cardiaque peuvent jouer un rôle majeur dans la prévention et l'induction du LQTS médicamenteux et/ou de TdP.

Des études récentes effectuées au sein de notre laboratoire ont montré que la prolongation de la repolarisation cardiaque par le cisapride (bloqueur d' I_{Kr}) après traitement des cobayes par le vérapamil (modulateur non sélectif de première génération des transporteurs membranaires ABC et OCT) était plus importante comparativement à des animaux non traités¹⁹¹. En effet, il semblerait que le traitement au vérapamil induit une modulation de l'expression de certains transporteurs cardiaques, impliquant ainsi une accumulation plus importante du cisapride en milieu intracellulaire et alors une toxicité accrue par rapport aux non traités.

3.3.1. Triple affinité pour I_{Kr} , CYP3A et P-gp : une triade intrigante

Nous avons précédemment vu que de nombreux bloqueurs d' I_{Kr} étaient des substrats des CYPs, particulièrement le CYP3A4. De plus, il est bien établi que beaucoup de médicaments qui sont des substrats du CYP3A4 sont également des substrats de P-gp¹⁹². En effet, il est bien établi que l'expression de CYPs est généralement accompagnée d'une expression de transporteurs membranaires (e.g. P-gp). Ces deux protéines forment ensemble une barrière physiologique hautement efficace contre l'absorption des médicaments, notamment au niveau intestinal et hépatique.

Par analogie avec le croisement entre les substrats de P-gp/CYP d'une part et celui des substrats de CYP/ I_{Kr} d'autre part, nous, et d'autres chercheurs, avons remarqué que plusieurs bloqueurs d' I_{Kr} , qui sont des substrats de CYPs, étaient également des substrats de P-gp (et d'autres transporteurs membranaires). Pour expliquer ce phénomène, il nous semble intéressant de revisiter et d'expliquer la capacité que possède un si grand nombre de médicaments, à structures chimiques tellement différentes et provenant de classes thérapeutiques aussi diverses, à bloquer le canal I_{Kr} .

Morgan et Sullivan publièrent une des premières revues décrivant les relations structure-activité pour les antiarythmiques de classe III qui se lient à I_{Kr} ¹⁹³ : ils proposèrent un modèle structurel pour un pharmacophore de classe III qui comporte un cycle aromatique substitué en para, relié à un atome d'azote basique par une chaîne très variable. La *Figure 10* expose les structures moléculaires de quelques médicaments non cardiovasculaires mais bloqueurs d' I_{Kr} avec le pharmacophore de Morgan et Sullivan¹⁹⁴. Hors, nous remarquons que seulement une partie de ces médicaments peut s'identifier à ce pharmacophore (colonne de droite dans la *Figure 10*). Une étude récente de Coi *et al.*

a identifié des caractéristiques « toxicophoriques » pour prédire les molécules pouvant bloquer I_{Kr} ¹⁹⁵. Ceci a été effectué par une modélisation du pore de HERG/ I_{Kr} . Leur étude a conclu que les propriétés d'un bloqueur d' I_{Kr} devaient inclure 1) un atome d'azote protoné à distance d'un hétéroatome et 2) un groupe aromatique capable d'interagir au sein d'une zone définie par les résidus Gly657 du pore ou au sein d'une zone localisée au sommet de l'axe du pore.

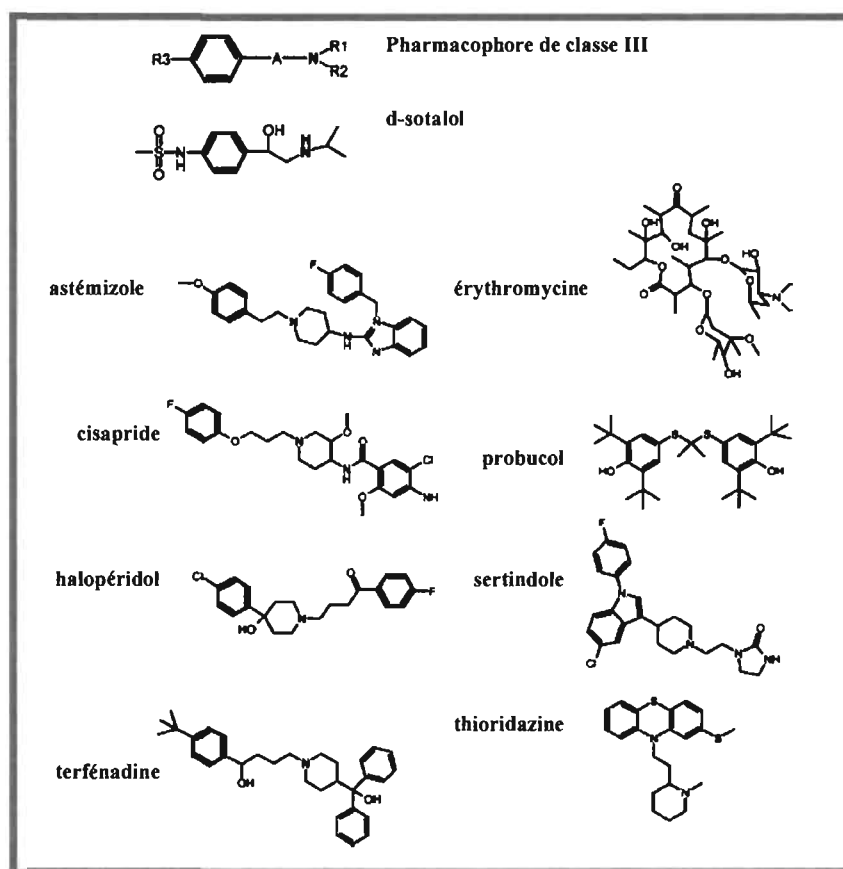


Figure 10 : Comparaison structurelle des bloqueurs d' I_{Kr} avec le pharmacophore de classe III (Adapté de¹⁹⁴)

Par ailleurs, une des caractéristiques majeures qui font d'une molécule un substrat de P-gp est la lipophilie¹⁹⁶. De plus, les P-gp transportent les composés avec une charge

électrique nulle ou une unité cationique donneuse d'électrons. Ainsi, plusieurs bloqueurs d' I_{Kr} qui sont des molécules aromatiques planaires ont des caractéristiques semblables à celle des substrats types de P-gp (ou d'autres transporteurs membranaires), ce qui pourrait expliquer le croisement entre les substrats.

3.3. Interactions médicamenteuses de type pharmacologique

Les interactions médicamenteuses peuvent être divisées en deux catégories : pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Les interactions pharmacocinétiques, comme vu précédemment, consistent en une action d'un médicament sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou l'excrétion d'une autre molécule. Ceci induit une modulation de ses concentrations plasmatiques, par conséquent une modulation des concentrations disponibles à son site d'action ou de toxicité. En revanche, les interactions pharmacodynamiques concernent deux ou plusieurs médicaments ayant des effets additifs, synergiques ou inhibiteurs.

3.3.1. Prise simultanée de deux ou plusieurs bloqueurs d' I_{Kr}

Nous avons vu précédemment que la co-administration de deux ou plusieurs substrats des CYP3A ou des P-gp pouvait conduire à une interaction médicamenteuse qui résulterait en une augmentation des concentrations libres du bloqueur d' I_{Kr} et l'augmentation du risque de TdP.

Les événements proarythmiques furent principalement observés durant la coadministration de deux bloqueurs d' I_{Kr} tel que l'antihistaminique-H1 terféndine et l'antibiotique macrolide érythromycine¹⁹⁷. Le mécanisme sous-jacent fut expliqué par

une inhibition du métabolisme CYP3A4-dépendant de la terfénadine (substrat de CYP3A4) par l'administration d'érythromycine (inhibiteur de CYP3A4); ceci induit une augmentation majeure des concentrations plasmatiques de la terfénadine induisant une prolongation significative de la repolarisation cardiaque et une augmentation du risque de TdP¹⁰⁶. Hors, il semblerait que le vrai mécanisme ne soit pas bien clair, la question résidant dans le fait que cette interaction soit de type pharmacocinétique ou de type pharmacodynamique, via une potentialisation d'effets.

Parmi les cas cliniques de TdP retrouvés dans la littérature, il est intéressant de noter que les médicaments impliqués dans des interactions médicamenteuses de type compétition métabolique sont généralement des antibiotiques macrolides et des antifongiques imidazolés, qui sont des bloqueurs puissants d'I_{Kr}^{146, 198, 199}. Ces constatations influencèrent les directives des scientifiques et des services de santé publique qui suggèrent d'éviter l'association de médicaments a) connus pour prolonger l'intervalle QT et b) ceux qui peuvent interagir en inhibant le métabolisme résultant en une accumulation médicamenteuse²⁰⁰⁻²⁰².

3.3.2. Association d'un bloqueur d'I_{Kr} et d'un bloqueur d'I_{Ks}

Notre laboratoire a déjà démontré que la coadministration d'un bloqueur d'I_{Kr} et d'un bloqueur d'I_{Ks} aboutissait à une potentialisation de l'effet de prolongation de la repolarisation cardiaque comparativement à l'addition de l'effet des deux médicaments chacun administré seul²⁰³. Ces résultats furent expliqués par le fait que les canaux I_{Kr} et I_{Ks} présentaient des sites de liaison distincts sur des protéines distinctes. De plus, le blocage des deux courants I_{Kr} et I_{Ks} élimine la grande majorité du potentiel de

repolarisation cardiaque (réserve de repolarisation), impliquant une repolarisation beaucoup plus lente, et un risque accru de développer des TdP.

3.4. Variations de la glycémie et rôle du diabète

La relation entre le diabète et la prolongation de l'intervalle QT est de plus en plus un sujet de grand intérêt²⁰⁴⁻²⁰⁷. En effet, le diabète est devenu un grand problème de santé publique, touchant plus de 150 millions de personnes dans le monde aujourd'hui selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS); les estimations avancent le nombre de 366 millions de diabétiques en 2030. Pour cela, une gestion performante de cette épidémie et la prévention de la survenue de ses complications semblent prioritaires.

Les complications du diabète sont typiquement des maladies macrovasculaires (i.e. maladies cardiovasculaires, accidents vasculaires cérébraux, maladies vasculaires périphériques...) et microvasculaires (i.e. rétinopathie, néphropathie, neuropathie...).

Parmi les désordres cardiovasculaires, le diabète – type I et II – a été fortement associé à des épisodes d'augmentation de la durée et de la dispersion de l'intervalle QT chez des personnes de tout âge et sexe.

Des hypothèses ont été formulées stipulant que ces manifestations électrophysiologiques étaient responsables de l'augmentation du risque de mortalité cardiaque soudaine chez les patients diabétiques. La prévalence de la prolongation de l'intervalle QT chez les diabétiques est d'un ordre élevé atteignant les 26 % avec un haut risque de mort subite²⁰⁸. Dans une étude impliquant 101 femmes, l'intervalle QTc était prolongé en fonction de la détérioration de la tolérance au glucose, même après ajustement de possibles facteurs confondants²⁰⁹. Récemment, une autre étude a démontré qu'une ingestion de glucose, bien qu'elle n'ait peu d'effets chez des sujets sains, augmentait

d'une manière très aiguë et significative la durée et la dispersion de l'intervalle QT chez les patients atteints de LQTS congénital, déclenchant des arythmies chez certains d'entre eux²¹⁰. Des cas de TdP et de mortalité ont également été rapportés chez des patients diabétiques durant une hypoglycémie (glucose 2 mmol/L)²¹¹, ou durant une combinaison de plusieurs facteurs de risque tel qu'une hypokaliémie, une hypomagnésémie et un usage combiné de glibenclamide, probucol et indapamide²¹².

Dans une étude plus récente, une jeune fille homozygote pour une mutation de HERG a développé un épisode de TdP à l'âge de deux ans, ce qui coïncidait avec le développement de diabète²¹³. A l'âge de quatre ans, sa sœur, également homozygote pour cette mutation, mourut après avoir subi une hypoglycémie non expliquée. La probabilité que la mortalité à un si jeune âge soit liée aux complications vasculaires du diabète est peu probable, mais plutôt à un événement aigu telle que la variation de la glycémie.

De plus, dans une analyse multivariée récente, la glycémie était l'un des rares facteurs de risque cardiovasculaires indépendants associé avec un prolongement de l'intervalle QT²¹⁴. Ceci a suggéré que la prolongation de l'intervalle QT était due *per se* au diabète et que le glucose sanguin jouait un rôle important dans la repolarisation cardiaque et les courants repolarisants.

Par ailleurs, une étude expérimentale par Zhang *et al.* a démontré que l'hypo- et l'hyperglycémie diminuait significativement l'amplitude du courant de base de HERG dans des cellules HEK293 transfectées par HERG comparativement à la normoglycémie²¹⁵. Ces expériences ont suggéré que le diabète, via une faible ou une importante concentration de glucose, agissait comme une insulte métabolique sur la réserve de repolarisation, indépendamment de l'insulinémie ou de l'influence sympatho-

adrénergique. Cependant, cette étude n'a pas évalué l'effet possible du diabète et de la concentration de glucose sur la pharmacologie d' I_{Kr} ou d' I_{Ks} ²¹⁶.

4. Mise en perspective et objectifs de recherche

Plusieurs médicaments (terfénadine, astémizole, érythromycine, pimozide, dropéridol, cisapride, dompéridone, ondansétron...) de diverses classes pharmacologiques ont été impliqués dans la genèse de phénomènes proarythmiques connus sous le nom de LQTS médicamenteux. La manifestation électrophysiologique de ce syndrome consiste principalement en une tachycardie ventriculaire polymorphique (ou TdP) qui peut être associée à la mort subite. De plus, il est remarquable que les femmes sont à plus haut risque pour cet effet toxique majeur de certains médicaments, et seulement des explications mécanistiques partielles ont été proposées jusqu'à maintenant.

La majorité des médicaments responsables du LQTS médicamenteux ont une affinité élevée pour la composante rapide du courant potassique rectifiant retardé (ou I_{Kr}). I_{Kr} est codé par *HERG* (gène human ether-a-go-go) et le site de fixation à I_{Kr} est intracellulaire.

Hors, un médicament connu pour prolonger l'intervalle QT n'induit pas des phénomènes proarythmiques importants que chez une très faible minorité de personnes. Ces derniers présentent généralement des facteurs prédisposants qui vont favoriser ou accélérer le développement de TdP. Parmi les facteurs de risque décrits dans la littérature, nous pouvons citer des facteurs cardiaques, tels que l'insuffisance cardiaque ou la bradycardie, et les facteurs non cardiaques, tels que les troubles électrolytiques, le sexe féminin et les interactions médicamenteuses.

Plusieurs de ces facteurs prédisposants n'ont pas de mécanisme bien élucidé pouvant expliquer la manière dont ils favorisent l'occurrence de TdP. Pour cela, l'objectif principal de ces travaux de doctorat était de mieux comprendre et de proposer de nouveaux mécanismes concernant le sexe féminin, les interactions médicamenteuses, l'effet des transporteurs membranaires et le diabète comme facteurs prédisposant au LQTS médicamenteux. Ainsi les quatre prochains chapitres, rédigés sous forme d'articles scientifiques, analyseront les facteurs prédisposants suivants :

1. Sexe féminin : Le sexe féminin a été longtemps établi comme un facteur de risque majeur du LQTS médicamenteux et de TdP. Les mécanismes décrits se concentrent principalement sur les hormones sexuelles. Cependant les études publiées restent lacunaires dans la mesure où elles ne considèrent pas nécessairement le médicament dans le LQTS médicamenteux d'une part, et dans le fait qu'il y aurait peut-être d'autres mécanismes impliqués d'autre part. Pour analyser plus en profondeur ce facteur, tout en excluant l'effet des hormones, nous avons utilisé des cœurs isolés de cobayes pré-pubertaires perfusés avec un bloqueur d' I_{Kr} , d' I_{Ks} ou les deux ensembles, tel que décrit dans le chapitre 2.

2. Interactions médicamenteuses : Les événements proarythmiques sont majoritairement observés durant la coadministration de deux bloqueurs d' I_{Kr} qui sont également des substrats de CYP3A. Le mécanisme longtemps avancé dans la littérature pour expliquer ce phénomène est une compétition métabolique qui augmenterait les concentrations de l'un des bloqueurs d' I_{Kr} . Hors cette interaction peut être de type pharmacocinétique ou de type pharmacodynamique. De plus, à notre connaissance, les effets de l'administration concomitante de deux bloqueurs d' I_{Kr} sur la prolongation de l'intervalle QT indépendamment de l'interaction métabolique n'ont jamais été évalués

en perfusion cardiaque. De plus, plusieurs études cliniques de TdP médicamenteuses ont été observées après un long traitement avec un seul bloqueur d' I_{Kr} suivi par l'instauration d'un traitement avec un second bloqueur d' I_{Kr} ^{41, 217, 218}. Ainsi, l'ordre de traitement n'a jamais été évalué. Pour cela, nous avons effectué une analyse de la perfusion concomitante ou séquentielle de deux bloqueurs d' I_{Kr} en perfusion de cœurs isolés de cobaye et par patch clamp sur des cellules HEK293 transfectées d'une manière stable par HERG/ I_{Kr} . Cette étude sera décrite dans le chapitre 3.

3. Transporteurs membranaires : Plusieurs médicaments associés avec le LQTS médicamenteux sont également des substrats/inhibiteurs de la P-gp. De plus, plusieurs études cliniques sur de nouveaux adjuvants anticancéreux utilisés comme modulateur des transporteurs d'efflux furent suspendues avant la mise sur le marché à cause de leur potentiel arythmogène²¹⁹. Ces observations nous ont poussés à étudier une possible interaction physique et fonctionnelle entre HERG et P-gp et de voir si les transporteurs peuvent moduler l'effet des médicaments sur la repolarisation cardiaque puisque les sites de liaison à I_{Kr} sont intracellulaires^{55, 220, 221}. L'interaction physique fut étudiée par immunohistochimie et celle fonctionnelle par patch-clamp sur des cellules co-transfectées avec MDR1/P-gp et HERG/ I_{Kr} . Cette étude sera décrite dans le chapitre 4.

De plus, nous avons déjà publié des données démontrant l'effet du vérapamil – probablement comme modulateur des transporteurs membranaires – sur l'effet électrophysiologique du cisapride, un bloqueur d' I_{Kr} ¹⁹¹. Ici, nous avons voulu confirmer cet effet sur un autre bloqueur d' I_{Kr} , la dompéridone, et sur un bloqueur d' I_{Ks} , l'indapamide. De plus, nous avons évalué ces effets en fonction du sexe, ce qui nous permet d'avoir un aperçu sur un rôle possible des transporteurs membranaires dans les

différences liées au sexe du LQTS médicamenteux. Cette étude sera décrite dans le chapitre 2.

4. Diabète : Le diabète de type I et II a été fortement associé à des épisodes d'augmentation de la durée et de la dispersion de l'intervalle QT chez des personnes de tout âge et sexe. Ceci était également lié à l'apparition de TdP. Plusieurs études ont observé l'effet de la concentration de glucose sur le courant de base d' I_{Kr} mais aucune, à notre connaissance, n'a évalué le même effet en utilisant des bloqueurs d' I_{Kr} ou d' I_{Ks} spécifiques. Pour cela, nous avons étudié en perfusion de cœurs isolés et en patch clamp l'effet d'un bloqueur d' I_{Kr} , d' I_{Ks} ou des deux ensembles sur la repolarisation cardiaque tout en variant les concentrations de glucose perfusé. Cette étude sera décrite dans le chapitre 5.

La connaissance développée par ces travaux pourront amener à une meilleure compréhension du mécanisme d'action des différents facteurs prédisposants étudiés et permettront une meilleure évaluation et prévention des variabilités interindividuelles observées dans le LQTS médicamenteux.

RÉFÉRENCES

1. Alché É-Pd. *Comprendre la physiologie cardiovasculaire*. 2e éd. ed. Paris: Flammarion médecine-sciences; 2003.
2. Zipes DP, Jalife J. *Cardiac electrophysiology : from cell to bedside*. 4th ed. Philadelphia: Saunders; 2004.
3. Katz AM. *Physiology of the heart*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
4. Phibbs B. *The human heart : a basic guide to heart disease*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
5. Dumaine R, Antzelevitch C. Molecular mechanisms underlying the long QT syndrome. *Curr Opin Cardiol*. 2002;17(1):36-42.
6. Ludomirsky A, Klein HO, Sarelli P, Becker B, Hoffman S, Taitelman U, Barzilai J, Lang R, David D, DiSegni E, Kaplinsky E. Q-T prolongation and polymorphous ("torsade de pointes") ventricular arrhythmias associated with organophosphorus insecticide poisoning. *The American journal of cardiology*. 1982;49(7):1654-1658.
7. Roden DM, George AL, Jr. The cardiac ion channels: relevance to management of arrhythmias. *Annu Rev Med*. 1996;47:135-148.
8. Archer SL, Rusch NJ. *Potassium channels in cardiovascular biology*. New York: Kluwer Academic/Plenum; 2001.
9. Bouchard JF, Lamontagne D. Mechanisms of protection afforded by preconditioning to endothelial function against ischemic injury. *The American journal of physiology*. 1996;271(5 Pt 2):H1801-1806.

10. Rosendorff C. *Essential cardiology : principles and practice*. 2nd ed. Totowa, N.J.: Humana Press; 2005.
11. Bennett DH. *Cardiac arrhythmias : practical notes on interpretation and treatment*. 6th ed. London ; New York: Arnold; 2002.
12. Modell SM, Lehmann MH. The long QT syndrome family of cardiac ion channelopathies: a HuGE review. *Genet Med*. 2006;8(3):143-155.
13. Jervell A, Lange-Nielsen F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *American heart journal*. 1957;54(1):59-68.
14. Romano C, Gemme G, Pongiglione R. [Rare Cardiac Arrhythmias of the Pediatric Age. I. Repetitive Paroxysmal Tachycardia.]. *Minerva pediatrica*. 1963;15:1155-1164.
15. Ward OC. A New Familial Cardiac Syndrome in Children. *Journal of the Irish Medical Association*. 1964;54:103-106.
16. Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell*. 1995;80(5):795-803.
17. Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell*. 1995;80(5):805-811.
18. Collins KK, Van Hare GF. Advances in congenital long QT syndrome. *Current opinion in pediatrics*. 2006;18(5):497-502.
19. Vincent GM. The molecular genetics of the long QT syndrome: genes causing fainting and sudden death. *Annu Rev Med*. 1998;49:263-274.

20. Fraser GR, Froggatt P, Murphy T. Genetical Aspects of the Cardio-Auditory Syndrome of Jervell and Lange-Nielsen (Congenital Deafness and Electrocardiographic Abnormalities). *Annals of human genetics*. 1964;28:133-157.
21. Moss AJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Locati E, Carleen E. The long QT syndrome: a prospective international study. *Circulation*. 1985;71(1):17-21.
22. Schwartz PJ, Moss AJ, Vincent GM, Crampton RS. Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation*. 1993;88(2):782-784.
23. Schwartz PJ. Management of long QT syndrome. *Nature clinical practice*. 2005;2(7):346-351.
24. Moss AJ, Schwartz PJ. 25th anniversary of the International Long-QT Syndrome Registry: an ongoing quest to uncover the secrets of long-QT syndrome. *Circulation*. 2005;111(9):1199-1201.
25. Schwartz PJ, Priori SG, Cerrone M, Spazzolini C, Odero A, Napolitano C, Bloise R, De Ferrari GM, Klersy C, Moss AJ, Zareba W, Robinson JL, Hall WJ, Brink PA, Toivonen L, Epstein AE, Li C, Hu D. Left cardiac sympathetic denervation in the management of high-risk patients affected by the long-QT syndrome. *Circulation*. 2004;109(15):1826-1833.
26. Kron J, Oliver RP, Norsted S, Silka MJ. The automatic implantable cardioverter-defibrillator in young patients. *Journal of the American College of Cardiology*. 1990;16(4):896-902.
27. Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ. Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. *Circulation*. 1999;99(4):529-533.

28. Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Ronchetti E, Grillo M, Vicentini A, Spazzolini C, Nastoli J, Bottelli G, Folli R, Cappelletti D. Risk stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348(19):1866-1874.
29. Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, Denjoy I, Guicheney P, Breithardt G, Keating MT, Towbin JA, Beggs AH, Brink P, Wilde AA, Toivonen L, Zareba W, Robinson JL, Timothy KW, Corfield V, Wattanasirichaigoon D, Corbett C, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Lehmann MH, Schwartz K, Coumel P, Bloise R. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation.* 2001;103(1):89-95.
30. Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ, Grillo M, Bloise R, Ronchetti E, Moncalvo C, Tulipani C, Veia A, Bottelli G, Nastoli J. Association of long QT syndrome loci and cardiac events among patients treated with beta-blockers. *Jama.* 2004;292(11):1341-1344.
31. Wilde AA, Jongbloed RJ, Doevendans PA, Duren DR, Hauer RN, van Langen IM, van Tintelen JP, Smeets HJ, Meyer H, Geelen JL. Auditory stimuli as a trigger for arrhythmic events differentiate HERG-related (LQTS2) patients from KVLQT1-related patients (LQTS1). *Journal of the American College of Cardiology.* 1999;33(2):327-332.
32. Schwartz PJ, Priori SG, Locati EH, Napolitano C, Cantu F, Towbin JA, Keating MT, Hammoude H, Brown AM, Chen LS. Long QT syndrome patients with mutations of the SCN5A and HERG genes have differential responses to Na⁺ channel blockade and to increases in heart rate. Implications for gene-specific therapy. *Circulation.* 1995;92(12):3381-3386.

33. Stramba-Badiale M, Priori SG, Napolitano C, Locati EH, Vinolas X, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Goulene K, Schwartz PJ. Gene-specific differences in the circadian variation of ventricular repolarization in the long QT syndrome: a key to sudden death during sleep? *Ital Heart J.* 2000;1(5):323-328.
34. Schwartz PJ, Stone HL. Effects of unilateral stellectomy upon cardiac performance during exercise in dogs. *Circulation research.* 1979;44(5):637-645.
35. Selzer A, Wray HW. Quinidine Syncope. Paroxysmal Ventricular Fibrillation Occurring During Treatment Of Chronic Atrial Arrhythmias. *Circulation.* 1964;30:17-26.
36. Hohnloser SH, Singh BN. Proarrhythmia with class III antiarrhythmic drugs: definition, electrophysiologic mechanisms, incidence, predisposing factors, and clinical implications. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1995;6(10 Pt 2):920-936.
37. Roden DM, Balser JR, George AL, Jr., Anderson ME. Cardiac ion channels. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:431-475.
38. De Ponti F, Poluzzi E, Montanaro N. Organising evidence on QT prolongation and occurrence of Torsades de Pointes with non-antiarrhythmic drugs: a call for consensus. *Eur J Clin Pharmacol.* 2001;57(3):185-209.
39. Haverkamp W, Breithardt G, Camm AJ, Janse MJ, Rosen MR, Antzelevitch C, Escande D, Franz M, Malik M, Moss A, Shah R. The potential for QT prolongation and pro-arrhythmia by non-anti-arrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a Policy Conference of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res.* 2000;47(2):219-233.

40. Lasser KE, Allen PD, Woolhandler SJ, Himmelstein DU, Wolfe SM, Bor DH. Timing of new black box warnings and withdrawals for prescription medications. *Jama*. 2002;287(17):2215-2220.
41. Monahan BP, Ferguson CL, Killeavy ES, Lloyd BK, Troy J, Cantilena LR, Jr. Torsades de pointes occurring in association with terfenadine use. *Jama*. 1990;264(21):2788-2790.
42. Bishop RO, Gaudry PL. Prolonged Q-T interval following astemizole overdose. *Arch Emerg Med*. 1989;6(1):63-65.
43. Stahlmann R, Lode H. Toxicity of quinolones. *Drugs*. 1999;58 Suppl 2:37-42.
44. Connolly MJ, Astridge PS, White EG, Morley CA, Cowan JC. Torsades de pointes ventricular tachycardia and terodiline. *Lancet*. 1991;338(8763):344-345.
45. Drolet B, Zhang S, Deschenes D, Rail J, Nadeau S, Zhou Z, January CT, Turgeon J. Droperidol lengthens cardiac repolarization due to block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1999;10(12):1597-1604.
46. Ridley JM, Dooley PC, Milnes JT, Witchel HJ, Hancox JC. Lidoflazine is a high affinity blocker of the HERG K(+)channel. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;36(5):701-705.
47. Eckardt L, Breithardt G, Haverkamp W. Electrophysiologic characterization of the antipsychotic drug sertindole in a rabbit heart model of torsade de pointes: low torsadogenic potential despite QT prolongation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;300(1):64-71.
48. Deamer RL, Wilson DR, Clark DS, Prichard JG. Torsades de pointes associated with high dose levomethadyl acetate (ORLAAM). *J Addict Dis*. 2001;20(4):7-14.

49. Drolet B, Khalifa M, Daleau P, Hamelin BA, Turgeon J. Block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current by the prokinetic agent cisapride underlies drug-related lengthening of the QT interval. *Circulation*. 1998;97(2):204-210.
50. Morissette P, Hreiche R, Turgeon J. Drug-induced long QT syndrome and torsade de pointes. *Can J Cardiol*. 2005;21(10):857-864.
51. Camm AJ, Yap YG, Malik M. *Acquired long QT syndrome*. Malden, Mass.: Futura; 2004.
52. De Ponti F, Poluzzi E, Montanaro N, Ferguson J. QTc and psychotropic drugs. *Lancet*. 2000;356(9223):75-76.
53. Malfatto G, Beria G, Sala S, Bonazzi O, Schwartz PJ. Quantitative analysis of T wave abnormalities and their prognostic implications in the idiopathic long QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*. 1994;23(2):296-301.
54. Chen J, Seeböhm G, Sanguinetti MC. Position of aromatic residues in the S6 domain, not inactivation, dictates cisapride sensitivity of HERG and eag potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12461-12466.
55. Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti MC. A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(22):12329-12333.
56. Shimizu W, Ohe T, Kurita T, Kawade M, Arakaki Y, Aihara N, Kamakura S, Kamiya T, Shimomura K. Effects of verapamil and propranolol on early afterdepolarizations and ventricular arrhythmias induced by epinephrine in congenital long QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*. 1995;26(5):1299-1309.

57. Sicouri S, Antzelevitch C. A subpopulation of cells with unique electrophysiological properties in the deep subepicardium of the canine ventricle. The M cell. *Circulation research*. 1991;68(6):1729-1741.
58. Liu DW, Antzelevitch C. Characteristics of the delayed rectifier current (IKr and IKs) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker IKs contributes to the longer action potential of the M cell. *Circulation research*. 1995;76(3):351-365.
59. Kay GN, Plumb VJ, Arciniegas JG, Henthorn RW, Waldo AL. Torsade de pointes: the long-short initiating sequence and other clinical features: observations in 32 patients. *Journal of the American College of Cardiology*. 1983;2(5):806-817.
60. Roden DM, Woosley RL, Primm RK. Incidence and clinical features of the quinidine-associated long QT syndrome: implications for patient care. *American heart journal*. 1986;111(6):1088-1093.
61. Roden DM, Thompson KA, Hoffman BF, Woosley RL. Clinical features and basic mechanisms of quinidine-induced arrhythmias. *Journal of the American College of Cardiology*. 1986;8(1 Suppl A):73A-78A.
62. Dessertenne F, Fabiato A, Coumel P. [A new chapter in electrocardiography: progressive variations in the amplitude of the electrocardiogram]. *Actual Cardiol Angeiol Int (Paris)*. 1966;15(4):241-258.
63. Dessertenne F. [Ventricular tachycardia with 2 variable opposing foci]. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux*. 1966;59(2):263-272.
64. Fabiato A, Coumel P. Torsades de pointes, a quarter of a century later: a tribute to Dr. F. Dessertenne. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1991;5(1):167-169.

65. Houltz B, Darpo B, Edvardsson N, Blomstrom P, Brachmann J, Crijns HJ, Jensen SM, Svernhage E, Vallin H, Swedberg K. Electrocardiographic and clinical predictors of torsades de pointes induced by almokalant infusion in patients with chronic atrial fibrillation or flutter: a prospective study. *Pacing Clin Electrophysiol.* 1998;21(5):1044-1057.
66. Jackman WM, Friday KJ, Anderson JL, Aliot EM, Clark M, Lazzara R. The long QT syndromes: a critical review, new clinical observations and a unifying hypothesis. *Prog Cardiovasc Dis.* 1988;31(2):115-172.
67. Schwartz PJ, Wolf S. QT interval prolongation as predictor of sudden death in patients with myocardial infarction. *Circulation.* 1978;57(6):1074-1077.
68. Ahnve S. QT interval prolongation in acute myocardial infarction. *European heart journal.* 1985;6 Suppl D:85-95.
69. Gidh-Jain M, Huang B, Jain P, el-Sherif N. Differential expression of voltage-gated K⁺ channel genes in left ventricular remodeled myocardium after experimental myocardial infarction. *Circulation research.* 1996;79(4):669-675.
70. Martin AB, Garson A, Jr., Perry JC. Prolonged QT interval in hypertrophic and dilated cardiomyopathy in children. *American heart journal.* 1994;127(1):64-70.
71. Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation research.* 1993;73(2):379-385.
72. Hart G. Cellular electrophysiology in cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res.* 1994;28(7):933-946.

73. Choy AM, Lang CC, Chomsky DM, Rayos GH, Wilson JR, Roden DM. Normalization of acquired QT prolongation in humans by intravenous potassium. *Circulation*. 1997;96(7):2149-2154.
74. Pedersen HS, Elming H, Seibaek M, Burchardt H, Brendorp B, Torp-Pedersen C, Kober L. Risk factors and predictors of Torsade de pointes ventricular tachycardia in patients with left ventricular systolic dysfunction receiving Dofetilide. *The American journal of cardiology*. 2007;100(5):876-880.
75. Kulan K, Ural D, Komsuoglu B, Agacdiken A, Goldeli O, Komsuoglu SS. Significance of QTc prolongation on ventricular arrhythmias in patients with left ventricular hypertrophy secondary to essential hypertension. *Int J Cardiol*. 1998;64(2):179-184.
76. Siscovick DS, Raghunathan TE, Rautaharju P, Psaty BM, Cobb LA, Wagner EH. Clinically silent electrocardiographic abnormalities and risk of primary cardiac arrest among hypertensive patients. *Circulation*. 1996;94(6):1329-1333.
77. Singh JP, Johnston J, Sleight P, Bird R, Ryder K, Hart G. Left ventricular hypertrophy in hypertensive patients is associated with abnormal rate adaptation of QT interval. *Journal of the American College of Cardiology*. 1997;29(4):778-784.
78. Brachmann J, Scherlag BJ, Rosenshtraukh LV, Lazzara R. Bradycardia-dependent triggered activity: relevance to drug-induced multiform ventricular tachycardia. *Circulation*. 1983;68(4):846-856.
79. Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific

- block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide. *Circulation research*. 1993;72(1):75-83.
80. Roden DM, Anderson ME. The pause that refreshes, or does it? Mechanisms in torsades de pointes. *Heart*. 2000;84(3):235-237.
81. Ichida F, Fatica NS, O'Loughlin JE, Snyder MS, Ehlers KH, Engle MA. Correlation of electrocardiographic and echocardiographic changes in Kawasaki syndrome. *American heart journal*. 1988;116(3):812-819.
82. Ramamurthy S, Talwar KK, Goswami KC, Shrivastava S, Chopra P, Broor S, Malhotra A. Clinical profile of biopsy proven idiopathic myocarditis. *Int J Cardiol*. 1993;41(3):225-232.
83. Yang P, Kanki H, Drolet B, Yang T, Wei J, Viswanathan PC, Hohnloser SH, Shimizu W, Schwartz PJ, Stanton M, Murray KT, Norris K, George AL, Jr., Roden DM. Allelic variants in long-QT disease genes in patients with drug-associated torsades de pointes. *Circulation*. 2002;105(16):1943-1948.
84. Takahashi N, Ito M, Inoue T, Koumatsu K, Takeshita Y, Tsumabuki S, Tamura M, Inoue K, Maeda T, Saikawa T. Torsades de pointes associated with acquired long QT syndrome: observation of 7 cases. *J Cardiol*. 1993;23(1):99-106.
85. Yang T, Snyders DJ, Roden DM. Rapid inactivation determines the rectification and [K⁺]_o dependence of the rapid component of the delayed rectifier K⁺ current in cardiac cells. *Circulation research*. 1997;80(6):782-789.
86. Numaguchi H, Johnson JP, Jr., Petersen CI, Balsler JR. A sensitive mechanism for cation modulation of potassium current. *Nat Neurosci*. 2000;3(5):429-430.

87. Yang T, Roden DM. Extracellular potassium modulation of drug block of IKr. Implications for torsade de pointes and reverse use-dependence. *Circulation*. 1996;93(3):407-411.
88. Daleau P, Turgeon J. Triamterene inhibits the delayed rectifier potassium current (IK) in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation research*. 1994;74(6):1114-1120.
89. Turgeon J, Daleau P, Bennett PB, Wiggins SS, Selby L, Roden DM. Block of IKs, the slow component of the delayed rectifier K⁺ current, by the diuretic agent indapamide in guinea pig myocytes. *Circulation research*. 1994;75(5):879-886.
90. Chakraborti S, Chakraborti T, Mandal M, Mandal A, Das S, Ghosh S. Protective role of magnesium in cardiovascular diseases: a review. *Mol Cell Biochem*. 2002;238(1-2):163-179.
91. Altura BM, Altura BT. New perspectives on the role of magnesium in the pathophysiology of the cardiovascular system. I. Clinical aspects. *Magnesium*. 1985;4(5-6):226-244.
92. Akiyama T, Batchelder J, Worsman J, Moses HW, Jedlinski M. Hypocalcemic Torsades de Pointes. *J Electrocardiol*. 1989;22(1):89-92.
93. Carlsson L, Drews L, Duker G. Rhythm anomalies related to delayed repolarization in vivo: influence of sarcolemmal Ca⁺⁺ entry and intracellular Ca⁺⁺ overload. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;279(1):231-239.
94. Wu Y, Roden DM, Anderson ME. Calmodulin kinase inhibition prevents development of the arrhythmogenic transient inward current. *Circulation research*. 1999;84(8):906-912.

95. Tomaselli GF, Rose J. Molecular aspects of arrhythmias associated with cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol.* 2000;15(3):202-208.
96. Stanek EJ, Simko RJ, DeNofrio D, Pavri BB. Prolonged quinidine half-life with associated toxicity in a patient with hepatic failure. *Pharmacotherapy.* 1997;17(3):622-625.
97. Barre J, Mallat A, Rosenbaum J, Deforges L, Houin G, Dhumeaux D, Tillement JP. Pharmacokinetics of erythromycin in patients with severe cirrhosis. Respective influence of decreased serum binding and impaired liver metabolic capacity. *Br J Clin Pharmacol.* 1987;23(6):753-757.
98. Di Pasquale G, Andreoli A, Lusa AM, Urbinati S, Biancoli S, Cere E, Borgatti ML, Pinelli G. Cardiologic complications of subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg Sci.* 1998;42(1 Suppl 1):33-36.
99. Sen S, Stober T, Burger L, Anstatt T, Rettig G. Recurrent torsade de pointes type ventricular tachycardia in intracranial hemorrhage. *Intensive Care Med.* 1984;10(5):263-264.
100. Banai S, Tzivoni D. Drug therapy for torsade de pointes. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1993;4(2):206-210.
101. Khan IA. Clinical and therapeutic aspects of congenital and acquired long QT syndrome. *Am J Med.* 2002;112(1):58-66.
102. Viskin S. Torsades de Pointes. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 1999;1(2):187-195.
103. Bazett A. An analysis of the time relationship of electrocardiograms. *Heart.* 1920;7:353-370.

104. Abinader EG, Shahar J. Possible female preponderance in prenylamine-induced 'torsade de pointes' tachycardia. Short communication. *Cardiology*. 1983;70(1):37-40.
105. Makkar RR, Fromm BS, Steinman RT, Meissner MD, Lehmann MH. Female gender as a risk factor for torsades de pointes associated with cardiovascular drugs. *Jama*. 1993;270(21):2590-2597.
106. Woosley RL, Chen Y, Freiman JP, Gillis RA. Mechanism of the cardiotoxic actions of terfenadine. *Jama*. 1993;269(12):1532-1536.
107. Waldo AL, Camm AJ, deRuyter H, Friedman PL, MacNeil DJ, Pauls JF, Pitt B, Pratt CM, Schwartz PJ, Veltri EP. Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. The SWORD Investigators. Survival With Oral d-Sotalol. *Lancet*. 1996;348(9019):7-12.
108. Drici MD, Knollmann BC, Wang WX, Woosley RL. Cardiac actions of erythromycin: influence of female sex. *Jama*. 1998;280(20):1774-1776.
109. Rautaharju PM, Zhou SH, Wong S, Calhoun HP, Berenson GS, Prineas R, Davignon A. Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Can J Cardiol*. 1992;8(7):690-695.
110. Bidoggia H, Maciel JP, Capalozza N, Mosca S, Blaksley EJ, Valverde E, Bertran G, Arini P, Biagetti MO, Quinteiro RA. Sex-dependent electrocardiographic pattern of cardiac repolarization. *American heart journal*. 2000;140(3):430-436.
111. Stolt A, Karila T, Viitasalo M, Mantysaari M, Kujala UM, Karjalainen J. QT interval and QT dispersion in endurance athletes and in power athletes using

- large doses of anabolic steroids. *The American journal of cardiology*. 1999;84(3):364-366, A369.
112. Larsen JA, Tung RH, Sadananda R, Goldberger JJ, Horvath G, Parker MA, Kadish AH. Effects of hormone replacement therapy on QT interval. *The American journal of cardiology*. 1998;82(8):993-995.
113. Romhilt DW, Chaffin C, Choi SC, Irby EC. Arrhythmias on ambulatory electrocardiographic monitoring in women without apparent heart disease. *The American journal of cardiology*. 1984;54(6):582-586.
114. Brouillette J, Trepanier-Boulay V, Fiset C. Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *J Physiol*. 2003;546(Pt 2):403-413.
115. Drici MD, Burklow TR, Haridasse V, Glazer RI, Woosley RL. Sex hormones prolong the QT interval and downregulate potassium channel expression in the rabbit heart. *Circulation*. 1996;94(6):1471-1474.
116. Hara M, Danilo P, Jr., Rosen MR. Effects of gonadal steroids on ventricular repolarization and on the response to E4031. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;285(3):1068-1072.
117. Liu XK, Katchman A, Drici MD, Ebert SN, Ducic I, Morad M, Woosley RL. Gender difference in the cycle length-dependent QT and potassium currents in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;285(2):672-679.
118. Trepanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circulation research*. 2001;89(5):437-444.
119. Ortiz de Montellano PR. *Cytochrome P450 : structure, mechanism, and biochemistry*. 3rd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2005.

120. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 2003;409(1):2-6.
121. Omura T, Sato R. A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem.* 1962;237:1375-1376.
122. Porter TD, Coon MJ. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem.* 1991;266(21):13469-13472.
123. Lewis DF, Eddershaw PJ, Dickins M, Tarbit MH, Goldfarb PS. Structural determinants of cytochrome P450 substrate specificity, binding affinity and catalytic rate. *Chem Biol Interact.* 1998;115(3):175-199.
124. Nelson DR. Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P450 evolution. *Arch Biochem Biophys.* 2003;409(1):18-24.
125. Nelson DR. Cytochrome P450 nomenclature. *Methods Mol Biol.* 1998;107:15-24.
126. Lewis DF. 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics.* 2004;5(3):305-318.
127. Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev.* 2002;34(1-2):83-448.
128. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics.* 1996;6(1):1-42.

129. Pelkonen O, Maenpaa J, Taavitsainen P, Rautio A, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica*. 1998;28(12):1203-1253.
130. Hollenberg PF. Characteristics and common properties of inhibitors, inducers, and activators of CYP enzymes. *Drug Metab Rev*. 2002;34(1-2):17-35.
131. Watkins PB, Wrighton SA, Schuetz EG, Maurel P, Guzelian PS. Macrolide antibiotics inhibit the degradation of the glucocorticoid-responsive cytochrome P-450p in rat hepatocytes in vivo and in primary monolayer culture. *J Biol Chem*. 1986;261(14):6264-6271.
132. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J*. 2005;5(1):6-13.
133. Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci*. 1999;20(8):342-349.
134. He P, Court MH, Greenblatt DJ, Von Moltke LL. Genotype-phenotype associations of cytochrome P450 3A4 and 3A5 polymorphism with midazolam clearance in vivo. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;77(5):373-387.
135. Anglicheau D, Legendre C, Beaune P, Thervet E. Cytochrome P450 3A polymorphisms and immunosuppressive drugs: an update. *Pharmacogenomics*. 2007;8(7):835-849.
136. Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, Weimar W, van Gelder T. Genetic polymorphisms of the CYP3A4,

- CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;74(3):245-254.
137. Dai Y, Iwanaga K, Lin YS, Hebert MF, Davis CL, Huang W, Kharasch ED, Thummel KE. In vitro metabolism of cyclosporine A by human kidney CYP3A5. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(9):1889-1902.
138. Kivisto KT, Niemi M, Schaeffeler E, Pitkala K, Tilvis R, Fromm MF, Schwab M, Eichelbaum M, Strandberg T. Lipid-lowering response to statins is affected by CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics.* 2004;14(8):523-525.
139. Hreiche R, Turgeon J. Interactions médicamenteuses et risque de torsades de pointes. *Pharmactuel.* 2005;38(3):134-139.
140. Wang JF, Yang Y, Sullivan MF, Min J, Cai J, Zeldin DC, Xiao YF, Morgan JP. Induction of cardiac cytochrome p450 in cocaine-treated mice. *Exp Biol Med (Maywood).* 2002;227(3):182-188.
141. Thum T, Borlak J. Gene expression in distinct regions of the heart. *Lancet.* 2000;355(9208):979-983.
142. Wu S, Moomaw CR, Tomer KB, Falck JR, Zeldin DC. Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. *J Biol Chem.* 1996;271(7):3460-3468.
143. Nishimura M, Naito S, Yokoi T. Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2004;19(2):135-149.
144. Michaud V, Dumas M, Turgeon J. CYP2C8 is involved in the metabolism of verapamil in human heart microsomes. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83(Supp 1):PI-85.

145. Walles M, Thum T, Levsen K, Borlak J. Verapamil: new insight into the molecular mechanism of drug oxidation in the human heart. *J Chromatogr A*. 2002;970(1-2):117-130.
146. Daleau P, Lessard E, Groleau MF, Turgeon J. Erythromycin blocks the rapid component of the delayed rectifier potassium current and lengthens repolarization of guinea pig ventricular myocytes. *Circulation*. 1995;91(12):3010-3016.
147. Drolet B, Rousseau G, Daleau P, Cardinal R, Simard C, Turgeon J. Pimozide (Orap) prolongs cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current in native cardiac myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2001;6(3):255-260.
148. Geelen P, Drolet B, Rail J, Berube J, Daleau P, Rousseau G, Cardinal R, O'Hara GE, Turgeon J. Sildenafil (Viagra) prolongs cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current. *Circulation*. 2000;102(3):275-277.
149. Drolet B, Rousseau G, Daleau P, Cardinal R, Turgeon J. Domperidone should not be considered a no-risk alternative to cisapride in the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Circulation*. 2000;102(16):1883-1885.
150. Drolet B, Yang T, Daleau P, Roden DM, Turgeon J. Risperidone prolongs cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003;41(6):934-937.
151. Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochimica et biophysica acta*. 1973;323(3):466-483.

152. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et biophysica acta*. 1976;455(1):152-162.
153. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(9):3004-3008.
154. Linton KJ, Higgins CF. The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol*. 1998;28(1):5-13.
155. Couture L, Nash JA, Turgeon J. The ATP-binding cassette transporters and their implication in drug disposition: a special look at the heart. *Pharmacol Rev*. 2006;58(2):244-258.
156. Linton KJ, Higgins CF. Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflugers Arch*. 2007;453(5):555-567.
157. Zhang EY, Knipp GT, Ekins S, Swaan PW. Structural biology and function of solute transporters: implications for identifying and designing substrates. *Drug Metab Rev*. 2002;34(4):709-750.
158. Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins Introduction. *Pflugers Arch*. 2004;447(5):465-468.
159. Adibi SA. The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. *Gastroenterology*. 1997;113(1):332-340.
160. Bradshaw DM, Arceci RJ. Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. *J Clin Oncol*. 1998;16(11):3674-3690.

161. Berndt WO. The role of transport in chemical nephrotoxicity. *Toxicol Pathol.* 1998;26(1):52-57.
162. Owens MJ, Nemeroff CB. The serotonin transporter and depression. *Depress Anxiety.* 1998;8 Suppl 1:5-12.
163. Reith ME, Xu C, Chen NH. Pharmacology and regulation of the neuronal dopamine transporter. *Eur J Pharmacol.* 1997;324(1):1-10.
164. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3473-3478.
165. Siegsmond M, Brinkmann U, Schaffeler E, Weirich G, Schwab M, Eichelbaum M, Fritz P, Burk O, Decker J, Alken P, Rothenpieler U, Kerb R, Hoffmeyer S, Brauch H. Association of the P-glycoprotein transporter MDR1(C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(7):1847-1854.
166. Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003;43:285-307.
167. Choudhuri S, Klaassen CD. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int J Toxicol.* 2006;25(4):231-259.
168. Lee SS, Jeong HE, Yi JM, Jung HJ, Jang JE, Kim EY, Lee SJ, Shin JG. Identification and functional assessment of BCRP polymorphisms in a Korean

- population. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2007;35(4):623-632.
169. Adachi M, Asakura Y, Sato Y, Tajima T, Nakajima T, Yamamoto T, Fujieda K. Novel SLC12A1 (NKCC2) Mutations in Two Families with Bartter Syndrome Type 1. *Endocr J*. 2007.
170. Joo KW, Lee JW, Jang HR, Heo NJ, Jeon US, Oh YK, Lim CS, Na KY, Kim J, Cheong HI, Han JS. Reduced urinary excretion of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter in Gitelman syndrome: preliminary data. *Am J Kidney Dis*. 2007;50(5):765-773.
171. Speletas M, Kioumi A, Loules G, Hytioglou P, Tsitouridis J, Christakis J, Germenis AE. Analysis of SLC40A1 gene at the mRNA level reveals rapidly the causative mutations in patients with hereditary hemochromatosis type IV. *Blood Cells Mol Dis*. 2007.
172. Seithel A, Eberl S, Singer K, Auge D, Heinkele G, Wolf NB, Dorje F, Fromm MF, Konig J. The influence of macrolide antibiotics on the uptake of organic anions and drugs mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2007;35(5):779-786.
173. Kivisto KT, Niemi M. Influence of drug transporter polymorphisms on pravastatin pharmacokinetics in humans. *Pharm Res*. 2007;24(2):239-247.
174. Ito K, Olsen SL, Qiu W, Deeley RG, Cole SP. Mutation of a single conserved tryptophan in multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) results in loss of drug resistance and selective loss of organic anion transport. *J Biol Chem*. 2001;276(19):15616-15624.

175. Conseil G, Deeley RG, Cole SP. Polymorphisms of MRP1 (ABCC1) and related ATP-dependent drug transporters. *Pharmacogenetics and genomics*. 2005;15(8):523-533.
176. Conrad S, Kauffmann HM, Ito K, Leslie EM, Deeley RG, Schrenk D, Cole SP. A naturally occurring mutation in MRP1 results in a selective decrease in organic anion transport and in increased doxorubicin resistance. *Pharmacogenetics*. 2002;12(4):321-330.
177. Kruh GD, Guo Y, Hopper-Borge E, Belinsky MG, Chen ZS. ABCC10, ABCC11, and ABCC12. *Pflugers Arch*. 2007;453(5):675-684.
178. Cusatis G, Gregorc V, Li J, Spreafico A, Ingersoll RG, Verweij J, Ludovini V, Villa E, Hidalgo M, Sparreboom A, Baker SD. Pharmacogenetics of ABCG2 and adverse reactions to gefitinib. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(23):1739-1742.
179. Aoyama N, Takahashi N, Kitaichi K, Ishihara R, Saito S, Maeno N, Ji X, Takagi K, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Iwata N, Inada T, Ozaki N. Association between gene polymorphisms of SLC22A3 and methamphetamine use disorder. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2006;30(10):1644-1649.
180. Urban TJ, Gallagher RC, Brown C, Castro RA, Lagpacan LL, Brett CM, Taylor TR, Carlson EJ, Ferrin TE, Burchard EG, Packman S, Giacomini KM. Functional genetic diversity in the high-affinity carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5). *Molecular pharmacology*. 2006;70(5):1602-1611.
181. Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*. 2001;42(7):1007-1017.

182. Marzolini C, Tirona RG, Kim RB. Pharmacogenomics of the OATP and OAT families. *Pharmacogenomics*. 2004;5(3):273-282.
183. Hagenbuch B, Meier PJ. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochimica et biophysica acta*. 2003;1609(1):1-18.
184. Shimizu M, Fuse K, Okudaira K, Nishigaki R, Maeda K, Kusuhara H, Sugiyama Y. Contribution of OATP (organic anion-transporting polypeptide) family transporters to the hepatic uptake of fexofenadine in humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2005;33(10):1477-1481.
185. Grube M, Meyer zu Schwabedissen HE, Prager D, Haney J, Moritz KU, Meissner K, Roskopf D, Eckel L, Bohm M, Jedlitschky G, Kroemer HK. Uptake of cardiovascular drugs into the human heart: expression, regulation, and function of the carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5). *Circulation*. 2006;113(8):1114-1122.
186. Koepsell H, Schmitt BM, Gorboulev V. Organic cation transporters. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2003;150:36-90.
187. Jonker JW, Schinkel AH. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308(1):2-9.
188. Oudard S, Marie JP, Pujade Lauraine E. [MDR (Multiple Drug Resistant) type of resistance to chemotherapy in clinical practice]. *Bull Cancer*. 1996;83(8):609-618.
189. Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J, Kroemer HK. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest*. 1999;104(2):147-153.

190. Sipe BE, Jones RJ, Bokhart GH. Rhabdomyolysis causing AV blockade due to possible atorvastatin, esomeprazole, and clarithromycin interaction. *Ann Pharmacother.* 2003;37(6):808-811.
191. Morissette P, Hreiche R, Turgeon J. Modulatory role of verapamil treatment on the cardiac electrophysiological effects of cisapride. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007;84(12):1285-1290.
192. Pal D, Mitra AK. MDR- and CYP3A4-mediated drug-drug interactions. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2006;1(3):323-339.
193. Morgan TK, Jr., Sullivan ME. An overview of class III electrophysiological agents: a new generation of antiarrhythmic therapy. *Prog Med Chem.* 1992;29:65-108.
194. De Ponti F, Poluzzi E, Montanaro N. QT-interval prolongation by non-cardiac drugs: lessons to be learned from recent experience. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000;56(1):1-18.
195. Coi A, Massarelli I, Testai L, Calderone V, Bianucci AM. Identification of "toxicophoric" features for predicting drug-induced QT interval prolongation. *Eur J Med Chem.* 2008.
196. Seelig A, Blatter XL, Wohnsland F. Substrate recognition by P-glycoprotein and the multidrug resistance-associated protein MRP1: a comparison. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2000;38(3):111-121.
197. Honig PK, Woosley RL, Zamani K, Conner DP, Cantilena LR, Jr. Changes in the pharmacokinetics and electrocardiographic pharmacodynamics of terfenadine with concomitant administration of erythromycin. *Clin Pharmacol Ther.* 1992;52(3):231-238.

198. Owens RC, Jr. QT prolongation with antimicrobial agents: understanding the significance. *Drugs*. 2004;64(10):1091-1124.
199. Dumaine R, Roy ML, Brown AM. Blockade of HERG and Kv1.5 by ketoconazole. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;286(2):727-735.
200. Yap YG, Camm AJ. Drug induced QT prolongation and torsades de pointes. *Heart*. 2003;89(11):1363-1372.
201. Abriel H, Schlapfer J, Keller DI, Gavillet B, Buclin T, Biollaz J, Stoller R, Kappenberger L. Molecular and clinical determinants of drug-induced long QT syndrome: an iatrogenic channelopathy. *Swiss Med Wkly*. 2004;134(47-48):685-694.
202. Roden DM. Drug-induced prolongation of the QT interval. *N Engl J Med*. 2004;350(10):1013-1022.
203. Geelen P, Drolet B, Lessard E, Gilbert P, O'Hara GE, Turgeon J. Concomitant Block of the Rapid (I(Kr)) and Slow (I(Ks)) Components of the Delayed Rectifier Potassium Current is Associated With Additional Drug Effects on Lengthening of Cardiac Repolarization. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 1999;4(3):143-150.
204. Marques JL, George E, Peacey SR, Harris ND, Macdonald IA, Cochrane T, Heller SR. Altered ventricular repolarization during hypoglycaemia in patients with diabetes. *Diabet Med*. 1997;14(8):648-654.
205. Brown DW, Giles WH, Greenlund KJ, Valdez R, Croft JB. Impaired fasting glucose, diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk factors are associated with prolonged QTc duration. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Cardiovasc Risk*. 2001;8(4):227-233.

206. Landstedt-Hallin L, Englund A, Adamson U, Lins PE. Increased QT dispersion during hypoglycaemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of internal medicine*. 1999;246(3):299-307.
207. Lengyel C, Virag L, Biro T, Jost N, Magyar J, Biliczki P, Kocsis E, Skoumal R, Nanasi PP, Toth M, Kecskemeti V, Papp JG, Varro A. Diabetes mellitus attenuates the repolarization reserve in mammalian heart. *Cardiovasc Res*. 2007;73(3):512-520.
208. Veglio M, Bruno G, Borra M, Macchia G, Bargerò G, D'Errico N, Pagano GF, Cavallo-Perin P. Prevalence of increased QT interval duration and dispersion in type 2 diabetic patients and its relationship with coronary heart disease: a population-based cohort. *Journal of internal medicine*. 2002;251(4):317-324.
209. Solini A, Passaro A, D'Elia K, Calzoni F, Alberti L, Fellin R. The relationship of plasma glucose and electrocardiographic parameters in elderly women with different degrees of glucose tolerance. *Aging (Milano)*. 2000;12(4):249-255.
210. Nishizaki M, Ashikaga T, Yamawake N, Fujii H, Arita M, Sumitomo N, Sakurada H, Hiraoka M. Effects of glucose-induced insulin secretion on ventricular repolarization in patients with congenital long QT syndrome. *Circ J*. 2002;66(1):35-40.
211. Abo K, Ishida Y, Yoshida R, Hozumi T, Ueno H, Shiotani H, Matsunaga K, Kazumi T. Torsade de pointes in NIDDM with long QT intervals. *Diabetes Care*. 1996;19(9):1010.
212. Quek DK, H'Ng P K. Torsade de pointes and sudden death associated with diabetic autonomic diarrhoea--a case report. *Singapore Med J*. 1993;34(3):266-270.

213. Piippo K, Laitinen P, Swan H, Toivonen L, Viitasalo M, Pasternack M, Paavonen K, Chapman H, Wann KT, Hirvela E, Sajantila A, Kontula K. Homozygosity for a HERG potassium channel mutation causes a severe form of long QT syndrome: identification of an apparent founder mutation in the Finns. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;35(7):1919-1925.
214. Grandinetti A, Seifried S, Mor J, Chang HK, Theriault AG. Prevalence and risk factors for prolonged QTc in a multiethnic cohort in rural Hawaii. *Clin Biochem*. 2005;38(2):116-122.
215. Zhang Y, Han H, Wang J, Wang H, Yang B, Wang Z. Impairment of human ether-a-go-go-related gene (HERG) K⁺ channel function by hypoglycemia and hyperglycemia. Similar phenotypes but different mechanisms. *J Biol Chem*. 2003;278(12):10417-10426.
216. Gupta A, Lawrence AT, Krishnan K, Kavinsky CJ, Trohman RG. Current concepts in the mechanisms and management of drug-induced QT prolongation and torsade de pointes. *American heart journal*. 2007;153(6):891-899.
217. Fournier P, Pacouret G, Charbonnier B. [A new cause of torsades de pointes: combination of terfenadine and troleandomycin]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 1993;42(5):249-252.
218. Feroze H, Suri R, Silverman DI. Torsades de pointes from terfenadine and sotalol given in combination. *Pacing Clin Electrophysiol*. 1996;19(10):1519-1521.
219. Stupp R, Bauer J, Pagani O, Gerard B, Cerny T, Sessa C, Bastian G, Sarkany M, Schlapfer J, Giroux B, Leyvraz S. Ventricular arrhythmia and torsade de pointe:

- dose limiting toxicities of the MDR-modulator S9788 in a phase I trial. *Ann Oncol.* 1998;9(11):1233-1242.
220. Zou A, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti MC. Single HERG delayed rectifier K⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes. *The American journal of physiology.* 1997;272(3 Pt 2):H1309-1314.
221. Zhang S, Zhou Z, Gong Q, Makielski JC, January CT. Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circulation research.* 1999;84(9):989-998.

CHAPITRE II

GENDER-RELATED DIFFERENCES IN DRUG-INDUCED PROLONGATION OF CARDIAC REPOLARIZATION IN PRE-PUBERTAL GUINEA PIGS


**Gender-related differences in drug-induced prolongation of cardiac repolarization
in pre-pubertal guinea pigs.**

Raymond Hreiche¹, Pierre Morissette¹, Hubert Zakrzewski-Jakubiak¹, Jacques Turgeon¹.

¹ Faculty of Pharmacy, Université de Montréal.

Running title: Gender differences in K⁺ channel block.

Address for correspondence: Jacques Turgeon, Ph.D.
Research Center
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
Hôtel-Dieu, Masson Pavilion room 8-213
3850 Saint Urbain street,
Montreal (QC) H2W 1T7
Tel : (514) 890-8044
Fax : (514) 412-7186



1. Résumé

Introduction: Bien que le risque accru de survenue du LQTS médicamenteux chez les femmes soit bien établi, les mécanismes sous-jacents sont encore partiellement compris. Pour cela, l'objectif majeur de cette étude était d'évaluer les différences liées au sexe lors d'un blocage d' I_{Kr} , d' I_{Ks} et d' $I_{Kr}+I_{Ks}$ dans des cœurs isolés de cobayes mâles et femelles en âge pré-pubertaire. Nous étions particulièrement intéressés dans l'étude de cœurs isolés d'animaux traités avec du vérapamil puisqu'il a été démontré que ce dernier inhibe l'activité des transporteurs membranaires de certains médicaments et module l'activité d'un bloqueur d' I_{Kr} , le cisapride. **Méthodes:** Les animaux (n=120) furent sacrifiés par dislocation cervicale, leurs cœurs isolés et rétroperfusés avec une solution tampon contenant de la dofétilide, de la dompéridone, de l'indapamide, du dofétilide+indapamide ou de la domperidone+indapamide. La durée du potentiel d'action monophasique à 90 % de repolarisation (MAPD₉₀) fut mesurée avant et après la perfusion de médicament(s). **Résultats:** L'indapamide (bloqueur d' I_{Ks}) prolongea la MAPD₉₀ chez les femelles (15.1±0.5 msec) d'une façon plus prononcée que chez les mâles (9.7±1.3 msec; p<0.05) dans les cœurs d'animaux traités au vérapamil et la même tendance fut observée dans les cœurs d'animaux non traités (17.0±5.7 vs 11.8±3.5; p=0.069). Par contre, la prolongation de la MAPD₉₀ induite par les bloqueurs d' I_{Kr} que sont la dompéridone et la dofétilide, n'était pas significativement différente entre mâles et femelles. Le traitement au vérapamil fut associé à une prolongation plus importante du MAPD₉₀ dans les cœurs perfusés avec la dofétilide ou la dompéridone comparativement aux animaux non traités (p<0.01). Hors, le traitement au vérapamil n'induisit pas de différence liée au sexe lorsque des bloqueurs d' I_{Kr} ou d' I_{Ks} furent

perfusés. **Conclusion:** En conclusion, 1) les cobayes femelles présentèrent une augmentation plus importante de leur $MAPD_{90}$ lorsqu'elles furent exposées à l'indapamide, un bloqueur d' I_{Ks} , 2) aucune différence significative liée au sexe ne fut observée pour les bloqueurs d' I_{Kr} et 3) le vérapamil n'a pas révélé de différences liées au sexe lors du blocage d' I_{Kr} ou d' I_{Ks} bien qu'il augmenta le blocage d' I_{Kr} induit par le dofétilide et la dompéridone.

2. Abstract

Introduction: An increased risk for drug-induced long QT syndrome (LQTS) in women is well established but the underlying mechanisms are still poorly understood. Therefore, the main objective of our study was to evaluate gender-related differences for block of I_{Kr} , I_{Ks} and $I_{Kr}+I_{Ks}$ in isolated hearts from pre-pubertal male and female guinea pigs. We were particularly interested in studying hearts from animal treated with verapamil since the drug has been shown to inhibit membrane drug transporters activities and modulate block of I_{Kr} . **Methods:** Animals (n=120) were sacrificed by cervical dislocation, hearts isolated and buffer-perfused with either dofetilide, domperidone, indapamide, dofetilide+indapamide or domperidone+indapamide. Monophasic action potential at 90% repolarisation (MAPD₉₀) was measured during baseline, during drug(s) perfusion and after a washout period. **Results:** Indapamide (I_{Ks} blocker) prolonged more the MAPD₉₀ in female (15.1 ± 0.5 msec) than male (9.7 ± 1.3 msec; $p<0.05$) in hearts from verapamil treated animals and the same tendency was observed in hearts from untreated animals (17.0 ± 5.7 vs 11.8 ± 3.5 ; $p=0.069$). In contrast, MAPD₉₀ prolongation induced by the I_{Kr} blockers domperidone and dofetilide was not significantly different between males and females. Verapamil treatment was associated with a greater prolongation of MAPD₉₀ in hearts perfused with dofetilide or domperidone ($p<0.01$). Yet, verapamil treatment did not induce a gender difference when I_{Kr} or I_{Ks} blockers were perfused. **Conclusion:** In conclusion, 1) female guinea pigs exhibited a greater increase in their MAPD₉₀ when exposed to indapamide, an I_{Ks} blocker, 2) no gender-related differences were observed for I_{Kr} blockers, and 3) verapamil did not uncover gender-related differences in I_{Kr} or I_{Ks} block although it increased block of I_{Kr} by dofetilide and domperidone.

3. Introduction

Drugs that prolong cardiac repolarization cause a lengthening of the QT interval on the surface electrocardiogram and are associated with an increased risk of inducing torsades de pointes (TdP)¹. This polymorphic ventricular tachycardia may be self-terminating or may degenerate into ventricular fibrillation and death. The first cases of drug-induced QT prolongation were seen in patients treated with the antiarrhythmic drug quinidine². Clinical cases were later shown to occur with many other drugs; most cases of QT prolongation have appeared in patients presenting with predisposing factors such as bradycardia, low serum potassium or magnesium levels, or receiving concomitant treatments with drugs that lengthen cardiac repolarization^{1, 3}. Since then, another important predisposing factor to prolonged QT intervals and torsades de pointes has been recognized: gender.

Indeed, in 1993 Makkar published an analysis of the gender distribution of 332 cases of TdP induced by antiarrhythmic drugs⁴; the results of this study clearly demonstrated that women were at an increased risk of developing proarrhythmic events. Larger studies with the *d*-isomer of sotalol (SWORD study) also found female gender as a major risk factor for proarrhythmic events related to drug intake in a post-myocardial infarction population⁴.

The mechanisms responsible for the predisposition of women to TdP are unknown but may be related to the fact that the baseline QTc interval is naturally longer in women than in men after puberty^{5, 6}. In fact, the QT interval shortens after puberty in men as it

remains steady in women throughout their lifetime. It only returns to initial values around the age of 50 or 60⁶. These evidences led to the hypothesis that sex steroids are the cause of the prolonged QTc observed. In fact, studies have demonstrated that there is an important down regulation of mRNA concentrations encoding for the IsK and Kv1.5 potassium genes when ovariectomized rabbits were treated with 17 β -estradiol or dihydrotestosterone⁷. A more recent study has indicated that menstrual cycle differences exist in QTc responses to ibutilide with a greater increase in QTc during menses and ovulation of the menstrual cycle⁸. These results provide strong evidence that sex hormones can modulate the expression of ion channels. Nevertheless, they explain only part of the phenomenon and scientists agree that mechanisms responsible for gender-related differences in the risk of proarrhythmia from drugs remain largely undefined.

Some researchers have tried to explain drug induced long QT syndrome while examining gender differences in the pharmacokinetics of drugs. It has been shown that the activity of the hepatic enzyme CYP3A4 which is often involved in the metabolism of drugs that prolong cardiac repolarization, is higher in women than in men⁹. However, such an effect would reduce rather than increase the QTc, unless these actions were produced by active metabolites. Gender-associated differences in transport processes for endogenous and exogenous substrates have also been reported in various organs of the body for rats, mice and humans¹⁰⁻¹³. Hepatic P-glycoprotein (P-gp) expression is 2-fold higher in men than in women suggesting that the disposition of P-gp substrates is different between genders¹⁴.

Several membrane transporters are also expressed in the heart¹⁵. Yet, very few studies have looked at the potential for gender-related differences in the transport of drugs to the heart. We recently reported that treatment with verapamil, a calcium channel blocker and a well-known modulator of membrane transporters, can potentiate the electrophysiological effects of cisapride, a gastrokinetic drug with I_{Kr} blockade properties¹⁶. Based on these results, we hypothesized that the potential verapamil-induced modulation of the activity of membrane transporters would alter the effects of other potassium channel blockers on cardiac repolarization and would partly explain gender differences.

Therefore, the objectives of the present study were to 1) Evaluate gender-related differences in the prolongation of cardiac repolarization under conditions of I_{Kr} blockade, I_{Ks} blockade, and under concomitant I_{Kr}/I_{Ks} blockade, 2) Confirm the modulatory role of verapamil treatment on the cardiac electrophysiological effects of I_{Kr} blockers other than cisapride¹⁶, 3) Evaluate effects of verapamil treatment before I_{Kr} , I_{Ks} and I_{Kr}/I_{Ks} blockade, and 4) Determine if this modulatory role could explain the gender-related differences in drug-induced prolongation of cardiac repolarization. In order to eliminate the role of hormonal modulation on ion channels, experiments were performed in pre-pubertal animals.

4. Methods

Experiments were performed in accordance with our institutional guidelines on animal research. Animals were housed and maintained in compliance with the *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* of the Canadian Council on Animal Care.

Drug preparation

Verapamil (Sigma-Aldrich) was dissolved in saline and administered at a dose of 11.6 mg/kg. Dofetilide (generously supplied by Pfizer, USA) and domperidone (Sigma-Aldrich) were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and then added to the buffer solution at a final concentration of 20 nM and 100 nM, respectively. Indapamide (Sigma-Aldrich) was dissolved in methanol and then added to the buffer solution at a final concentration of 66 μ M.

Treatment with verapamil

Pre-pubertal male and female Hartley guinea pigs (age, 3 to 4 weeks; weight, 300 to 350 g; n=120: 6 animals per drug group per gender and per verapamil treatment; Charles River Laboratories, Montreal, Quebec, Canada) were utilized in this study. Half of them (n=60) were injected daily with verapamil 11.6 mg/kg i.p. for 5 days. The last injection was given 24 hours prior to animal sacrifice, isolation of the heart and conduct of electrophysiological studies.

Heart Isolation and perfusion technique

Animals were anticoagulated by injection of heparin sodium (400 IU i.p.). Twenty minutes later, animals were killed by cervical dislocation, and their hearts were rapidly excised and immersed in cold (4°C) Krebs-Henseleit buffer containing (mM) glucose 11.2, KCl 4.7, CaCl₂ 1.2, NaHCO₃ 25, NaCl 118.5, MgSO₄ 2.5, and KH₂PO₄ 1.2. This solution was continuously gassed with 95 % oxygen plus 5 % carbon dioxide (pH 7.4, 37°C). Each heart was cannulated and retrogradely perfused via the aorta with the Krebs-Henseleit buffer at a constant pressure equivalent to 100 cm H₂O. To permit rapid exchange in perfusion solutions, a double warming coil heart perfusion system (Harvard Apparatus, Inc., South Natick, MA) and two parallel liquid columns were used.

Electrophysiological Measurements

Hearts were electrically stimulated (clinical stimulator, Digital Cardiovascular instruments inc.) at a basic cycle length of 250 msec (4 Hz) at three times threshold via two silver electrodes implanted in the epicardium of the right ventricle. A monophasic action potential catheter (Langendorff probe model 225, EP Technologies Inc) was introduced in the left ventricle through the mitral valve and securely positioned to obtain a visually adequate signal (amplitude >5 mV, stable phase 4). During the protocol, monophasic action potential signals were continuously recorded and sampled at 2000 Hz. The output was analyzed using the Notocord-hem version 3.5 software (Notocord Systems, Croissy sur Seine, France).

Hearts were perfused with Krebs-Henseleit buffer during a control period of 10 minutes to reach stability of the monophasic action potential signal. Thereafter, perfusion was performed for 10 minutes with buffer containing one of the following drugs: 20 nM

dofetilide, 100 nM domperidone, 66 μ M indapamide, 20 nM dofetilide + 66 μ M indapamide or 100 nM domperidone + 66 μ M indapamide. Perfusion with buffer containing no drug was then restarted during a 10 minute washout period to assess reversal of drug effects.

Statistical analysis

Only hearts with reversal of drug effects on reperfusion with buffer containing no drug were included in the analysis. Data on the magnitude of drug effects were compared by a Student *t* test. In addition, a 3-way ANOVA was performed to assess the statistical significance of the 3 parameters studied – namely the gender, verapamil treatment and the type of drug perfused – independently and in association. All values are expressed as mean \pm S.D. Level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

5. Results

Typical recordings of monophasic action potentials obtained from isolated guinea pig hearts recorded at baseline and during perfusion of dofetilide 20 nM are illustrated in Figure 1. Amplitude of the signals was stable throughout the duration of the experiments.

Inter-gender comparison of MAPD₉₀ prolongation in non-treated animals

Dofetilide 20 nM (I_{Kr} block) prolonged the MAPD₉₀ by 21.6 ± 2.3 msec in hearts from untreated male animals versus 21.6 ± 1.1 msec in hearts from untreated females ($p > 0.05$) (Fig. 2A). Similarly, prolongation of the MAPD₉₀ caused by another I_{Kr} blocker, domperidone 100 nM, was not significantly different in males versus females (15.9 ± 4.7 vs 15.5 ± 4.2 msec respectively; $p > 0.05$) (Fig. 2A). On the other hand, a gender-related effect tended to be observed with indapamide used as a selective I_{Ks} blocker. Indeed, at a concentration of 66 μ M, the drug prolonged MAPD₉₀ by 11.8 ± 3.5 msec in hearts from untreated male animals compared to 17.0 ± 5.7 msec in untreated female animals ($p = 0.069$) (Fig. 2B). Finally, concomitant blockade of I_{Kr} (with dofetilide 20 nM or domperidone 100 nM) and I_{Ks} (with indapamide) was not associated with gender-differences in MAPD₉₀ prolongation ($p > 0.05$) (Fig. 2C). Indeed, dofetilide 20 nM + indapamide 66 μ M prolonged the MAPD₉₀ by 35.6 ± 1.1 msec in males vs 36.0 ± 0.8 msec in females ($p > 0.05$) while domperidone 100 nM + indapamide 66 μ M prolonged MAPD₉₀ by 20.8 ± 1.8 msec in males vs 22.4 ± 1.6 msec in females ($p > 0.05$).

Gender-independent comparison of MAPD₉₀ prolongation in verapamil-treated animals

In this set of experiments, we compared – independently from the gender covariable – the potential modulatory effects of verapamil treatment on the prolongation of MAPD₉₀ due to I_{Kr} blockade (dofetilide or domperidone), I_{Ks} blockade (indapamide) or I_{Kr}/I_{Ks} blockade. Therefore, we pooled together results from male and female guinea pig hearts. Fig. 3A shows that prolongation of MAPD₉₀ with I_{Kr} blockers was greater in hearts from animals treated with verapamil compared to untreated animals. Indeed, dofetilide 20 nM prolonged the MAPD₉₀ by 24.8 ± 3.5 msec in animals treated with verapamil compared to 21.6 ± 1.7 msec in untreated animals ($p < 0.05$, $n = 12$). Similarly, a significant difference was observed with domperidone 100 nM in animals treated with verapamil compared to untreated animals (19.7 ± 4.1 vs 15.7 ± 4.3 msec respectively, $p < 0.01$, $n = 12$). In contrast, no differences were observed between results from verapamil treated or untreated animals when these hearts were perfused with the I_{Ks} blocker indapamide 66 μ M (13.1 ± 3.2 vs 14.4 ± 5.2 msec respectively, Fig. 3B, $p > 0.05$). Finally, Fig. 3C illustrates results of MAPD₉₀ prolongation under concomitant I_{Kr}/I_{Ks} blockade with or without verapamil treatment. While verapamil treatment did not cause modulation in the MAPD₉₀ prolongation with dofetilide 20 nM + indapamide 66 μ M (34.2 ± 3.4 in verapamil-treated animals vs 35.8 ± 1.0 msec in control animals, $p > 0.05$), it induced a more significant prolongation when hearts were perfused with domperidone 100 nM + indapamide 66 μ M (25.2 ± 5.5 in verapamil-treated animals vs 21.1 ± 3.9 msec in control animals, $p < 0.05$, $n = 12$).

Inter-gender comparison of MAPD₉₀ prolongation with or without verapamil-treatment

Fig. 4 compares results obtained taking into account both variables i.e. verapamil treatment and gender. Data presented in Fig. 4A and 4B suggest that verapamil does not play a significant role in gender-related differences. Indeed, the absence of gender-differences observed in the prolongation of MAPD₉₀ induced by I_{Kr} blockers (Fig. 4A) is not modified by verapamil treatment (Fig. 4B). Moreover, when indapamide 66 μ M was perfused, verapamil treatment (Fig. 4D) did not modulate the gender-related differences already observed with untreated animals (Fig. 4C). Indeed, MAPD₉₀ was prolonged by 15.1 ± 0.5 msec in verapamil-treated females compared to 9.7 ± 1.3 in verapamil-treated males ($p < 0.05$). However, the non significant difference observed without verapamil treatment became significant when animals were treated with verapamil. Finally, the association of I_{Kr}/I_{Ks} blockade with dofetilide 20 nM + indapamide 66 μ M showed a gender-related modulation induced by verapamil [(Fig 4F, 32.7 ± 1.5 vs 36.9 ± 0.9 msec in male vs female respectively, $p < 0.05$) while no significant gender-related differences were observed with domperidone 100 nM + indapamide 66 μ M (Fig. 4F, 25.1 ± 7.4 vs 25.4 ± 2.8 msec in male vs female respectively, $p > 0.05$)].

In a more global statistical comparison of our results, a 3-way ANOVA statistical analysis showed that the gender parameter exhibits a significant effect ($p = 0.0091$) with a significant male/female difference present in all groups. The gender parameter does not interact with other factors, which indicates that these gender-related differences are significant in all circumstances (independently from the type of drug perfused or the absence or presence of the verapamil treatment). Furthermore, the verapamil treatment

parameter shows a significant effect ($p = 0.0323$) and interacts significantly with the type of drug perfused ($p = 0.0168$). Thus, the type of drug perfused is critical for the verapamil treatment effect. In this case, the significant drugs that interact with the verapamil treatment are I_{Kr} blockers (dofetilide and domperidone), and the association domperidone + indapamide.

6. Discussion

Results obtained in this study demonstrate that a gender-related difference exists for the block of I_{Ks} when indapamide is used. They further confirm that treatment of guinea pigs with the membrane transporters modulator verapamil for 5 days modulates the prolongation of cardiac repolarization induced by I_{Kr} blockers, although no gender-related differences could be revealed.

We have previously reported that prolongation of cardiac repolarization by cisapride (I_{Kr} blocker)¹⁷ in isolated guinea pig hearts was significantly increased when animals were treated with verapamil¹⁶. That study also showed intracellular accumulation of cisapride in isolated cardiac myocytes after verapamil treatment. In addition, we clearly showed that block of I_{Kr} by verapamil was not a direct factor in potentiation observed; indeed, verapamil concentrations in cardiomyocytes at the time of perfusion was more than 10-time less than the IC_{50} for verapamil's block of I_{Kr} ^{16, 18}. In the present study, we aimed to confirm modulatory effects of verapamil treatment on the prolongation of cardiac repolarization for two other I_{Kr} blockers. Drugs used were a pure class-III antiarrhythmic I_{Kr} blocker, dofetilide¹⁹, and a drug with pharmacological properties similar to those of cisapride, namely domperidone²⁰. On one hand, domperidone – a gastrokinetic drug with I_{Kr} blocking properties – has been identified as an ABC transporter substrate, in particular the P-gp^{21, 22}. On the other hand, little is known about the membrane transport of dofetilide although the drug represents a potential ABC membrane transporter substrate²³. The increase in I_{Kr} block observed with dofetilide and domperidone in hearts from animals treated with verapamil suggest that the access to the intracellular binding

of these drugs on I_{Kr} channel was increased. This suggests that verapamil treatment would increase intracellular concentrations of dofetilide and domperidone¹⁶.

We also intended to assess the modulatory role of verapamil treatment on I_{Ks} and combined I_{Kr}/I_{Ks} block. Indapamide, selected as an I_{Ks} blocker²⁴, prolonged ventricular repolarization indifferently in hearts isolated from animals receiving or not a verapamil treatment, suggesting that indapamide concentrations may not be modulated by verapamil. In addition, mixed results were obtained concerning verapamil treatment effects on the combined block of I_{Kr} and I_{Ks} . Indeed, domperidone appeared more sensitive than dofetilide to verapamil modulatory effects.

The main objective of the current study was to evaluate gender-related differences in the prolongation of ventricular repolarization in pre-pubertal guinea pigs under various conditions. A previous study by James *et al.* evaluated the gender-related differences in the repolarization of ventricular myocytes in post-pubertal guinea pigs²⁵. These authors showed significant gender-related differences in the densities of I_{K1} , I_K and I_{Ca} . They did not however evaluate the effects of channel blockers on that difference. Our results are similar to those reported previously by Brouillette *et al.* which could not show a gender-difference in QTc prolongation induced by another I_{Kr} blocker, E-4031²⁶. However, our results differ from theirs by showing gender-related differences when an I_{Ks} blocker is perfused. Several factors could explain these different results: on the one hand, we used in our experiments guinea-pigs at a pre-pubertal age. This allowed us to exclude the effect of sexual hormones on cardiac repolarization in the assessment of gender-differences, contrary to Brouillette *et al.* who utilized adult animals. On the other hand,

Brouillette *et al.* measured the QTc prolongation in the absence of heart stimulation; we, however, measured the MAPD₉₀ prolongation in hearts electrically stimulated at a basic cycle length of 250 msec. Finally, we used indapamide as an I_{Ks} blocker probe^{24, 27}, while Brouillette *et al.* used HMR1556.

Even though the guinea pig is an ideal model to study I_{Kr} and I_{Ks} , a limitation to our study is the unavailability of monoclonal antibodies for various membrane transporters in this species; furthermore, genetic sequences of these proteins are unpublished. This prevented us to directly measure the level of expression of several of these proteins or their mRNA. Consequently, no direct proof could be brought to demonstrate the modulatory effects of verapamil on these transporters. One possible mechanism that could explain the modulatory effects of verapamil could be an upregulation of $I_{Ca,L}$. Indeed, Schroder *et al.* recently showed that chronic calcium channel blockade via verapamil treatment significantly causes an upregulation of $I_{Ca,L}$ in mouse ventricle²⁸. In our model, if an upregulation of $I_{Ca,L}$ occurs, an increase in calcium channel density and activity would definitely lead to an increase in the MAPD₂₀ and MAPD₅₀ and could lead to an increase in the MAPD₉₀. This increase could explain the more pronounced prolongation of repolarization observed in our model when hearts were perfused with dofetilide or domperidone after verapamil treatment. Even if our model of verapamil treatment differs from Schroder *et al.* model, a future assessment of the verapamil effect on calcium currents in our model seems necessary.

Other species were utilized in experimental studies in order to evaluate gender-related effects of potassium channel blockers on cardiac repolarization. Usage of mice and rats

for this matter is very limited due to the fact that I_{Kr} and I_{Ks} do not play a significant role in ventricular cardiac repolarization of adults animals²⁹. Dogs and rabbits both express I_{Kr} and I_{Ks} ³⁰ but female estrus cycle differ significantly from humans and render extrapolation to humans rather difficult. To our knowledge, our study is the first to evaluate gender-related differences of I_{Kr}/I_{Ks} blockers on cardiac repolarization in a pre-pubertal animal model.

Among the main objectives of this study, we aimed to better understand the mechanisms underlying gender-related differences in the prolongation of cardiac repolarization. Our formulated hypothesis was that influx/efflux membrane transporters expressed *in situ* are differentially expressed in males and females. This concept is based on previously described studies showing discrepancies in membrane transporters expression between gender¹⁰⁻¹⁴. This variance could generate different intracellular concentrations of potassium channel blockers leading to different prolongation amplitudes in cardiac repolarization. In other words, if more influx transporters or less efflux transporters are expressed in females compared to males, a higher intracellular drug concentration will occur in females leading to more potassium channel blocking effects.

Recent reports reveal the wide expression of influx and efflux membrane transporters in the heart, but few is known on their exact role in the transport of drugs, especially potassium channel blockers^{15, 31, 32}. Moreover, verapamil has been used as a wide-scale multidrug resistance modulator and has been demonstrated to alter the pharmacokinetics of many drugs that are transported by ABC transporters or OCTN2³³⁻³⁵. In the interpretation of our results, one must consider the diversified expression of membrane

transporters in the heart and the limited selectivity of verapamil towards these transporters.

The clinical relevance of our findings in regard to gender-related differences is a better understanding of the risk of using an I_{Ks} blocker in women, an issue less evaluated comparatively to I_{Kr} blockers usage. So far, reports on indapamide-induced TdP have been described only in women³⁶. Our verapamil-related results are of great clinical importance in patients with polypharmacy. The community is at great needs to better understand the role of drug response modifiers like verapamil in order to predict occurrence of major side effects.

7. Conclusion

In conclusion, results obtained in this study demonstrate that gender-related differences in cardiac repolarization are observed in guinea pig hearts exposed to I_{Ks} blockers but not to I_{Kr} blockers. In addition, we confirmed the modulatory effect of verapamil on the prolongation of cardiac repolarization with I_{Kr} blockers. This is of major importance in the understanding of predisposing factors that could exacerbate the onset of drug-induced arrhythmias. Finally, we could not demonstrate that verapamil treatment - via a potential modulation of the activity of membrane transporters - is implicated in the gender-related differences in drug-induced LQTS and therefore, further studies need to be conducted.

8. References

1. Morissette P, Hreiche R, Turgeon J. Drug-induced long QT syndrome and torsade de pointes. *Can J Cardiol.* 2005;21(10):857-864.
2. Selzer A, Wray HW. Quinidine Syncope. Paroxysmal Ventricular Fibrillation Occurring During Treatment Of Chronic Atrial Arrhythmias. *Circulation.* 1964;30:17-26.
3. Roden DM. Drug-induced prolongation of the QT interval. *N Engl J Med.* 2004;350(10):1013-1022.
4. Makkar RR, Fromm BS, Steinman RT, Meissner MD, Lehmann MH. Female gender as a risk factor for torsades de pointes associated with cardiovascular drugs. *Jama.* 1993;270(21):2590-2597.
5. Bazett A. An analysis of the time relationship of electrocardiograms. *Heart.* 1920;7:353-370.
6. Rautaharju PM, Zhou SH, Wong S, Calhoun HP, Berenson GS, Prineas R, Davignon A. Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Can J Cardiol.* 1992;8(7):690-695.
7. Drici MD, Burklow TR, Haridasse V, Glazer RI, Woosley RL. Sex hormones prolong the QT interval and downregulate potassium channel expression in the rabbit heart. *Circulation.* 1996;94(6):1471-1474.
8. Rodriguez I, Kilborn MJ, Liu XK, Pezzullo JC, Woosley RL. Drug-induced QT prolongation in women during the menstrual cycle. *Jama.* 2001;285(10):1322-1326.

9. Hunt CM, Westerkam WR, Stave GM. Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A. *Biochem Pharmacol.* 1992;44(2):275-283.
10. Morris ME, Lee HJ, Predko LM. Gender differences in the membrane transport of endogenous and exogenous compounds. *Pharmacol Rev.* 2003;55(2):229-240.
11. Kleinman LI, Loewenstein MS, Goldstein L. [Sex difference in the transport of p-aminohippurate by the rat kidney.]. *Endocrinology.* 1966;78(2):403-406.
12. Orzes N, Bellentani S, Aldini R, Simoni P, Ferretti I, Lunazzi GC, Sottocasa GL, Tiribelli C. Sex differences in the hepatic uptake of sulphobromophthalein in the rat. *Clin Sci (Lond).* 1985;69(5):587-593.
13. Anton FM, Garcia Puig J, Ramos T, Gonzalez P, Ordas J. Sex differences in uric acid metabolism in adults: evidence for a lack of influence of estradiol-17 beta (E2) on the renal handling of urate. *Metabolism.* 1986;35(4):343-348.
14. Schuetz EG, Furuya KN, Schuetz JD. Interindividual variation in expression of P-glycoprotein in normal human liver and secondary hepatic neoplasms. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;275(2):1011-1018.
15. Couture L, Nash JA, Turgeon J. The ATP-binding cassette transporters and their implication in drug disposition: a special look at the heart. *Pharmacological reviews.* 2006;58(2):244-258.
16. Morissette P, Hreiche R, Turgeon J. Modulatory role of verapamil treatment on the cardiac electrophysiological effects of cisapride. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007;84(12):1285-1290.
17. Drolet B, Khalifa M, Daleau P, Hamelin BA, Turgeon J. Block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current by the prokinetic agent

- cisapride underlies drug-related lengthening of the QT interval. *Circulation*. 1998;97(2):204-210.
18. Zhang S, Zhou Z, Gong Q, Makielski JC, January CT. Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circulation research*. 1999;84(9):989-998.
 19. Rasmussen HS, Allen MJ, Blackburn KJ, Butrous GS, Dalrymple HW. Dofetilide, a novel class III antiarrhythmic agent. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;20 Suppl 2:S96-105.
 20. Drolet B, Rousseau G, Daleau P, Cardinal R, Turgeon J. Domperidone should not be considered a no-risk alternative to cisapride in the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Circulation*. 2000;102(16):1883-1885.
 21. El Ela AA, Hartter S, Schmitt U, Hiemke C, Spahn-Langguth H, Langguth P. Identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors among psychoactive compounds--implications for pharmacokinetics of selected substrates. *J Pharm Pharmacol*. 2004;56(8):967-975.
 22. Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest*. 1996;97(11):2517-2524.
 23. Yamreudeewong W, DeBisschop M, Martin LG, Lower DL. Potentially significant drug interactions of class III antiarrhythmic drugs. *Drug Saf*. 2003;26(6):421-438.
 24. Turgeon J, Daleau P, Bennett PB, Wiggins SS, Selby L, Roden DM. Block of IKs, the slow component of the delayed rectifier K⁺ current, by the diuretic agent indapamide in guinea pig myocytes. *Circulation research*. 1994;75(5):879-886.

25. James AF, Arberry LA, Hancox JC. Gender-related differences in ventricular myocyte repolarization in the guinea pig. *Basic Res Cardiol.* 2004;99(3):183-192.
26. Brouillette J, Lupien MA, St-Michel C, Fiset C. Characterization of ventricular repolarization in male and female guinea pigs. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;42(2):357-366.
27. Fiset C, Drolet B, Hamelin BA, Turgeon J. Block of IKs by the diuretic agent indapamide modulates cardiac electrophysiological effects of the class III antiarrhythmic drug dl-sotalol. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;283(1):148-156.
28. Schroder E, Magyar J, Burgess D, Andres D, Satin J. Chronic verapamil treatment remodels I_{Ca,L} in mouse ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(4):1906-1916.
29. Varro A, Lathrop DA, Hester SB, Nanasi PP, Papp JG. Ionic currents and action potentials in rabbit, rat, and guinea pig ventricular myocytes. *Basic Res Cardiol.* 1993;88(2):93-102.
30. Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *The Journal of physiology.* 2000;525 Pt 2:285-298.
31. Grube M, Kock K, Oswald S, Draber K, Meissner K, Eckel L, Bohm M, Felix SB, Vogelgesang S, Jedlitschky G, Siegmund W, Warzok R, Kroemer HK. Organic anion transporting polypeptide 2B1 is a high-affinity transporter for atorvastatin and is expressed in the human heart. *Clinical pharmacology and therapeutics.* 2006;80(6):607-620.

32. Hagenbuch B, Meier PJ. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochimica et biophysica acta*. 2003;1609(1):1-18.
33. Leu BL, Huang JD. Inhibition of intestinal P-glycoprotein and effects on etoposide absorption. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1995;35(5):432-436.
34. Meerum Terwogt JM, Beijnen JH, ten Bokkel Huinink WW, Rosing H, Schellens JH. Co-administration of cyclosporin enables oral therapy with paclitaxel. *Lancet*. 1998;352(9124):285.
35. Grube M, Meyer zu Schwabedissen HE, Prager D, Haney J, Moritz KU, Meissner K, Roskopf D, Eckel L, Bohm M, Jedlitschky G, Kroemer HK. Uptake of cardiovascular drugs into the human heart: expression, regulation, and function of the carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5). *Circulation*. 2006;113(8):1114-1122.
36. Letsas KP, Alexanian IP, Pappas LK, Kounas SP, Efremidis M, Sideris A, Kardaras F. QT interval prolongation and torsade de pointes associated with indapamide. *International journal of cardiology*. 2006;112(3):373-374.

9. Figure Legends

Figure 1: Recordings of monophasic action potential signals obtained from isolated guinea pig hearts exposed to Krebs-Henseleit buffer containing no drug or dofetilide 20 nM..

Figure 2: MAPD₉₀ prolongation (msec) observed in hearts isolated from pre-pubertal male (black bars) and female (white bars) guinea pigs perfused with buffer followed by dofetilide 20 nM or domperidone 100 nM (Panel A), indapamide 66 µM (Panel B), or (dofetilide 20 nM + indapamide 66 µM) and (dofetilide 20 nM + indapamide 66 µM) (Panel C); n = 6 per group.

Figure 3: MAPD₉₀ prolongation (msec) observed in hearts isolated from pre-pubertal male and female guinea pigs treated with (horizontal pattern) or without (vertical pattern) verapamil 11.6 mg/kg/j for 5 days and perfused with buffer followed by dofetilide 20 nM or domperidone 100 nM (Panel A), indapamide 66 µM (Panel B), or dofetilide 20 nM + indapamide 66 µM and dofetilide 20 nM + indapamide 66 µM (Panel C); n = 12 per group, *: p<0.05, **: p<0.01 for untreated vs treated with verapamil.

Figure 4: MAPD₉₀ prolongation (msec) observed in hearts isolated from pre-pubertal male and female guinea pigs treated with or without verapamil 11.6 mg/kg/j for 5 days and perfused with buffer followed by dofetilide 20 nM or domperidone 100 nM (Panel A and B), indapamide 66 µM (Panel C and D), or dofetilide 20 nM + indapamide 66 µM

and dofetilide 20 nM + indapamide 66 μ M (Panel E and F); n = 6 per group, *: p<0.05 for males vs females.

Figure 1

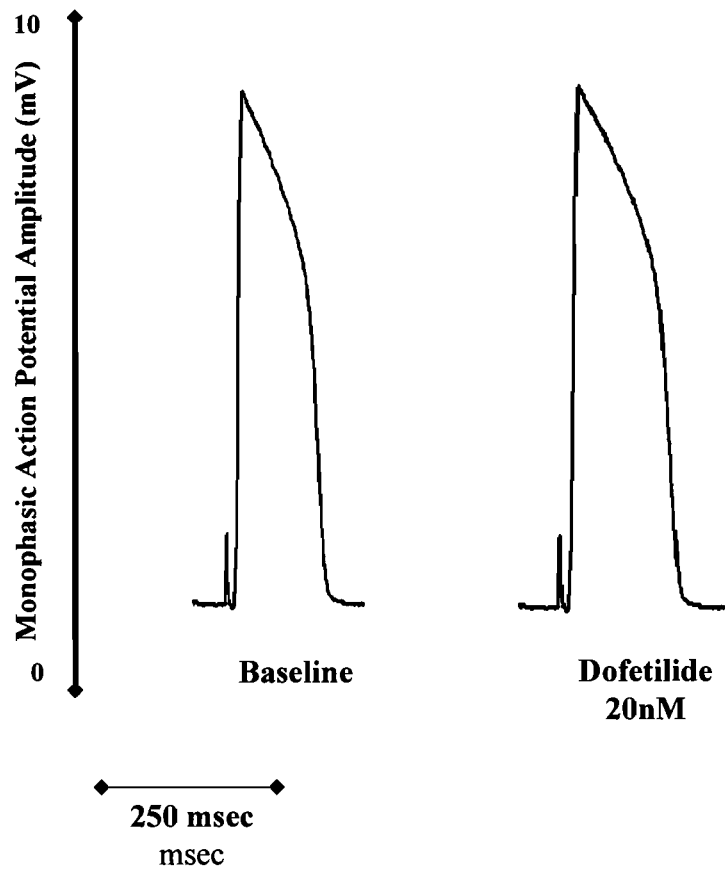


Figure 2

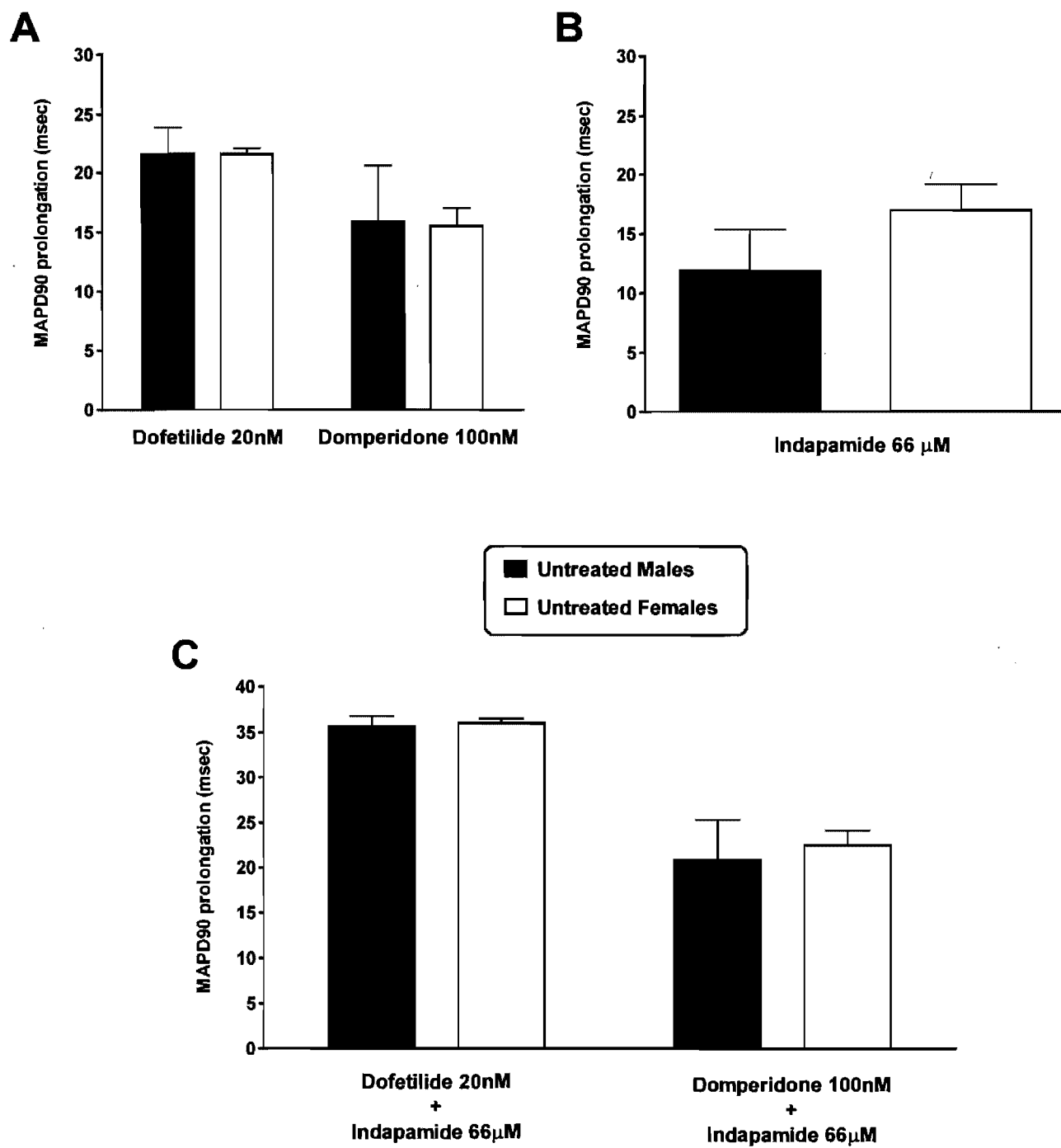


Figure 3

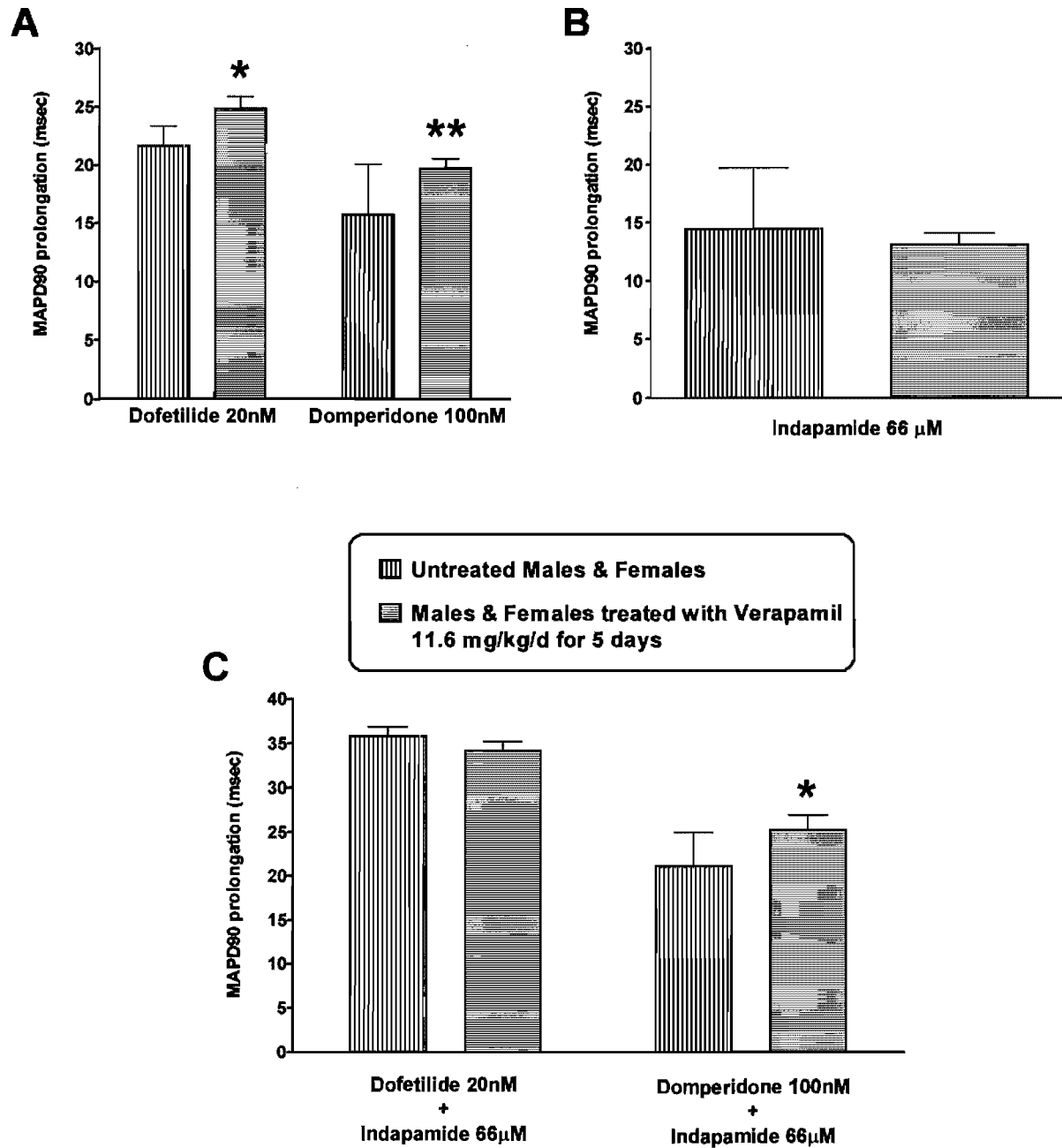
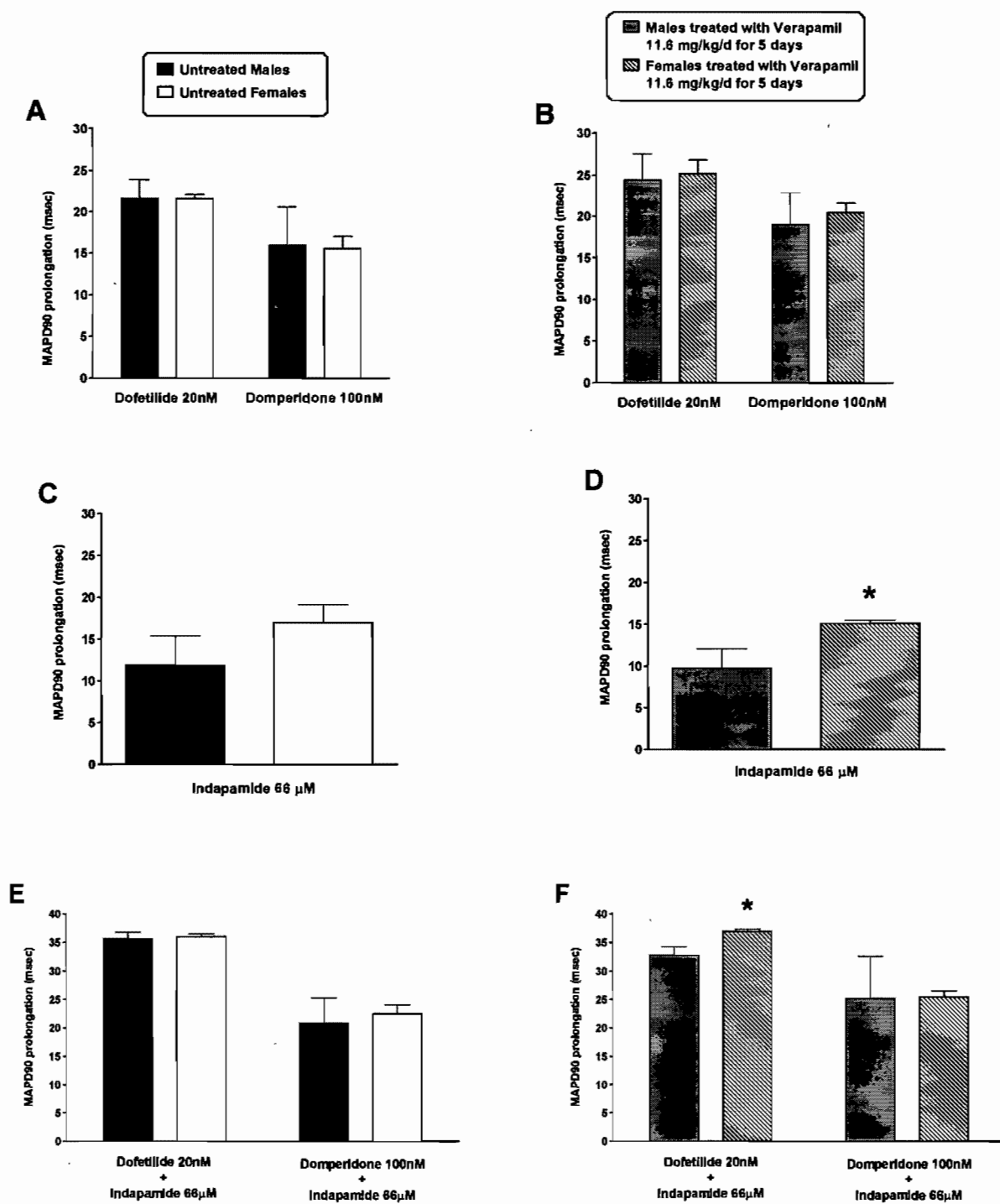


Figure 4



CHAPITRE III

LENGTHENING OF CARDIAC REPOLARIZATION IN ISOLATED GUINEA PIGS HEARTS BY SEQUENTIAL OR CONCOMITANT ADMINISTRATION OF TWO I_{KR} BLOCKERS

Lengthening of cardiac repolarization in isolated guinea pigs hearts by sequential or concomitant administration of two I_{Kr} blockers.

Raymond Hreiche^{1,2}, Pharm.D., M.Sc.,

Isabelle Plante^{1,2}, Ph.D.

Benoit Drolet^{3,4}, B.Pharm, Ph.D.,

Pierre Morissette^{1,2}, Ph.D.,

Jacques Turgeon^{1,2}, B.Pharm., Ph.D.

¹Faculty of Pharmacy, Université de Montréal.

²Research Center, CHUM,

³Faculty of Pharmacy, Université Laval,

⁴Research Center, Institut Universitaire de Cardiologie et Pneumologie, Hôpital Laval.

Running title: Combined administration of two I_{Kr} blockers

Address for correspondence:

Jacques Turgeon, Ph.D.
Research Center,
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
Hotel-Dieu – Centre de Recherche,
Masson Pavilion (Room 8-107)
3850, Saint-Urbain street,
Montreal (QC) Canada H2W 1T7
Tel: (514) 890-8044
Fax: (514) 412-7186



1. Résumé

Introduction: Le blocage du courant I_{Kr} induit une prolongation significative de la repolarisation cardiaque et constitue une préoccupation majeure en pharmacovigilance. Les avertissements cliniques ont souvent été associés à l'administration concomitante de deux médicaments (bloqueurs d' I_{Kr}) pouvant prolonger l'intervalle QT. Pour cela, l'objectif de cette étude était d'évaluer la prolongation de la repolarisation cardiaque durant le blocage combiné de deux bloqueurs d' I_{Kr} administrés simultanément ou séquentiellement en différents ordres. **Méthodes et Résultats:** 1) La $MAPD_{90}$ fut déterminée dans des cœurs isolés et perfusés de cobayes mâles. Les cœurs ($n=80$) furent exposés à des bloqueurs d' I_{Kr} – dofétilide (20 ou 200 nM), N-acetyl procainamide (NAPA) (100 ou 1000 μ M) ou érythromycine (60 ou 120 μ M) – seuls ou en combinaison (à faibles et hautes concentrations). Nos résultats ont démontré que la prolongation de la $MAPD_{90}$ observée lorsque les médicaments sont combinés était moindre que la somme des effets observés pour chaque médicament seul et cela aussi bien à faibles et à hautes concentrations. Dans une seconde série d'expériences, des cœurs ($n=180$) furent perfusés avec du tampon contenant de la dompéridone (5 ou 50 nM) pendant 10 min suivies par l'addition de kétoconazole (10 ou 100 μ M) ou érythromycine (10 ou 100 μ M) pour 10 min additionnelles. La séquence opposée fut également évaluée en perfusant le kétoconazole (0.3, 1, 3 ou 10 μ M) ou l'érythromycine (10 μ M) en premier, suivie par l'addition de dompéridone (50, 150 ou 300 nM) ou dofétilide (20 ou 150 nM) à la solution tampon. Le kétoconazole et l'érythromycine, quand ils sont perfusés en premier, antagonisent les effets de la dompéridone sur la

MAPD₉₀. En contraste, le kétoconazole et l'érythromycine prolongent la MAPD₉₀ même si la MADP₉₀ était prolongée *a priori* par la dompéridone ou la dofétilide. 2) Les expériences de patch-clamp ont été effectuées dans des cellules (n = 61) issues d'une lignée cellulaire stable HEK293 transfectée par *HERG*. Le blocage de HERG fut évalué dans des cellules exposées à la dompéridone 50 nM suivie par dompéridone 50 nM + kétoconazole 10 µM ou l'inverse (kétoconazole 10 µM suivi par du kétoconazole 10 µM + dompéridone 50 nM). La perfusion de dompéridone 50 nM sous des conditions de blocage de HERG *a priori* par le kétoconazole 10 µM induit une augmentation du courant de queue de HERG par 135 ± 38 %, alors que la dompéridone 50 nM lorsque perfusée après le tampon, diminue le courant de queue de HERG de 47±6 %. En contraste, la perfusion de kétoconazole 10 µM sous des conditions de blocage de HERG *a priori* par la dompéridone 50 nM induit une diminution plus importante du courant de queue de HERG de 81±2 %, alors que le kétoconazole 10 µM lorsque perfusée seule après le tampon, diminue le courant de HERG de 56±4 %. **Conclusion:** Cette étude mécanistique ne supporte pas le concept de potentialisation des effets des médicaments observés durant l'administration concomitante de deux bloqueurs d'I_{Kr} (HERG). De plus, l'ordre d'administration de deux ou plusieurs bloqueurs d'I_{Kr} ensemble, ainsi que les changements dans les concentrations de ces médicaments au niveau du site de fixation à I_{Kr}, semblent être des facteurs importants à considérer lors de l'évaluation du risque chez les patients de subir le LQTS médicamenteux.

2. Abstract

Background: Block of I_{Kr} causes lengthening of cardiac repolarization. This effect is of major concern for patient safety such that it warrants clinical attention during the combined administration of two QT prolonging drugs (I_{Kr} blockers). The objective of the present study was to assess prolongation of cardiac repolarization during the combined use of two I_{Kr} blockers when administered either concomitantly or sequentially. **Methods and Results:** 1) $MAPD_{90}$ was determined in isolated, buffer-perfused hearts from male guinea-pigs. Hearts (n=80) were exposed to I_{Kr} blockers – dofetilide (20 or 200 nM), NAPA (100 or 1000 μ M) or erythromycin (60 or 120 μ M) – alone or in combination (low and high concentrations). Our results demonstrated that $MAPD_{90}$ prolongation observed when drugs were combined was less than the summation of effects observed for each drug perfused alone either at low or high concentrations. In a second series of experiments, hearts (n=180) were perfused with buffer containing domperidone (5 or 50 nM) for 10 min followed by the addition of ketoconazole (10 or 100 μ M) or erythromycin (10 or 100 μ M) for another 10 min. The opposite sequence was also evaluated by perfusing ketoconazole (0.3, 1, 3 or 10 μ M) or erythromycin (10 μ M) first, followed by the addition of domperidone (50, 150 or 300 nM) or dofetilide (20 or 150 nM) to the buffer solution. Ketoconazole and erythromycin, when perfused first, antagonized $MAPD_{90}$ prolonging effects of domperidone. In contrast, ketoconazole and erythromycin were able to prolong $MAPD_{90}$ even though $MAPD_{90}$ was *a priori* prolonged by domperidone or dofetilide. 2) Patch-clamp experiments were performed with cells (n=61) taken from a *HERG*-transfected HEK293 stable cell line. Blocking of *HERG* was assessed in cells exposed to domperidone 50 nM and then domperidone 50

nM + ketoconazole 10 μ M or the opposite (ketoconazole 10 μ M and then ketoconazole 10 μ M + domperidone 50 nM). Perfusion of domperidone 50 nM under conditions of *a priori* block of HERG by ketoconazole 10 μ M causes an increase in HERG tail amplitude by $135\pm 38\%$, while domperidone 50 nM when perfused after buffer, decreases HERG tail amplitude by $47\pm 6\%$. In contrast, perfusion of ketoconazole 10 μ M under conditions of *a priori* block of HERG by domperidone 50 nM causes a greater decrease in HERG tail amplitude by $81\pm 2\%$, while ketoconazole 10 μ M when perfused alone after buffer, decreases HERG tail amplitude by $56\pm 4\%$. **Conclusion:** This mechanistic electrophysiological study does not support the concept that potentiation of drug effects is observed during the combined administration of two I_{Kr} (HERG) blockers. Furthermore, the order of administration of two or more I_{Kr} blockers together, as well as changes in drug concentration levels next to the effector binding site on I_{Kr} , needs to be taken into account when establishing risk of drug-induced LQTS in patients.

Key Words: HERG; Drug-induced long QT syndrome; Ketoconazole, Domperidone, Erythromycin, Dofetilide, NAPA, Potassium channel blockers; Monophasic action potential duration; Cardiac repolarization; Membrane transporters.

3. Introduction

Drug-induced long QT syndrome (LQTS) is a cardiac electrophysiological abnormality characterized by a prolonged QT interval on the surface ECG which may predispose patients to the polymorphic ventricular arrhythmia termed torsades de pointes (TdP) [1-3]. Clinicians have long been familiar with this severe adverse drug effect particularly in the context of antiarrhythmic drug therapy [4, 5]. However, and since the early nineties, several non-cardiovascular drugs with various primary pharmacological activities have been withdrawn from the market – or restrictly delivered – because of their “torsadogenic” effects [6]. These include terfenadine [7], astemizole [8], grepafloxacin [9], terodiline [10], droperidol [11], lidoflazine [12], sertindole [13], levomethadyl [14] and cisapride [15]. Today, more than 125 drugs currently available in the North American market have been associated with the drug-induced LQTS (<http://www.Torsades.org/>).

Except for a handful of them, it has been shown that most drugs known to prolong the QT interval are potent blockers of the delayed rectifier potassium current (I_K). I_K is the major outward current responsible for cardiac repolarization in humans. This current comprises rapidly (I_{Kr}) and slowly (I_{Ks}) activating components [16-19]. Class III antiarrhythmic agents such as N-acetylprocainamide (NAPA), *d*-sotalol, E-4031 and dofetilide [20-22] as well as many non-cardiovascular drugs (antihistamines, macrolide antibiotics, ...) [11, 15, 23-28] prolong action potential duration by selectively blocking I_{Kr} , whereas other drugs such as indapamide or triamterene block preferentially I_{Ks} [29].

Drug-induced LQTS is often observed under conditions of impaired drug elimination as it was first described for the drug-drug interaction between the histamine H1-antagonist terfenadine and the macrolide antibiotic erythromycin [30]. Indeed, these events were explained mostly through an inhibition of terfenadine CYP3A4-mediated metabolism by erythromycin (CYP3A4 inhibitor). Inhibition of CYP3As caused a major increase in terfenadine plasma concentrations leading to an increased block of I_{Kr} by terfenadine, prolongation of cardiac repolarization and ultimately TdP [31]. It is noteworthy that macrolide antibiotics (including erythromycin) and imidazole antifungals that often cause the impaired metabolism status on CYP3As are also potent I_{Kr} blockers [32-34]. Yet, the question arises whether the true mechanism of drug-induced LQTS under conditions of drug-drug interactions is explained only by a pharmacokinetic interaction or whether potentiation of drug effects (pharmacodynamic interaction) is also part of the explanation?

Our laboratory has established that the coadministration of I_{Kr} and I_{Ks} blockers leads to a potentiation of drug effects on the lengthening of cardiac repolarization [35]. We studied block of I_{Ks} by diuretic agents and subsequently demonstrated how they could potentiate QT-prolonging drug effects of dofetilide and NAPA (in isolated hearts) or sotalol (in whole animals) [29, 35-38]. This mechanism of potentiation of drug effects is easily understandable since I_{Kr} and I_{Ks} present different binding sites on different proteins. However, to our knowledge, the effects of the concomitant administration of two I_{Kr} blockers on QT prolongation independently from their metabolic drug-drug interactions have not yet been assessed. Moreover, many clinical cases of drug-induced TdP have been described when treatment with an I_{Kr} blocker is being initiated while a long term

treatment with another I_{Kr} blocker was already in place [7, 39, 40]. Yet, the importance of the order of administration of drugs on the lengthening of repolarization observed is still unknown.

With these concepts in mind, we investigated the modulation of cardiac repolarization lengthening during the administration of I_{Kr} blockers either alone or combined. Furthermore, we assessed the importance of the order of administration of two I_{Kr} blockers when administered sequentially. Our hypothesis was tested using buffer-perfused guinea pig hearts (monophasic action potential duration measured at 90% repolarization ($MAPD_{90}$)) and isolated cells using the whole-cell patch clamp technique; dofetilide, NAPA, erythromycin, ketoconazole, and domperidone were used as selective I_{Kr} blockers.

4. Methods

Experiments were performed in accordance with our institutional guidelines on animal research. Animals were housed and maintained in compliance with the *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* of the Canadian Council on Animal Care.

A- Drug preparation

Dofetilide (generously supplied by Pfizer Inc.) was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and then added to the buffer solution at a concentration of 20, 150 or 200 nM. Domperidone was dissolved in DMSO and added to the buffer solution at a final concentration of 5, 50, 150 and 300 nM. Ketoconazole was dissolved in methanol and then added to the buffer solution at a final concentration of 0.3, 1, 3 and 10 μ M. NAPA – (100 μ M or 1 mM) and erythromycin – (10, 60 or 120 μ M) containing buffer solutions were prepared by adding the required amount of the drug to a freshly prepared Krebs-Heinseleit solution. NAPA, erythromycin, domperidone and ketoconazole were purchased from Sigma-Aldrich.

B- Experiments with buffer-perfused isolated hearts

Heart Isolation and Perfusion Technique

Male Hartley guinea pigs (weight, 300 to 350 g; Charles River Laboratories, Montreal, Quebec, Canada) were anticoagulated by injection of heparin sodium (400 IU IP). Twenty minutes later, animals were killed by cervical dislocation, and their hearts were rapidly extirpated and immersed in cold (4°C) Krebs-Henseleit buffer containing (mM) glucose 11.2, KCl 4.7, CaCl₂ 1.2, NaHCO₃ 25, NaCl 118.5, MgSO₄ 2.5, and KH₂PO₄

1.2. This solution was continuously gassed with 95% oxygen plus 5% carbon dioxide (pH 7.4, 37°C). Each heart was cannulated and retrogradely perfused via the aorta with the Krebs- Henseleit buffer at a constant pressure equivalent to 100 cm H₂O. To permit rapid exchange in perfusion solutions, a double warming coil heart perfusion system (Harvard Apparatus, Inc., South Natick, MA) and two parallel liquid columns were used.

Electrophysiological Measurements

Hearts were electrically stimulated (EP-2, clinical stimulator, Digital Cardiovascular instruments inc.) at a basic cycle length of 250 msec (4 Hz) at three times threshold via two silver electrodes implanted in the epicardium of the right ventricle. A monophasic action potential catheter (Langendorff probe model 225, EP Technologies Inc) was introduced in the left ventricle through the mitral valve and securely positioned to obtain a visually adequate signal (amplitude > 5 mV, stable phase 4). During the protocol, monophasic action potential signals were continuously recorded and sampled at 2000 Hz. The output was analysed using the Notocord-hem version 3.5 software (Notocord Systems, Croissy sur Seine, France) for Windows 2000. Average action potential duration at 90% repolarization (APD₉₀) was calculated for each complex as the average duration from the potential beginning to 90% repolarization of the MAP measurements.

Protocols

1- Single and concomitant administration of two I_{Kr} blockers.

The effects of three potent I_{Kr} blockers, alone and combined in pair, were evaluated in this protocol. Hearts were perfused with Krebs-Henseleit buffer during a control period of 10 minutes. Thereafter, perfusion was performed for 10 minutes with buffer

containing [dofetilide (20 nM or 200 nM, n=8 per concentration)], [NAPA (100 μ M or 1 mM, n=8 per concentration)], [erythromycin (60 μ M or 120 μ M, n=8 per concentration)], [dofetilide + NAPA (20 nM + 100 μ M or 200 nM + 1 mM respectively, n=8 per concentration regimen)] or [dofetilide + erythromycin (20 nM + 60 μ M or 200 nM + 120 μ M respectively, n = 8 per concentration regimen)]. Perfusion with buffer containing no drug was then restarted during a 10 minute washout period to assess reversal of drug effects. To evaluate reverse frequency-dependent properties, monophasic action potential signals were recorded at various basic pacing cycles lengths (250, 200 and 150 msec).

2- Single and sequential administration of two I_{Kr} blockers.

First, the effects of four I_{Kr} blockers administered alone were tested. After a 10 min Krebs-Henseleit buffer-based perfusion, hearts were perfused with either [domperidone (5, 50, 150 or 300 nM, n=6 per concentration)], [ketoconazole (0.3, 1, 3, 10 and 100 μ M, n=6)], [erythromycin (10 or 120 μ M, n=6)] or [dofetilide (20 or 150 nM, n=6)]. Then, a washout period with the buffer alone was performed to assess reversibility of the effects.

Thereafter, the effects of erythromycin or ketoconazole respectively coadministered with domperidone were evaluated after a primary perfusion step with domperidone. This sequence intended to determine the effects obtained when a potent additional I_{Kr} blocker is administered on top of a previously administered I_{Kr} blocker. Hearts were perfused with Krebs-Henseleit buffer containing domperidone (5 or 50 nM, n=6 per concentration) during a period of 10 minutes. Then ketoconazole (10 or 100 μ M) or erythromycin (10 or 120 μ M) was added to the perfusion for 10 minutes. Perfusion with

the original domperidone-containing solution was then restarted during a 10 minute washout period to assess reversal of drug effects.

Finally, the opposite sequence was evaluated by perfusing ketoconazole (0.3, 1, 3 and 10 μM) or erythromycin (10 μM) first, followed by the addition of domperidone (50, 150 or 300 nM, n=6 per concentration) or dofetilide (20 or 150 nM, n=6 per concentration) to the buffer solution. After 10 min, buffer containing either ketoconazole or erythromycin was restarted.

Statistical analysis

For all protocols, only hearts with reversal of phase 2 drug effects on reperfusion with the buffer containing no drug or phase 1 drug respectively were included in the analysis. Data on the magnitude of drug effects vs. control were analyzed with a Student's paired t test. Drug effects at different concentrations were analysed with a Student's unpaired t test. Differences in MAPD_{90} prolongation were compared with an ANOVA test combined with a Bonferroni post-hoc test. All values are expressed as mean \pm SD. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

C- Patch-clamp experiments

HEK 293 cell preparation and electrophysiological measurements

HERG-transfected HEK293 cells were kindly donated by Dr Craig January (University of Wisconsin). The stably transfected cells were cultured in minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 μM non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G-418. Prior to electrophysiological studies the cells were harvested from the culture dish by trypsinization and transferred to a 0.5 mL

bath mounted on the stage of an inverted microscope (Axiovert 35, Zeiss). Cells were superfused with HEPES-buffered tyrode solution containing (in mM) 137 NaCl, 4 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 glucose and 10 HEPES (pH 7.4 with NaOH). Membrane currents were recorded in whole cell configuration using suction pipettes. The pipettes had a tip resistance of 1 to 3 MΩ. The internal pipette solution contained (in mM) 130 KCl, 1 CaCl₂, 2 MgCl₂, 11 EGTA, 5 MgATP, 5 KATP and 10 HEPES (pH 7.2 with KOH). An Axopatch-200A amplifier was used to generate voltage-clamp protocol, acquire data, and analyse voltage and current signals. All experiments were performed at room temperature (22–23°C).

Protocols

Effects of several I_{Kr} blockers on the HERG/I_{Kr} current were studied in cells clamped at holding potential of -80 mV. Depolarizing steps were applied for 1 sec to voltages between 50 and -50 mV in 10 mV increments. Cells were then repolarized at -40 mV for 1 sec, before they returned to the holding potential (-80 mV).

In a first set of experiments, domperidone (50 and 300 nM, n=5 per concentration) and ketoconazole 10 μM (n=5) effects on HERG/I_{Kr} current were assessed. Then, the effect of ketoconazole 10 μM was assessed when it was perfused after a 10 min perfusion with domperidone 50 or 300 nM (n=5 per concentration). Finally, HERG blocking effects of domperidone 50 and 300 nM were evaluated after a 10 min perfusion of ketoconazole 10 μM (n=5 per concentration).

Data storage and analysis

Currents were low-pass filtered at 1 kHz (4-pole Bessel filter; -3 dB/octave) and sampled at 2 kHz. Magnitude of domperidone effects for patch-clamp data were analysed with a Student paired t-test. A p value <0.05 was considered statistically significant. All values were expressed as mean \pm SD.

5. Results

Experiments with buffer-perfused isolated hearts

1- Single and concomitant administration of two I_{Kr} blockers.

Figure 1 illustrates prolongation of the $MAPD_{90}$ observed in hearts exposed to dofetilide (20 nM or 200 nM), NAPA (100 μ M or 1 mM), erythromycin (60 μ M or 120 μ M) or their combination at their respective IC_{50} for block of I_{Kr} and at a basic cycle length of 250 msec. Perfusion of hearts with dofetilide 20 nM caused an increase of 17.8 ± 1.6 msec in $MAPD_{90}$ ($p < 0.001$ vs. baseline), whereas use of 10 times higher concentrations of dofetilide (200 nM) caused an increase of 27.0 ± 3.3 msec in $MAPD_{90}$ ($p < 0.001$ vs. baseline and vs. dofetilide 20 nM). Mean increases in $MAPD_{90}$ during perfusion with NAPA 100 μ M was 15.7 ± 1.0 msec ($p < 0.001$ vs. baseline) compared to a 22.4 ± 1.9 msec increase observed with NAPA 1 mM ($p < 0.001$ vs. baseline and vs. NAPA 100 μ M). Erythromycin 60 μ M increased the $MAPD_{90}$ by 16.4 ± 3.6 msec ($p < 0.001$ vs. baseline) while a 2 times higher concentration caused a 23.7 ± 3.9 msec increase ($p < 0.001$ vs. baseline, $p < 0.01$ vs. erythromycin 60 μ M). Perfusion of dofetilide 20 nM + NAPA 100 μ M increased the $MAPD_{90}$ by 24.3 ± 2.9 msec ($p < 0.001$ vs. baseline) while 10 times higher concentrations of both drugs increased $MAPD_{90}$ only by 26.4 ± 4.4 msec ($p < 0.001$ vs. baseline; $p = NS$ vs. dofetilide 20 nM + NAPA 100 μ M). Combination of dofetilide 20 nM + erythromycin 60 μ M increased the $MAPD_{90}$ by 25.1 ± 3.8 msec ($p < 0.001$ vs. baseline) while 10 times and 2 times higher concentrations respectively induced a 30.0 ± 5.3 msec prolongation of $MAPD_{90}$ ($p < 0.001$ vs. baseline; $p = NS$ vs. dofetilide 20 nM + erythromycin 60 μ M). This indicates that $MAPD_{90}$ augmentation

reaches a certain plateau when concentration of I_{Kr} blockers is increased. Furthermore, at low concentrations (20 nM and 100 μ M respectively), the combination of dofetilide and NAPA induced a mean increase of 24.3 ± 2.9 msec in $MAPD_{90}$ which is much less than the summation of the effect observed with each drug perfused separately ($17.8 + 15.7 = 33.5$ msec). Similarly, the combination of high concentrations of dofetilide and NAPA increased the $MAPD_{90}$ by less than the addition of the effect of each drug alone (26.4 msec vs. $27.0 + 22.3 = 49.3$ msec respectively). Similar effects were observed with the combination of dofetilide and erythromycin at both concentrations, indicating that a partial additive effect, not potentiation, is observed during concomitant administration of two I_{Kr} blockers.

At basic pacing cycles of 200 msec and 150 msec, $MAPD_{90}$ was significantly shorter than during the slower pacing rate (250 msec) during all steps of the protocol. Indeed, as shown in figure 2, $MAPD_{90}$ prolongation was less important at a short cycle length ($p < 0.001$ at 250 msec vs. 200 msec vs. 150 msec for all tested drugs), confirming the reverse rate-dependence characteristic of I_{Kr} blockers. Qualitatively, similar partial additive effects as those described for BCL 250 were observed at BCL 200 and 150 msec.

2- Single and sequential administration of two I_{Kr} blockers.

In this protocol, measurements of $MAPD_{90}$ were performed in a series of experiments at a basic pacing cycle length of 250 msec. Table 1 summarizes $MAPD_{90}$ prolongation (in msec) observed after administration of the drug alone and after the sequential administration of two I_{Kr} blockers.

Figure 3A illustrates the effects of ketoconazole 10 and 100 μM after perfusion with buffer, domperidone 5 and 50 nM. Ketoconazole 10 and 100 μM induced an MAPD_{90} prolongation of 10.0 ± 1.0 and 19.5 ± 1.5 msec respectively when they were preceded with buffer perfusion. The magnitude of MAPD_{90} prolongation induced by ketoconazole 10 and 100 μM remains unaltered when domperidone 5 or 50 nM were perfused first (12.3 ± 0.7 and 19.2 ± 1.6 msec for domperidone 5 nM pre-perfusion, versus 12.7 ± 1.3 and 19.0 ± 1.7 msec for domperidone 50 nM pre-perfusion respectively, $p < 0.05$).

In contrast, Figure 3B illustrates the effects of domperidone 50, 150 and 300 nM after perfusion with buffer, ketoconazole 0.3, 1, 3 and 10 μM . Domperidone 50 nM prolonged the MAPD_{90} by 12.5 ± 1.2 msec when it was preceded with buffer perfusion containing no drug comparatively to 10.6 ± 0.3 and 10.7 ± 2.0 msec when preceded with ketoconazole 1 and 10 μM ($p < 0.05$). Similarly, domperidone 150 nM prolonged MAPD_{90} by 17.2 ± 0.9 msec when perfused after buffer containing no drug compared to 12.2 ± 0.4 and 10.6 ± 1.2 msec when it was perfused after ketoconazole 1 and 10 μM respectively ($p > 0.001$ vs buffer pre-perfusion). Domperidone 300 nM prolonged MAPD_{90} by 22.2 ± 1.1 msec when it was preceded with buffer containing no drug. This prolongation was significantly decreased when domperidone 300 nM was preceded with ketoconazole 10 μM (11.8 ± 1.1 msec, $p > 0.001$), ketoconazole 3 μM (11.7 ± 0.7 msec, $p > 0.001$), 1 μM (17.4 ± 0.5 msec, $p > 0.001$), and as low as 0.3 μM (19.5 ± 0.5 msec, $p > 0.01$). It is noteworthy to mention that the lowest ketoconazole concentration studied (0.3 μM) does not cause any significant prolongation of MAPD_{90} when perfused alone.

Similarly to Figures 3A and 3B, Figures 4A and 4B describe the effects observed after the sequential administration of erythromycin and domperidone. Domperidone, when administered first, does not antagonize erythromycin effects on repolarization (Figure 4A). However, erythromycin (like ketoconazole), when administered first, antagonizes domperidone effects on repolarization (Figure 4B).

To further evaluate the potential antagonism induced by ketoconazole, we perfused ketoconazole 10 μ M before adding dofetilide 20 or 150 nM. Similarly to results observed with domperidone, MAPD₉₀ prolongation induced by dofetilide was significantly decreased when ketoconazole was perfused first compared to a buffer perfusion (data shown in table 1).

C- Patch-clamp experiments

Patch-clamp experiments in HEK293 cells stably transfected with HERG/I_{Kr} were performed to assess the action potential-prolonging effects of the sequential administration of two I_{Kr} blockers (domperidone and ketoconazole). Table 2 summarizes results of I_{Kr} blockade (%) observed during the exposure to each I_{Kr} blocker alone or combined, i.e. ketoconazole and domperidone.

Figure 5A shows activating and tail currents of I_{Kr} elicited in HEK293 cells perfused under control conditions, after 10 minutes of domperidone 50 nM and after 10 minutes of washout. Domperidone 50 nM caused a $46.6 \pm 5.9\%$ reduction in the tail current (n=5). Fig. 6B shows activating and tail currents of I_{Kr} elicited in HEK293 cells perfused with ketoconazole 10 μ M, after 10 minutes of domperidone 50 nM + ketoconazole 10 μ M and after 10 minutes of ketoconazole 10 μ M as a washout. Contrary to the inhibitory

effect observed previously with domperidone 50 nM alone, domperidone 50 nM increased tail amplitude by $135.3 \pm 37.9\%$ ($n = 5$, $p < 0.001$ vs domperidone 50 nM alone) when cells were exposed to ketoconazole first.

On the other hand, when domperidone was perfused first, modulation of ketoconazole effects on HERG block were observed. Indeed, ketoconazole 10 μM caused a $55.9 \pm 3.8\%$ reduction in the tail current ($n = 5$) when it was perfused alone (Table 2). When preceded with domperidone 50 or 300 nM, ketoconazole 10 μM reduced HERG current by 81.1 ± 2.0 or $35.5 \pm 12.0\%$ respectively ($n = 5$, $p < 0.01$ vs ketoconazole 10 μM alone).

6. Discussion

Results obtained in this study indicate that the concomitant administration of two I_{Kr} blockers – either “classical” class III antiarrhythmic agents (such as dofetilide and NAPA) or non-cardiovascular drugs (such as domperidone, erythromycin or ketoconazole) – in isolated guinea pig hearts leads to a partial additive effect, not to a synergism. Furthermore, we demonstrated that the order of administration of two I_{Kr} blockers modulates the magnitude of effects observed on cardiac repolarization. Indeed, when ketoconazole or erythromycin are perfused first in isolated guinea pig hearts, they antagonize the prolonging effect of domperidone or dofetilide. Yet, this antagonism is not observed when domperidone is perfused first, indicating that not all I_{Kr} blockers can induce antagonism on other I_{Kr} blockers when they are perfused first. Patch clamp experiments confirmed that HERG block is sensitive to the order of perfusion/administration of drugs.

Concomitant administration of two I_{Kr} blockers

In the first part of the study, combined perfusion of dofetilide and NAPA at their respective IC_{50} for block of I_{Kr} caused a significantly greater increase in $MAPD_{90}$ than did the perfusion of either drug alone; however, the magnitude of drug effects was less than that estimated by the summation of effects observed during the perfusion of each drug alone. Furthermore, we aimed to evaluate the effects of combined perfusion of drugs at 10-fold their respective IC_{50} for block of I_{Kr} . Concomitant perfusion of dofetilide and NAPA at a concentration 10 times higher led to no more significant increase in $MAPD_{90}$ compared to the lowest concentrations. Following the same

protocol as previously described, dofetilide and erythromycin showed comparable results as those observed with dofetilide and NAPA.

Previous clinical observations have indicated that the combined administration of two or more I_{Kr} blockers was dangerous, without indicating the extent of potentiation that could be observed [2, 41]. In agreement with our results, Rubart et al. have shown that a pretreatment of erythromycin in dog Purkinje fibers and papillary muscles antagonizes the lengthening of APD observed with dofetilide [42]. Our study clearly shows that the combination of two I_{Kr} blockers does not lead to any potentiation of effects, but only to a partial additive effect. Unlike most ion channels, HERG binds several compounds of widely differing structures [43, 44], mainly into one intracellular site. It has been shown that block of HERG is made possible by a binding at the level of two unique hydrophobic residues that are Phe 652 and Tyr 656. These residues are situated intracellularly in the sixth transmembrane spanning domain [45]. Two exceptions to this block are observed with fluvoxamine (sites of interaction not identified yet [46]) and ERG toxins (extracellular sites of interaction [47]).

As a basic principle in agonist/antagonist binding to a receptor, it is well known that most drugs interact with specific receptors by precise physico-chemical and steric interactions between specific chemical moieties of the drug. When two drugs with various affinities for binding to the same receptor are exposed simultaneously to their receptor, antagonism develops. The affinity and concentration of each drug at the site of binding is the key determinant of this competition. In addition, a group of receptors expressed in a cell membrane can be saturated by a certain concentration of one or more drugs applied together, and this depending mainly on the number of receptors expressed. These concepts are clearly applicable to the binding site of HERG by I_{Kr} blockers. By

homology, when two I_{Kr} blockers are co-perfused simultaneously, a competition is expected and the drug with the highest affinity to HERG is binded. Furthermore, with a certain drug concentration, the I_{Kr} receptors are saturated leading to a plateau effect. This was observed when we augmented by 10-times the concentration of dofetilide or NAPA and by 2-times that of erythromycin. A recent publication by Margulis *et al.* evaluated the effect of simultaneous application of two I_{Kr} blockers on HERG current amplitude in patch clamp [48]. The I_{Kr} blockers selected in their study were chosen depending on their binding sites and classified in three categories: 1) cisapride and quinidine (with similar sites), 2) cisapride and fluvoxamine (with possibly dissimilar sites) and 3) cisapride and BeKm-1 (with clearly distinct sites). Compared to our results conducted *ex vivo*, the authors concluded that no synergism was observed in the three categories, and that there was a trend towards a partial additive effect [48].

Rate-dependent changes in MAPD₉₀

Class III antiarrhythmic drugs prolong action potential duration preferentially at slow heart rates. This rate-dependent effect is called reverse use-dependence [49]. We confirmed this effect with non-cardiovascular I_{Kr} blockers, and during the coadministration of two I_{Kr} blockers. Reverse-use dependence was observed with dofetilide, NAPA, erythromycin, dofetilide + NAPA and dofetilide + erythromycin. It has been suggested that reverse-use dependence could result from a nearly constant block of I_{Kr} if other repolarizing potassium currents, like I_{Ks} , increase in magnitude and thus lessen the impact of I_{Kr} block at fast heart rates.

Sequential administration of two I_{Kr} blockers

In the second part of our study, our objective was to evaluate the effects of I_{Kr} blockers when they are perfused after a previous I_{Kr} block, excluding any metabolic interaction between the two drugs. This experimental model is frequently observed in clinical situations, especially when patients treated chronically with a certain drug possessing I_{Kr} blocking properties are being administered with another I_{Kr} blocker [7, 39, 40]. Yet, our model is mechanistically interesting because it excludes any intestinal or hepatic metabolic interaction that can be observed in clinical situations; this lead to a better focus on the pharmacodynamic interaction observed *in situ*. When ketoconazole (or erythromycin) is perfused after several increasing concentrations of domperidone, no significant antagonism mediated by domperidone is observed on I_{Kr} block. This is coherent with our previous results concluding that dual I_{Kr} block does not lead to a potentiation but to a competition and results in a partial additive effect until saturation of the receptors. Furthermore, we assessed the reverse situation by perfusing ketoconazole at clinical concentrations in the first phase, followed by an addition of domperidone at different concentrations. When we augmented domperidone concentrations, no further increase in the $MAPD_{90}$ was observed when hearts are pre-perfused with ketoconazole, compared to pre-perfused with buffer containing no drug. We even assessed a very low concentration of ketoconazole (0.3 μM), which doesn't have any effect on repolarization by itself, and yet ketoconazole was still able to antagonize the prolonging effect of domperidone. The same effects were observed when erythromycin was perfused before domperidone and not vice-versa.

Following these experiments, we aimed to assess whether the previously observed effects were characteristic of domperidone, or if they could be reproduced with other I_{Kr}

blockers. Therefore, we evaluated the effects of dofetilide (as a pure I_{Kr}) after perfusion of ketoconazole. And similarly to domperidone, dofetilide effects were antagonized by the pre-perfusion of ketoconazole.

Several hypothetical mechanisms could be proposed to explain this antagonism phenomenon when ketoconazole (or erythromycin) is perfused first. Indeed, ketoconazole and erythromycin are large molecules that can create steric barrier to other smaller molecules like domperidone, and restrict their access to the binding site on I_{Kr} . A second hypothesis is that ketoconazole or erythromycin are potential inhibitors of influx transporters expressed at the membrane surface of cardiomyocytes. These influx transporters, like many solute carrier transporters (SLC), are known to be expressed in the heart and can play a major role in modulating the intracellular concentration of their substrates [50-52]. Keeping in mind that the binding site on I_{Kr} is intracellular, domperidone (and dofetilide) needs to enter the cardiomyocyte to block I_{Kr} . Therefore, domperidone transport would be inhibited by ketoconazole or erythromycin, this leading to a decrease in the intracellular concentration of domperidone and a decrease in the block of I_{Kr} . Yet, more studies need to be accomplished in order to evaluate the possibility of this mechanism by clearly identifying which membrane transporters are expressed in cardiomyocytes, and what are their specific substrates.

To further elucidate the potential mechanisms involved, we evaluated the ketoconazole-domperidone like effects in HERG-stably transfected HEK293 cells with the patch-clamp technique. Results showed that domperidone, when perfused first, slightly but significantly increases the inhibitory effects of ketoconazole on HERG/ I_{Kr} (from ~ 56%

inhibition with ketoconazole alone to ~ 81% when ketoconazole is preceded by domperidone). More interestingly, when ketoconazole was perfused first and domperidone 50 nM added afterward, the latter increases the amplitude of HERG current by an average of 135%; in comparison, this current was inhibited (not increased) by 47% when domperidone 50 nM was perfused alone. These results clearly show that the order of perfusion of two I_{Kr} blockers is a determining factor in protecting or aggravating the toxic effects of these drugs.

Clinical implications

The observed partial additive effects on the prolongation of action potential during the combined administration of two I_{Kr} blockers supports to a certain limit the clinical recommendations suggesting to avoid the administration of more than one drug known to prolong the QT interval at the same time. However, our results clearly suggest that major pharmacokinetic interactions associated with the inhibition of specific metabolic pathways such as those mediated by CYP3As are of greatest clinical relevance. The resulting increase in plasma levels of one I_{Kr} blocker appears to explain most of the QT prolongation observed under these clinical situations.

Moreover, the order of administration seems to be an important factor to be considered when administering two I_{Kr} blockers. Yet, many studies need to be elaborated before obtaining tools to understand and predict which I_{Kr} blocker can be dangerous when preceding another specific I_{Kr} blocker.

7. Conclusion

Simultaneous perfusion with two I_{Kr} blockers leads to a partial additive effect, not to a synergistic effect, such as widely believed. Therefore, results in this study only partially support the hypothesis that the coadministration of two I_{Kr} blockers with different metabolic pathways should be clinically avoided. Moreover, the order of a sequential administration of two I_{Kr} blockers is an important factor to consider when treating with drugs known to prolong cardiac repolarization. Indeed, not all I_{Kr} blockers interact identically whether they are perfused before or after another I_{Kr} blocker.

8. References

1. Fenichel, R.R., et al., *Drug-induced torsades de pointes and implications for drug development*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2004. **15**(4): p. 475-95.
2. Roden, D.M., *Drug-induced prolongation of the QT interval*. N Engl J Med, 2004. **350**(10): p. 1013-22.
3. Viskin, S., *Long QT syndromes and torsade de pointes*. Lancet, 1999. **354**(9190): p. 1625-33.
4. Selzer, A. and H.W. Wray, *Quinidine Syncope. Paroxysmal Ventricular Fibrillation Occurring During Treatment Of Chronic Atrial Arrhythmias*. Circulation, 1964. **30**: p. 17-26.
5. Hohnloser, S.H. and B.N. Singh, *Proarrhythmia with class III antiarrhythmic drugs: definition, electrophysiologic mechanisms, incidence, predisposing factors, and clinical implications*. J Cardiovasc Electrophysiol, 1995. **6**(10 Pt 2): p. 920-36.
6. Lasser, K.E., et al., *Timing of new black box warnings and withdrawals for prescription medications*. Jama, 2002. **287**(17): p. 2215-20.
7. Monahan, B.P., et al., *Torsades de pointes occurring in association with terfenadine use*. Jama, 1990. **264**(21): p. 2788-90.
8. Bishop, R.O. and P.L. Gaudry, *Prolonged Q-T interval following astemizole overdose*. Arch Emerg Med, 1989. **6**(1): p. 63-5.
9. Stahlmann, R. and H. Lode, *Toxicity of quinolones*. Drugs, 1999. **58 Suppl 2**: p. 37-42.

10. Connolly, M.J., et al., *Torsades de pointes ventricular tachycardia and terodiline*. Lancet, 1991. **338**(8763): p. 344-5.
11. Drolet, B., et al., *Droperidol lengthens cardiac repolarization due to block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current*. J Cardiovasc Electrophysiol, 1999. **10**(12): p. 1597-604.
12. Ridley, J.M., et al., *Lidoflazine is a high affinity blocker of the HERG K(+)channel*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **36**(5): p. 701-5.
13. Eckardt, L., G. Breithardt, and W. Haverkamp, *Electrophysiologic characterization of the antipsychotic drug sertindole in a rabbit heart model of torsade de pointes: low torsadogenic potential despite QT prolongation*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **300**(1): p. 64-71.
14. Deamer, R.L., et al., *Torsades de pointes associated with high dose levomethadyl acetate (ORLAAM)*. J Addict Dis, 2001. **20**(4): p. 7-14.
15. Drolet, B., et al., *Block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current by the prokinetic agent cisapride underlies drug-related lengthening of the QT interval*. Circulation, 1998. **97**(2): p. 204-10.
16. Carmeliet, E., *K⁺ channels and control of ventricular repolarization in the heart*. Fundam Clin Pharmacol, 1993. **7**(1): p. 19-28.
17. Horie, M., S. Hayashi, and C. Kawai, *Two types of delayed rectifying K⁺ channels in atrial cells of guinea pig heart*. Jpn J Physiol, 1990. **40**(4): p. 479-90.
18. Sanguinetti, M.C. and N.K. Jurkiewicz, *Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents*. J Gen Physiol, 1990. **96**(1): p. 195-215.

19. Chinn, K., *Two delayed rectifiers in guinea pig ventricular myocytes distinguished by tail current kinetics*. J Pharmacol Exp Ther, 1993. **264**(2): p. 553-60.
20. Weerapura, M., T.E. Hebert, and S. Nattel, *Dofetilide block involves interactions with open and inactivated states of HERG channels*. Pflugers Arch, 2002. **443**(4): p. 520-31.
21. Falk, R.H. and J.M. Decara, *Dofetilide: a new pure class III antiarrhythmic agent*. Am Heart J, 2000. **140**(5): p. 697-706.
22. Gillis, A.M., *Effects of antiarrhythmic drugs on QT interval dispersion--relationship to antiarrhythmic action and proarrhythmia*. Prog Cardiovasc Dis, 2000. **42**(5): p. 385-96.
23. Drolet, B., et al., *Risperidone prolongs cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current*. J Cardiovasc Pharmacol, 2003. **41**(6): p. 934-7.
24. Drolet, B., et al., *Pimozide (Orap) prolongs cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current in native cardiac myocytes*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2001. **6**(3): p. 255-60.
25. Drolet, B., et al., *Domperidone should not be considered a no-risk alternative to cisapride in the treatment of gastrointestinal motility disorders*. Circulation, 2000. **102**(16): p. 1883-5.
26. Geelen, P., et al., *Sildenafil (Viagra) prolongs cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current*. Circulation, 2000. **102**(3): p. 275-7.

27. Drolet, B., et al., *Thioridazine lengthens repolarization of cardiac ventricular myocytes by blocking the delayed rectifier potassium current*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **288**(3): p. 1261-8.
28. Khalifa, M., et al., *Block of potassium currents in guinea pig ventricular myocytes and lengthening of cardiac repolarization in man by the histamine H1 receptor antagonist diphenhydramine*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **288**(2): p. 858-65.
29. Turgeon, J., et al., *Block of IKs, the slow component of the delayed rectifier K⁺ current, by the diuretic agent indapamide in guinea pig myocytes*. Circ Res, 1994. **75**(5): p. 879-86.
30. Honig, P.K., et al., *Changes in the pharmacokinetics and electrocardiographic pharmacodynamics of terfenadine with concomitant administration of erythromycin*. Clin Pharmacol Ther, 1992. **52**(3): p. 231-8.
31. Woosley, R.L., et al., *Mechanism of the cardiotoxic actions of terfenadine*. Jama, 1993. **269**(12): p. 1532-6.
32. Owens, R.C., Jr., *QT prolongation with antimicrobial agents: understanding the significance*. Drugs, 2004. **64**(10): p. 1091-124.
33. Daleau, P., et al., *Erythromycin blocks the rapid component of the delayed rectifier potassium current and lengthens repolarization of guinea pig ventricular myocytes*. Circulation, 1995. **91**(12): p. 3010-6.
34. Dumaine, R., M.L. Roy, and A.M. Brown, *Blockade of HERG and Kv1.5 by ketoconazole*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. **286**(2): p. 727-35.
35. Geelen, P., et al., *Concomitant Block of the Rapid (I(Kr)) and Slow (I(Ks)) Components of the Delayed Rectifier Potassium Current is Associated With*

- Additional Drug Effects on Lengthening of Cardiac Repolarization.* J Cardiovasc Pharmacol Ther, 1999. **4**(3): p. 143-150.
36. Fiset, C., et al., *Block of I_{Ks} by the diuretic agent indapamide modulates cardiac electrophysiological effects of the class III antiarrhythmic drug dl-sotalol.* J Pharmacol Exp Ther, 1997. **283**(1): p. 148-56.
37. Turgeon, J., et al., *Influence of indapamide and chlorthalidone on reperfusion-induced ventricular fibrillation in isolated guinea pig hearts.* J Cardiovasc Pharmacol, 1995. **26**(4): p. 518-23.
38. Daleau, P. and J. Turgeon, *Triamterene inhibits the delayed rectifier potassium current (I_K) in guinea pig ventricular myocytes.* Circ Res, 1994. **74**(6): p. 1114-20.
39. Fournier, P., G. Pacouret, and B. Charbonnier, *[A new cause of torsades de pointes: combination of terfenadine and troleandomycin].* Ann Cardiol Angeiol (Paris), 1993. **42**(5): p. 249-52.
40. Feroze, H., R. Suri, and D.I. Silverman, *Torsades de pointes from terfenadine and sotalol given in combination.* Pacing Clin Electrophysiol, 1996. **19**(10): p. 1519-21.
41. Yap, Y.G. and A.J. Camm, *Drug induced QT prolongation and torsades de pointes.* Heart, 2003. **89**(11): p. 1363-72.
42. Rubart, M., et al., *Electrophysiological mechanisms in a canine model of erythromycin-associated long QT syndrome.* Circulation, 1993. **88**(4 Pt 1): p. 1832-44.

43. De Ponti, F., et al., *Safety of non-antiarrhythmic drugs that prolong the QT interval or induce torsade de pointes: an overview*. Drug Saf, 2002. **25**(4): p. 263-86.
44. De Ponti, F., E. Poluzzi, and N. Montanaro, *QT-interval prolongation by non-cardiac drugs: lessons to be learned from recent experience*. Eur J Clin Pharmacol, 2000. **56**(1): p. 1-18.
45. Sanguinetti, M.C. and J.S. Mitcheson, *Predicting drug-hERG channel interactions that cause acquired long QT syndrome*. Trends Pharmacol Sci, 2005. **26**(3): p. 119-24.
46. Milnes, J.T., et al., *Blockade of HERG potassium currents by fluvoxamine: incomplete attenuation by S6 mutations at F656 or Y652*. Br J Pharmacol, 2003. **139**(5): p. 887-98.
47. Korolkova, Y.V., G.N. Tseng, and E.V. Grishin, *Unique interaction of scorpion toxins with the hERG channel*. J Mol Recognit, 2004. **17**(3): p. 209-17.
48. Margulis, M. and S. Sorota, *Additive effects of combined application of multiple hERG blockers*. J Cardiovasc Pharmacol, 2008. **Epub ahead of print**.
49. Hondeghem, L.M. and D.J. Snyders, *Class III antiarrhythmic agents have a lot of potential but a long way to go. Reduced effectiveness and dangers of reverse use dependence*. Circulation, 1990. **81**(2): p. 686-90.
50. Grube, M., et al., *Uptake of cardiovascular drugs into the human heart: expression, regulation, and function of the carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5)*. Circulation, 2006. **113**(8): p. 1114-22.
51. Koepsell, H., B.M. Schmitt, and V. Gorboulev, *Organic cation transporters*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2003. **150**: p. 36-90.

52. Jonker, J.W. and A.H. Schinkel, *Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3)*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004. **308**(1): p. 2-9.

9. Table Legends

Table 1. Summary of the extent of MAPD₉₀ prolongation observed from different protocols of drug perfusion. Phase 1 consists of a 10 min perfusion with Kerbs Henseleit buffer or an I_{Kr} blocker. Phase 2 consists of adding an I_{Kr} blocker (in bold in Phase 2 column) to the I_{Kr} blocker (or buffer) already present in phase 1. Phase 3 is a return to the perfusion solution used in phase 1.

Table 2. Extent of I_{Kr} blockade (%) observed with different drug perfusion in HEK293-stably transfected HERG cells. Drugs were perfused either alone or combined in a sequence

Table 1

Phase 1	Phase 2	Phase 3	N	MAPD₉₀ prolongation: Phase 2 – Phase 1 (msec)	SEM
Buffer	Ketoconazole 10 µM	Buffer	6	10.00	0.97
Domperidone 5 nM	Ketoconazole 10 µM	Domperidone 5 nM	6	12.33	0.73
Domperidone 50 nM	Ketoconazole 10 µM	Domperidone 50 nM	6	12.67	1.33
Buffer	Ketoconazole 100 µM	Buffer	6	19.50	1.50
Domperidone 5 nM	Ketoconazole 100 µM	Domperidone 5 nM	6	19.17	1.59
Domperidone 50 nM	Ketoconazole 100 µM	Domperidone 50 nM	6	19.00	1.73
Buffer	Domperidone 50 nM	Buffer	6	12.50	1.19
Ketoconazole 1 µM	Domperidone 50 nM	Ketoconazole 1 µM	6	10.67	0.33
Ketoconazole 10 µM	Domperidone 50 nM	Ketoconazole 10 µM	6	10.67	2.01
Erythromycin 10 µM	Domperidone 50 nM	Erythromycin 10 µM	6	9.83	0.51
Buffer	Domperidone 150 nM	Buffer	6	17.20	0.86
Ketoconazole 1 µM	Domperidone 150 nM	Ketoconazole 1 µM	6	12.17	0.44
Ketoconazole 10 µM	Domperidone 150 nM	Ketoconazole 10 µM	6	10.60	1.17
Erythromycin 10 µM	Domperidone 150 nM	Erythromycin 10 µM	6	12.88	1.23
Buffer	Domperidone 300 nM	Buffer	6	22.20	1.07
Ketoconazole 0.3 µM	Domperidone 300 nM	Ketoconazole 0.3 µM	6	19.50	0.50
Ketoconazole 1 µM	Domperidone 300 nM	Ketoconazole 1 µM	6	17.38	0.47
Ketoconazole 3 µM	Domperidone 300 nM	Ketoconazole 3 µM	6	11.67	0.67
Ketoconazole 10 µM	Domperidone 300 nM	Ketoconazole 10 µM	6	11.83	1.08
Erythromycin 10 µM	Domperidone 300 nM	Erythromycin 10 µM	6	14.20	0.58
Buffer	Erythromycin 10 µM	Buffer	6	10.33	0.76
Domperidone 5 nM	Erythromycin 10 µM	Domperidone 5 nM	6	10.00	0.58
Domperidone 50 nM	Erythromycin 10 µM	Domperidone 50 nM	6	9.67	0.33
Buffer	Erythromycin 120 µM	Buffer	6	21.33	1.20
Domperidone 5 nM	Erythromycin 120 µM	Domperidone 5 nM	6	18.50	2.25
Domperidone 50 nM	Erythromycin 120 µM	Domperidone 50 nM	6	20.33	0.33
Buffer	Dofetilide 20 nM	Buffer	6	18.00	0.77
Ketoconazole 10 µM	Dofetilide 20 nM	Ketoconazole 10 µM	6	9.67	1.76
Buffer	Dofetilide 150 nM	Buffer	6	23.50	0.50
Ketoconazole 10 µM	Dofetilide 150 nM	Ketoconazole 10 µM	6	12.17	0.60

Table 2

Phase 1	Phase 2	Phase 3	N	I_{Kr} blockade: Phase 2 – Phase 1 (%)	SEM
Buffer	Domperidone 50nM	Buffer	5	-46.60%	5.93%
Buffer	Domperidone 300nM	Buffer	5	-83.40%	1.21%
Buffer	Ketoconazole 10μM	Buffer	5	-55.94%	3.80%
Domperidone 50nM	+ Ketoconazole 10μM	Domperidone 50nM	5	-81.06%	2.04%
Domperidone 300nM	+ Ketoconazole 10μM	Domperidone 300nM	5	-35.53%	11.98%
Ketoconazole 10μM	+ Domperidone 50nM	Ketoconazole 10μM	12	135.28%	37.87%
Ketoconazole 10μM	+ Domperidone 300nM	Ketoconazole 10μM	12	-48.13%	7.72%
Buffer	Domperidone 50nM + Ketoconazole 10μM	Buffer	12	-83.45%	2.31%

10. Figure Legends

Figure 1. MAPD₉₀ prolongation observed after hearts perfusion of [dofetilide 20 and 200 nM], [NAPA 100 μM and 1 mM], [erythromycin 60 μM and 120 μM], [dofetilide + NAPA (20 nM + 100 μM and 200 nM + 1 mM respectively)] and [dofetilide + erythromycin (20 nM + 60 μM and 200 nM + 120 μM respectively)] (n = 8 per concentration).

Figure 2. Panels A and B illustrate changes in MAPD₉₀ at different pacing cycle lengths (250, 200 and 150 msec) in hearts perfused with dofetilide, NAPA, erythromycin, dofetilide + NAPA and dofetilide + erythromycin at different concentrations (n = 8 per concentration).

Figure 3. Panel A shows changes in MAPD₉₀ observed in hearts perfused with buffer, domperidone 5 or 50 nM followed respectively by an addition of ketoconazole 10 or 100 μM. Panel B shows changes in MAPD₉₀ observed in hearts perfused with buffer, ketoconazole 0.3, 1, 3 or 10 μM followed respectively by an addition of domperidone 50, 150 or 300 nM (n = 6 per group, **: p<0.01; ***: p<0.001 vs after Krebs henseleit buffer).

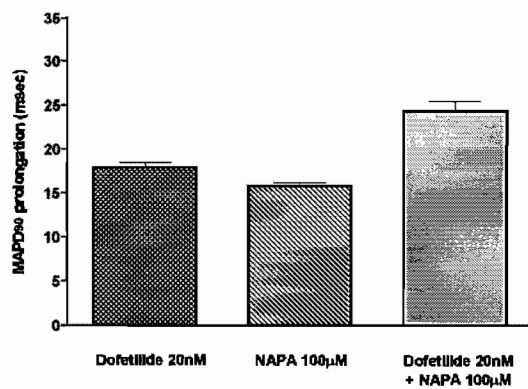
Figure 4. Panel A shows changes in MAPD₉₀ observed in hearts perfused with buffer, domperidone 5 or 50 nM followed respectively by an addition of erythromycin 10 or 120 μM. Panel B shows changes in MAPD₉₀ observed in hearts perfused with buffer, or

erythromycin 10 μ M followed respectively by an addition of domperidone 50, 150 or 300 nM (n=6 per group, **: p<0.01; ***: p<0.001 vs after Krebs henseleit buffer).

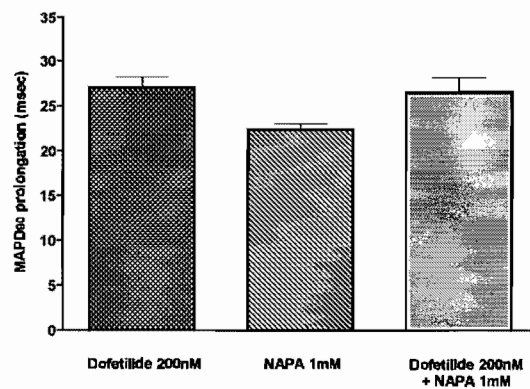
Figure 5. HERG outward and tail currents are shown, elicited by a 4 sec step to + 20 mV in HEK293^{HERG+} control cells (Panel A) and HEK293^{HERG+} cells perfused with ketoconazole 10 μ M (Panel B) under control conditions and in the presence of domperidone 50 nM.

Figure 1

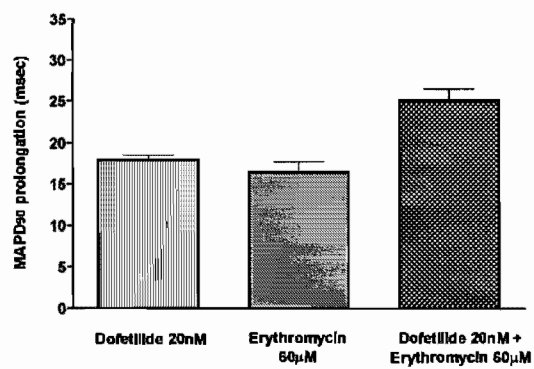
A



B



C



D

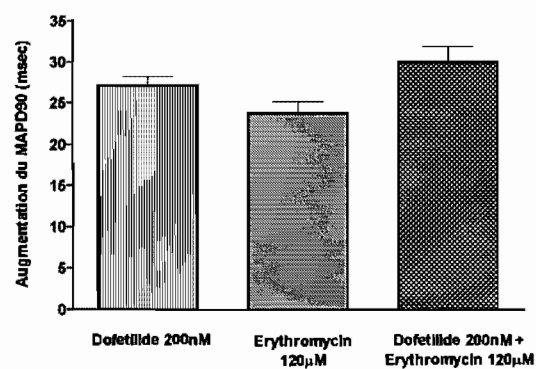
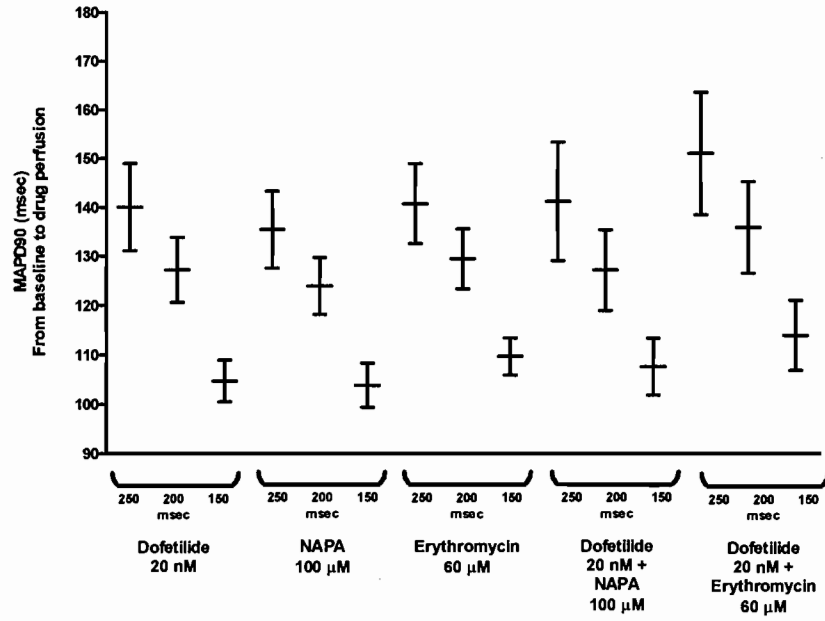


Figure 2

A



B

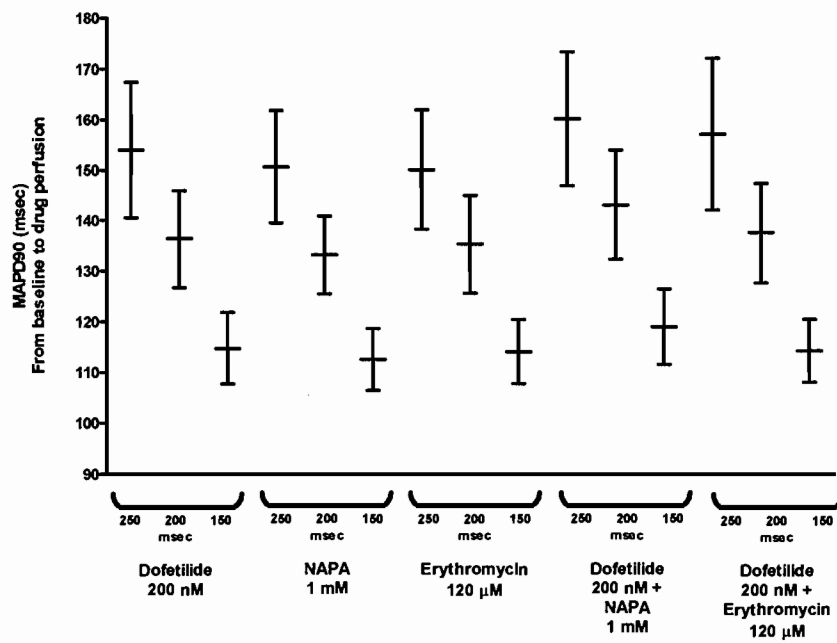
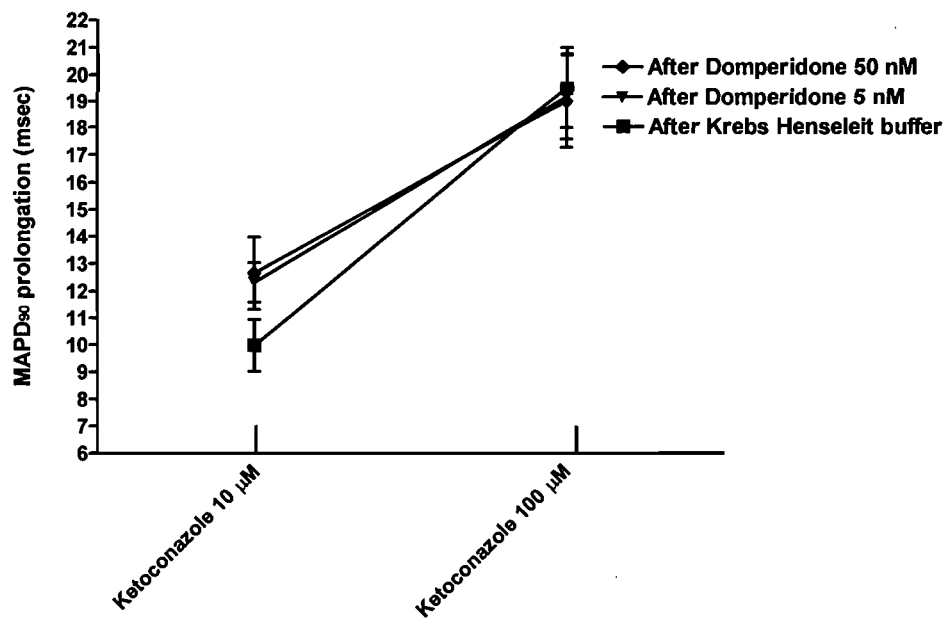


Figure 3

A



B

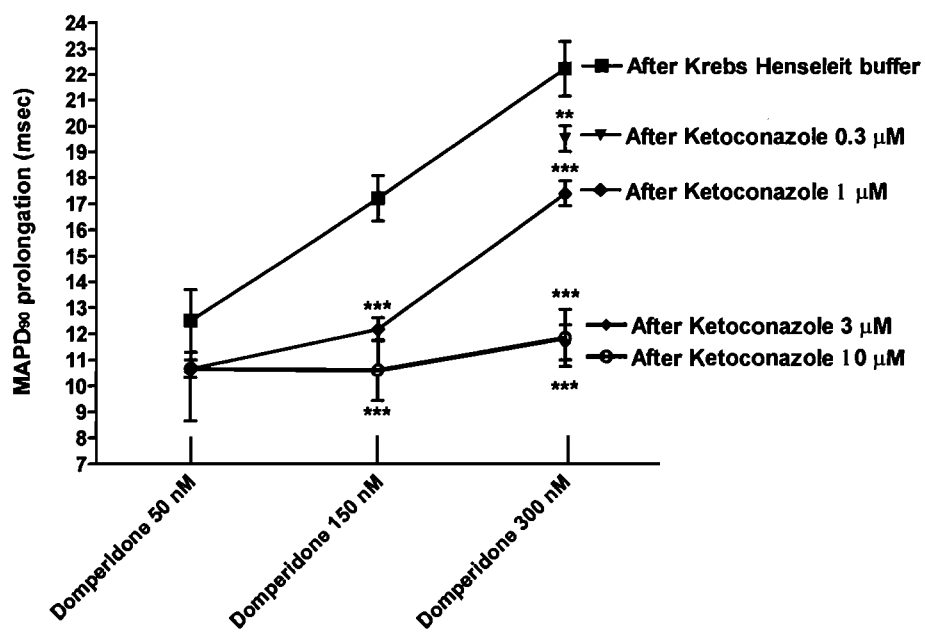
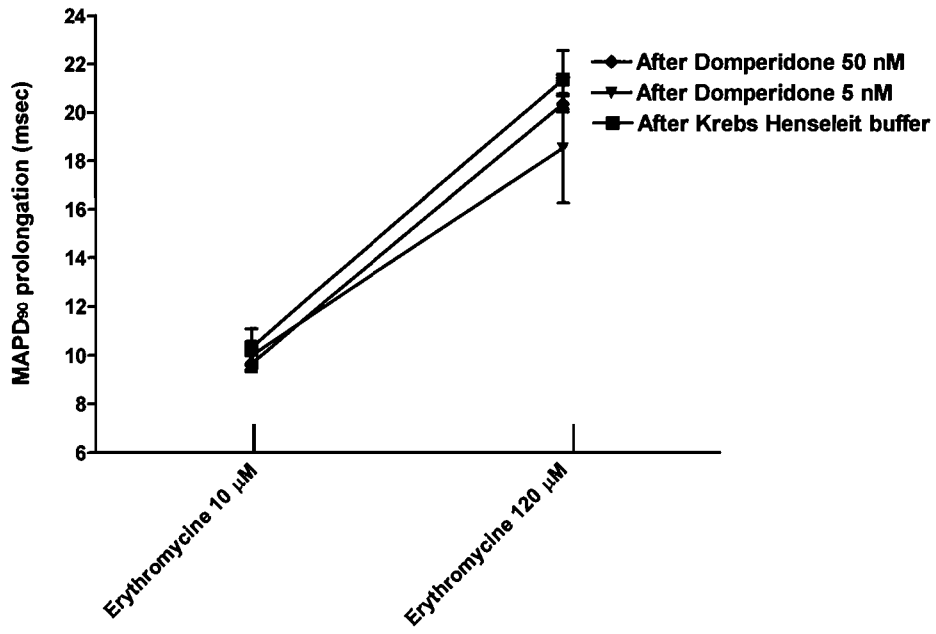


Figure 4

A



B

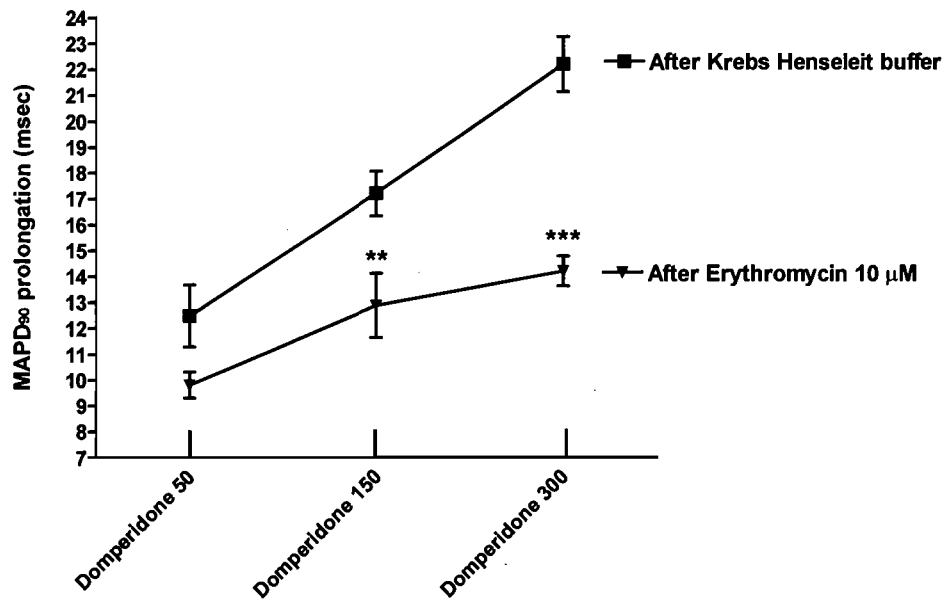
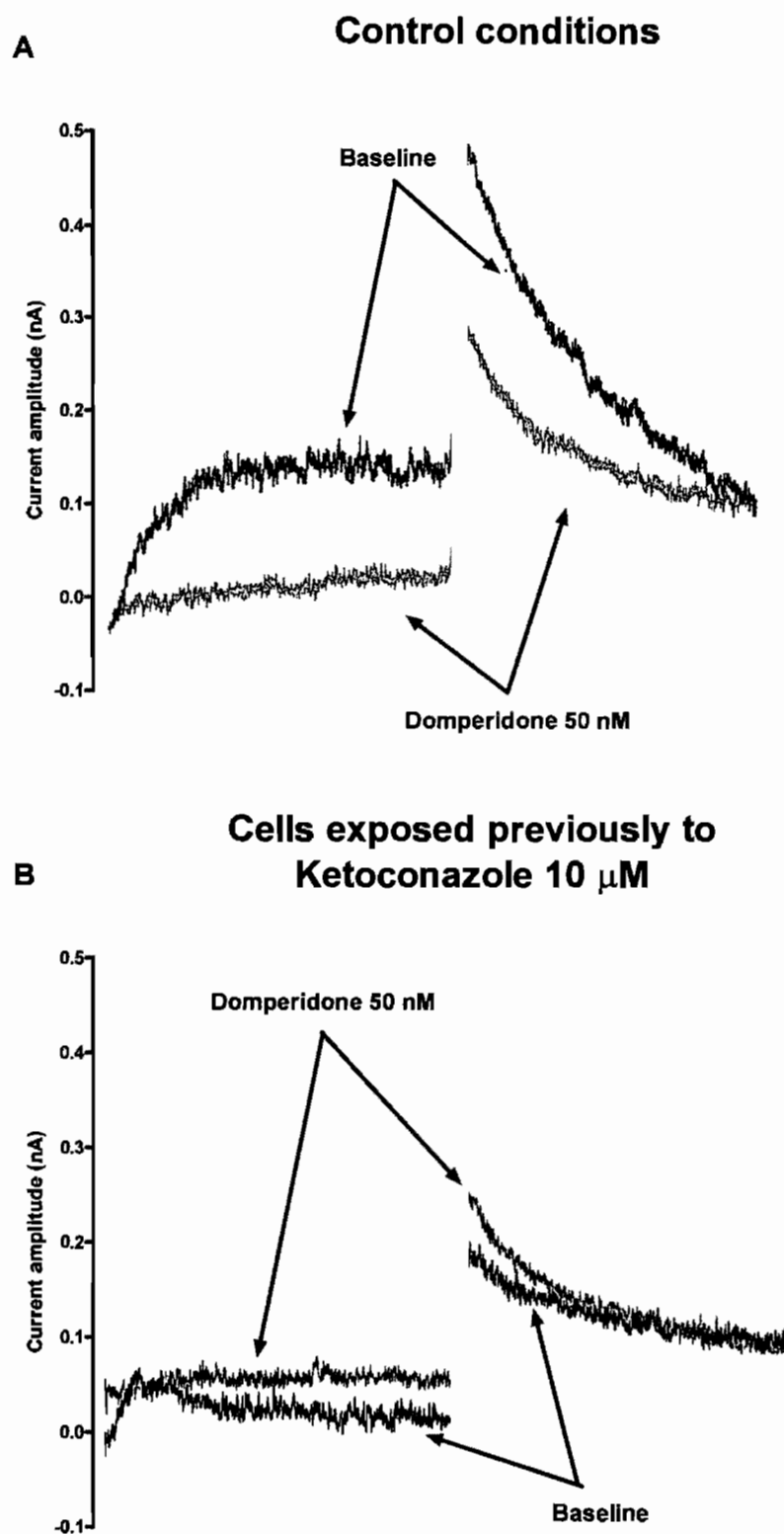


Figure 5



CHAPITRE IV

DEMONSTRATION OF A CLOSE PHYSICAL INTERACTION BETWEEN HERG AND P-GLYCOPROTEIN: A POTENTIAL ROLE IN DRUG-INDUCED LONG QT SYNDROME

**Demonstration of a close physical interaction between HERG and P-glycoprotein:
A potential role in drug-induced Long QT Syndrome**

Raymond Hreiche[¶], Hakima Yahi-Kerbane[¶], Isabelle Plante, Francois Belanger,
Jacques Turgeon.

[¶] Authors contributed equally to this manuscript.

Faculty of Pharmacy, Université de Montréal.

Running title: P-gp and drug-induced LQTS

Address for correspondence:

Jacques Turgeon, Ph.D.

Research Center

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal


Hôtel-Dieu, Masson Pavilion room 8-213

3850 Saint Urbain street,

Montreal (QC) H2W 1T7

Tel : (514) 890-8044

Fax : (514) 412-7186



1. Résumé

Introduction: Le syndrome du QT long (LQTS) médicamenteux est un effet indésirable majeur des médicaments associés au blocage du courant potassique cardiaque I_{Kr} (HERG). Nous avons remarqué que plusieurs des médicaments associés au LQTS médicamenteux sont également des substrats/inhibiteurs du transporteur membranaire d'efflux P-glycoprotéine (P-gp). Pour cela, les objectifs de cette étude étaient d'évaluer l'interaction possible entre HERG et P-gp au niveau des cardiomyocytes humains et de cobayes et d'évaluer le rôle de la P-gp durant le blocage fonctionnel d' I_{Kr} par les médicaments.

Méthodes et Résultats: Nos résultats ont démontré pour la première fois une étroite interaction physique entre la protéine d'un canal potassique cardiaque (HERG) et un transporteur membranaire d'efflux (P-gp). Nous avons également démontré que l'expression de la P-gp dans des cellules HEK293 transfectées par HERG augmentait le blocage d' I_{Kr} induit par la dompéridone, un substrat de P-gp avec des propriétés de blocage d' I_{Kr} .

Conclusions: L'étroite interaction physique et fonctionnelle entre ces deux protéines fournit une nouvelle donnée qui servira à une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents au LQTS médicamenteux.

2. Abstract

Background: Drug-induced long QT syndrome (LQTS) is the major side effect of drugs associated with block of the cardiac potassium current I_{Kr} (HERG). We noticed that several of the drugs associated with drug-induced LQTS are also substrates/inhibitors of the membrane transporter P-glycoprotein (P-gp). Therefore, the objectives of our study were to assess the possible interaction between HERG and P-gp in human and guinea pig cardiomyocytes and to evaluate the role of P-gp during functional block of I_{Kr} by drugs.

Methods and Results: Our results show for the first time a tight physical interaction between a cardiac potassium channel protein (HERG) and a membrane drug efflux transporter (P-gp). We also show that P-gp expression in HERG transfected HEK293 cells increased the apparent IC_{50} for block of I_{Kr} by domperidone, a P-gp substrate and known I_{Kr} blocker.

Conclusions: The close physical interaction and functional relationship between these two proteins provides new information for a better understanding of mechanisms underlying the drug-induced LQTS.

3. Introduction

The hallmark of all LQTS – congenital or drug-induced – is an abnormal cardiac ventricular repolarization which translates on the surface ECG into a prolonged QT interval¹. Excessive prolongation of the QT interval is associated with an increased risk of torsades de pointes (TdP), a polymorphic ventricular tachycardia that can degenerate into ventricular fibrillation and death.

Prolonged repolarization can be caused by an increase in depolarizing inward currents (I_{Na} ; LQT3, or I_{Ca-L} ; LQT8) or by a decrease in repolarizing outward currents. The latter mostly involves potassium channels and particularly the delayed rectifier current (I_K) for drug-induced LQTS¹. In guinea pigs and humans, I_K comprises both a rapidly (I_{Kr}) and a slowly (I_{Ks}) activating component²⁻⁴. In humans, I_{Kr} is encoded by *HERG* (human ether-a-go-go-related gene; *KCNH2*)^{5, 6} and studies at the molecular level demonstrated that the molecular physiology and pharmacology of *HERG* and I_{Kr} are similar^{7, 8}. In addition, we and others have identified that many drugs responsible for the occurrence of drug-induced LQTS have an important blocking affinity towards I_{Kr} ⁹⁻¹¹. Today, the list of drugs associated with a prolongation of the QT interval is rather long and includes non-antiarrhythmic agents, some of which had to be removed from the market (cisapride, terfenadine, astemizole)^{9, 12}.

We recently compiled complete information on the relative expression and function of numerous ABC (ATP-Binding Cassette) efflux transporters in the heart¹³. Hence, from the ABC transporter family, it is known that at least 13 proteins exhibit a considerable

level of expression in the heart (**P-gp/MDR1**, **MRP1**, **MRP4**, **MRP5**, **MRP7**, **BCRP**, **ABCD2**, **ABCA1**, **ABCA5**, **ABCA6**, **ABCA8**, **ABCA9**, **ABCA10**)¹³. Seven of them (bold type) have been involved in drug transport; but 3 of them namely, **P-gp**, **MRP1** and **BCRP**, seem to have major roles¹³. Due to their presence, we suggested that distribution of several drugs to cardiac tissues would be modulated by the activity of these transporters¹⁴. Influx transporters would increase the intracellular concentration of drugs while efflux transporters would cause the opposite.

Data in the literature indicate that several P-gp substrates/inhibitors (e.g. domperidone) are often associated with block of I_{Kr} , and inversely that several drugs with I_{Kr} blocking properties are substrates/inhibitors of P-gp^{10, 15}. For example, several anticancer adjuvants / Pgp modulators such as S9788 never reached the market due to their potential pro-arrhythmic side effects¹⁶. These observations prompt us to study the physical and functional interaction between HERG and P-gp and to hypothesize that transporters would modulate drug effects on cardiac repolarization since major binding sites to I_{Kr} are intracellular¹⁷⁻¹⁹.

Therefore, the objectives of the present study were 1) to determine whether HERG and P-gp physically interact together in human and guinea pig ventricular myocytes and 2) to evaluate the functional role of P-gp expression on the block of I_{Kr} mediated by domperidone, a probe drug that is a P-gp substrate and a non-antiarrhythmic I_{Kr} blocker.

4. Methods

1. Study of the physical interaction of HERG and P-gp

1.1. Membrane protein extraction

Samples from human (RETEB, Réseau en Santé Cardiovasculaire, FRSQ, Canada) and male Hartley guinea pig (Charles River Laboratories) left ventricular tissues were washed in cooled PBS and then rapidly frozen with liquid nitrogen. The tissue was grinded and suspended in 10 mL of lysis buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 0.1 %SDS, 1 % NP40, 10 μ L Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)). Using a polytron, the suspension was homogenized for 20 seconds and centrifuged for 15 min at 5,000g at 4°C to remove the remaining cells. The supernatant was then centrifuged at 120,000 g for 1 hour to pellet the membranes, and then analysed by Western blotting. The pellet was then resuspended in 500 μ L (75 mmol/L Tris, 12.5 mmol/L, MgCl₂, 5 mmol/L EDTA, pH 7.4) and then used for the co-immunoprecipitation experiments.

1.2. Co-immunoprecipitation

The supernatant described above was diluted with equal volume of dilution buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 0.1 %SDS, 1 % NP40, 10 μ L Protease Inhibitor Cocktail (Sigma), pH 7.4) and centrifuged at 45,000 g to remove crude membranes. The supernatant corresponding to the protein membranes was incubated overnight with antibodies directed either against P-gp (C219, Zymed) or HERG (APC-062, Alamone). A negative control was performed with anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies. Agarose beads A/G were then added for 30 min to 1 hour to the immunoprecipitates. After washing with the dilution buffer 4 to 10 times, protein concentration was determined

using the detergent compatible kit (Pierce). Co-immunoprecipitated proteins were then separated by Western blotting.

1.3. Western Blotting

Membrane protein extracts from human and guinea pigs hearts were separated by 8 % SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose filters (Amersham-Biosciences). Free binding sites were blocked with 1 % fat-free dry milk, 1 % BSA, 0.05 % Tween 20 in PBS (pH 7.4), and membranes were probed with rabbit anti-HERG antibodies (Alamone) and mouse anti-P-gp antibodies (C219), and incubated overnight at 4°C. Nitrocellulose membranes were washed three times with PBS-T (0.05 % Tween 20 in PBS) and incubated with goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies or anti-mouse IgG antibodies followed by the ECL method (Amersham-Biosciences), and then analysed with Chemimager (Alpha Innotech).

1.4. Immunohistochemistry

The relationship between HERG and P-gp was studied in guinea pig ventricular cardiomyocytes by an immunohistochemical procedure. Guinea pig cardiomyocytes were freshly isolated as described previously following exposure to collagenase²⁰. Cardiomyocytes were washed with PBS then incubated in Labteck dishes – treated previously with Polylysine 80 % – at 37°C for 1 hour to allow the adherence of cardiomyocytes. Subsequently, cardiomyocytes were washed and permeabilized with 0.25 % Triton X-100 in PBS. Non-specific binding sites were blocked with 10 % FCS and 3 % BSA for 1 hour at room temperature. Cardiomyocytes were incubated with primary anti-P-gp antibodies (dilution 1:100) or primary anti-HERG antibodies (dilution

1:25) in 10 % FCS and 1 % BSA overnight at 4°C. P-gp was visualized with Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibodies (Molecular Probes) and HERG was visualized with TexasRed-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibodies (dilution 1:400). Nuclei were visualized with propidium iodide contained in the Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). Cardiomyocytes were examined under a Leica confocal laser screening microscope with argon ion lasers appropriate for Alexa 488 and propidium iodide. Images were collected with Leica 10x, 40x oil objectives and 63x.

Human ventricular heart tissue samples were rapidly rinsed in PBS, recovered with OCT (Optimal Cutting Temperature compound, Somagen) and immediately frozen in liquid nitrogen. Six-micrometer cryosections of human tissues were fixed with cold acetone for 10 min. The immunohistochemical procedures were performed exactly as described above for guinea pig ventricular cardiomyocytes.

2. Study of the functional interaction of HERG and P-gp

2.1 Cloning of MDR1 cDNA

MDR1 cDNA clone was prepared using vector pGEM3ZF(-)Xba-MDR1.1 (ATCC, Manassas, Virginia, USA) as cDNA template. The cDNA fragment of *MDR1* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) (at 94°C for 2 min, followed by 40 cycles at 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec and 68°C for 4 min) with upstream primer H-1b 5'ACGCGTCGACGATGGATCTTGAAGGGGA and downstream primer R-1b 5'CGCGGATCCTCAATGGCGCTTTGTTCCA. These primers contain a new restriction site in the end of the fragment for endonucleases Sal I and BamHI. PCR reactions were performed with 2U of Platinum pfx DNA polymerase (Invitrogen). cDNA insert was

enclosed cohesively into multiple cloning sites (MCS) of vector pEGFP-C1 (Clontech) by a digestion of the insert and the vector with Sal I and BamHI. Recombinant pEGFP-MDR1 vector was sequenced before transfection into HEK293 cells.

2.2. Transfection of MDR1 in HEK 293 cells that stably express HERG.

Cells from HERG-transfected HEK 293 stable cell line (kindly donated by Dr. Craig January, University of Wisconsin) were cultivated with 10 μ g of the recombinant pGFP-MDR1 vector using the calcium phosphate precipitation technique²¹. Transiently transfected cells were incubated for 18 h in 100 mm dishes and then trypsinized and transferred to 35 mm dishes. The green fluorescent protein was coexpressed with MDR1 to assess the transfection efficiency and to identify expressing cells for voltage-clamp analysis. Fluorescent cells were voltage-clamped 48 to 72 h after transfection.

2.3. Patch-clamp experiments

Whole-cell voltage-clamp recordings were performed on transfected cells (or non-transfected controls) well displaying green fluorescence. The setup was performed at 37°C with the preparation in 35-mm dishes mounted on the stage of an inverted microscope (Axiovert 35, Zeiss). Currents were recorded in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique using an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments, Burlingame, Calif., USA). Voltage clamp were controlled by the pCLAMP software package (version 9 Axon Instruments).

Patch pipettes used were heat-polished to obtain a tip resistance of about 3 M Ω when filled with intracellular solution containing (mM): 110 KCl; 1 MgCl₂.6H₂O; 5 BAPTA-K₄; 5 K₂ATP; 10 HEPES (pH = 7.2, adjusted with KOH). Cells were superfused with a

control external solution containing (mM): 145 NaCl; 4 KCl; 1.8 CaCl₂·2H₂O; 1 MgCl₂·6H₂O; 10 glucose; 10 HEPES (pH = 7.35, adjusted with NaOH). This solution is compatible with patch-clamp experiments and is suitable for transporter activity. Domperidone solution was prepared daily by dissolving required amount of the drug in DMSO then in the Tyrode solution perfusing the cells. Effects of domperidone on the HERG current were studied in cells clamped at holding potential of -80 mV. Depolarizing steps were applied for 4 sec to voltages between 60 and -40 mV in 10 mV increments. Cells were then repolarized at -40 mV for 6 sec, before they returned to the holding potential (-80 mV).

3. Data storage and analysis

Currents were low-pass filtered at 1 kHz (4-pole Bessel filter; -3 dB/octave) and sampled at 2 kHz. Magnitude of domperidone effects for patch-clamp data were analysed with a Student paired t-test. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant. All values were expressed as mean ± SD.

5. Results

1. Physical interaction of HERG and P-gp

To improve the resolution and the sensitivity of the detection techniques, we performed immunochemistry using fluorescent antibodies combined with confocal microscopy. Fig. 1A shows a longitudinal morphological presentation of slices of human cardiac ventricles where cardiomyocytes can be distinguished (enlargement 10X, 40X and 100X). Fig. 1B shows that both HERG and P-gp could easily be localized in such slices of human cardiac ventricular tissue. In addition, the co-localization of the two proteins was revealed by simultaneous exposure to wavelengths for both HERG and P-gp antibodies. These results were confirmed in isolated guinea pig cardiac ventricular myocytes (Fig. 2).

As a second step and in order to determine whether the two proteins physically interact, we performed co-immunoprecipitation studies by exposing membrane protein extracts from human and guinea pig cardiac ventricular tissues to anti-P-gp antibodies and looked for the presence of HERG in these immunoprecipitates. Human heart protein extracts were exposed to non-selective IgG antibodies (Fig. 3A and 3B; lines 2 and 4) and to anti-P-gp antibodies where P-gp could be detected after 24 and 4 hours of exposure (Fig. 3A; lines 3 and 5). Western blotting with anti-HERG antibodies of these immunoprecipitates also revealed the presence of HERG (Fig. 3B; lines 3 and 5). Non-selective binding was not observed with A/G beads (Fig. 3A and 3B; line 6). We also performed reversed co-immunoprecipitation by precipitating HERG first and revealed the presence of P-gp in these immunoprecipitates. Finally, the presence of P-gp and

HERG was also demonstrated in membrane protein extracts from guinea pig hearts (Fig. 4).

2. Functional interaction of HERG and P-gp

2.1. Patch-clamp experiments

Figure 5A shows HERG currents elicited by 4 sec step from a holding potential of -80 mV to +20 mV, followed by repolarization to -50 mV for 6 sec, in a HERG⁺ stably transfected HEK293 cells perfused under control conditions and in the presence of domperidone 100 nmol/L. After a repolarizing step to -50 mV, an outward tail current was recorded. Tail current amplitude increased with depolarizing steps from -40 to +10mV and was then superimposed on further depolarizing steps to +50 mV. At 37°C, domperidone 100 nmol/L suppressed both the outward and tail current, as shown in Fig. 5A and B. The mean decrease in HERG tail-current peak amplitude in 5 HEK293 control cells exposed to the same concentration of domperidone was 63±8 %. In contrast, HEK^{HERG+} cells transfected with MDR1 exhibited a significant lower inhibition of 31±2 % when perfused with domperidone 100 nmol/L at 37°C (Fig.5B; p<0.001, n=5). To further validate our paired results (measurement and comparison for each cell of HERG amplitude in the absence and presence of domperidone), we used a non-paired approach by using different cells for measurement of the current amplitude under control conditions and during the exposure to drug. This approach eliminates the potential overestimation of I_{Kr} block due to rundown of the current. After amplitude normalization, domperidone 100 nmol/L showed lower inhibition of HERG current in HEK^{HERG+} cells transfected with MDR1 compared to non-transfected HEK^{HERG+} cells (30 vs 48 %, p<0.01, n = 25 / group).

6. Discussion

Results obtained in this study indicate a very close physical interaction between HERG and P-gp in human and guinea pig cardiac ventricular myocytes. Furthermore, we showed that expression of P-gp in HEK293^{HERG+} cells decreases the blocking effect of domperidone, a well-known P-gp substrate. This is most probably explained by a decrease in domperidone intracellular concentrations mediated through a drug efflux by P-gp.

Our results clearly confirmed the presence of HERG and P-gp in human and guinea pig hearts. Although the expression of HERG has been indisputable in cardiac myocytes, various levels of expression of P-gp have been reported¹³. To our knowledge, these findings are the first to describe a physical interaction between HERG, the main potassium channel responsible for human ventricular repolarization, and P-gp, an ABC efflux membrane transporter that actively transports diverse molecules across the membrane. Moreover, we believe that this is the third report of a close interaction between ion channels and transporters in various cell types. Indeed, others have shown that CFTR (ABCC7) is a constituent of chloride channels²², while SUR1 (ABCC8) is a constituent of ATP-dependant potassium channels ($I_{K(ATP)}$)^{23, 24}. CFTR and SUR1 are important and necessary subunits for the normal functioning of these channels, and comparatively, P-gp may be an essential element for HERG function in the heart and in other vital organs. Indeed, P-gp and HERG proteins play an important role in several pathologies. For instance, P-gp is highly expressed in several tumour types and has a prevalent role in cancer treatment where it explains some of the multidrug resistance

phenomena²⁵. Increasing evidences also indicate that ion channels such as HERG are involved in the pathophysiology of cancer^{26, 27}. HERG is frequently over-expressed in many tumour cell lines as well as in primary human cancers. It is believed that HERG may interact with adhesion receptors of the integrin family²⁸. However, the direct interaction of P-gp and HERG in tumour cells has not been evaluated yet and our results may be a trigger to further studies concerning this potential close relationship.

We have also shown that transfection of HEK293^{HERG+} cells with P-gp clearly modulates the amplitude of I_{Kr} blockade mediated by domperidone. Domperidone was marketed worldwide since 1978 as a gastrokinetic and antiemetic drug. However, it was associated with several cases of QT prolongation and sudden death^{29, 30}; the mechanism of its proarrhythmic properties was explained by a direct blocking effect on HERG channel¹⁰. Furthermore, domperidone is a proven substrate of P-gp and can be used as a valid P-gp probe^{31, 32}. For these reasons, domperidone was chosen as a double probe for both P-gp and HERG in this study.

In our study, modulation of domperidone blocking effects mediated by P-gp transfection could be explained from a pharmacokinetic approach. First, we co-expressed the green fluorescent protein (GFP) with P-gp to identify by a fluorescent microscope detector which cells do truly express P-gp. This expression shows that these new cells have an additional pharmacokinetic factor that plays a role in detoxification, i.e. expelling domperidone (P-gp substrate) towards the extracellular milieu. Decreasing the intracellular concentration of domperidone leads to a decrease in domperidone availability at HERG binding site; this manifestly leads to a decrease in the I_{Kr} blocking effect of domperidone and to a larger I_{Kr} amplitude as shown in our results.

These findings are of great importance from a drug safety perspective. Indeed, patients that exhibit different activities in their influx/efflux transporters could have major variations in the magnitude of drug action, and more particularly with non-antiarrhythmic drugs in the heart. For instance, a decrease in the activity of an efflux transporter such as P-gp due to genetic polymorphisms could result in the accumulation of P-gp substrate drugs in the heart, the brain or in the placenta that all express high levels of this efflux transporter³³. Conversely, a decrease in the activity of an influx transporter could result in lower tissue levels for similar plasma concentrations. This could bring a new explanation to the inter-individual variability observed in the drug-induced LQTS. Despite the fact that many risk factors (gender, bradycardia, drug-drug interactions...) have been identified for the drug-induced LQTS, we still remain unable to adequately predict which patient will develop proarrhythmia with a specific drug. With these findings in hand (associated with future more elaborated fundamental and clinical data), physicians will look further at genetic polymorphisms in influx/efflux transporters and drug interactions that could lead not only to an impaired metabolism but also to an impaired active transmembrane transport.

7. Conclusion

In conclusion, we demonstrated in this study a physical and functional interaction between HERG and P-gp in cardiac ventricular myocytes and HEK293 cells expressing HERG. Our results suggest that the extent of block of I_{Kr} by various drugs in cardiac myocytes could be linked to the activity of the efflux drug transporter P-gp. Intersubject variability in the activity of P-gp due to genetic polymorphisms or drug-drug interactions that could lead to a modulation in P-gp activity could be major determinants of drug channel block on I_{Kr} , hence, of the risk of drug-induced LQTS.

8. References

1. Morissette P, Hreiche R, Turgeon J. Drug-induced long QT syndrome and torsade de pointes. *Can J Cardiol.* 2005;21(10):857-864.
2. Gintant GA. Two components of delayed rectifier current in canine atrium and ventricle. Does IKs play a role in the reverse rate dependence of class III agents? *Circulation research.* 1996;78(1):26-37.
3. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol.* 1990;96(1):195-215.
4. Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. *Circulation research.* 1996;78(4):689-696.
5. Warmke JW, Ganetzky B. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(8):3438-3442.
6. Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell.* 1995;81(2):299-307.
7. Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell.* 1999;97(2):175-187.
8. Kiehn J, Lacerda AE, Wible B, Brown AM. Molecular physiology and pharmacology of HERG. Single-channel currents and block by dofetilide. *Circulation.* 1996;94(10):2572-2579.

9. Drolet B, Khalifa M, Daleau P, Hamelin BA, Turgeon J. Block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current by the prokinetic agent cisapride underlies drug-related lengthening of the QT interval. *Circulation*. 1998;97(2):204-210.
10. Drolet B, Rousseau G, Daleau P, Cardinal R, Turgeon J. Domperidone should not be considered a no-risk alternative to cisapride in the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Circulation*. 2000;102(16):1883-1885.
11. Drolet B, Yang T, Daleau P, Roden DM, Turgeon J. Risperidone prolongs cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003;41(6):934-937.
12. Roden DM. Drug-induced prolongation of the QT interval. *N Engl J Med*. 2004;350(10):1013-1022.
13. Couture L, Nash JA, Turgeon J. The ATP-binding cassette transporters and their implication in drug disposition: a special look at the heart. *Pharmacol Rev*. 2006;58(2):244-258.
14. Morissette P, Hreiche R, Turgeon J. Modulatory role of verapamil treatment on the cardiac electrophysiological effects of cisapride. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006;84(12):1285-1290.
15. Dan Y, Murakami H, Koyabu N, Ohtani H, Sawada Y. Distribution of domperidone into the rat brain is increased by brain ischaemia or treatment with the P-glycoprotein inhibitor verapamil. *J Pharm Pharmacol*. 2002;54(5):729-733.
16. Stupp R, Bauer J, Pagani O, Gerard B, Cerny T, Sessa C, Bastian G, Sarkany M, Schlapfer J, Giroux B, Leyvraz S. Ventricular arrhythmia and torsade de pointe:

- dose limiting toxicities of the MDR-modulator S9788 in a phase I trial. *Ann Oncol.* 1998;9(11):1233-1242.
17. Zou A, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti MC. Single HERG delayed rectifier K⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes. *The American journal of physiology.* 1997;272(3 Pt 2):H1309-1314.
 18. Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti MC. A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(22):12329-12333.
 19. Zhang S, Zhou Z, Gong Q, Makielski JC, January CT. Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circulation research.* 1999;84(9):989-998.
 20. Morrissette P, Hreiche R, Mallet L, Vo D, Knaus EE, Turgeon J. Olanzapine prolongs cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current. *J Psychopharmacol.* 2006.
 21. Berube J, Chahine M, Daleau P. Modulation of HERG potassium channel properties by external pH. *Pflugers Arch.* 1999;438(3):419-422.
 22. Duan DY, Liu LL, Bozeat N, Huang ZM, Xiang SY, Wang GL, Ye L, Hume JR. Functional role of anion channels in cardiac diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 2005;26(3):265-278.
 23. Inagaki N, Gono T, Clement JPt, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science.* 1995;270(5239):1166-1170.
 24. Morrissey A, Rosner E, Lanning J, Parachuru L, Dhar Chowdhury P, Han S, Lopez G, Tong X, Yoshida H, Nakamura TY, Artman M, Giblin JP, Tinker A,

- Coetzee WA. Immunolocalization of KATP channel subunits in mouse and rat cardiac myocytes and the coronary vasculature. *BMC Physiol.* 2005;5(1):1.
25. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene.* 2003;22(47):7468-7485.
26. Arcangeli A. Expression and role of hERG channels in cancer cells. *Novartis Found Symp.* 2005;266:225-232; discussion 232-224.
27. Wang H, Zhang Y, Cao L, Han H, Wang J, Yang B, Nattel S, Wang Z. HERG K⁺ channel, a regulator of tumor cell apoptosis and proliferation. *Cancer Res.* 2002;62(17):4843-4848.
28. Arcangeli A, Becchetti A, Cherubini A, Crociani O, Defilippi P, Guasti L, Hofmann G, Pillozzi S, Olivotto M, Wanke E. Physical and functional interaction between integrins and hERG potassium channels. *Biochem Soc Trans.* 2004;32(Pt 5):826-827.
29. Domperidone and sudden death. *Prescrire Int.* 2006;15(86):226.
30. Rocha CM, Barbosa MM. QT interval prolongation associated with the oral use of domperidone in an infant. *Pediatr Cardiol.* 2005;26(5):720-723.
31. El Ela AA, Hartter S, Schmitt U, Hiemke C, Spahn-Langguth H, Langguth P. Identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors among psychoactive compounds--implications for pharmacokinetics of selected substrates. *J Pharm Pharmacol.* 2004;56(8):967-975.
32. Tsujikawa K, Dan Y, Nogawa K, Sato H, Yamada Y, Murakami H, Ohtani H, Sawada Y, Iga T. Potentiation of domperidone-induced catalepsy by a P-glycoprotein inhibitor, cyclosporin A. *Biopharm Drug Dispos.* 2003;24(3):105-114.

33. Ieiri I, Takane H, Otsubo K. The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(9):553-576.

9. Figure Legends

Figure 1: Detection of HERG and P-gp in Human cardiac ventricular tissues by immunohistochemistry.

Fig. 1A shows longitudinal morphological presentation of slices of human cardiac ventricles by optical microscopy. The tissue was fixed in formol 10 %, and then stained with hematoxyline. Fig. 1B shows, from left to right, the localisation of HERG (red), P-gp (green), their co-localisation (merge) and the negative controls obtained following exposure to mouse secondary antibodies (without anti-P-gp) and rabbit secondary antibodies (without HERG).

Figure 2: Detection of HERG and P-gp in guinea pig cardiac ventricular myocytes by immunohistochemistry.

Fig. 2 reveals the localisation of P-gp and HERG in the cell membrane of guinea pig cardiac myocytes. Fig. 2A and B show from left to right, the localisation of HERG (red) and P-gp (green), and their co-localisation (merge). Fig. 2C shows from left to right, negative controls obtained following exposure to rabbit secondary antibodies (without HERG) or mouse secondary antibodies (without anti-P-gp).

Figure 3: Association of P-gp with HERG in human heart

Using Western blotting and specific antibodies, Fig. 3A shows, from left to right, P-gp revealed from a crude human membrane extract corresponding to the input (line 1), IP revealed with mouse IgG antibodies as a negative control (lines 2 and 4), IP revealed with P-gp antibodies (24 hours and 4 hours; lines 3 and 5), and IP revealed with A/G

beads as another negative control (line 6). Fig. 3B shows, from left to right, the presence of HERG, visualised with HERG antibodies (lines 1, 3 and 5). (IP: Immunoprecipitation, IB: Immunoblotting, P-gp: P-glycoprotein, HERG: human ether-a-go-go-related channel).

Figure 4: Association of P-gp with HERG in guinea pig heart

Using Western blotting and specific antibodies, figure 4A shows, from left to right, P-gp revealed from a crude guinea pig heart membrane extract corresponding to the input (line 1), IP revealed with P-gp antibodies (24 hours and 4 hours; lines 2 and 3), IP revealed with mouse IgG antibodies as a negative control (line 4), IP revealed with A/G beads as another negative control (line 5). Figure 4B, shows from left to right the presence of HERG, visualised with HERG antibodies (lines 1, 2 and 3).

Figure 5: HERG block in control and MDR1 transfected cells.

HERG outward and tail currents are showed, elicited by a 4 sec step to +20 mV in HEK293^{HERG+} control cells (Panel A) and HEK293^{HERG+} transfected with MDR1 (Panel B) under control conditions and in the presence of domperidone 100 nmol/L.

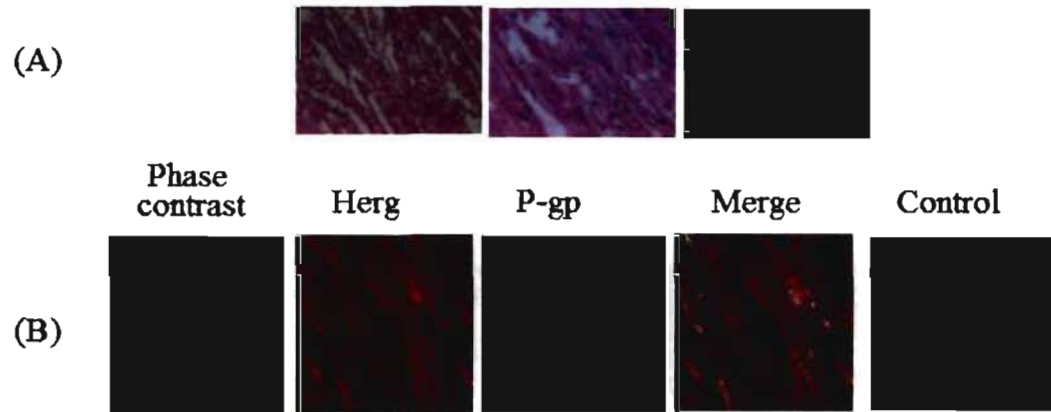
Figure 1:

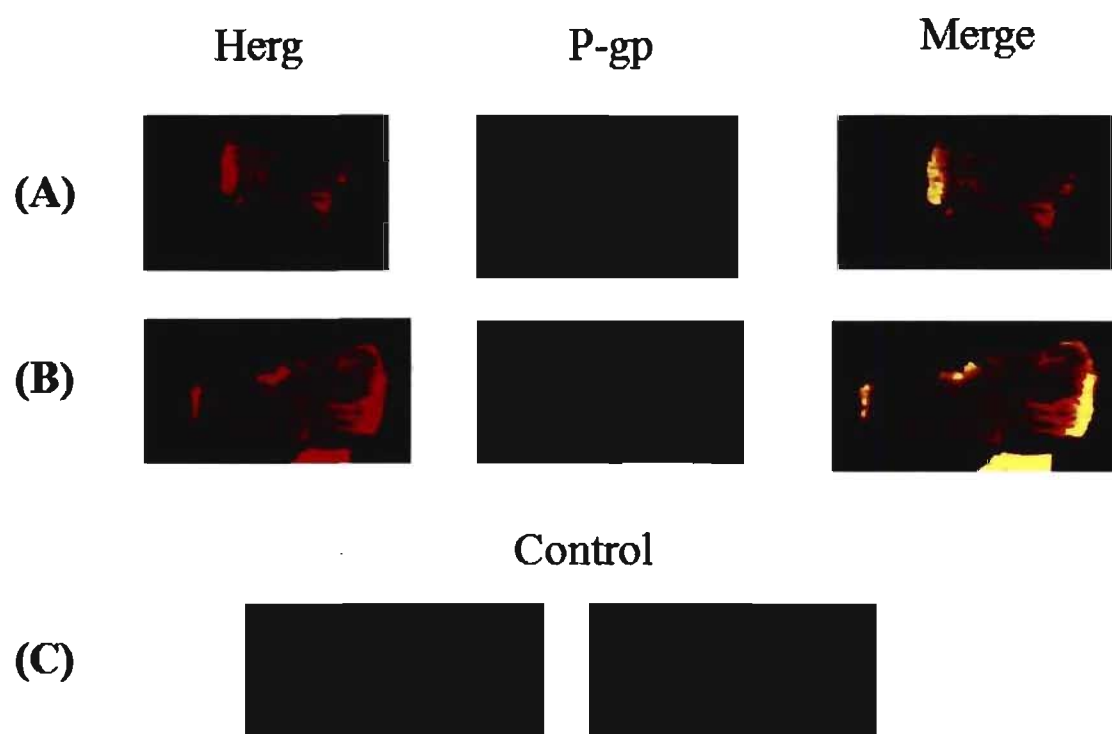
Figure 2:

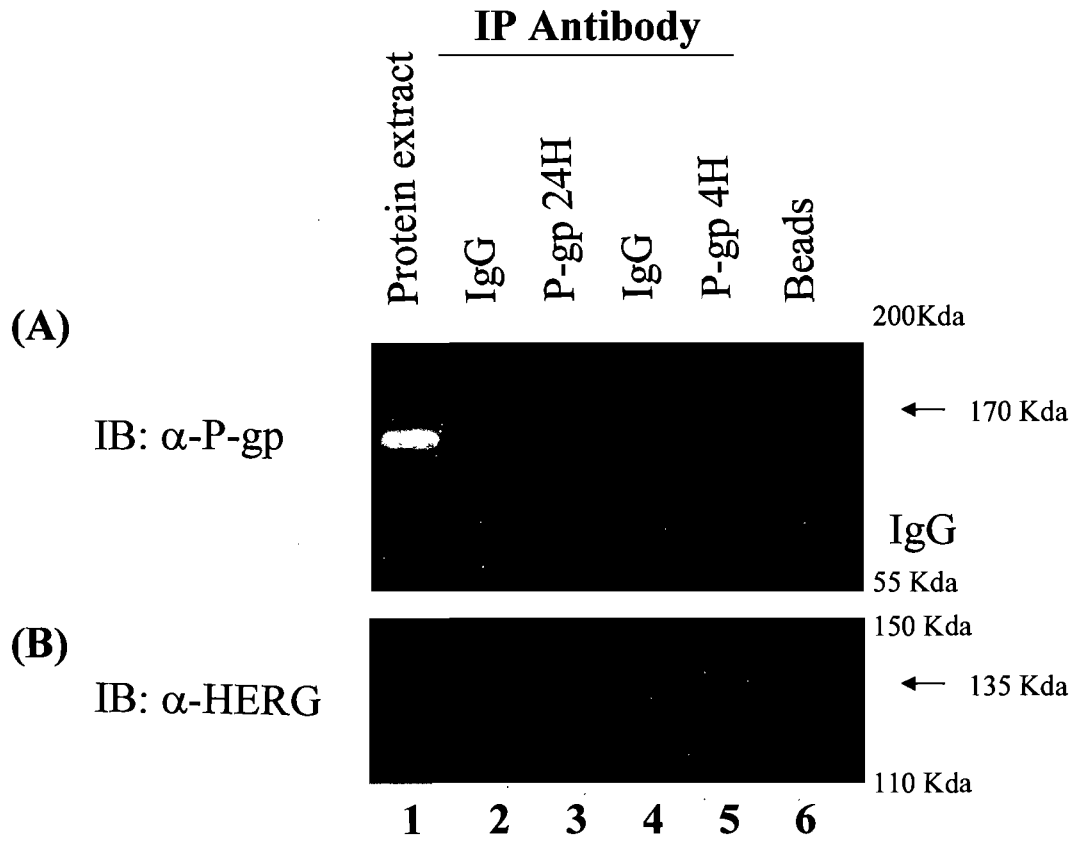
Figure 3:

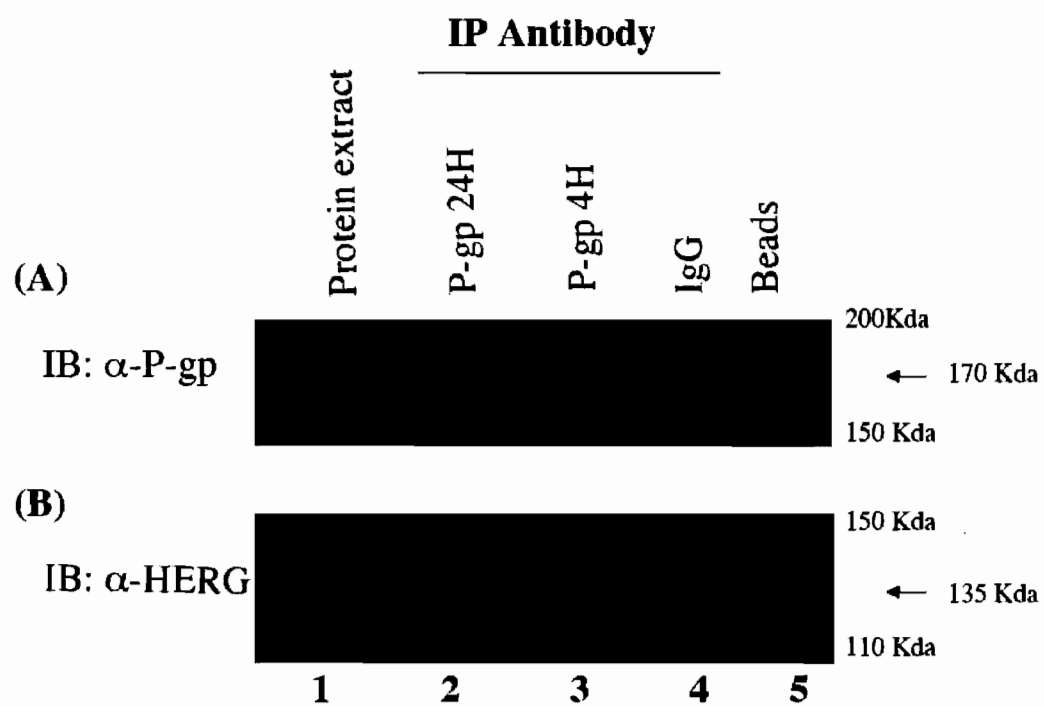
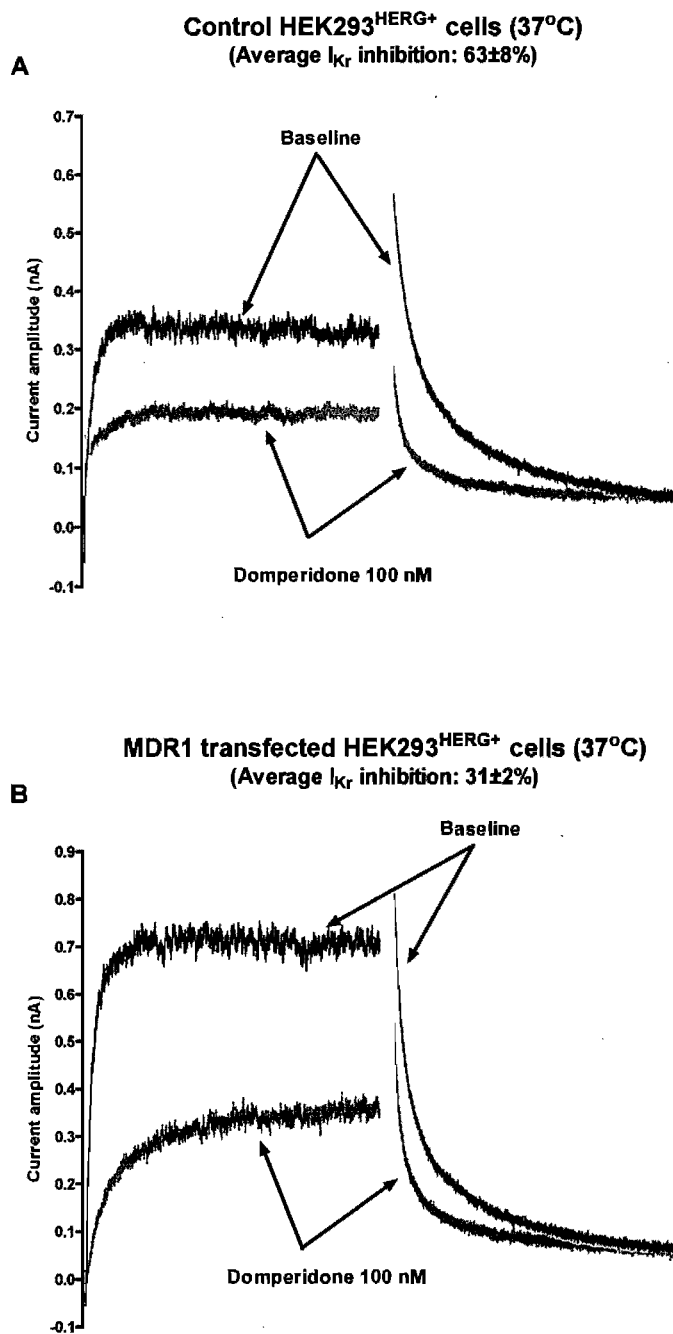
Figure 4:

Figure 5:

CHAPITRE V

IMPACT OF GLUCOSE CONCENTRATION ON CARDIAC VENTRICULAR REPolarIZATION UNDER I_{KR}/I_{KS} BLOCKING AGENTS

**Impact of glucose concentration on cardiac ventricular repolarization under I_{Kr}/I_{Ks}
blocking agents**

Raymond Hreiche^{1,2}, Isabelle Plante^{1,2}, Louis-Philippe David², Chantale Simard^{3,4},
Jacques Turgeon,^{1,2} Benoit Drolet^{3,4}

¹Faculté de pharmacie, Université de Montréal, Montréal QC

²Centre de recherche du CHUM, Pavillon Hôtel-Dieu de Montréal, Montréal QC

³Faculté de pharmacie, Université Laval, Québec QC

⁴Hôpital Laval, Centre de recherche, Québec QC

Running title: Role of glucose in cardiac repolarization and pharmacology

Address for correspondence:

Dr Benoit Drolet
Hôpital Laval, Centre de recherche
2725, chemin Sainte-Foy
Québec QC Canada
G1V 4G5
Phone : 418-656-8711 ext. 5755
Fax : 418-656-4509
E-mail [REDACTED]

1. Résumé

Introduction: Le diabète a été fortement associé à une prolongation de l'intervalle QT, qui peut déclencher ultimement des arythmies fatales. L'objectif de la présente étude était d'évaluer la façon dont la concentration de glucose peut moduler les effets des médicaments sur la repolarisation ventriculaire et sur les courants potassiques cardiaques de repolarisation. **Méthodes:** Des cœurs de cobayes Hartley mâles furent isolés et rétroperfusés selon le modèle de Langendorff et la durée du potentiel d'action monophasique à 90 % de repolarisation (MAPD₉₀) fut mesurée dans le ventricule gauche. Trois concentrations de glucose (1, 5 ou 20 mmol/L) furent testées avec de la dofétilide 20 nmol/L (un bloqueur spécifique d'I_{Kr}), du chromanol 293B 10 µmol/L (un bloqueur spécifique d'I_{Ks}) ou les deux ensembles. Les effets des concentrations de glucose (1, 5 ou 20 mmol/L) sur le blocage d'I_{Kr} induit par la dofétilide 20 nmol/L furent également mesurés dans des cellules HEK293 transfectés avec HERG en utilisant la technique de patch clamp en mode cellule entière. **Résultats:** La dofétilide 20 nmol/L prolongea la MAPD₉₀ de 17.0 ± 0.7 msec avec du glucose 5 mmol/L, 25.1 ± 2.7 msec avec du glucose 1 mmol/L (p<0.01 vs glucose 5 mmol/L) et 24.2 ± 1.3 msec avec du glucose 20 mmol/L (p<0.05 vs glucose 5 mmol/L). Le chromanol 293B 10 µmol/L prolongea la MAPD₉₀ de 7.4 ± 0.2 msec en présence de glucose 5 mmol/L, 7.5 ± 0.3 msec en présence de glucose 1 mmol/L (NS) et 7.3 ± 0.2 msec en présence de glucose 20 mmol/L (NS). Quand les deux médicaments furent perfusés ensembles, la MAPD₉₀ fut prolongée par 35.3 ± 0.8 msec avec du glucose 5 mmol/L, 34.8 ± 1.0 msec avec du glucose 1 mmol/L (NS) et 35.8 ± 1.3 msec avec du glucose 20 mmol/L (NS). La

dofétilide 20 nmol/L inhiba le courant HERG/ I_{Kr} par $47.8 \pm 4.0 \%$ en présence de glucose 5 mmol/L, $62.9 \pm 5.0 \%$ en présence de glucose 1 mmol/L ($p < 0.01$ vs glucose 5 mmol/L) et $60.1 \pm 2.0 \%$ en présence de glucose 20 mmol/L ($p < 0.05$ vs glucose 5 mmol/L). **Conclusion:** Des concentrations faibles et élevées de glucose potentialisent et inhibent les effets de la dofétilide sur la $MAPD_{90}$ et sur le courant HERG respectivement. Par contre, aucune potentiation de la prolongation de la $MAPD_{90}$ induite par le chromanol 293B ne fut observée avec des concentrations faibles et élevées de glucose. Le blocage combiné d' I_{Kr} et d' I_{Ks} donne un prolongement synergique de la $MAPD_{90}$ en présence de glucose 5 mmol/L; cet effet n'était pas significativement différent en présence de glucose 1 ou 20 mmol/L. L'hypo- et l'hyperglycémie observées chez les diabétiques n'augmentent pas seulement la durée de l'intervalle QT, mais peuvent prédisposer à une prolongation encore plus prononcée de l'intervalle QT induite par les médicaments.

2. Abstract

Aims: Diabetes has extensively been associated with QT interval prolongation, which ultimately may trigger life-threatening arrhythmias. The objective of the present study was to evaluate how glucose concentration may modulate drug effects on ventricular repolarization and on cardiac repolarizing potassium currents. **Methods:** Hearts from male Hartley guinea pigs were isolated and retroperfused in the Langendorff mode and monophasic action potential duration was measured at 90 % repolarization (MAPD₉₀) from the left ventricle. Three glucose concentrations (1, 5 or 20 mmol/L) were tested with either dofetilide 20 nmol/L (a specific I_{Kr} blocker), chromanol 293B 10 μmol/L (a specific I_{Ks} blocker) or both. Effects of glucose concentration (1, 5 or 20 mmol/L) on I_{Kr} blockade mediated by dofetilide 20 nmol/L were also measured in HERG-transfected HEK293 cells using the whole cell patch-clamp technique. **Results:** Dofetilide 20 nmol/L prolonged MAPD₉₀ by 17.0±0.7 msec at glucose 5 mmol/L, 25.1±2.7 msec at 1 mmol/L (p<0.01 vs glucose 5 mmol/L) and 24.2±1.3 msec at 20 mmol/L (p<0.05 vs glucose 5 mmol/L). Chromanol 293B 10 μmol/L prolonged MAPD₉₀ by 7.4±0.2 msec at glucose 5 mmol/L, 7.5±0.3 msec at 1 mmol/L (NS) and 7.3±0.2 msec at 20 mmol/L (NS). When both drugs were used concomitantly, MAPD₉₀ was prolonged by 35.3±0.8 msec at glucose 5 mmol/L, 34.8±1.0 msec at 1 mmol/L (NS) and 35.8±1.3 msec at 20 mmol/L (NS). Dofetilide 20 nmol/L inhibited HERG/I_{Kr} current by 47.8±4.0 % at glucose 5 mmol/L, 62.9±5.0 % at 1 mmol/L (p<0.01 vs glucose 5 mmol/L) and 60.1±2.0 % at 20 mmol/L (p<0.05 vs glucose 5 mmol/L). **Conclusion:** Low and high glucose concentrations potentiate the MAPD₉₀-prolonging and HERG-inhibiting effects of

dofetilide. In contrast, no potentiation of the MAPD₉₀-prolonging effect of chromanol 293B is observed at low or high glucose concentration. Combined block of I_{Kr} and I_{Ks} has a synergistic MAPD₉₀-prolonging effect at glucose 5 mmol/L; and this effect is not significantly different at glucose 1 or 20 mmol/L. Hypo- and hyperglycemia observed during diabetes not only increases QT interval duration, but may also predispose to further drug-induced QT prolongation.

3. Introduction

The prevalence of diabetes for all age-groups worldwide was estimated to be 2.8 % in 2000 and 4.4 % in 2030. The total number of people with diabetes is projected to rise from 171 million in 2000 to 366 million in 2030. Considering the global increase in the proportion of people > 65 years of age and the increasing prevalence of obesity worldwide, it is likely that these figures provide an underestimate of the future “diabetes epidemic”¹. Cardiovascular complications of diabetes are typically assigned to macrovascular (coronary artery disease, stroke, peripheral vascular disease) and microvascular (retinopathy, nephropathy and neuropathy) disorders. Much less known is the fact that diabetes (type I and II) has also been extensively associated with increases of both QT interval duration and dispersion in people of all ages and both genders²⁻⁸. In fact, the prevalence of QTc prolongation among diabetic patients was shown to be as high as 26 %⁹. Interestingly, QT prolongation has been extensively observed during both hypo- and hyperglycemia¹⁰⁻¹².

The long QT syndrome (LQTS) is characterized by a prolongation of the QT interval on the ECG and a delayed ventricular repolarization. It is associated with triggering of life-threatening polymorphic ventricular tachycardia (torsades de pointes), which can degenerate into ventricular fibrillation, syncope and sudden death. Of note, large clinical trials have shown that patients with diabetes are at an increased risk for sudden death^{13;14}.

The congenital LQTS is an inherited condition in which arrhythmias are most often the consequence of allelic variants involving either the rapid (I_{Kr}) or slow (I_{Ks}) delayed rectifiers, two major repolarizing potassium currents of the human heart. Acquired LQTS is mainly caused by a wide variety of drugs. One of the most intriguing observations has been that although drug-induced LQTS could theoretically result from blockade of any repolarizing current, almost all of the drugs causing acquired LQTS appear to do so by preferentially blocking I_{Kr} . Moreover, only a minority of subjects treated with these drugs actually develop arrhythmias each time they accidentally take harmful drugs. Therefore, interplay of multiple precipitating factors is probably needed to actually induce proarrhythmia. Indeed, allelic variants in ion channel genes have been identified in some patients suffering from drug-induced LQTS, thus linking congenital and acquired LQTS¹⁵. Interestingly, another report demonstrated that while having little effect on normal subjects, glucose ingestion acutely and markedly increased the QT interval duration and dispersion in congenital LQTS patients, triggering arrhythmias in some of them¹⁶.

Pharmacological studies suggest that in the normal human heart, I_{Kr} and I_{Ks} currents contribute to preserve a stable repolarization process and a sufficiently large repolarization reserve¹⁷. To develop proarrhythmic conditions would require the simultaneous presence of strong repolarization unbalancing forces that can be generated by allelic variants in cardiac ion channel genes, drugs, and other factors, such as the potential link to abnormal glucose metabolism.

It was therefore our hypothesis that on top of their effect on baseline I_{Kr} , hypo- and hyperglycemia might increase I_{Kr} sensitivity to specific blockers such as dofetilide, further increasing their QT-prolonging effect and the risk for cardiac proarrhythmia.

4. Methods

Experiments were performed in accordance with our institutional guidelines on animal research. Animals were housed and maintained in compliance with the *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* of the Canadian Council on Animal Care.

1. Experiments with retroperfused isolated hearts

Drug preparation

Dofetilide (generously supplied by Pfizer, Groton CT), used as a specific I_{Kr} blocker, was dissolved in a limited amount (0.02 % final concentration) of dimethylsulfoxide (DMSO) and then added to the buffer solution at a final concentration of 20 nmol/L. Chromanol 293B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), used as a specific I_{Ks} blocker, was dissolved in a limited amount (0.02 % final concentration) of DMSO and then added to the buffer solution at a final concentration of 10 μ mol/L.

Heart Isolation and Perfusion Technique

Male Hartley guinea pigs (weight, 300-350 g; Charles River Laboratories, Montréal, QC, Canada) were anticoagulated by injection of heparin sodium (400 IU IP). Twenty

minutes later, animals were killed by cervical dislocation, and their hearts were rapidly extirpated and immersed in cold (4°C) Krebs-Henseleit buffer containing (in mmol/L) glucose either 1, 2, 5 or 20, KCl 4.7, CaCl₂ 1.2, NaHCO₃ 25, NaCl 118.5, MgSO₄ 2.5, and KH₂PO₄ 1.2. This solution was continuously gassed with 95 % oxygen plus 5 % carbon dioxide (pH 7.4, 37°C). Each heart was cannulated and retrogradely perfused via the aorta with the Krebs- Henseleit buffer at a constant pressure equivalent to 100 cm H₂O. To permit rapid exchange in perfusion solutions, a double warming coil heart perfusion system (Harvard Apparatus, Holliston, MA) and two parallel liquid columns were used.

Electrophysiological measurements

Hearts were electrically stimulated (EP-2, clinical stimulator, Digital Cardiovascular Instruments Inc.) at a basic cycle length of 150 (with chromanol 293B) or 250 msec (with dofetilide) via two silver electrodes implanted in the epicardium of the right ventricle. A monophasic action potential catheter (Langendorff probe model 225, EP Technologies Inc., Sunnyvale CA) was introduced in the left ventricle through the mitral valve and securely positioned to obtain a visually adequate signal (amplitude >5 mV, stable phase 4). During the protocol, monophasic action potential signals were continuously recorded and sampled at 2000 Hz. The output was analysed using the Notocord-hem version 3.5 software (Notocord Systems, Croissy-sur-Seine, France) for Windows 2000. Average action potential duration at 90 % repolarization (APD₉₀) was calculated for each complex as the average duration from the action potential beginning to 90 % completion of repolarization of the MAP measurement.

Protocols

In a first set of experiments, hearts (n=6/group) were perfused with Krebs-Henseleit buffer containing 5 mmol/L glucose during a control period of 10 minutes to reach stability of the monophasic action potential signal. Thereafter, perfusion was performed for 10 minutes with buffer containing 1 or 20 mmol/L glucose. Perfusion with buffer containing 5 mmol/L glucose was then restarted during a 10-minute washout period to assess reversal of glucose concentration effect.

In a second set of experiments, hearts (n=6/group) were perfused with Krebs-Henseleit buffer containing either 1, 2, 5 or 20 mmol/L glucose during a control period of 10 minutes to reach stability of the monophasic action potential signal. Thereafter, perfusion was performed for 10 minutes with one of the following drug regimen: 20 nmol/L dofetilide, 10 μ mol/L chromanol 293B, or 20 nmol/L dofetilide + 10 μ mol/L chromanol 293B simultaneously. Perfusion with buffer containing no drug was then restarted during a 10-minute washout period to assess reversal of drug effects.

Statistical analysis

Only hearts with reversal of drug or glucose effects upon reperfusion with baseline buffer were included in the analysis. Data on the magnitude of glucose or drug effects were compared with an unpaired Student's *t*-test. All values are expressed as mean \pm S.D. Level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

2. Whole cell patch-clamp experiments

HEK293 cell preparation and electrophysiological measurements

HERG-transfected HEK293 cells were kindly donated by Dr Craig T. January (University of Wisconsin, Madison WI). The stably transfected cells were cultured in minimum essential medium (MEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum, 1X non-essential amino acids solution for MEM (#321-011-EL, Weisent. In mg/L, final: 8.9 L-alanine, 15 L-asparagine.H₂O 13.3 L-aspartic acid, 14.7 L-glutamic acid, 7.5 glycine, 11.5 L-proline, 10.5 L-serine), 1 mmol/L sodium pyruvate, 2 mmol/L L-glutamine and 400 µg/mL G-418. Whole-cell voltage-clamp recordings were performed in 35-mm dishes mounted on the stage of an inverted microscope (Axiovert 35, Zeiss). Currents were recorded in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique using an Axopatch 200A amplifier (Molecular Devices-Axon Instruments, Union City, CA). Voltage clamps were controlled by the pCLAMP software package (version 9.0 Axon Instruments). Patch pipettes used (Warner Instruments, Hamden, CT) were heat-polished to obtain a tip resistance of about 3 MΩ when filled with intracellular solution containing (mmol/L): 110 KCl; 1 MgCl₂.6H₂O; 5 BAPTA-K₄; 5 K₂ATP; 10 HEPES (pH=7.2, adjusted with KOH). Cells were superfused with a control external solution containing (mmol/L): 145 NaCl; 4 KCl; 1.8 CaCl₂.2H₂O; 1 MgCl₂.6H₂O; either 1, 5 or 20 glucose; 10 HEPES (pH=7.35, adjusted with NaOH). Dofetilide solution was prepared daily by dissolving required amount of the drug in DMSO, then added in the Tyrode solution perfusing the cells (maximal final DMSO concentration 0.002 % v/v). Effects of dofetilide on the HERG current were studied in cells clamped at a holding potential of -80 mV. Depolarizing steps were applied for 4 sec to voltages between -50 and +50 mV in 10-mV increments. Tail currents were measured at -40 mV for 6 sec, and cells were then returned to the holding potential (-80 mV).

Data storage and analysis

Currents were low-pass filtered at 1 kHz (4-pole Bessel filter; -3 dB/octave) and sampled at 2 kHz. Magnitude of dofetilide effects for patch-clamp data were analysed with an unpaired Student's *t*-test by comparing cells perfused with dofetilide with cells perfused with buffer containing no drug. All values were expressed as mean \pm SD. Level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

5. Results

1. Experiments with retroperfused isolated hearts

Effects of glucose concentration on MAPD₉₀:

When isolated hearts from guinea pigs were perfused with Krebs-Henseleit buffer containing 5 mmol/L glucose followed by a buffer containing 1 mmol/L glucose, MAPD₉₀ was prolonged by 0.8 ± 3.1 msec ($p > 0.05$, vs glucose 5 mmol/L (Fig.1). However, when hearts were perfused with buffer containing 5 mmol/L glucose followed by a buffer containing 20 mmol/L glucose, MAPD₉₀ was prolonged by 7.5 ± 1.3 msec ($p < 0.001$ vs glucose 5 mmol/L (Fig. 1).

Effects of glucose concentration on MAPD-prolonging properties of dofetilide:

Typical recordings of monophasic action potentials obtained from isolated guinea pig hearts recorded at baseline and during perfusion of dofetilide 20 nmol/L at 1, 5 and 20 mmol/L glucose concentration are illustrated in Figure 2. Dofetilide 20 nmol/L (a specific I_{Kr} blocker) prolonged the MAPD₉₀ by 17.0 ± 0.7 msec in hearts paced at a basic cycle length (BCL) of 250 msec ($n=5$) perfused with glucose 5 mmol/L (equivalent to normoglycemia) (Fig. 3). When perfusing with glucose 2 ($n=5$) and 1 mmol/L ($n=5$) (equivalent to hypoglycemia) dofetilide 20 nmol/L prolonged MAPD₉₀ by 22.0 ± 0.9 and 25.1 ± 2.7 msec respectively (both $p < 0.01$ vs glucose 5 mmol/L). Similarly, when perfusing with glucose 20 mmol/L ($n=5$) (equivalent to hyperglycemia), dofetilide 20 nmol/L prolonged MAPD₉₀ by 24.2 ± 1.3 msec ($p < 0.01$ vs glucose 5 mmol/L).

Effects of glucose concentration on MAPD-prolonging properties of chromanol 293B:

Figure 4 shows that chromanol 293B 10 $\mu\text{mol/L}$ (a specific I_{Ks} blocker) prolonged MAPD_{90} by 7.5 ± 0.3 , 7.4 ± 0.2 and 7.3 ± 0.2 msec when hearts were paced at a BCL of 150 msec and perfused with buffer containing 1 (n=5), 5 (n=5) or 20 mmol/L glucose (n=5) respectively ($p>0.05$ for both glucose 1 and 20 mmol/L, vs glucose 5 mmol/L).

Effects of glucose concentration on the MAPD-prolonging properties of dofetilide + chromanol 293B:

Figure 5 shows the effect of simultaneous $I_{Kr}+I_{Ks}$ blockade with dofetilide 20 nmol/L and chromanol 293B 10 $\mu\text{mol/L}$ on MAPD_{90} . With buffer containing 5 mmol/L glucose in hearts (n=5) paced at a BCL of 250 msec, MAPD_{90} was prolonged by 34.8 ± 1.1 msec compared to 35.3 ± 0.8 and 35.9 ± 1.4 msec with buffer containing 1 (n=5) or 20 mmol/L glucose (n=5) respectively (both $p>0.05$, vs glucose 5 mmol/L).

2. Whole cell patch-clamp experiments

Figure 6 shows typical recordings of HERG currents obtained from stably-transfected HEK293 cells, at baseline, and after perfusion with dofetilide 20 nmol/L in an extracellular buffer containing either 1, 5 or 20 mmol/L glucose.

Effect of glucose concentration on the HERG-blocking properties of dofetilide

Figure 7 shows modulation of HERG-blocking effect of dofetilide 20 nmol/L under different extracellular glucose concentrations. Indeed, dofetilide 20 nmol/L reduced HERG tail current amplitude by 47.8 ± 4.0 % at glucose 5 mmol/L (n=8 cells), but by

62.9±5.5 % and 60.1±2.7 % at glucose 1 and 20 mmol/L respectively (n=8 cells each, both p<0.05 vs glucose 5 mmol/L).

6. Discussion

As diabetes was strongly associated with sympathoadrenal neuropathy, it was generally assumed that increased QT duration and dispersion were due to increased plasma catecholamines concentrations seen during both hypo- and hyperglycemia, and to hypokalemia associated with hyperinsulinemia¹⁰⁻¹². However, ECG parameters during hyperinsulinemia in normoglycemic clamps indicate that insulin levels *per se* do not prolong the QT interval nor increase the QT dispersion^{3;18}. Moreover, further studies^{19;20} aiming to establish an association between QTc prolongation and diabetic autonomic neuropathy revealed that QTc prolongation was also present in diabetic patients without autonomic neuropathy²¹.

Interestingly, Zhang *et al.*²² showed in HERG-transfected HEK293 cells that both acute hypo- and hyperglycemia cause a significant depression of the amplitude of baseline wild-type HERG current, when compared to normoglycemia. They showed that depression of HERG current in hypoglycemia results from underproduction of ATP and in hyperglycemia from overproduction of reactive oxygen species. This report therefore suggested that diabetes, via low or high blood glucose acts as a metabolic insult on repolarization reserve, independently of insulinemia and sympathoadrenal influence. However, this latter study did not look at the possible effect of diabetes and glucose concentration on the pharmacology of I_{Kr} , the main potassium current found to be the target of nearly all QT-prolonging drugs²³.

In the present paper, we report that low (1 mmol/L) and high (20 mmol/L) glucose concentrations potentiate the HERG-blocking effect of dofetilide, a specific I_{Kr} blocker, when compared to normal (5 mmol/L) glucose concentration.

These cellular data were confirmed in the Langendorff-perfused isolated guinea pig heart model. Indeed, we also report that low and high glucose concentrations potentiate the $MAPD_{90}$ -prolonging effect of dofetilide, when compared to normal glucose level. In contrast, no such potentiation of the $MAPD_{90}$ -prolonging effect of chromanol 293B, a specific I_{Ks} blocker, is observed under low or high glucose concentration, when compared to normal glucose. Moreover, as it has been shown before^{24;25}, concomitant block of I_{Kr} and I_{Ks} has a synergistic effect on $MAPD_{90}$. Indeed, as dofetilide 20 nmol/L alone was shown to prolong $MAPD_{90}$ by ~17 msec and chromanol 293B 10 μ mol/L alone by ~8 msec, a “combined prolongation” of ~25 msec would have been expected from a simple additive effect at glucose 5 mmol/L. The combined effect of both drugs was rather shown to be more than additive, reaching ~35 msec. This is a classic example of the effect of a combined attack on the repolarization reserve. However, $MAPD_{90}$ -prolonging effect of combined dofetilide and chromanol 293B is not significantly different at glucose 1 or 20 mmol/L, when compared to glucose 5 mmol/L ($p>0.05$). In fact, this synergistic effect is observed at all glucose concentrations.

Therefore, deviation from normal glucose concentration on either side (hypo- or hyperglycemia) not only reduces baseline $HERG/I_{Kr}$ ²², but potentiates HERG current block and MAPD-prolonging effect of drugs such as dofetilide, further decreasing the repolarization reserve and increasing the risk for excessive QT interval prolongation and cardiac proarrhythmia.

The fact that we observe the same effect on “either side of normoglycemia” seems intriguing at first. Indeed, it is not intuitive that both hypo- and hyperglycemia may result in similar electrophysiological and pharmacological phenotypes. However, getting back to clinical observations and as mentioned before, numerous reports have indeed shown similar effects on the ECG of both hypo- and hyperglycemia in diabetic patients, i.e. prolongation of the QT interval¹⁰⁻¹².

In fact, there is a possible unifying explanation for these similar electrophysiological and pharmacological effects observed during either hypo- or hyperglycemia. First, before considering the modulating effect of glucose concentration on any QT-prolonging drug, one must remind that Zhang *et al.* have shown that depression of baseline HERG current amplitude results from underproduction of ATP during hypoglycemia and from overproduction of reactive oxygen species during hyperglycemia²².

Underproduction of ATP in HERG-transfected HEK293 cells:

As low levels of intracellular ATP were shown to reduce baseline HERG current amplitude, it is reasonable to think that they may also affect other ATP-dependent intracellular machineries, such as the P-glycoprotein drug efflux transporter.

P-glycoprotein (P-gp) is a plasma membrane glycoprotein of about 170 kD that belongs to the superfamily of ATP-binding cassette (ABC) transporters²⁶. P-gp functions as an energy-dependent drug efflux pump that lowers intracellular drug concentrations. Expressed in tumor cells, P-gp causes the *multi drug resistance* (MDR) phenotype by the active extrusion of a wide variety of cancer chemotherapeutic drugs²⁷. Interestingly, P-gp expression is not only confined to tumor cells, but also present in numerous tissues including the human heart²⁸⁻³¹. More interestingly, in large clinical trials involving a total of 1445 patients, P-glycoprotein substrates and inhibitors, among other drugs, were shown to cause a difference in clearance of dofetilide ranging between -16 and +3 %³², thus strongly suggesting that dofetilide is indeed a P-gp substrate. This is also consistent with the fact that dofetilide is a CYP3A4 substrate³³ and that considerable overlap exists between CYP3A4 and P-gp substrates²⁶.

Getting back to our cellular model, endogenous ABCB1 (P-gp) is indeed expressed in HEK293 cells³⁴. Furthermore, dofetilide binding site on the HERG channel was shown to be located on the intracellular site of the S6 segment of the protein, as the vast majority of HERG-blocking drugs^{35:36}. As a consequence, hypoglycemia would not only reduce baseline HERG current via ATP depletion, but also reduce intracellular dofetilide

extrusion, thus increasing its HERG-blocking effect. This would also be applicable to other HERG-blocking drugs. Indeed, we have previously shown similar results during low glucose exposure with *d*-sotalol³⁷.

Underproduction of ATP in isolated retroperfused isolated guinea pig hearts:

As expression of P-gp was also demonstrated in guinea pig ventricular myocytes^{38,39}, it is likely that potentiation of MAPD₉₀-prolonging effect of dofetilide during perfusion with low glucose buffer is also due to P-gp inhibition via depletion of intracellular ATP. Interestingly, this would also be applicable to the human heart, as it has been shown to express P-gp²⁸⁻³¹.

Overproduction of reactive oxygen species (ROS) in HERG-transfected HEK293 cells:

The consequence of hyperglycemia in the physiological process of oxidative phosphorylation is the generation of excessive amounts of ROS as by-products of the consumption of molecular oxygen in the electron transport chain⁴⁰. Superoxide anion O₂⁻ was found to be the major ROS produced under hyperglycemia, along with H₂O₂ and the highly reactive hydroxyl group (OH)²². Interestingly, NADPH oxidase, which was found to be a major source of glucose-induced oxidative stress during hyperglycemia via O₂⁻ production⁴¹, is endogenously expressed in HEK293 cells⁴².

Therefore, in addition to damages induced to mitochondria, ROS may diffuse throughout the cytoplasm and cause further deleterious effects on other cellular structures and processes, such as P-gp and its drug extrusion activity. Indeed, down regulation of P-gp expression and activity under the effect of ROS was demonstrated⁴³⁻⁴⁵. Reduction of dofetilide extrusion from its intracellular binding site, via ROS-mediated down regulation of P-gp activity during hyperglycemia, may explain potentiation of the drug's HERG-blocking effect. This would also be applicable to other HERG-blocking drugs. Indeed, we have previously shown similar results during high glucose exposure with *d*-sotalol³⁷.

Over production of ROS in isolated retroperfused isolated guinea pig hearts:

Again, as expression of P-gp and NADPH oxidase were also demonstrated in guinea pig ventricular myocytes^{38;46}, it is likely that potentiation of MAPD₉₀-prolonging effect of dofetilide during perfusion with high glucose buffer is also due to P-gp down regulation via over exposure to ROS. Interestingly, this would also be applicable to the human heart, as it has been shown to express P-gp²⁸⁻³¹. Along those lines, we have previously demonstrated the concept of potentiation of MAPD-prolonging effect of an I_{Kr}-blocker by inhibition of intracellular drug extrusion⁴⁷. Indeed, under the effect of verapamil, a P-gp inhibitor, we have shown concentration- and time-dependent potentiation of the MAPD-prolonging effect of cisapride. In fact, intracellular concentrations of cisapride were shown to be significantly higher in cardiomyocytes from animals treated with verapamil, when compared to those treated with saline. More recently, we confirmed the modulating role of P-gp on the HERG-blocking properties of domperidone, a well-

characterized I_{Kr} -blocker⁴⁸ and P-gp substrate³⁹. Indeed, we showed that when MDR1 (P-gp) is co-transfected with HERG in HEK293 cells, block of I_{Kr} by domperidone 100 nmol/L is dramatically reduced⁴⁹. This illustrates the same concept, but in the opposite direction.

Animal models of type I diabetes: Effects on cardiac repolarization

A number of cardiac electrophysiological studies on animal models of diabetes were carried out in the past⁵⁰⁻⁵³. However, these were conducted nearly exclusively in rats and mice, two species that do not express phenotypically and physiologically significant I_{Kr} and I_{Ks} in their adulthood. Therefore, use of these species appears questionable when one wishes to study the modulating role of diabetes on the QT interval and on LQTS phenotype, as LQTS in humans is mostly an " I_{Kr}/I_{Ks} disease". More interestingly, in the recent past, studies using one of the very few I_{Kr}/I_{Ks} -bearing mammalian animal species (dog, rabbit and guinea pig) have evaluated the modulating role of diabetes on cardiac repolarization. Indeed, Lengyel *et al.*⁵⁴, using the alloxan-induced diabetic canine heart have shown action potential prolongation and significant reduction in the density of I_{Ks} in the alloxan-treated group. They showed that this reduction of I_{Ks} was likely due to a diminished expression of minK (KCNE1), the gene encoding the β -subunit of I_{Ks} . Interestingly, this was corrected upon exposure to insulin. No such difference was observed in the density of I_{Kr} . Latter on, similar results were obtained by the same group using the alloxan-treated diabetic rabbit heart⁵⁵. Zhang *et al.*⁵⁶, also using the alloxan-treated diabetic rabbit heart, came up with results a bit different. Indeed, they showed, among other things, ~20 % QT prolongation, ~70 % reduction in the density of I_{Kr} and

~40 % reduction in the density of I_{Ks} in the alloxan-treated animals. Indeed, they showed reduction of expression of HERG, KCNQ1 (encoding the α -subunit of I_{Ks}), and KCNE1, thus explaining reduction of both I_{Kr} and I_{Ks} in their alloxan-treated rabbits.

However, again, none of these studies has evaluated the possible modulating effect of diabetes on the QT- and/or MAPD-prolonging properties of I_{Kr} and I_{Ks} blocking drugs such as dofetilide and chromanol 293B.

7. Conclusion

Low and high glucose concentrations potentiate the MAPD₉₀-prolonging and I_{Kr}-blocking effects of dofetilide. It does not appear to be the case when block of I_{Ks} is performed with chromanol 293B, or when block of I_{Kr} and I_{Ks} is performed simultaneously. These results suggest that glycemic level could represent a major determinant of I_{Kr} block and hence, of drug-induced long QT syndrome. Further studies using I_{Kr}/I_{Ks}-bearing animal species will therefore be required to assess this potential drug-modulating effect of diabetes in a more physiologically relevant context. Moreover, as 90 % of clinical cases of diabetes are Type II diabetes, studies involving diet-induced animal models of this form of the disease are definitely warranted.

8. References

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;**27**:1047-1053.
2. Suys BE, Huybrechts SJ, De Wolf D, Op De Beeck, Matthys D, Van Overmeire B *et al*. QTc interval prolongation and QTc dispersion in children and adolescents with type 1 diabetes. *J Pediatr*. 2002;**141**:59-63.
3. Landstedt-Hallin L, Englund A, Adamson U, Lins PE. Increased QT dispersion during hypoglycaemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Intern Med*. 1999;**246**:299-307.
4. Marques JL, George E, Peacey SR, Harris ND, Macdonald IA, Cochrane T *et al*. Altered ventricular repolarization during hypoglycaemia in patients with diabetes. *Diabet Med*. 1997;**14**:648-654.
5. Brown DW, Giles WH, Greenlund KJ, Valdez R, Croft JB. Impaired fasting glucose, diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk factors are associated with prolonged QTc duration. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Cardiovasc Risk*. 2001;**8**:227-233.
6. Veglio M, Bruno G, Borra M, Macchia G, Bargero G, D'Errico N *et al*. Prevalence of increased QT interval duration and dispersion in type 2 diabetic patients and its relationship with coronary heart disease: a population-based cohort. *J Intern Med*. 2002;**251**:317-324.

7. Linnemann B, Janka HU. Prolonged QTc interval and elevated heart rate identify the type 2 diabetic patient at high risk for cardiovascular death. The Bremen Diabetes Study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2003;**111**:215-222.
8. Dekker JM, Feskens EJ, Schouten EG, Klootwijk P, Pool J, Kromhout D. QTc duration is associated with levels of insulin and glucose intolerance. The Zutphen Elderly Study. *Diabetes*. 1996;**45**:376-380.
9. Borra M, Veglio M, Bruno G. Prevalence of QTc prolongation in type II diabetics: an Italian population-based cohort. *Diabetologia*. 1999;**42**[Suppl.1]: A295.
10. Robinson RT, Harris ND, Ireland RH, Lee S, Newman C, Heller SR. Mechanisms of abnormal cardiac repolarization during insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes*. 2003;**52**:1469-1474.
11. Eckert B, Agardh CD. Hypoglycaemia leads to an increased QT interval in normal men. *Clin Physiol*. 1998;**18**:570-575.
12. Marfella R, Nappo F, De Angelis L, Siniscalchi M, Rossi F, Giugliano D. The effect of acute hyperglycaemia on QTc duration in healthy man. *Diabetologia*. 2000;**43**:571-575.
13. Curb JD, Rodriguez BL, Burchfiel CM, Abbott RD, Chiu D, Yano K. Sudden death, impaired glucose tolerance, and diabetes in Japanese American men. *Circulation*. 1995;**91**:2591-2595.

14. Ewing DJ, Boland O, Neilson JM, Cho CG, Clarke BF. Autonomic neuropathy, QT interval lengthening, and unexpected deaths in male diabetic patients. *Diabetologia*. 1991;**34**:182-185.
15. Yang P, Kanki H, Drolet B, Yang T, Wei J, Viswanathan PC *et al*. Allelic variants in long-QT disease genes in patients with drug-associated torsades de pointes. *Circulation*. 2002;**105**:1943-1948.
16. Nishizaki M, Ashikaga T, Yamawake N, Fujii H, Arita M, Sumitomo N *et al*. Effects of glucose-induced insulin secretion on ventricular repolarization in patients with congenital long QT syndrome. *Circ J*. 2002;**66**:35-40.
17. Roden DM. Long QT syndrome: reduced repolarization reserve and the genetic link. *J Intern Med*. 2006;**259**:59-69.
18. Iacobellis G, Curione M, Di Bona S, Ribaudo MC, Zappaterreno A, Vecci E *et al*. Effect of acute hyperinsulinemia on ventricular repolarization in uncomplicated obesity. *Int J Cardiol*. 2005;**99**:161-163.
19. Ewing DJ, Neilson JM. QT interval length and diabetic autonomic neuropathy. *Diabet Med*. 1990;**7**:23-26.
20. Chambers JB, Sampson MJ, Sprigings DC, Jackson G. QT prolongation on the electrocardiogram in diabetic autonomic neuropathy. *Diabet Med*. 1990;**7**:105-110.
21. Lo SS, Sutton MS, Leslie RD. Information on type 1 diabetes mellitus and QT interval from identical twins. *Am J Cardiol*. 1993;**72**:305-309.

22. Zhang Y, Han H, Wang J, Wang H, Yang B, Wang Z. Impairment of human ether-a-go-go-related gene (HERG) K⁺ channel function by hypoglycemia and hyperglycemia. Similar phenotypes but different mechanisms. *J Biol Chem.* 2003;**278**:10417-10426.
23. Gupta A, Lawrence AT, Krishnan K, Kavinsky CJ, Trohman RG. Current concepts in the mechanisms and management of drug-induced QT prolongation and torsade de pointes. *Am Heart J.* 2007;**153**:891-899.
24. Fiset C, Drolet B, Hamelin BA, Turgeon J. Block of IKs by the diuretic agent indapamide modulates cardiac electrophysiological effects of the class III antiarrhythmic drug dl-sotalol. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;**283**:148-156.
25. Geelen P, Drolet B, Lessard E, Gilbert P, O'Hara GE, Turgeon J. Concomitant Block of the Rapid (I(Kr)) and Slow (I(Ks)) Components of the Delayed Rectifier Potassium Current is Associated With Additional Drug Effects on Lengthening of Cardiac Repolarization. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 1999;**4**:143-150.
26. Zhang Y, Benet LZ. The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin Pharmacokinet.* 2001;**40**:159-168.
27. Patel NH, Rothenberg ML. Multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Invest New Drugs.* 1994;**12**:1-13.
28. Meissner K, Sperker B, Karsten C, Zu Schwabedissen HM, Seeland U, Bohm M *et al.* Expression and localization of P-glycoprotein in human heart: effects of cardiomyopathy. *J Histochem Cytochem.* 2002;**50**:1351-1356.

29. Meissner K, Jedlitschky G, Meyer zu SH, Dazert P, Eckel L, Vogelgesang S *et al.* Modulation of multidrug resistance P-glycoprotein 1 (ABCB1) expression in human heart by hereditary polymorphisms. *Pharmacogenetics*. 2004;**14**:381-385.
30. Solbach TF, König J, Fromm MF, Zolk O. ATP-binding cassette transporters in the heart. *Trends Cardiovasc Med*. 2006;**16**:7-15.
31. Oswald S, Grube M, Siegmund W, Kroemer HK. Transporter-mediated uptake into cellular compartments. *Xenobiotica*. 2007;**37**:1171-1195.
32. Dofetilide (Tikosyn[™]) monograph. Pfizer. 2008.
33. Walker DK, Alabaster CT, Congrave GS, Hargreaves MB, Hyland R, Jones BC *et al.* Significance of metabolism in the disposition and action of the antidysrhythmic drug, dofetilide. In vitro studies and correlation with in vivo data. *Drug Metab Dispos*. 1996;**24**:447-455.
34. Gow JM, Chinn LW, Kroetz DL. The effects of ABCB1 3'-untranslated region variants on mRNA stability. *Drug Metab Dispos*. 2008;**36**:10-15.
35. Lees-Miller JP, Duan Y, Teng GQ, Duff HJ. Molecular determinant of high-affinity dofetilide binding to HERG1 expressed in *Xenopus* oocytes: involvement of S6 sites. *Mol Pharmacol*. 2000;**57**:367-374.
36. Sanguinetti MC, Chen J, Fernandez D, Kamiya K, Mitcheson J, Sanchez-Chapula JA. Physicochemical basis for binding and voltage-dependent block of hERG channels by structurally diverse drugs. *Novartis Found Symp*. 2005;**266**:159-166.

37. Hreiche R, Ricard G, Turgeon J, Drolet B. Modulatory effects of glucose concentrations on cardiac repolarization under conditions of drug-induced blockade of I_{Kr} and/or I_{Ks} currents in guinea pigs. *Clin Pharmacol Ther* 2007;**81**[Suppl 1]:S48-S49.
38. Couture L, Nash J, Nguyen L, Turgeon J. Effects of verapamil pre-treatment on the distribution of a p-glycoprotein substrate, ^3H -domperidone, in heart and whole-body tissues of Hartley guinea pigs. *Clin Pharmacol Ther* 2006;**79**[Suppl 1]:P80.
39. Couture L, Nash J, Nguyen L, Turgeon J. Effects of verapamil pre-treatments on the distribution of ^3H -domperidone, a p-glycoprotein substrate, to the heart and other tissues of male and female Hartley guinea pigs. *Clin Pharmacol Ther* 2007;**81**[Suppl 1]: S91.
40. Wallace DC. A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing. *Novartis Found Symp.* 2001;**235**:247-263.
41. Lu T, He T, Katusic ZS, Lee HC. Molecular mechanisms mediating inhibition of human large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels by high glucose. *Circ Res.* 2006;**99**:607-616.
42. Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK *et al.* Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem.* 2004;**279**:45935-45941.

43. Cai Y, Lu J, Miao Z, Lin L, Ding J. Reactive oxygen species contribute to cell killing and p-glycoprotein downregulation by salvicine in multidrug resistant K562/A02 cells. *Cancer Biol Ther.* 2007;**6**:1794-1799.
44. Wartenberg M, Ling FC, Schallenberg M, Baumer AT, Petrat K, Hescheler J *et al.* Down-regulation of intrinsic P-glycoprotein expression in multicellular prostate tumor spheroids by reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2001;**276**:17420-17428.
45. Wartenberg M, Hoffmann E, Schwindt H, Grunheck F, Petros J, Arnold JR *et al.* Reactive oxygen species-linked regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in Nox-1 overexpressing prostate tumor spheroids. *FEBS Lett.* 2005;**579**:4541-4549.
46. MacCarthy PA, Grieve DJ, Li JM, Dunster C, Kelly FJ, Shah AM. Impaired endothelial regulation of ventricular relaxation in cardiac hypertrophy: role of reactive oxygen species and NADPH oxidase. *Circulation.* 2001;**104**:2967-2974.
47. Morissette P, Hreiche R, Turgeon J. Modulatory role of verapamil treatment on the cardiac electrophysiological effects of cisapride. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006;**84**:1285-1290.
48. Drolet B, Rousseau G, Daleau P, Cardinal R, Turgeon J. Domperidone should not be considered a no-risk alternative to cisapride in the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Circulation.* 2000;**102**:1883-1885.
49. Plante I, Hreiche R, Bélanger F, Turgeon J. P-glycoprotein (*MDR1*) expression modulates IC₅₀ of domperidone for block of the rapid component of the delayed

rectifier potassium current (IKr) in a HEK293 cell line stably expressing HERG. *Clin Pharmacol Ther* 2008;**83**[Suppl 1]:S83-S84.

50. Shimoni Y, Firek L, Severson D, Giles W. Short-term diabetes alters K⁺ currents in rat ventricular myocytes. *Circ Res*. 1994;**74**:620-628.
51. Shimoni Y. Inhibition of the formation or action of angiotensin II reverses attenuated K⁺ currents in type 1 and type 2 diabetes. *J Physiol*. 2001;**537**:83-92.
52. Shimoni Y, Ewart HS, Severson D. Type I and II models of diabetes produce different modifications of K⁺ currents in rat heart: role of insulin. *J Physiol*. 1998;**507**(Pt 2):485-496.
53. Shimoni Y, Chuang M, Abel ED, Severson DL. Gender-dependent attenuation of cardiac potassium currents in type 2 diabetic db/db mice. *J Physiol*. 2004;**555**:345-354.
54. Lengyel C, Virag L, Biro T, Jost N, Magyar J, Biliczki P *et al*. Diabetes mellitus attenuates the repolarization reserve in mammalian heart. *Cardiovasc Res*. 2007;**73**:512-520.
55. Lengyel C, Virag L, Kovacs PP, Kristof A, Pacher P, Kocsis E *et al*. Role of slow delayed rectifier K⁺-current in QT prolongation in the alloxan-induced diabetic rabbit heart. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008;**192**:359-368.
56. Zhang Y, Xiao J, Lin H, Luo X, Wang H, Bai Y *et al*. Ionic mechanisms underlying abnormal QT prolongation and the associated arrhythmias in diabetic

rabbits: a role of rapid delayed rectifier K⁺ current. *Cell Physiol Biochem.*
2007;**19**:225-238.

9. Figure Legends

Figure 1: MAPD₉₀ prolongation (msec) observed in hearts isolated from guinea pigs perfused with buffer containing 5 mmol/L glucose followed by 1 mmol/L glucose and buffer containing 5 mmol/L glucose followed by 20 mmol/L glucose (n=6 per group, ***: p<0.001, vs 5 mmol/L glucose).

Figure 2: Recordings of monophasic action potential signals obtained from isolated guinea pig hearts exposed to Krebs-Henseleit buffer containing no drug or dofetilide 20 nmol/L at 1, 5 or 20 mmol/L glucose concentration.

Figure 3: MAPD₉₀ prolongation (msec) observed in hearts isolated from guinea pigs perfused with buffer containing dofetilide 20 nmol/L at 1, 2, 5 or 20 mmol/L glucose concentration (n=6 per group, **: p<0.01 vs 5 mmol/L glucose).

Figure 4: MAPD₉₀ prolongation (msec) observed in hearts isolated from guinea pigs perfused with buffer containing chromanol 293B 10 μ mol/L at 1, 5 or 20 mmol/L glucose concentration (n=6 per group, both 1 and 20 mmol/L glucose p>0.05 vs 5 mmol/L glucose).

Figure 5: MAPD₉₀ prolongation (msec) observed in hearts isolated from guinea pigs perfused with buffer containing dofetilide 20 nmol/L + chromanol 293B 10 μ mol/L at 1, 5 or 20 mmol/L glucose concentration (n=6 per group, both 1 and 20 mmol/L glucose p>0.05 vs 5 mmol/L glucose).

Figure 6: Typical recordings of HERG activating and tail currents are shown in HEK293 cells before and after exposure to dofetilide 20 nmol/L with 1, 5 or 20 mmol/L extracellular glucose concentration.

Figure 7: HERG-blocking effect of dofetilide 20 nmol/L in HEK293 cells under different extracellular glucose concentrations (1, 5 or 20 mmol/L) (n=8 per group, *: $p < 0.05$ vs 5 mmol/L glucose).

Figure 1

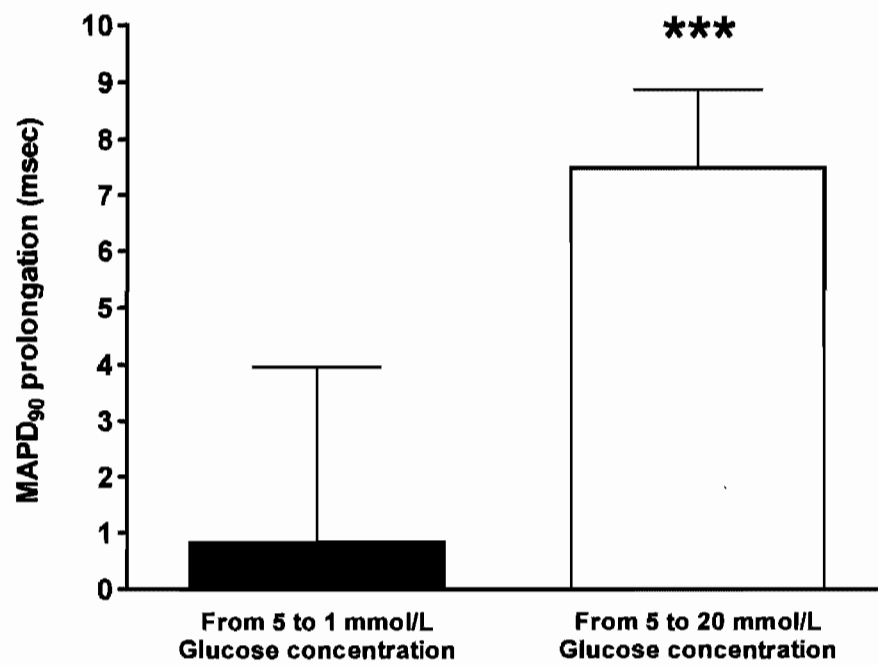


Figure 2

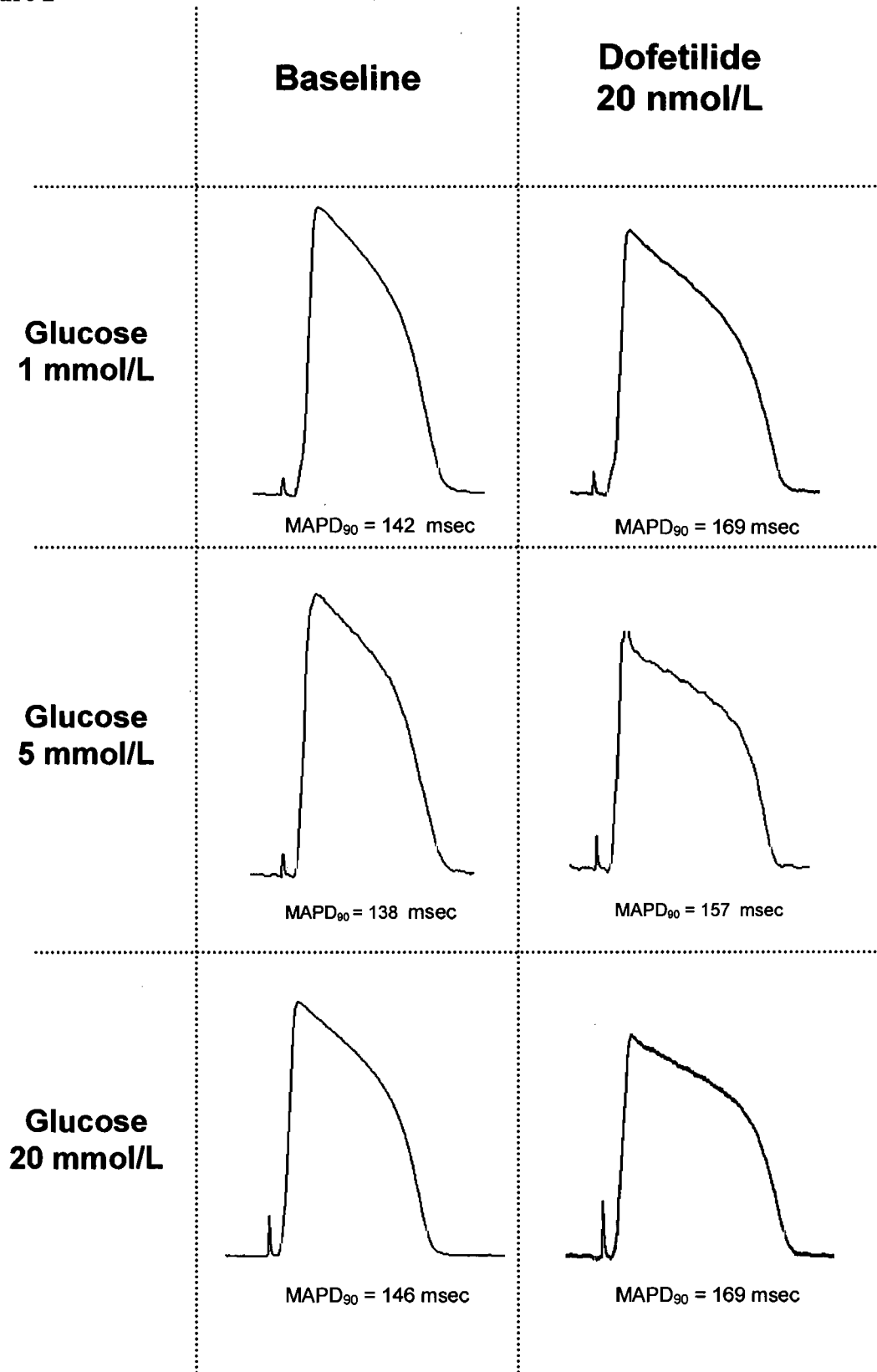


Figure 3

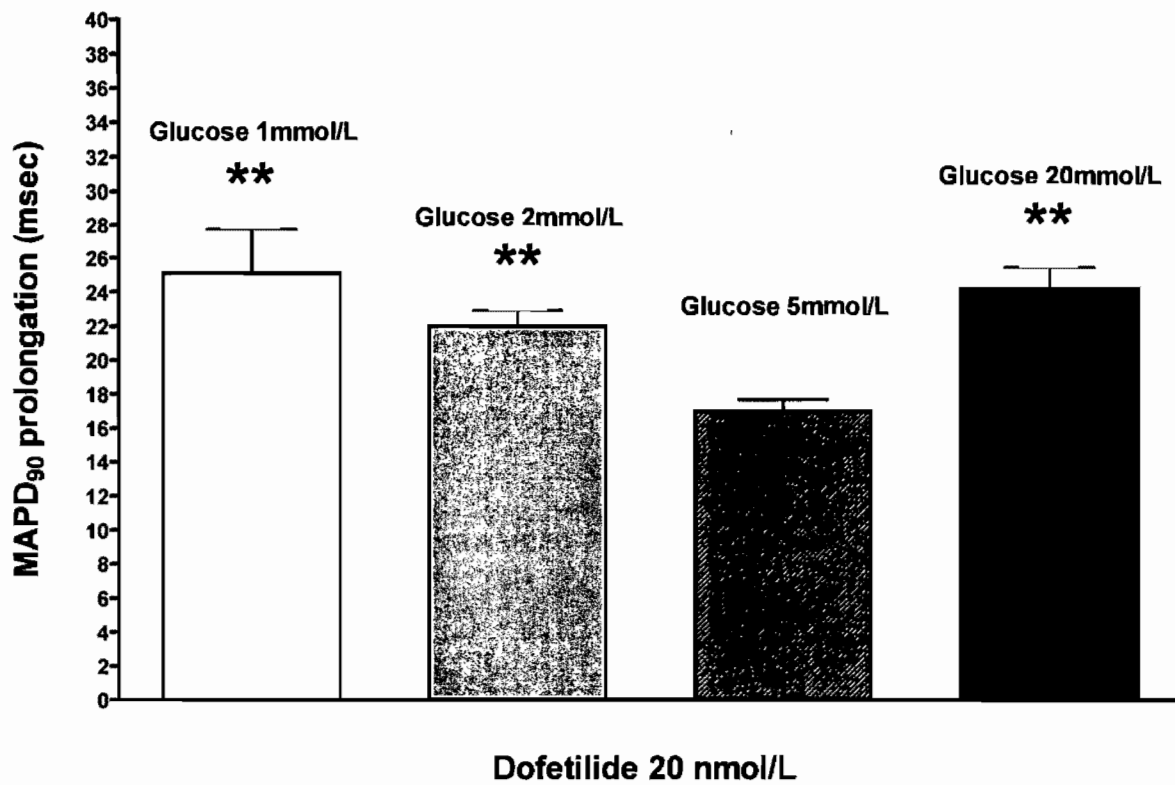


Figure 4

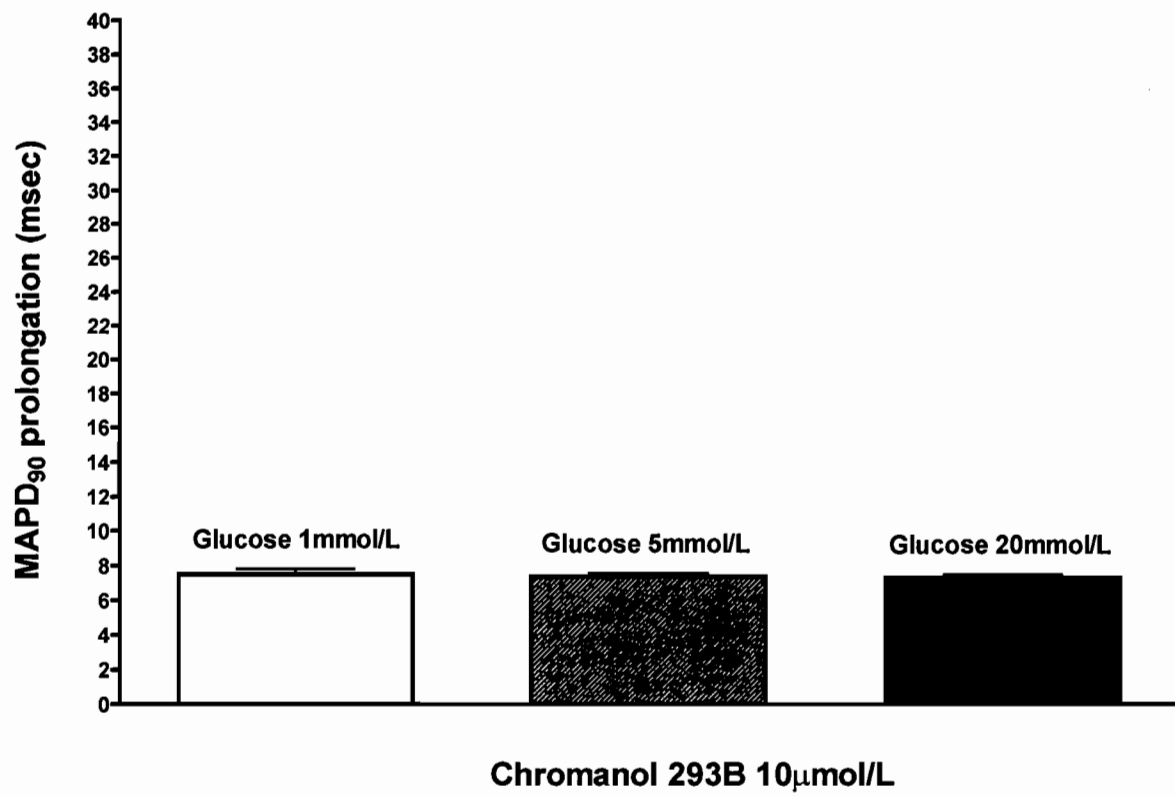


Figure 5

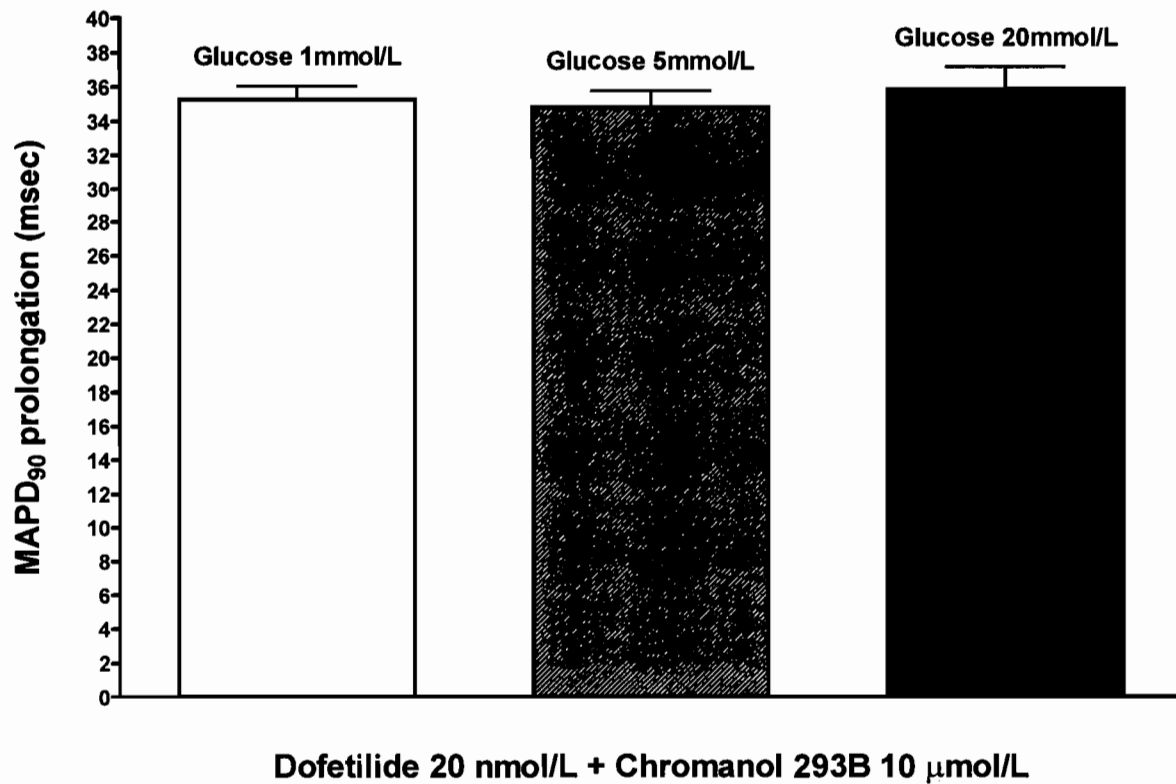


Figure 6

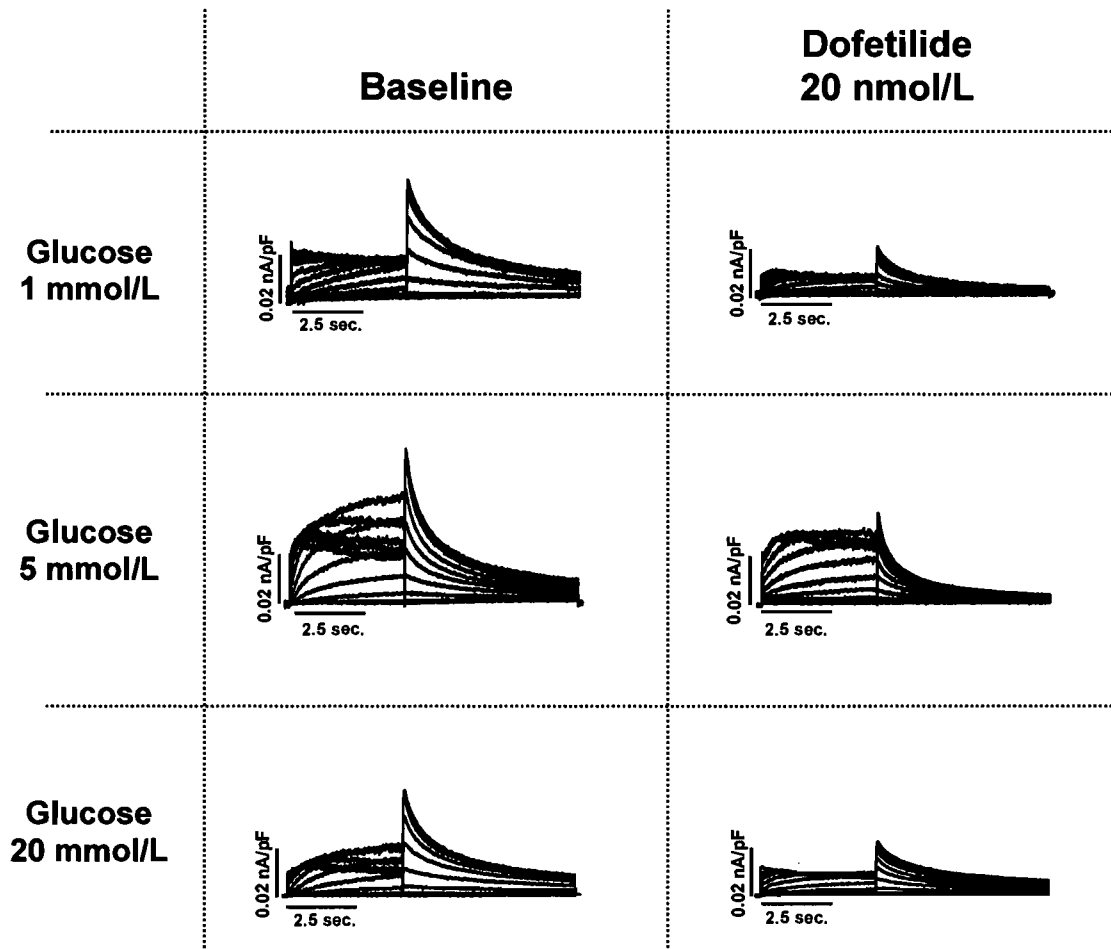
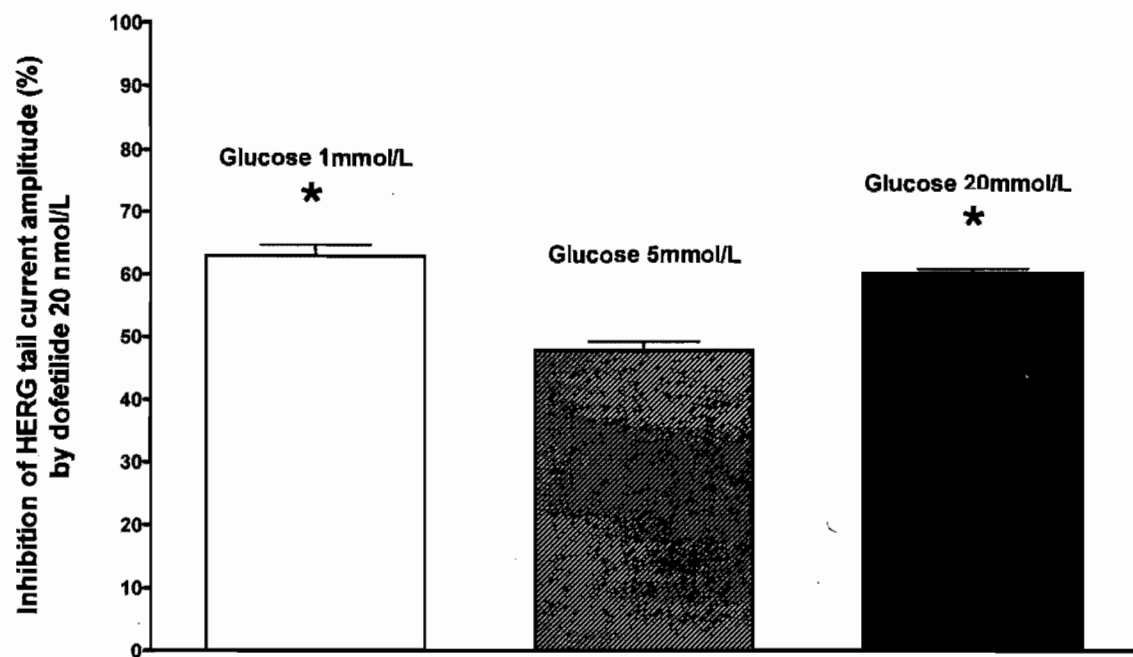


Figure 7



CHAPITRE VI

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Discussion générale et Conclusion

Les médicaments identifiés pour leur capacité à prolonger l'intervalle QT n'induisent des phénomènes proarythmiques que chez un très faible nombre d'individus. Ces derniers semblent en effet présenter des facteurs prédisposants qui vont favoriser ou accélérer le développement de TdP. Pour cela, les objectifs de ces travaux de doctorat consistaient à étudier et évaluer plusieurs facteurs de risque prédisposant au LQTS médicamenteux, qui ont été longtemps connus mais dont le mécanisme sous-jacent a été mal ou partiellement élucidé.

Pour arriver à cette fin, deux techniques complémentaires d'électrophysiologie cardiaque ont été utilisées, i.e. la perfusion de cœurs isolés de cobayes, et la technique de « voltage imposé » (patch-clamp en anglais) en configuration de cellule entière (whole cell).

Choix de l'espèce animale pour ces études

Le laboratoire du Dr Turgeon a développé une importante expertise dans les études électrophysiologiques chez le cobaye qui représente un modèle idéal pour étudier I_{Kr} et I_{Ks} dans des cœurs isolés et perfusés. Pour étudier le transporteur membranaire P-gp, le modèle de souris muté pour le gène *mdr1a* représente un modèle intéressant pour des études complémentaires. Cependant, I_{Kr} est exprimé principalement chez les souris embryonnaires mais ne peut être détecté chez les souris mâles. Le cobaye représente également un modèle intéressant pour étudier les différences mâles-femelles.

Microélectrodes sur cœurs entiers isolés de cobayes

La préparation de cœur perfusé de mammifères fut mise au point en 1897 par Oscar Langendorff. Cette méthode fut développée en se basant sur le modèle de perfusion de cœur de grenouille établi par Elias Cyon en Allemagne en 1866. Très peu de modèles expérimentaux d'organes isolés furent autant utilisés à travers les années que le modèle de Langendorff. Parmi les *avantages* de cette méthode, il a été démontré qu'elle fournit des résultats hautement reproductibles, et permet un large spectre d'études physiologiques, morphologiques, biochimiques et pharmacologiques, incluant la fonction contractile, la fréquence cardiaque, la fonction vasculaire coronaire, le métabolisme cardiaque, la morphologie et l'activité électrique du cœur. Bien que le cœur soit isolé de l'organisme entier, l'organe reste quand même intact, et lorsqu'on lui fournit un environnement approprié (e.g. l'oxygénation, la température, le tampon physiologique), le cœur bat spontanément et la méthode reste relativement physiologique. Cette méthode permet également d'exclure toute influence de la circulation systémique et des systèmes nerveux autonome (SNA) et central (SNC), permettant de déceler l'action directe des médicaments (détermination précise de la relation concentration/réponse) sur les différents paramètres cardiaques.

Par contre, plusieurs *inconvenients/limites* peuvent être associés au système de perfusion de Langendorff. En effet, un risque de préconditionnement du cœur lors de l'isolation et l'instrumentation est présent, d'où la rapidité de manipulation est nécessaire.

Dans notre cas, ce modèle *ex vivo* de cœur isolé de cobaye nous permet de mesurer les potentiels d'action monophasiques (MAP) avec une électrode de contact de type Franz. Contrairement aux ECG de surface qui représentent la somme de l'activité électrique totale du cœur, les MAP fournissent une indication des changements locaux de potentiel

transmembranaire. Hors, le MAP n'est pas représentatif des changements d'amplitude réelle du potentiel transmembranaire mais représente avec fidélité les changements de voltage dans le temps. Ainsi, bien que l'amplitude de la phase de dépolarisation 0 n'est pas exacte, le changement de la durée du MAP reste une valeur très fiable longuement utilisée en électrophysiologie cardiaque; elle permet ainsi de mesurer les changements dans la repolarisation cardiaque [1]. Des enregistrements de signaux de ces électrodes permettent la mesure de la durée du potentiel d'action des cellules adjacentes et cette mesure est considérée une reproduction fiable de la durée du potentiel d'action mesurée par des techniques intracellulaires [2]. Des enregistrements stables jusqu'à 2 heures ont été rapportés avec un cathéter conventionnel de MAP *in vivo* chez les animaux et les humains [3]. De plus, Hamlin *et al.* ont conclu en 2004 que la capacité d'identifier le prolongement de l'intervalle QT dans ce modèle de perfusion chez le cobaye présentait une sensibilité de 1 (26 positifs sur un total de 26 qui prolongent l'intervalle QT) et une spécificité également de 1 (13 négatifs sur un total de 13 qui ne prolongent pas l'intervalle QT) [4]. Ils conclurent également que la préparation de cœur isolé de cobaye était égale ou même supérieure à d'autres préparations *in vitro* puisque le cobaye contient tous les types tissulaires, récepteurs et canaux (sauf I_{to}) sur lesquels une molécule peut avoir un impact et altérer la repolarisation ventriculaire.

Technique de patch-clamp en mode cellule entière.

Le patch clamp est une technique couramment utilisée en électrophysiologie cardiaque et neuronale, permettant d'utiliser l'activité électrique d'une cellule au repos et en action. Elle permet également d'étudier tous les courants ioniques de la membrane cytoplasmique entière ou d'étudier un canal ionique spécifique tel qu' I_{Kr} .

Techniquement, elle consiste à mettre en continuité électrique une micropipette en verre avec la cellule d'intérêt, de rompre la membrane et d'étudier l'activité macroscopique de l'ensemble des courants cellulaires. Ce mode est appelé cellule entière (ou *whole cell* en anglais).

L'avantage de cette technique est d'étudier avec précision la relation directe de cause à effet d'un médicament envers un canal ionique particulier – qui est $HERG/I_{Kr}$ dans notre cas. Ainsi, dans nos travaux, nous avons utilisé une lignée cellulaire stable HEK293 exprimant *HERG* (généreusement fournie par Dr. Craig January, Université du Wisconsin). De plus, pour évaluer les effets de la P-gp, nous avons transfecté le gène responsable de cette protéine, *MDR1*, dans les cellules exprimant *HERG*. Ceci nous permettait d'étudier l'interaction directe entre l'expression de la P-gp dans les cellules et le blocage du courant I_{Kr} par un médicament spécifique.

Cependant, un des inconvénients de cette technique réside dans le fait qu'on est loin du modèle physiologique réel *in vivo*, et il faut être très prudent avant d'extrapoler les résultats observés en patch clamp par rapport à ce qui pourrait être observé dans l'organisme entier.

Sexe féminin comme facteur de risque du LQTS médicamenteux

Dans le chapitre II, nous avons évalué chez des cobayes mâles et femelles les différences liées au sexe dans la prolongation de la repolarisation cardiaque sous les conditions de blocage d' I_{Kr} , d' I_{Ks} , et d'un blocage concomitant d' I_{Kr}/I_{Ks} . Cette étude avait pour but principal une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents aux différences liées au sexe dans le LQTS médicamenteux, et ceci indépendamment de l'effet des hormones sexuelles. Afin d'éliminer le rôle de ces hormones sur les canaux ioniques, les

expériences ont été effectuées chez des cobayes en âge de pré-puberté. De plus, nous voulions évaluer l'effet potentiel de la modulation des transporteurs membranaires par le vérapamil (modulateur des transporteurs membranaires) en fonction du sexe. Cette évaluation fut effectuée en traitant les cobayes mâles et femelles par du verapamil pendant 5 jours avant l'isolation et la perfusion des cœurs; ce prétraitement fut préalablement décrit par notre équipe dans l'article de Morissette *et al.* [5].

Les résultats obtenus dans cette étude ont démontré une différence liée au sexe lors d'un blocage d' I_{Ks} avec l'indapamide et non avec les bloqueurs d' I_{Kr} (dofétilide/dompéridone). De plus, nous n'avons pas pu démontrer dans ce modèle l'implication de la modulation des transporteurs membranaires dans les différences liées au sexe, sans néanmoins rejeter notre hypothèse d'origine.

La pertinence clinique des résultats de cette étude est d'approfondir la compréhension des différences liées au sexe dans le LQTS médicamenteux, particulièrement lors de l'usage de bloqueurs d' I_{Ks} chez les femmes, un sujet moins étudié comparativement à l'usage des bloqueurs d' I_{Kr} . En effet, les cas de TdP associés à l'indapamide ont été seulement observés chez les femmes [6]. De plus, nos résultats signalent l'importance de mieux comprendre le rôle des médicaments « modificateurs de réponse » tels que le vérapamil afin de mieux pouvoir prédire la survenue d'effets indésirables majeurs comme le LQTS médicamenteux.

Interactions médicamenteuses : administration concomitante et séquentielle

La prise de deux médicaments pouvant prolonger l'intervalle QT a souvent été référée comme une contre-indication majeure en clinique. Dans le chapitre III, notre objectif était d'évaluer si l'administration concomitante de deux bloqueurs d' I_{Kr} (dofétilide,

NAPA ou érythromycine) résultait en une prolongation majeure de la repolarisation cardiaque comparativement au blocage d' I_{Kr} induit par un de ces médicaments administrés seul. De plus, nous avons évalué l'importance de l'ordre d'administration séquentielle de deux bloqueurs d' I_{Kr} . Ces deux séries d'expériences furent effectuées dans des cœurs de cobaye isolés puis perfusés ainsi que dans des lignées cellulaires HEK293 exprimant HERG par patch clamp.

Nos résultats indiquent que l'administration de deux bloqueurs d' I_{Kr} dans des cœurs isolés de cobayes induit un effet additif partiel et non synergique. De plus, nous avons démontré pour la première fois que l'ordre d'administration séquentielle de deux bloqueurs d' I_{Kr} était un facteur important de prolongation de la repolarisation cardiaque. En effet, quand le kétoconazole ou l'érythromycine, deux bloqueurs d' I_{Kr} , sont perfusés en premier, ils antagonisent l'effet électrophysiologique de la dompéridone, un autre bloqueur d' I_{Kr} . Hors, cet antagonisme n'est pas observé quand la dompéridone est administrée en premier. De plus, ces résultats furent reproduits en patch clamp dans des cellules HEK293 exprimant HERG.

Transporteurs membranaires

Nous avons déjà démontré que lorsque des cobayes étaient traités avec du vérapamil pendant 5 jours, l'effet de blocage d' I_{Kr} par le cisapride était significativement augmenté par rapport aux contrôles [5]. Ceci fut expliqué par une probable modulation des transporteurs membranaires (transporteurs ABC) par le vérapamil. Dans le chapitre II, nous avons voulu confirmer le rôle modulateur du traitement au vérapamil sur les effets électrophysiologiques de bloqueurs d' I_{Kr} autres que le cisapride. Les résultats obtenus ont confirmé que le traitement des cobayes avec le vérapamil pendant 5 jours modulait

la prolongation de la repolarisation cardiaque induite par les bloqueurs d' I_{Kr} (dofétilide et dompéridone) sans effet significatif sur les bloqueurs d' I_{Ks} .

Dans le chapitre IV, nous avons évalué 1) la possibilité que HERG et P-gp interagissent physiquement ensemble dans des cardiomyocytes humains et de cobayes et 2) le rôle fonctionnel de l'expression de P-gp sur le blocage d' I_{Kr} induit par la dompéridone, un substrat de P-gp et un bloqueur d' I_{Kr} .

Nos résultats ont démontré, par immunohistochimie et co-immunoprécipitation, une interaction physique très étroite entre HERG et P-gp dans les cardiomyocytes humains et de cobayes. De plus, nous avons démontré que l'expression de P-gp dans une lignée cellulaire HEK293 exprimant d'une façon stable HERG diminue l'effet inhibant de la dompéridone sur I_{Kr} . Ceci est probablement expliqué par une diminution des concentrations intracellulaires de domperidone due à une augmentation du transport d'efflux actif induit par la surexpression de P-gp.

Ces résultats présentent une grande importance d'un point de vue clinique et d'inocuité des médicaments. En effet, les patients qui présentent des activités différentes de transporteurs d'influx/efflux (dus à des mutations génétiques ou à des interactions médicamenteuses) peuvent présenter des variations majeures dans l'amplitude de l'action médicamenteuse, et particulièrement dans les médicaments non antiarythmiques au niveau cardiaque. Ceci pourrait fournir une nouvelle explication aux variabilités interindividuelles observées dans le LQTS médicamenteux.

Diabète et variations de la glycémie

Le diabète (type I et II) a été longtemps associé à une augmentation de la durée et de la dispersion de l'intervalle QT chez des patients de tout âge et sexe, pouvant ultimement induire des arythmies fatales [7-9]. Dans le chapitre V, nous avons ainsi étudié le rôle de la variation de la glycémie dans des conditions de blocage d' I_{Kr} , d' I_{Ks} et des deux ensembles. Ceci a été effectué dans un modèle de cœurs isolés de cobayes mâles perfusés avec la dofétilide (bloqueur d' I_{Kr}), le chromanol 293B (bloqueur d' I_{Ks}), et l'association des deux. De plus, nous avons évalué ces effets en patch clamp sur des cellules HEK293 exprimant d'une façon stable HERG. Nos résultats ont démontré que l'hypo- et l'hyperglycémie induisaient une augmentation des effets de la dofétilide, un bloqueur d' I_{Kr} , sur le MAPD90. De plus, cet effet était observé en patch clamp avec une augmentation de l'inhibition d' I_{Kr} . Par ailleurs, aucun effet significatif de l'hypo- ou l'hyperglycémie n'a été observé avec le bloqueur d' I_{Ks} , ni avec l'association du blocage d' I_{Kr} / I_{Ks} . Bien qu'il semble intrigant que l'hypo et l'hyperglycémie conduisent au même effet électrophysiologique, ceci est bien corrélé avec les données cliniques chez des patients diabétiques [10-12]. Les résultats de cette étude suggèrent ainsi pour la première fois que le niveau de glycémie est un déterminant majeur du blocage d' I_{Kr} , et joue donc un rôle important dans le LQTS médicamenteux.

In fine, les résultats de cette thèse de doctorat nous mènent à une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents aux variabilités interindividuelles retrouvées dans le LQTS d'origine médicamenteuse. Le sexe féminin, les interactions médicamenteuses (via l'association concomitante ou séquentielle de deux bloqueurs

d' I_{Kr}), les transporteurs membranaires (comme la P-gp), et le diabète (et fluctuations de la glycémie) s'ajoutent à la liste de facteurs pouvant expliquer les variabilités interindividuelles dans le LQTS médicamenteux.

Avec le vieillissement constant de la population, la polypharmacie devient de plus en plus fréquente. Cette polypharmacie est inévitablement associée à une augmentation du risque d'interactions médicamenteuses graves telles que le LQTS médicamenteux. Ainsi les résultats de cet ouvrage associés à de futures études qui comprendront et identifieront encore plus les mécanismes de prédisposition au LQTS permettront une meilleure évaluation par le médecin traitant des rapports bénéfice/risque lors des prescriptions médicamenteuses. L'individualisation de la pharmacothérapie de chaque patient en fonction de son bagage génétique, son dossier thérapeutique et ses différents facteurs prédisposants restera l'élément majeur à prendre en considération.

Perspectives futures

Sexe féminin comme facteur de risque du LQTS médicamenteux : En complément de cette étude, il serait intéressant de voir si les différences liées au sexe observées lors du blocage d' I_{Ks} avec l'indapamide sont retrouvées avec d'autres bloqueurs d' I_{Ks} ou s'ils sont spécifiques à l'indapamide.

Interactions médicamenteuses, administration concomitante et séquentielle : Afin de comprendre la mécanistique derrière l'antagonisme observé lors de l'administration séquentielle de deux bloqueurs d' I_{Kr} , il serait très intéressant de faire des expériences de patch clamp plus poussées en analysant les potentiels d'action et la cinétique des

courants bloqués. Des études de liaisons pharmacologiques classiques seraient également utiles afin de connaître les compétitions observées entre les différents bloqueurs d' I_{Kr} utilisés.

Transporteurs membranaires et interaction P-gp/HERG : Des études complémentaires pour analyser la présence ou non d'autres transporteurs membranaires (tel que BCRP, MRP5...) dans le cardiomyocyte permettraient de mieux comprendre le profil d'expression de ces transporteurs et leur interaction avec HERG. Il serait également intéressant de développer des mutagenèses dirigées au niveau de P-gp exprimé dans les cellules HEK293 et d'analyser l'impact de ces mutations sur le blocage du courant repolarisant induit par les bloqueurs d' I_{Kr} .

Diabète et variations de la glycémie : Suite aux résultats significatifs obtenus dans le chapitre V, il serait, entre autres, très intéressant d'étudier chez des animaux pseudo-diabétiques de type 1 (animaux traités à l'alloxane) et des animaux pseudo-diabétiques de type 2 (animaux nourris avec une diète hyperglycémique) l'effet des bloqueurs d' I_{Kr} sur la repolarisation cardiaque. Des études sur les espèces réactives de l'oxygène seraient également intéressantes afin de pouvoir expliquer le mécanisme modulateur des hypo- et hyperglycémies.

RÉFÉRENCES

1. Franz, M.R., *et al.*, *A new single catheter technique for simultaneous measurement of action potential duration and refractory period in vivo*. J Am Coll Cardiol, 1990. **16**(4): p. 878-86.
2. Franz, M.R., *et al.*, *In vitro validation of a new cardiac catheter technique for recording monophasic action potentials*. Eur Heart J, 1986. **7**(1): p. 34-41.
3. Franz, M.R., *Long-term recording of monophasic action potentials from human endocardium*. Am J Cardiol, 1983. **51**(10): p. 1629-34.
4. Hamlin, R.L., *et al.*, *Sensitivity and specificity of isolated perfused guinea pig heart to test for drug-induced lengthening of QTc*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2004. **49**(1): p. 15-23.
5. Morissette, P., R. Hreiche, and J. Turgeon, *Modulatory role of verapamil treatment on the cardiac electrophysiological effects of cisapride*. Can J Physiol Pharmacol, 2007. **84**(12): p. 1285-1290.
6. Letsas, K.P., *et al.*, *QT interval prolongation and torsade de pointes associated with indapamide*. Int J Cardiol, 2006. **112**(3): p. 373-4.
7. Suys, B.E., *et al.*, *QTc interval prolongation and QTc dispersion in children and adolescents with type 1 diabetes*. J Pediatr, 2002. **141**(1): p. 59-63.
8. Englund, A., M. Andersson, and L. Bergfeldt, *Dispersion in ventricular repolarization in patients with severe intraventricular conduction disturbances*. Pacing Clin Electrophysiol, 2001. **24**(7): p. 1067-75.
9. Marques, J.L., *et al.*, *Altered ventricular repolarization during hypoglycaemia in patients with diabetes*. Diabet Med, 1997. **14**(8): p. 648-54.

10. Robinson, R.T., *et al.*, *Mechanisms of abnormal cardiac repolarization during insulin-induced hypoglycemia*. *Diabetes*, 2003. **52**(6): p. 1469-74.
11. Eckert, B. and C.D. Agardh, *Hypoglycaemia leads to an increased QT interval in normal men*. *Clin Physiol*, 1998. **18**(6): p. 570-5.
12. Marfella, R., *et al.*, *The effect of acute hyperglycaemia on QTc duration in healthy man*. *Diabetologia*, 2000. **43**(5): p. 571-5.

ANNEXE 1

DRUG-INDUCED LONG QT SYNDROME IN WOMEN: A REVIEW OF CURRENT EVIDENCE AND REMAINING GAPS

Drug-Induced Long QT Syndrome in Women: A Review of Current Evidence and Remaining Gaps.

Raymond Hreiche¹, Pierre Morissette², Jacques Turgeon¹.

¹ Faculty of Pharmacy, Université de Montréal.

² Merck & Co., Inc.

Running title: Drug-induced LQTS in women.

Address for correspondence:

Jacques Turgeon, Ph.D.

Research Center

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

Hôtel-Dieu, Masson Pavilion room 8-213

3850 Saint Urbain street,

Montreal (QC) H2W 1T7

Tel : (514) 890-8044

Fax : (514) 412-7186



Abstract

Background: Women are at an increased risk of drug-induced long QT syndrome (LQTS). This major cardiac adverse effect may lead to malignant polymorphic ventricular tachycardias, termed *torsades de pointes*, which may degenerate into ventricular fibrillation and cause sudden death. **Objective:** This article reviews the current evidence and remaining gaps of drug-induced LQTS in women. **Methods:** Using the PubMed database, with search terms such as *gender, sex, sex differences* in combination with *cardiac electrophysiology, long QT syndrome, HERG, membrane transporters, cytochromes*, we conducted a systematic review of the available literature on sex differences in the LQTS. English- and French-language publications were searched until October 2007. **Results:** Clinical and experimental studies have reported that gonadal hormones play a role in sex-related differences of QT interval prolongation. Androgens may diminish drug effects on heart repolarization, and estrogens may facilitate arrhythmias. Furthermore, sex-related differences in the density of ion channels may partially explain this phenomenon. However, the magnitude of hormone-dependent differences observed in these studies remains very small compared with the large differences observed in clinical settings. Therefore, many scientists agree that the mechanisms responsible for sex-related differences in the risk of proarrhythmia from drugs remain largely undefined. **Conclusions:** Other factors, such as sex-related modulation of drug disposition in situ, may fill the gaps in our understanding of sex differences observed in drug-induced LQTS. We suggest that mechanisms, such as the modulation of the pharmacokinetics of I_{Kr} blockers (via modulation of intra- and extracellular concentrations), may be of major importance. Sex-specific changes in drug

transport and metabolism will result in different plasma and intracellular levels acting along a dose-response effect on I_{Kr} block. Consequently, important hormone-dependent factors such as metabolic enzymes and membrane transporters need to be investigated in new basic research studies.

Long QT Syndrome: Congenital versus Acquired

The congenital long QT syndrome (LQTS) was first described in 1957 in a family of several children with bilateral neural hearing defect.¹ Soon thereafter, a milder clinical form of congenital LQTS was described by Romano² and Ward *et al.*³ Currently, 10 forms have been identified, and mutations in several ion channels involved in depolarization and/or repolarization of cardiac ventricular myocytes have been identified as causal agents (**Table I**).⁴ Women present with congenital LQTS more often than do men; indeed 70 % of patients are female according to the International LQTS registry^{5,6}. In 1964, Selzer and Wray first described what would subsequently be termed *drug-induced (or acquired) LQTS* with the observation that quinidine could provoke QT prolongation and arrhythmias in otherwise healthy patients.⁷ Over the years, this phenomenon has also been noted with several therapeutic agents, and the list of drugs associated with prolongation of the QT interval has become quite long.⁸⁻¹⁰ This observation is increasingly intriguing, because the list includes drugs with no apparent cardiac action and from different therapeutic families¹¹ (**Table II**¹²).

From a clinical perspective, the hallmark of LQTS—in both the congenital and acquired forms—is an abnormal cardiac ventricular repolarization that translates, in most cases, into a prolonged QT interval on the surface electrocardiogram (ECG).^{11, 13} The QT interval reflects global ventricular repolarization (ie, the duration of action potentials of all ventricular cardiomyocytes). Excessive prolongation of cardiac repolarization may be associated with an increased risk of torsades de pointes (TdP), a polymorphic ventricular tachycardia that can degenerate into ventricular fibrillation, which may account for cardiac arrest or sudden death^{14, 15} (**Figure 1**).

Prolonged repolarization in cardiac ventricular myocytes may be due to an increase in depolarizing inward currents or to a decrease in repolarizing outward currents. The latter mostly involves potassium channels and, for drug-induced LQTS in particular, the delayed rectifier potassium current named I_K .¹¹ In guinea pigs, dogs and humans, I_K comprises both a rapid (I_{Kr} , rapid component of the delayed rectifier potassium current) and a slow activating component (I_{Ks} , slow component of the delayed rectifier potassium current).¹⁶⁻¹⁸ I_{Kr} is the main target of most drugs associated with acquired LQTS.¹¹

Predisposing Factors to Drug-Induced LQTS

Many risk factors have been identified as promoters that could favor drug-induced LQTS despite its unpredictability.^{11, 15} Among these factors, electrolyte disorders, such as hypokalemia, have been considered as an important risk for the occurrence of QT interval prolongation and TdP. Intriguingly, low extracellular potassium concentration reduces I_{Kr} and promotes QT prolongation, which has been explained by either a more extensive fast inactivation of I_{Kr} in hypokalemia¹⁹ or by a competitive sodium-induced I_{Kr} block.²⁰ Hypokalemia increases drug binding to the channel as well, resulting in excessive prolongation of repolarization.²¹ On the other hand, depletion of extracellular magnesium has been associated with abnormalities in depolarization, repolarization, and automaticity, and may be involved in triggering TdP. However, the mechanisms implicated are not clearly understood, although it appears that magnesium supplementation may be protective.²²

Bradycardia, caused largely by either slow sinus rhythm, hypothermia, or hypothyroidism, physiologically induces prolonged repolarization, which leads to a

higher risk of TdP occurrence.¹¹ Pause provoked by extrasystoles may be more important than bradycardia itself at the initiation of several cases of TdP.²³

Structural heart diseases, such as hypertrophy or congestive heart failure, have been associated with altered repolarization.²⁴ This is of great importance as a major risk factor for drug-induced LQTS because of its clinical impact as a confounding common factor. For example, electrical instability is a main characteristic of heart failure and is responsible for more than 50 % of deaths. Therefore, extreme caution must be exercised with these patients taking potential I_{Kr} blockers (Table II).

Another important risk factor is the concomitant administration of 2 I_{Kr} blockers.^{11, 13, 15} Frequently, the drugs responsible for the impaired metabolic status via cytochrome (CYP) 3As are macrolide antibiotics or imidazole antifungals, which are also potent I_{Kr} blockers.^{25, 26} One plausible mechanism of this interaction is an alteration in metabolism, leading to an increase in plasma concentrations of one of the I_{Kr} blockers and therefore to an increased risk of TdP.²⁷ Another possibility may be a simple additive blocking effect on I_{Kr} , although competitiveness is expected.

Further predisposing factors to drug-induced LQTS (not described herein) are, among others, toxins^{28, 29} and cerebrovascular disease.^{30, 31}

Alteration of Repolarization Reserve

The valid prediction of the development of TdP is a challenge in clinical practice. For example, whereas high drug plasma concentrations are somehow a good predictor, predicting the development of TdP with low drug concentrations remain uncertain. To address this idiosyncratic development of TdP, Roden et al³² have developed the concept of *repolarization reserve*. Normal repolarization is accomplished by multiple ion

channels, thus providing a safety reserve; therefore, in an ordinary situation when an I_{Kr} blocker is administered, a small or no QT interval prolongation is observed. However, in the presence of a reduced repolarization reserve (eg, in heart failure when I_{to} current is reduced), the same I_{Kr} blocker may precipitate QT prolongation and TdP.

Sex as a Major Risk Factor for Drug-Induced LQTS

Historical Insight

In the early 1920s, Bazett³³ was one of the first authors to describe the existence of sex-related differences in cardiac electrophysiology. He noted that QT intervals on an ECG were longer in women than in men. Sixty years later, Abinader and Shahar³⁴ observed that, compared with men, women were more susceptible to developing TdP with administration of prenylamine (71.4 %). In 1986, Roden et al³⁵ described the clinical circumstances associated with the occurrence of acquired LQTS and TdP with quinidine; among the 24 patients studied, 16 (67 %) were women. An excellent analysis by Makkar et al³⁶ in 1993 examined 332 cases of antiarrhythmic-induced TdP and found that 70 % of all cases occurred in women. These results clearly demonstrated, for the first time, that women were at greater risk of developing TdP than were men. In another study, 15 of 25 cases associated with terfenadine-induced TdP occurred in women.³⁷ The large clinical SWORD (Survival with Oral d-Sotalol) trial was intended to investigate whether d-sotalol, a class III antiarrhythmic drug with no β -blocking activity, could reduce mortality in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction.³⁸ This trial found that female sex was a major risk factor associated with an increase in arrhythmic deaths (Relative Risk = RR ~ 4 in women compared to RR ~ 1.5 in men). A

large US Food and Drug Administration MedWatch database retrospective analysis of 346 clinical cases of erythromycin-associated cardiac arrhythmias also found a female predominance (65 %).³⁹ Furthermore, In a data analysis, Gowda et al⁴⁰ determined that the prevalence of TdP induced by the class III antiarrhythmic drug ibutilide was significantly higher in women than in men (p=0.05).

Physiological Differences

It is important to emphasize that the QT interval is frequency dependent.³³ To adequately assess and compare QT intervals among different individuals, a correction of the QT interval with heart rate is necessary. The most commonly used formulas are Bazett's square-root formula (corrected QT [QTc] = $QT/RR^{1/2}$; RR = 1/heart rate) and Fridericia's cube-root formula ($QTc = QT/RR^{1/3}$).⁴¹ Whereas Bazett's formula is more commonly used, mainly for its simplicity, it is now well recognized that it is the least accurate. Other formulas (eg, Hodges, Framingham) are also used.

Some physiological factors (ie, corporal development and age) have been associated with an increased risk of QT interval prolongation and occurrence of TdP. Indeed, heart rate has been found to vary with age and sex.⁴² In infants and children under 10 years of age, no significant sex-related differences in heart rate were observed. However, women from puberty to adulthood present with an increased heart rate (p=0.0001) compared with men, with a similar uncorrected QT interval, thereby suggesting that the QTc interval is longer in women at this age span (p<0.0001).^{43, 44} This difference seems to vanish at age ≥ 65 years, resulting in similar QTc intervals between men and women. Rautaharju et al⁴² found that men present with a decrease in the QTc interval at puberty (due to a decrease in their heart rate), whereas women had no significant changes. In

contrast to women, the QTc interval in men increases gradually from puberty to age 50 years, when it returns to values comparable to women's. Based on these notions, this phenomenon is believed to be mainly related to variations in sex hormone levels and activity during puberty.

Besides variations observed in the duration of the QT interval, sex-related differences have been observed in QT dispersion. The latter is defined as the difference between the longest (QT_{max}) and the shortest (QT_{min}) QT intervals within a 12-lead ECG. Clinical and experimental studies completed by Kassotis et al have shown that QT dispersion is greater in men than in women.⁴⁵ It was suggested that the prolonged QT interval induces proarrhythmia related to early afterdepolarizations, while an increase in dispersion of repolarization seems to correlate with reentrant type ventricular arrhythmias. Therefore, and according to these authors, this may explain the increased risk of sudden cardiac death in men compared with an increased risk of drug-induced TdP in women.

Mechanisms of Female Predisposition: Clinical, In Vivo, and In Vitro Experiments

The decrease in the QT interval observed during puberty in men appears to be linked to androgens (specifically testosterone) rather than estrogens. In fact, a study by Bidoggia et al⁴⁶ noted that castrated men had a longer JTc interval (JTc is the corrected JT interval which reflects ventricular repolarisation than did noncastrated men (311.27±54.52 msec in castrated men versus 277.46±38.54 msec in noncastrated men, p<0.01). The same study found that women with a virilization syndrome had shorter QTc intervals than did castrated men and healthy women. A prospective study by Stolt et al⁴⁷ found that athletes who took large doses of anabolic steroids had shorter QTc intervals. In a

retrospective study by Larsen et al,⁴⁸ no significant effects of hormone replacement therapy (mainly estrogen) on the QTc interval were noted for postmenopausal women. However, some discrepancies remain for the role of estrogens: Romhilt et al⁴⁹ observed that women who took oral contraceptives had a higher risk of developing ventricular extrasystoles than did nontreated women, which suggested that both estrogen and progesterone were arrhythmogenics. Indeed, 53 % of women taking contraceptives developed premature ventricular contractions comparatively to 12 % of untreated women. Furthermore, women are more susceptible to developing ibutilide-induced QT prolongation during menstruation, especially during the ovulatory phase of the menstrual cycle compared with the luteal phase (mean increase in QTc = 59 msec during the ovulatory phase versus 53 msec in the luteal phase).⁵⁰

Estrogen and androgen receptors are found in myocardium, and studies have showed the modulatory role of hormones on the levels of messenger RNA in the calcium and potassium cardiac channels of mice⁵¹ and rabbits.⁵² A study by Hara et al⁵³ assessed the effects of dihydrotestosterone (DHT) and estradiol on the action potential of papillary muscles in oophorectomized rabbits. The authors concluded that estradiol significantly increases the action potential ($p < 0.05$), whereas DHT shortens it. The same study also found that sex hormones modulate response to I_{Kr} blockers (ie, E-4031). Indeed, a greater action potential prolongation was observed in rabbits treated with estradiol than in those treated with DHT.⁵³ Moreover, Drici et al⁵² observed that quinidine provoked more QTc interval prolongation in estradiol-treated rabbits than in DHT-treated rabbits. This study also found that the chronic use of estradiol and DHT decreased mRNA levels for the ultrarapid component of the delayed rectifier potassium current I_{Kur} (decrease of more than 85 % of mRNA levels) without any significant effects on the rapid component

I_{Kr} . An *in vivo* study by Lu et al⁵⁴ found that female rabbits were more susceptible than were males to QT prolongation when both sexes were administered dofetilide, a potent I_{Kr} blocker.

Sex-related differences in current densities have also been described by Liu *et al.*⁵⁵ I_{Kr} and I_{K1} (I_{K1} : inward rectifier potassium current) outward current densities were significantly lower ($p < 0.01$ for I_{Kr} and < 0.05 for I_{K1}) in female rabbits than in males, which implies prolonged repolarization and predisposition to LQTS in females. Another study analyzed the effects of androgen deficiency on ventricular repolarization in mice and reported that this deficiency induces a reduction in I_{Kur} density in ventricles, which may provoke a prolongation of action potential duration and QTc interval.^{51, 56} In addition, data suggest that the main factor associated with a lower risk of TdP in males is testosterone, which increases I_{Kr} and I_{Kur} densities and subsequently shortens QTc.⁵⁷

Besides the direct effects of sex hormones on channel expression and channel function, Pfeufer et al⁵⁸ and others have suggested that the common genetic variants which modulate QT in the general population show sex differences that may account for some of the intrinsic gender and individually distinct myocardial electrical properties. Indeed, the effect of the KCNH2-K897T variant's association on the QT interval was found to be more pronounced in females than in males.⁵⁹ Moreover, genetic markers KCNE1-rs727957, KCNQ1-rs757092, and KCNH2-rs3815459 were associated with sex differences.⁵⁸

All the findings previously mentioned suggest that men may have protection against drug-induced effects on cardiac repolarization because of their high androgen levels, whereas high estrogen levels may predispose women to arrhythmic events. In addition, it appears that hormones have a direct effect on ionic channel densities. However, the

small hormone-dependent differences noted suggest that these observations may only partially explain the mechanisms associated with sex-related differences in ventricular repolarization and arrhythmias. The magnitude of hormone-dependent differences observed in these studies remains very small compared with the large differences observed in clinical settings. Moreover, hormonal concentrations used in ex vivo and in vitro experiments largely exceed those observed in humans under normal physiological circumstances.

Other Potential Mechanisms

Not all the studies described in this article consider the drug itself – from both a pharmacodynamic and pharmacokinetic perspective – in the acquired LQTS. They failed to consider the effects of hormones on membrane transporters or enzymes that metabolize these drugs and could indirectly modulate their response.

The mechanisms responsible for sex-related differences in drug-induced LQTS remain poorly understood.^{53, 60} It is therefore possible that other factors, such as the pharmacokinetics of I_{Kr} blockers, may play key roles in the prevalence of drug-induced QT interval prolongation and TdP in women. In fact, I_{Kr} blockade is drug concentration-dependent, and, comparatively to other intracellular drug targets, any modulation in drug pharmacokinetics (ie, in absorption, distribution, metabolism, or elimination) could modify plasma concentrations and, more particularly, intracellular levels.⁶¹ This notion is of great importance, because major binding sites to I_{Kr} are intracellular. Determinants of intracellular concentrations of I_{Kr} blockers include membrane transporters and CYP expressed, in situ, within the heart.

Cytochromes P450 Enzymes

The CYP family is a superfamily of hemoproteins responsible for the oxidative metabolism of many xenobiotics and is therefore involved in major elimination pathways of many drugs⁶² (Figure 2). CYP3A is the predominant subfamily found in humans and accounts for the metabolism of >50 % of commercially available drugs.⁶³ Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies have shown that many compounds that are CYP3A substrates also possess the capacity for binding to I_{Kr}. To cite a few, macrolide antibiotics (erythromycin, clarithromycin), imidazole antifungals (ketoconazole, itraconazole), cisapride, droperidol, pimozone, sildenafil, thioridazine, and domperidone are all I_{Kr} blockers and CYP3A substrates.¹¹

Studies have shown that sexual hormones play an important role in CYP3A expression and functionality because they are also CYP3A substrates. Harris et al⁶⁴ noted that clearance of CYP3A4-metabolized drugs is greater in women, suggesting greater enzymatic activity; however, the activity of other pharmacokinetic systems appears to be greater in men. In contrast, the same authors noted that certain drugs had superior bioavailabilities in women. A recent *in vivo* study by Suzuki et al⁶⁵ reported that hepatic expression of CYP2B1 was greater in male than in female rats. In another experimental study, Ma et al⁶⁶ found that renal CYP2J5 levels in male mice were greater than in female mice. These differences disappeared when male mice were castrated, suggesting a direct effect of sex hormones on CYP expression. This observation evoked a greater metabolic capacity in males, which leads to a slower drug clearance and increased drug levels in females.

Besides CYP-dependent hepatic and intestinal metabolism, recent studies reported the presence of CYP-dependent oxidative metabolism in the heart.^{67, 68} Consequently, as

depicted in Figure 2 – that describes pharmacokinetic factors which modulates the occurrence of acquired long QT syndrome –, cardiomyocytes seem to be CYP equipped (CYP2C8, 2C19, 2D6, 2J2, 1A1, and 2E1) and may metabolize respective substrates in situ within the cardiomyocyte milieu.^{69, 70} Given that the majority of I_{Kr} blockers are CYP substrates, and by analogy to sex-related differences observed in hepatic CYPs, it is possible that cardiac CYPs may be modulated by sex and may lead to differences in cardiac intracellular concentrations. Therefore, potential sex-related variability in cardiac CYPs may play an important role in the understanding of sex-related differences in acquired LQTS. Additional studies are needed to better comprehend the role of these enzymes.

Membrane Transporters

ATP-binding cassette (ABC) transporters (eg, P-glycoprotein [P-gp] and multidrug resistance-associated protein [MRP]) are influx and efflux membrane transporters. By using ATP hydrolysis, ABC transporters can transport a wide variety of xenobiotics across the cellular membrane from the extracellular to the intracellular milieu and vice versa⁷¹ (Figure 2). Many membrane transporters can modulate drug intracellular concentrations in the intestine, liver, kidneys, brain, uterus, and other sites, especially in the heart. Indeed, many ABC transporters were discovered at the cardiac level, MDR1 (P-gp), MRP1, MRP2, MRP5, MRP7, and BCRP in particular.^{72, 73} Given that the binding site for I_{Kr} is intracellular, modulation of the intracellular concentration of I_{Kr} blockers due to variability in membrane transport activity is crucial to their pharmacological blocking effects on I_{Kr} .

Sex-related differences in the transport process of endogenous and exogenous substrates have been reported in different organs in rats, mice, and humans.⁷⁴ Hepatic expression of P-gp, for example, is 2-fold higher in men compared with women, suggesting that the transport of P-gp substrates may vary with gender.⁷⁵ Another study confirmed the existence of sex-related differences in the functional activity of P-gp in mice.⁷⁶

Organic anion transporters (OATs) and organic cation transporters (OCTs) are 2 large families of membrane transporters. They play a major role in the absorption, distribution, and elimination of numerous drugs and their metabolites, and participate more particularly in the distribution of many drugs in the heart.⁷⁷ Kobayashi et al⁷⁸ clearly described a sex-related differential genetic expression of OATs that is dependent on sex hormones. Moreover, Buist et al⁷⁹ observed variable expression of organic anion transporting proteins according to sex and the organ involved (intestine, kidney, etc).

These 2 large membrane transporter families can play a key role in modulating intracardiac concentrations of drugs next to their binding site.^{80, 81} For the past several years, our research group has conducted studies on membrane transporters and metabolic enzymes expressed in the heart and their relationship with drug-induced LQTS. We observed that P-gp and HERG (protein of I_{Kr}) interact very closely in cardiomyocytes (data submitted for publication, Hreiche *et al.*, 2008) Furthermore, our research group described the presence of CYP in cardiomyocytes.⁸² We also noted that treatment with the membrane transporter modulator verapamil in guinea pigs altered I_{Kr} blocker effects on action potential duration.⁸³ Most importantly, we are currently assessing the role of membrane transporters and metabolic enzymes in sex-related differences in acquired LQTS.

Conclusions

Women are at an increased risk of presenting with severe cardiac adverse effects such as drug-induced LQTS and TdP. Since the first study by Bazett in 1920, many others have shown the existence of electrophysiological differences between women and men, especially for the QTc interval. Sex hormones explain only part of the observed differences. Androgens provide protection against drug effects on repolarization, whereas estrogens seem to be proarrhythmic. In addition, sex differences in the density of ionic channels do exist but appear to partially explain women's predisposition to drug-induced LQTS. Hence, hormones act directly on the substrate that defines myocardial electrical properties, namely, channel expression and channel function. We suggest that other mechanisms, such as the modulation of the pharmacokinetics of I_{Kr} blockers (via modulation of intra- and extracellular concentrations), may be of major importance in our understanding of women's predisposition to acquired LQTS. Sex-specific changes in drug transport and metabolism will result in different plasma and intracellular levels acting along a dose-response effect on block of I_{Kr} . Consequently, important hormone-dependent factors such as metabolic enzymes and membrane transporters need to be investigated in new basic research studies.

References

1. Jervell A, Lange-Nielsen F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *American heart journal*. 1957;54(1):59-68.
2. Romano C, Gemme G, Pongiglione R. [Rare Cardiac Arrhythmias of the Pediatric Age. II. Syncopal Attacks Due to Paroxysmal Ventricular Fibrillation. (Presentation of 1st Case in Italian Pediatric Literature)]. *La Clinica pediatrica*. 1963;45:656-683.
3. Ward OC. A New Familial Cardiac Syndrome in Children. *Journal of the Irish Medical Association*. 1964;54:103-106.
4. Modell SM, Lehmann MH. The long QT syndrome family of cardiac ion channelopathies: a HuGE review. *Genet Med*. 2006;8(3):143-155.
5. Kaab S, Pfeufer A, Hinterseer M, Nabauer M, Schulze-Bahr E. Long QT syndrome. Why does sex matter? *Z Kardiol*. 2004;93(9):641-645.
6. Locati EH, Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, Vincent GM, Lehmann MH, Towbin JA, Priori SG, Napolitano C, Robinson JL, Andrews M, Timothy K, Hall WJ. Age- and sex-related differences in clinical manifestations in patients with congenital long-QT syndrome: findings from the International LQTS Registry. *Circulation*. 1998;97(22):2237-2244.
7. Selzer A, Wray HW. Quinidine Syncope. Paroxysmal Ventricular Fibrillation Occurring During Treatment Of Chronic Atrial Arrhythmias. *Circulation*. 1964;30:17-26.

8. Roden DM, Balser JR, George AL, Jr., Anderson ME. Cardiac ion channels. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:431-475.
9. Haverkamp W, Breithardt G, Camm AJ, Janse MJ, Rosen MR, Antzelevitch C, Escande D, Franz M, Malik M, Moss A, Shah R. The potential for QT prolongation and pro-arrhythmia by non-anti-arrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a Policy Conference of the European Society of Cardiology. *Cardiovascular research.* 2000;47(2):219-233.
10. De Ponti F, Poluzzi E, Montanaro N. Organising evidence on QT prolongation and occurrence of Torsades de Pointes with non-antiarrhythmic drugs: a call for consensus. *Eur J Clin Pharmacol.* 2001;57(3):185-209.
11. Morissette P, Hreiche R, Turgeon J. Drug-induced long QT syndrome and torsade de pointes. *The Canadian journal of cardiology.* 2005;21(10):857-864.
12. www.torsades.org (<http://www.torsades.org/medical-pros/drug-lists/drug-lists.htm>).
13. Roden DM. Drug-induced prolongation of the QT interval. *N Engl J Med.* 2004;350(10):1013-1022.
14. Antzelevitch C, Shimizu W. Cellular mechanisms underlying the long QT syndrome. *Current opinion in cardiology.* 2002;17(1):43-51.
15. Kannankeril PJ, Roden DM. Drug-induced long QT and torsade de pointes: recent advances. *Current opinion in cardiology.* 2007;22(1):39-43.
16. Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell.* 1995;81(2):299-307.

17. Gintant GA. Two components of delayed rectifier current in canine atrium and ventricle. Does IKs play a role in the reverse rate dependence of class III agents? *Circulation research*. 1996;78(1):26-37.
18. Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. *Circulation research*. 1996;78(4):689-696.
19. Yang T, Snyders DJ, Roden DM. Rapid inactivation determines the rectification and [K⁺]_o dependence of the rapid component of the delayed rectifier K⁺ current in cardiac cells. *Circulation research*. 1997;80(6):782-789.
20. Numaguchi H, Johnson JP, Jr., Petersen CI, Balser JR. A sensitive mechanism for cation modulation of potassium current. *Nature neuroscience*. 2000;3(5):429-430.
21. Yang T, Roden DM. Extracellular potassium modulation of drug block of IKr. Implications for torsade de pointes and reverse use-dependence. *Circulation*. 1996;93(3):407-411.
22. Chakraborti S, Chakraborti T, Mandal M, Mandal A, Das S, Ghosh S. Protective role of magnesium in cardiovascular diseases: a review. *Molecular and cellular biochemistry*. 2002;238(1-2):163-179.
23. Roden DM, Anderson ME. The pause that refreshes, or does it? Mechanisms in torsades de pointes. *Heart*. 2000;84(3):235-237.
24. Nabauer M, Kaab S. Potassium channel down-regulation in heart failure. *Cardiovascular research*. 1998;37(2):324-334.
25. Owens RC, Jr. QT prolongation with antimicrobial agents: understanding the significance. *Drugs*. 2004;64(10):1091-1124.

26. Daleau P, Lessard E, Groleau MF, Turgeon J. Erythromycin blocks the rapid component of the delayed rectifier potassium current and lengthens repolarization of guinea pig ventricular myocytes. *Circulation*. 1995;91(12):3010-3016.
27. Ray WA, Murray KT, Meredith S, Narasimhulu SS, Hall K, Stein CM. Oral erythromycin and the risk of sudden death from cardiac causes. *N Engl J Med*. 2004;351(11):1089-1096.
28. Little RE, Kay GN, Cavender JB, Epstein AE, Plumb VJ. Torsade de pointes and T-U wave alternans associated with arsenic poisoning. *Pacing Clin Electrophysiol*. 1990;13(2):164-170.
29. Ludomirsky A, Klein HO, Sarelli P, Becker B, Hoffman S, Taitelman U, Barzilai J, Lang R, David D, DiSegni E, Kaplinsky E. Q-T prolongation and polymorphous ("torsade de pointes") ventricular arrhythmias associated with organophosphorus insecticide poisoning. *The American journal of cardiology*. 1982;49(7):1654-1658.
30. Di Pasquale G, Lusa AM, Manini GL, Dominici P, Andreoli A, Limoni P, Pinelli G. [Cardiac arrhythmias associated with subarachnoid hemorrhage. Prospective study with dynamic electrocardiography]. *Giornale italiano di cardiologia*. 1984;14(5):323-329.
31. Sen S, Stober T, Burger L, Anstatt T, Rettig G. Recurrent torsade de pointes type ventricular tachycardia in intracranial hemorrhage. *Intensive Care Med*. 1984;10(5):263-264.
32. Roden DM. Taking the "idio" out of "idiosyncratic": predicting torsades de pointes. *Pacing Clin Electrophysiol*. 1998;21(5):1029-1034.

33. Bazett A. An analysis of the time relationship of electrocardiograms. *Heart*. 1920;7:353-370.
34. Abinader EG, Shahar J. Possible female preponderance in prenylamine-induced 'torsade de pointes' tachycardia. Short communication. *Cardiology*. 1983;70(1):37-40.
35. Roden DM, Woosley RL, Primm RK. Incidence and clinical features of the quinidine-associated long QT syndrome: implications for patient care. *American heart journal*. 1986;111(6):1088-1093.
36. Makkar RR, Fromm BS, Steinman RT, Meissner MD, Lehmann MH. Female gender as a risk factor for torsades de pointes associated with cardiovascular drugs. *Jama*. 1993;270(21):2590-2597.
37. Woosley RL, Chen Y, Freiman JP, Gillis RA. Mechanism of the cardiotoxic actions of terfenadine. *Jama*. 1993;269(12):1532-1536.
38. Waldo AL, Camm AJ, deRuyter H, Friedman PL, MacNeil DJ, Pauls JF, Pitt B, Pratt CM, Schwartz PJ, Veltri EP. Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. The SWORD Investigators. Survival With Oral d-Sotalol. *Lancet*. 1996;348(9019):7-12.
39. Drici MD, Knollmann BC, Wang WX, Woosley RL. Cardiac actions of erythromycin: influence of female sex. *Jama*. 1998;280(20):1774-1776.
40. Gowda RM, Khan IA, Pudukollu G, Vasavada BC, Sacchi TJ, Wilbur SL. Female preponderance in ibutilide-induced torsade de pointes. *Int J Cardiol*. 2004;95(2-3):219-222.

41. Aytemir K, Maarouf N, Gallagher MM, Yap YG, Waktare JE, Malik M. Comparison of formulae for heart rate correction of QT interval in exercise electrocardiograms. *Pacing Clin Electrophysiol.* 1999;22(9):1397-1401.
42. Rautaharju PM, Zhou SH, Wong S, Calhoun HP, Berenson GS, Prineas R, Davignon A. Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *The Canadian journal of cardiology.* 1992;8(7):690-695.
43. Morcet JF, Safar M, Thomas F, Guize L, Benetos A. Associations between heart rate and other risk factors in a large French population. *J Hypertens.* 1999;17(12 Pt 1):1671-1676.
44. Merri M, Benhorin J, Alberti M, Locati E, Moss AJ. Electrocardiographic quantitation of ventricular repolarization. *Circulation.* 1989;80(5):1301-1308.
45. Kassotis J, Costeas C, Bedi AK, Tolat A, Reiffel J. Effects of aging and gender on QT dispersion in an overtly healthy population. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2000;23(7):1121-1126.
46. Bidoggia H, Maciel JP, Capalozza N, Mosca S, Blaksley EJ, Valverde E, Bertran G, Arini P, Biagetti MO, Quinteiro RA. Sex differences on the electrocardiographic pattern of cardiac repolarization: possible role of testosterone. *American heart journal.* 2000;140(4):678-683.
47. Stolt A, Karila T, Viitasalo M, Mantysaari M, Kujala UM, Karjalainen J. QT interval and QT dispersion in endurance athletes and in power athletes using large doses of anabolic steroids. *The American journal of cardiology.* 1999;84(3):364-366, A369.

48. Larsen JA, Tung RH, Sadananda R, Goldberger JJ, Horvath G, Parker MA, Kadish AH. Effects of hormone replacement therapy on QT interval. *The American journal of cardiology*. 1998;82(8):993-995.
49. Romhilt DW, Chaffin C, Choi SC, Irby EC. Arrhythmias on ambulatory electrocardiographic monitoring in women without apparent heart disease. *Am J Cardiol*. 1984;54(6):582-586.
50. Rodriguez I, Kilborn MJ, Liu XK, Pezzullo JC, Woosley RL. Drug-induced QT prolongation in women during the menstrual cycle. *Jama*. 2001;285(10):1322-1326.
51. Brouillette J, Trepanier-Boulay V, Fiset C. Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *J Physiol*. 2003;546(Pt 2):403-413.
52. Drici MD, Burklow TR, Haridasse V, Glazer RI, Woosley RL. Sex hormones prolong the QT interval and downregulate potassium channel expression in the rabbit heart. *Circulation*. 1996;94(6):1471-1474.
53. Hara M, Danilo P, Jr., Rosen MR. Effects of gonadal steroids on ventricular repolarization and on the response to E4031. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;285(3):1068-1072.
54. Lu HR, Remeysen P, Somers K, Saels A, De Clerck F. Female gender is a risk factor for drug-induced long QT and cardiac arrhythmias in an in vivo rabbit model. *Journal of cardiovascular electrophysiology*. 2001;12(5):538-545.
55. Liu XK, Katchman A, Drici MD, Ebert SN, Ducic I, Morad M, Woosley RL. Gender difference in the cycle length-dependent QT and potassium currents in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;285(2):672-679.

56. Trepanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circulation research*. 2001;89(5):437-444.
57. Arya A. Gender-related differences in ventricular repolarization: beyond gonadal steroids. *Journal of cardiovascular electrophysiology*. 2005;16(5):525-527.
58. Pfeufer A, Jalilzadeh S, Perz S, Mueller JC, Hinterseer M, Illig T, Akyol M, Huth C, Schopfer-Wendels A, Kuch B, Steinbeck G, Holle R, Nabauer M, Wichmann HE, Meitinger T, Kaab S. Common variants in myocardial ion channel genes modify the QT interval in the general population: results from the KORA study. *Circulation research*. 2005;96(6):693-701.
59. Bezzina CR, Verkerk AO, Busjahn A, Jeron A, Erdmann J, Koopmann TT, Bhuiyan ZA, Wilders R, Mannens MM, Tan HL, Luft FC, Schunkert H, Wilde AA. A common polymorphism in KCNH2 (HERG) hastens cardiac repolarization. *Cardiovascular research*. 2003;59(1):27-36.
60. Pham TV, Rosen MR. Sex, hormones, and repolarization. *Cardiovascular research*. 2002;53(3):740-751.
61. Almond LM, Hoggard PG, Edirisinghe D, Khoo SH, Back DJ. Intracellular and plasma pharmacokinetics of efavirenz in HIV-infected individuals. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(4):738-744.
62. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 1996;6(1):1-42.

63. Kolars JC, Lown KS, Schriedlin-Ren P, Ghosh M, Fang C, Wrighton SA, Merion RM, Watkins PB. CYP3A gene expression in human gut epithelium. *Pharmacogenetics*. 1994;4(5):247-259.
64. Harris RZ, Benet LZ, Schwartz JB. Gender effects in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Drugs*. 1995;50(2):222-239.
65. Suzuki T, Zhao YL, Nadai M, Naruhashi K, Shimizu A, Takagi K, Takagi K, Hasegawa T. Gender-related differences in expression and function of hepatic P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp2) in rats. *Life Sci*. 2006.
66. Ma J, Graves J, Bradbury JA, Zhao Y, Swope DL, King L, Qu W, Clark J, Myers P, Walker V, Lindzey J, Korach KS, Zeldin DC. Regulation of mouse renal CYP2J5 expression by sex hormones. *Mol Pharmacol*. 2004;65(3):730-743.
67. Wang JF, Yang Y, Sullivan MF, Min J, Cai J, Zeldin DC, Xiao YF, Morgan JP. Induction of cardiac cytochrome p450 in cocaine-treated mice. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002;227(3):182-188.
68. Zordoky BN, El-Kadi AO. Modulation of cardiac and hepatic cytochrome P450 enzymes during heart failure. *Curr Drug Metab*. 2008;9(2):122-128.
69. Thum T, Borlak J. Gene expression in distinct regions of the heart. *Lancet*. 2000;355(9208):979-983.
70. Walles M, Thum T, Levsen K, Borlak J. Verapamil: new insight into the molecular mechanism of drug oxidation in the human heart. *J Chromatogr A*. 2002;970(1-2):117-130.
71. Silverman JA. Multidrug-resistance transporters. *Pharm Biotechnol*. 1999;12:353-386.

72. Meissner K, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H, Dazert P, Eckel L, Vogelgesang S, Warzok RW, Bohm M, Lehmann C, Wendt M, Cascorbi I, Kroemer HK. Modulation of multidrug resistance P-glycoprotein 1 (ABCB1) expression in human heart by hereditary polymorphisms. *Pharmacogenetics*. 2004;14(6):381-385.
73. Couture L, Nash JA, Turgeon J. The ATP-binding cassette transporters and their implication in drug disposition: a special look at the heart. *Pharmacological reviews*. 2006;58(2):244-258.
74. Morris ME, Lee HJ, Predko LM. Gender differences in the membrane transport of endogenous and exogenous compounds. *Pharmacol Rev*. 2003;55(2):229-240.
75. Schuetz EG, Furuya KN, Schuetz JD. Interindividual variation in expression of P-glycoprotein in normal human liver and secondary hepatic neoplasms. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;275(2):1011-1018.
76. Dagenais C, Zong J, Ducharme J, Pollack GM. Effect of mdr1a P-glycoprotein gene disruption, gender, and substrate concentration on brain uptake of selected compounds. *Pharm Res*. 2001;18(7):957-963.
77. Hagenbuch B, Meier PJ. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochimica et biophysica acta*. 2003;1609(1):1-18.
78. Kobayashi Y, Hirokawa N, Ohshiro N, Sekine T, Sasaki T, Tokuyama S, Endou H, Yamamoto T. Differential gene expression of organic anion transporters in male and female rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290(1):482-487.
79. Buist SC, Cherrington NJ, Choudhuri S, Hartley DP, Klaassen CD. Gender-specific and developmental influences on the expression of rat organic anion transporters. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;301(1):145-151.

80. Grube M, Meyer zu Schwabedissen HE, Prager D, Haney J, Moritz KU, Meissner K, Roskopf D, Eckel L, Bohm M, Jedlitschky G, Kroemer HK. Uptake of cardiovascular drugs into the human heart: expression, regulation, and function of the carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5). *Circulation*. 2006;113(8):1114-1122.
81. Oswald S, Grube M, Siegmund W, Kroemer HK. Transporter-mediated uptake into cellular compartments. *Xenobiotica*. 2007;37(10-11):1171-1195.
82. Michaud V, Masse R, Turgeon J. CYP2J2 metabolizes domperidone in guinea pig hearts. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2005;77:75.
83. Morissette P, Hreiche R, Turgeon J. Modulatory role of verapamil treatment on the cardiac electrophysiological effects of cisapride. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006;84(12):1285-1290.

Table I. Channelopathies associated with congenital long QT syndrome. Reproduced with permission.⁴

Type	Gene	Protein	Locus	Ion Current Affected	Effect of Mutation	Common Triggers
LQT1	KCNQ1	KvLQT1 (Kv7.1)	11p15.5	I _{Ks}	↓	Exercise, especially swimming; emotional stress
LQT2	KCNH2	hERG (Kv11.1)	7q35-q36	I _{Kr}	↓	Rest/sleep, auditory stimuli, emotional stress; postpartum state
LQT3	SCN5A	Nav1.5	3p24-p21	I _{Na}	↑	Rest/sleep
LQT4	ANK2	Ankyrin-B	4q25-q27	Affects Na ⁺ , K ⁺ , Ca ⁺⁺ exchange	↓	Exercise, emotional stress (based on limited data)
LQT5	KCNE1	MinK	21q22	I _{Ks}	↓	Insufficient data
LQT6	KCNE2	MiRP1	21q22	I _{Kr}	↓	Insufficient data
LQT7	KCNJ2	Kir2.1	17q23	I _{K1}	↓	Accompanied by alterations in serum K ⁺ level in some cases
LQT8	CACNA1C	Cav1.2	12p13.3	I _{Ca,L}	↑	Hypoglycemia, sepsis (2 cases)
LQT9	CAV3	Caveolin 3	3p25.3	I _{Na}	↑	Insufficient data
LQT10	SCN4B	Navb4	11q23.3	I _{Na}	↑	Insufficient data

↑ : Increase, ↓: Decrease, I_{Kr}: rapid component of the delayed rectifier potassium channel, I_{Ks}: slow component of the delayed rectifier potassium channel, I_{K1}: inward rectifier potassium current, I_{Na}: sodium channel, I_{Ca,L}: L-type calcium current.

Table II. List of drugs known to induce torsades de pointes and to be more prevalent in women (adapted from www.torsades.org with permission)¹².

Therapeutic Class	Chemical Name
Antiarrhythmics	Amiodarone
	Disopyramide
	Ibutilide
	Quinidine
	Sotalol
Antibiotics/Anti-infectious	Erythromycin
	Halofantrine
	Pentamidine
Anti-angina	Bepridil
Antipsychotics	Pimozide
Gastrokinetic stimulants	Cisapride
Opioids	Methadone

Figure Legends

Figure 1. Clinical manifestations of drug-induced long QT syndrome. (A) Typical monophasic action potential (MAP) recording showing that the action potential of a normal ventricular cardiomyocyte (1) is prolonged in presence of an I_{Kr} blocker (2). Occurrence of early after-depolarizations may lead to torsades de pointes (3). (B) QT interval is represented on a classical surface electrocardiogram. Drug-induced I_{Kr} block produces a QT interval prolongation (2) and can trigger torsades de pointes (3).

Figure 2. Pharmacokinetic factors that modulate the occurrence of acquired long QT syndrome. Free concentration of a drug crosses cellular membrane either by passive diffusion or actively using membrane transporters. A fraction is then either metabolized by cytochrome P (CYP) or transported unchanged toward extracellular milieu by other membrane transporters. The remaining fraction in the intracellular milieu blocks the rapid component of the delayed rectifier potassium current (I_{Kr}). Binding to I_{Kr} is intracellular and induces a decrease in K^+ efflux; this generates a prolongation of the ventricular repolarization and an increase in QT interval.²

² I_{Ks} : slow component of the delayed rectifier potassium current

Figure 1:

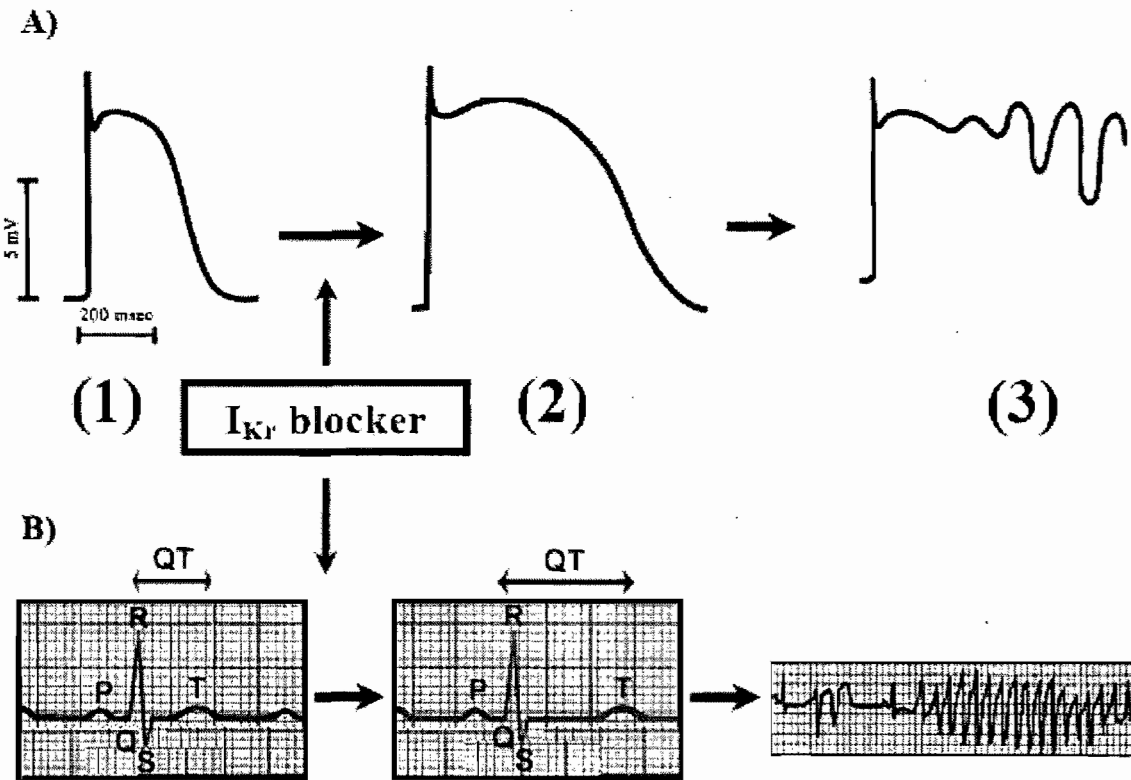
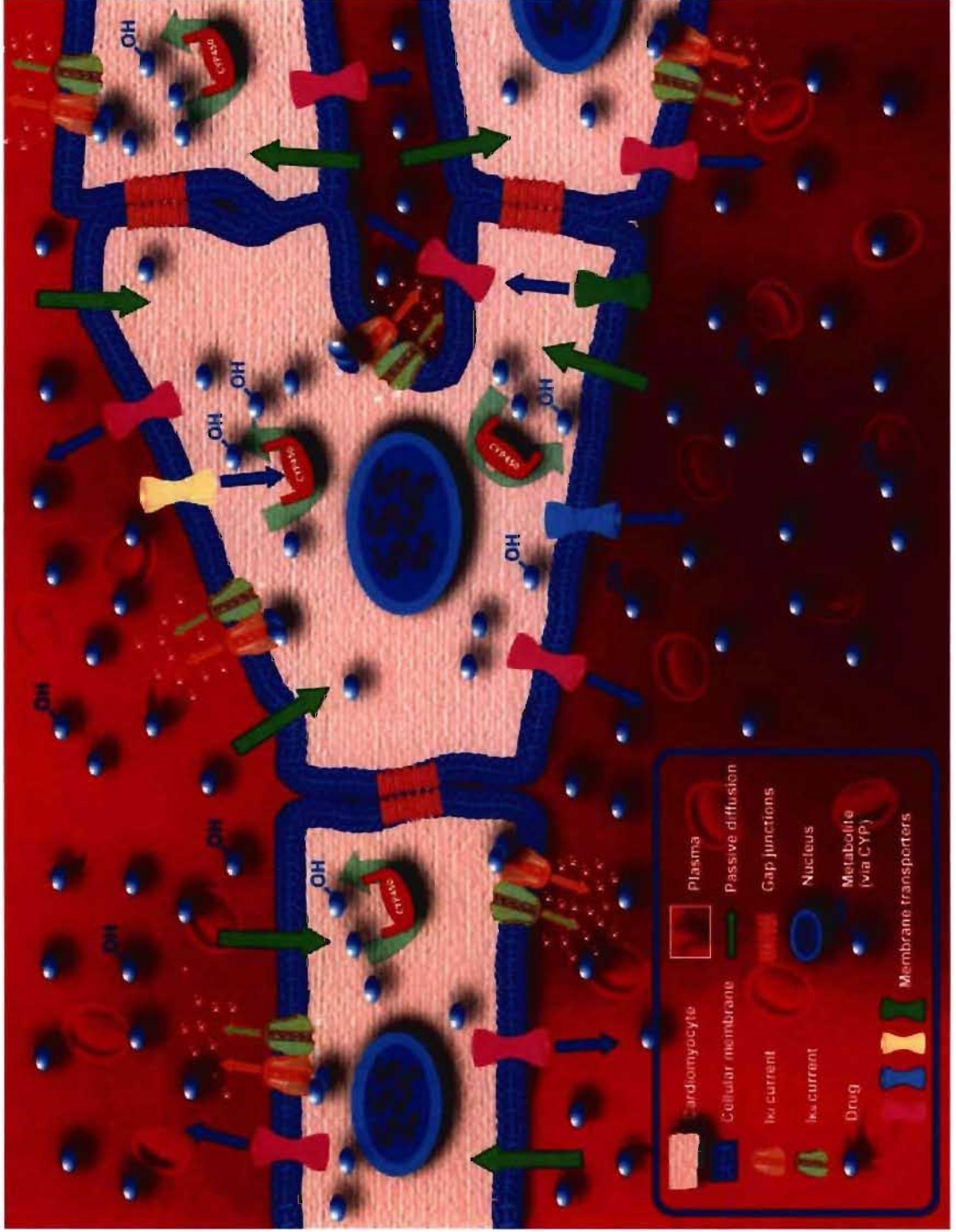


Figure 2:



ANNEXE 2

ROLE OF ETHNICITY IN MANAGING CARDIOVASCULAR PATIENTS

Chapter 5 - The role of ethnicity in managing cardiovascular patients

(In "Cardiovascular genetics and genomics" Edited by Dan Roden.)

Raymond Hreiche, Veronique Michaud, Jacques Turgeon.

Faculty of Pharmacy, Université de Montréal.

Address for correspondence:

Jacques Turgeon, Ph.D.

Research Center

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

Hôtel-Dieu, Masson Pavilion room 8-213

3850 Saint Urbain street,

Montreal (QC) H2W 1T7

Tel : (514) 890-8044

Fax : (514) 412-7186

[REDACTED]

[REDACTED]

Introduction

Historically, North American population was formed by episodic migration flows. While the majority of these flows initiated from Europe—mainly English, Spanish, and French—, North America's current demographic makeup is much more diversified. In 2005, the U.S. Census Bureau estimated the national population to be at 296,410,404. Of this total, 14.4 % self-identified as Hispanic or Latino origin, 12.8 % as Black, 4.3 % as Asian, and 1 % as American Indian and Alaskan native among other less numerous groups (U.S. Census Bureau 2005). This heterogeneity can be easily found in the majority of the world's metropolitan areas, and therefore raises major issues related to disparities, ranging from health risk factors to disease prevalence, life expectancy and adequate health care delivery. All these issues are inevitably related to genetic and environmental factors.

The term *ethnicity* stems from the Greek *ethnos* [1, 2], meaning *people* or *nation*. It is “a multi-faced quality that refers to the group to which people belong, and/or are perceived to belong, as a result of certain shared characteristics, including geographical and ancestral origins, but particularly cultural traditions and languages” [1]. However, the concept of ethnicity in health care and public health remains a controversial variable, with many ethical and definition issues. In clinical studies, it is still difficult to have a good grasp of terms like *Asians*, *Blacks* or *Hispanic* because of their inconsistency usage, intra-group heterogeneity (many studies do not mention the subgroups) and an absence of internationally recognized definitions. In this chapter, the “Asian” term in one clinical study, for example, may not be as representative of a subpopulation as the same term used in another study.

According to the World Heart Federation, heart disease is the world's number one killer and is responsible for one in every three deaths. This prevalence is even more pronounced in the Western Industrialized World. In the United States, heart disease has been the leading cause of death for the past 80 years [3]. Moreover, it is worth noting that rapid economic development, urbanization and lifestyle changes in developing countries are heavily responsible for an impressive increase in cardiovascular disease (CVD) [4]. Due to many genetic and environmental factors, not all individuals are equal with regard to CVD prevalence or in treatment responses, which inevitably leads to inequalities in their health management. In addition, the majority of clinical studies have been conducted using white men, and their results have been generalized to all patients irrespective of their ethnic group. This has led to the rise of “Ethnopharmacology,” which Munoz *et al.* define as “the study of the effect of ethnicity on responses to prescribed medication...” [5].

1- Environmental and cultural factors in treatment response

Environmental factors, such as climate, pollution, smoking, alcohol, drug intake, diet and so on, can be responsible for an important variation in drug response within the same individual [6]. Furthermore, these factors can cause disparities among groups of individuals, which could be related ethnicity.

For example, in addition to its proven direct effect on the prevalence of CVD [7], tobacco use has been implicated in drug-interactions with the widely-prescribed anticoagulant warfarin. It is well known that tobacco smoke is a potent inducer of the

cytochrome P450 (CYP) 1A2 which is partially responsible for the metabolism of warfarin in humans. Therefore, many clinical cases of increase in warfarin efficacy have been described in people who have recently stopped smoking [8]. In addition, possible warfarin treatment failure has been associated with smokeless tobacco. This failure was explained by an increased dietary source of vitamin K from tobacco [9]. These interactions can be of significant importance due to variations of prevalence of cigarette smoking within each population. According to the 2005 National Health Interview Survey, American Indians and Alaska Natives had the highest prevalence (32.0 %), followed by non-Hispanic whites (21.9 %), non-Hispanic blacks (21.5 %), Hispanics (16.2 %), and Asians (13.3 %) [10].

On the other hand, chronic and acute ethanol consumption can modulate the response and toxicity of many cardiovascular treatments. For example, ethanol can cause additive vasodilatation with such agents as nitroglycerin, methyldopa and hydralazine [11]. Moreover, ethanol can decrease plasma clearance of propranolol, leading to a decrease in the latter's efficacy [12]. Because of historical, religious and cultural factors, alcohol consumption varies among ethnic groups, which leads to a disparity in the toxicity observed with these drugs among these groups [13].

Treatment adherence is a key factor among cultural factors that could also modulate drug response, For example, many studies have correlated mediocre blood pressure control to poor treatment adherence, equally correlated to ethnicity [14].

2- Role of genetic factors in treatment efficacy and toxicity

Polymorphisms are naturally occurring variations in the sequence of genetic information on a segment of DNA in more than 1 % of the population. These variations lead to a modulation in the gene products—mostly proteins—which interact directly or indirectly with drugs. This could result in absence of the gene product (e.g., absence of a specific enzyme), presence of an inactive gene product (e.g., presence of an inactive enzyme), or increased gene product activity (e.g., presence of higher copies of this enzyme).

According to Burroughs *et al.*, three processes or mechanisms are involved in the polymorphisms-drug response interaction, namely, drug metabolism, drug targets, and disease pathway [6]. However, polymorphisms in drug metabolism are usually considered the most relevant due to their recurrence in many important therapeutic classes. This is especially true in comparison with the other two mechanisms that may affect only one drug or one class of drugs [6].

Polymorphisms of drug metabolism can influence individual response to drug therapy as a result of highly variable plasma concentrations of the parent compound or its metabolites [15]. Oxidation, acetylation, and/or methylation are the main processes of biotransformation. The CYP family is the major oxidative system and is implicated in the oxidation—and elimination—of more than 50 % of all marketed drugs [16]. More importantly, many polymorphisms in CYP activity have been described.

Drug targets are extremely numerous and consist of enzymes, cell surface receptors, nuclear hormone receptors, ion channels and transporters [17]. Many polymorphisms are observed within the genes encoding for these drug targets and can cause an alteration in sensitivity to several therapies.

Many of the above-mentioned polymorphisms are not uniformly distributed among ethnic groups [18]. This ethnicity-related discrepancy results in significant variation of drug response and takes one of the following forms: 1) alteration in treatment efficacy and responsiveness, or 2) alteration in treatment toxicity and adverse reactions (Figure 1).

2.1- Alteration in treatment responsiveness and efficacy

One of the best illustrations of the polymorphism of drug metabolism and its relation to ethnicity and treatment responsiveness may be the polymorphisms observed in *CYP2D6*. Indeed, *CYP2D6* polymorphisms are clinically very important due to the fact that around 20-25 % of all drugs are metabolized by this enzyme. Mutations in the *CYP2D6* locus result in either a no encoded enzyme, a deficient enzyme or an enzyme with increased activity [19]. This leads to four activity levels (or phenotypes): poor metabolizers (PMs); intermediate metabolizers (IMs); extensive metabolizers (EMs); and ultrarapid metabolizers (UMs) [20, 21]. Presently, more than 46 different major polymorphic *CYP2D6* alleles are known [22]. However, few are clinically and quantitatively relevant, namely, *CYP2D6*2*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*5*, *CYP2D6*10*, *CYP2D6*17* and *CYP2D6*41* (Table 1). In particular, the *2 allele variant, resulting from a gene multi-duplication, increases enzyme activity, which leads to an extensive *CYP2D6*-mediated metabolism and a decrease in the efficacy of *CYP2D6* substrates (many cardiovascular drugs). An excellent review by Bernard *et al.* provides a list of numerous studies conducted in many countries that demonstrated significant interethnic differences in

CYP2D6 allele frequencies (Table 2) [23]. These interethnic differences lead to significant variations in treatment efficacy among ethnic groups.

To cite some examples, many beta-blockers are partially or entirely cleared from the organism via a *CYP2D6*-mediated metabolism, such as bufuralol, bupranolol, carvedilol, labetalol, metoprolol, propranolol and timolol [22]. An increase in their metabolic clearance decreases their plasmatic concentrations and efficacy. In Ethiopian and Saudi Arabian descendants, for example, special attention—and probably higher doses—should be given in their hypertension management with many beta-blockers [22, 23]. Indeed, 29 % of Ethiopians and 21 % of Saudi Arabians are UMs for *CYP2D6* compared to Caucasians (4 %).

Other polymorphisms could diminish beta-blockers efficacy and response. In fact, many polymorphisms have been observed in beta1-adrenergic receptors, showing altered functions or regulations [24]. These receptors are the drug targets of beta-blockers and could therefore reduce their responsiveness. However, many clinical studies still need to be conducted in order to gain a better understanding of these polymorphisms and the way to use them in managing cardiovascular patients from different ethnic groups.

As is the case with beta-blockers, several antiarrhythmics are also metabolized by *CYP2D6*. Indeed, propafenone and flecainide can be less effective in UMs for *CYP2D6* and higher doses may be required [25]. Special attention should be given to these drugs.

Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors are currently the cornerstone of managing patients with cardiovascular and renal disease [26]. However, responsiveness to equivalent doses of ACE inhibitors fluctuates significantly between individuals within

the same group or from different ethnic groups [27] (Figure 2). Rigat *et al.* were among the first to explain inter-individual variability in the response to ACE inhibitor treatment [28]. They found that the ACE insertion/deletion (I/D) polymorphism—corresponding to an insertion or a deletion of a 287 bp Alu repeat polymorphism in intron 16—explained around 50 % of the variance in serum ACE levels. While many studies have been conducted since then in order to elucidate this polymorphism impact, the results have been inconclusive [29]. Still, a trend has been observed towards a better response to ACE inhibitors in Caucasian DD carriers compared to II carriers [30]. Moreover, some studies have found that ACE inhibitors do not normalize hypertension in African Americans as effectively as in Whites, and therefore the addition of a second antihypertensive agent, such as a diuretic, would be an excellent strategy [31-33].

2.2- Alteration in treatment toxicity and adverse reactions

Anticoagulotherapy is a perfect example for describing the variation of adverse reactions and its correlation with ethnicity. Indeed, warfarin—an oral anticoagulant from the coumarin family—is one of the most widely prescribed anticoagulant drugs for prophylaxis and treatment of pulmonary embolism and venous and arterial thrombosis [34]. However, its use requires very close patient monitoring (INR should fluctuate between 2 and 3) because of the clinical importance of observed adverse reactions. More precisely, bleeding is observed in up to 16 % of patients per year and serious hemorrhages are observed at a rate of 1.3 to 4.2 per 100 patients per year of exposure [35, 36]. These adverse reactions and the variability in warfarin dosage requirements have been related, *inter alia*, to genetic polymorphisms in *CYP2C9* (polymorphism of drug metabolism) and *VKORC1* (polymorphism of drug target).

First, CYP2C9 is the main metabolic enzyme responsible for the metabolism of S-warfarin, the isomer with the most pharmacological activity [37]. In addition, numerous allele variants have been identified for *CYP2C9*. Two of these allele variants (*3 and *6) are associated with a loss of activity while *2, *4, *5, and *11 are associated with weaker enzyme activities [38-41]. However, a decrease in warfarin's metabolic capability has only been described in carriers of *2 and *3 variants [42]. Diminution of the metabolic clearance of warfarin in PMs leads inevitably to an increase in plasma concentrations of S-warfarin and an increase in the drug's activity compared to an equivalent dose in EMs. A risk of severe adverse reactions is very frequent in PMs, making a dose adjustment necessary. Health management in warfarin-treated patients is complicated by the fact that these polymorphisms are not uniformly distributed in all ethnic groups. A review by Lee *et al.* describes the heterogenic distribution of CYP2C9 polymorphisms among ethnic groups (Table 3) [43]. For example, while one-third of Caucasians express either the *2 or *3 genotypes, no individuals of Japanese, Chinese, Korean or Taiwanese origin express the *2 variant, and few express the *3 variant.

Another factor that can explain the variability in warfarin treatment is the polymorphisms expressed in the warfarin pharmacodynamical target, namely, the vitamin K epoxide reductase (VKOR). These polymorphisms may lead to warfarin resistance and to a decrease in its activity. Many variants in the VKOR complex subunit 1 (*VKORC1*) gene have recently been described, including many haplotypes—based on single nucleotide polymorphisms. Moreover, it would appear that individuals carrying the H1 and H2 haplotypes require significantly lower doses of warfarin than those carrying the H7, H8 and H9 haplotypes [44, 45]. This is more pronounced in Asian sub-populations where, contrary to *CYP2C9* polymorphisms, *VKORC1* haplotypes account

for the difference in warfarin requirements between Chinese, Malays, and Indians [46]. Indeed, the *VKORC1* H1 haplotype is common among Chinese (87 %) and Malays (65 %) and less so among Indians (12 %) while H7, H8 and H9 haplotypes were inversely distributed among these groups [46]. In short, according to ethnic group, *CYP2C9* and *VKORC1* account for 5-22 % and 6-37 % of warfarin variability respectively [47]. In this light, new studies are needed to elucidate all the mechanisms and parameters that account for genetic-related variability of warfarin treatment [48].

ACE inhibitors have also been associated with an increase in treatment toxicity according to the ethnic background of the patient. Indeed, many studies have concluded that Black patients under ACE inhibitors had a three-fold increase in relative risk of angio-oedema episodes compared to non-Blacks [49]. It has been also suggested that American Asian patients have a high risk (50 %) of cough with ACE inhibitors, making this therapeutic class less tolerable in this ethnic population [50]. On the other hand, some small clinical trials have reported more depression incidence with hydrochlorothiazide in Black patients than in White patients [49].

3- Towards an individualized therapy for better management of cardiovascular patients from ethnic minorities?

As shown above, many examples of ethnicity-related pharmacogenetics can be listed to illustrate variability of drug efficacy and toxicity and, therefore, the difficulty of health management in these cases.

The genomic revolution, with the Human Genome Project as its center piece, has made many strides in providing a better understanding of the relationship between drug therapy and ethnicity. However, we are still at the very beginning of this knowledge development process. Indeed, many studies confirm that the impact of genetic ethnicity-related polymorphisms is still very controversial. This uncertainty can be explained by the fact that there have only been a few large clinical trials that have closely studied the impact of ethnicity on drug response. Moreover, even many published comparative trials between ethnic groups remain controversial because of the small number of Black, Asian or Hispanic subjects included compared to White subjects. This imbalance can create many biases and could lead to false conclusions.

In addition, we still lack an understanding of the clinical impact of every polymorphism discovered and of their impact on observed inter-ethnic variability. For example, polymorphisms in *VKOR1* and *CYP2C9* can only explain some of the variability in warfarin therapy. Many other yet-to-be-discovered genetic polymorphisms and environmental factors remain to be elucidated.

The dilemma that every physician faces remains the same: what is the optimal approach to, say, a self-described Black patient. Will he or she respond less with an ACE inhibitor? It is well established that even though Blacks in general respond less to ACE inhibitors, this therapeutic family should not be avoided for all Black patients. Even though physicians can ask—at a relatively high cost with many pharmacoeconomic doubts—for the genetic “fingerprints” of their patient, there is still a problem with the predictability of this information. Although genetic fingerprints are undoubtedly very

useful in predicting plasmatic concentrations of a drug and its clearance, they do not necessarily predict its pharmacological response.

The pharmacogenetic gaps we are currently facing in our understanding and prediction of drug response and toxicity can be overcome by continuing research in pharmacogenomics at the basic and clinical levels. The direction this research should take should be based on discovering new genetic markers followed by their validation in large clinical trials in different ethnic groups. Subsequently, this research could be used as a tool for physicians in everyday clinical practice. In addition, pharmaceutical companies should be pressed to include more individuals from ethnic groups in their clinical studies before drug launching.

Good health is our birthright, with no discrimination according to ethnic background. As such, healthcare should seek to eliminate disparities in cardiovascular health and healthcare delivery. All socioeconomic and environmental parameters indicate that population migrations will constantly increase over the next decades. As such, many societies which had genetically homogenous populations are being transformed into a mix of various ethnic backgrounds. Physicians will face new challenges in healthcare management because of greater variability in drug response.

The goal of rational drug treatment is to maximize benefits and to minimize harm. Despite the fact that we are not yet adequately able to predict drug effect and determine which treatment to use based on the patient's genetic characteristics, physicians should base their treatment plan on their clinical judgment, keeping in mind that a particular

individual interacts with his or her environment and can have phenotypic characteristics that might false genotype-based predictions.

In conclusion, the pharmacogenomic tools currently at our disposition (i.e. genetics chips, etc.) are—and even more so in the future—very useful for developing better individualized therapies, especially for ethnic groups.

References

- [1] Bhopal R. Glossary of terms relating to ethnicity and race: for reflection and debate. *Journal of epidemiology and community health*. 2004 Jun;58(6):441-5.
- [2] McKenzie K, Crowcroft NS. Describing race, ethnicity, and culture in medical research. *Bmj*. 1996 Apr 27;312(7038):1054.
- [3] Prevalence of heart disease--United States, 2005. *Mmwr*. 2007 Feb 16;56(6):113-8.
- [4] Cappuccio FP. Commentary: epidemiological transition, migration, and cardiovascular disease. *International journal of epidemiology*. 2004 Apr;33(2):387-8.
- [5] Munoz C, Hilgenberg C. Ethnopharmacology: understanding how ethnicity can affect drug response is essential to providing culturally competent care. *Holistic nursing practice*. 2006 Sep-Oct;20(5):227-34.
- [6] Burroughs VJ, Maxey RW, Levy RA. Racial and ethnic differences in response to medicines: towards individualized pharmaceutical treatment. *Journal of the National Medical Association*. 2002 Oct;94(10 Suppl):1-26.
- [7] Chen Z, Boreham J. Smoking and cardiovascular disease. *Seminars in vascular medicine*. 2002 Aug;2(3):243-52.
- [8] Evans M, Lewis GM. Increase in international normalized ratio after smoking cessation in a patient receiving warfarin. *Pharmacotherapy*. 2005 Nov;25(11):1656-9.
- [9] Kuykendall JR, Houle MD, Rhodes RS. Possible warfarin failure due to interaction with smokeless tobacco. *The Annals of pharmacotherapy*. 2004 Apr;38(4):595-7.
- [10] Tobacco use among adults--United States, 2005. *Mmwr*. 2006 Oct 27;55(42):1145-8.

- [11] DiPiro JT. Pharmacotherapy : a pathophysiologic approach. 6th ed. New York ; Toronto: McGraw-Hill 2005.
- [12] Sotaniemi EA, Anttila M, Rautio A, Stengard J, Saukko P, Jarvensivu P. Propranolol and sotalol metabolism after a drinking party. *Clin Pharmacol Ther.* 1981 Jun;29(6):705-10.
- [13] Caetano R, Clark CL, Tam T. Alcohol consumption among racial/ethnic minorities: theory and research. *Alcohol health and research world.* 1998;22(4):233-41.
- [14] Bosworth HB, Dudley T, Olsen MK, Voils CI, Powers B, Goldstein MK, *et al.* Racial differences in blood pressure control: potential explanatory factors. *The American journal of medicine.* 2006 Jan;119(1):70 e9-15.
- [15] Labbe L, Turgeon J. Clinical pharmacokinetics of mexiletine. *Clinical pharmacokinetics.* 1999 Nov;37(5):361-84.
- [16] Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug metabolism reviews.* 1997 Feb-May;29(1-2):413-580.
- [17] Robertson JG. Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs. *Biochemistry.* 2005 Apr 19;44(15):5561-71.
- [18] Engen RM, Marsh S, Van Booven DJ, McLeod HL. Ethnic differences in pharmacogenetically relevant genes. *Current drug targets.* 2006 Dec;7(12):1641-8.
- [19] Bertilsson L. Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clinical pharmacokinetics.* 1995 Sep;29(3):192-209.

- [20] Jann MW, Cohen LJ. The influence of ethnicity and antidepressant pharmacogenetics in the treatment of depression. *Drug metabolism and drug interactions*. 2000;16(1):39-67.
- [21] Meyer UA. Pharmacogenetics: the slow, the rapid, and the ultrarapid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994 Mar 15;91(6):1983-4.
- [22] Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J*. 2005;5(1):6-13.
- [23] Bernard S, Neville KA, Nguyen AT, Flockhart DA. Interethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6 in the U.S. population: clinical implications. *Oncologist*. 2006 Feb;11(2):126-35.
- [24] Mialet-Perez J, Liggett SB. Pharmacogenetics of beta1-adrenergic receptors in heart failure and hypertension. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux*. 2006 Jun;99(6):616-20.
- [25] Poolsup N, Li Wan Po A, Knight TL. Pharmacogenetics and psychopharmacotherapy. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2000 Jun;25(3):197-220.
- [26] Masoudi FA, Rathore SS, Wang Y, Havranek EP, Curtis JP, Foody JM, *et al*. National patterns of use and effectiveness of angiotensin-converting enzyme inhibitors in older patients with heart failure and left ventricular systolic dysfunction. *Circulation*. 2004 Aug 10;110(6):724-31.
- [27] Haas M, Yilmaz N, Schmidt A, Neyer U, Arneitz K, Stummvoll HK, *et al*. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism determines the antiproteinuric and

systemic hemodynamic effect of enalapril in patients with proteinuric renal disease. Austrian Study Group of the Effects of Enalapril Treatment in Proteinuric Renal Disease. *Kidney & blood pressure research*. 1998;21(1):66-9.

[28] Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *The Journal of clinical investigation*. 1990 Oct;86(4):1343-6.

[29] Costa-Scharplatz M, van Asselt AD, Bachmann LM, Kessels AG, Severens JL. Cost-effectiveness of pharmacogenetic testing to predict treatment response to angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Pharmacogenetics and genomics*. 2007 May;17(5):359-68.

[30] Scharplatz M, Puhan MA, Steurer J, Perna A, Bachmann LM. Does the Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene insertion/deletion polymorphism modify the response to ACE inhibitor therapy?--A systematic review. *Current controlled trials in cardiovascular medicine*. 2005 Oct 24;6:16.

[31] Saunders E, Weir MR, Kong BW, Hollifield J, Gray J, Vertes V, *et al*. A comparison of the efficacy and safety of a beta-blocker, a calcium channel blocker, and a converting enzyme inhibitor in hypertensive blacks. *Archives of internal medicine*. 1990 Aug;150(8):1707-13.

[32] Cushman WC, Reda DJ, Perry HM, Williams D, Abdellatif M, Materson BJ. Regional and racial differences in response to antihypertensive medication use in a randomized controlled trial of men with hypertension in the United States. Department of Veterans Affairs Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents. *Archives of internal medicine*. 2000 Mar 27;160(6):825-31.

- [33] Richardson AD, Piepho RW. Effect of race on hypertension and antihypertensive therapy. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. 2000 Feb;38(2):75-9.
- [34] Abdelhafiz AH. A review of anticoagulation with warfarin in patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Clinical therapeutics*. 2001 Oct;23(10):1628-36.
- [35] Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet*. 1999 Feb 27;353(9154):717-9.
- [36] Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood*. 2000 Sep 1;96(5):1816-9.
- [37] Wingard LB, Jr., O'Reilly RA, Levy G. Pharmacokinetics of warfarin enantiomers: a search for intrasubject correlations. *Clin Pharmacol Ther*. 1978 Feb;23(2):212-7.
- [38] Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, Zhang ZY, Kaminsky LS, Shenfield GM, *et al*. The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics*. 1996 Aug;6(4):341-9.
- [39] Dickmann LJ, Rettie AE, Kneller MB, Kim RB, Wood AJ, Stein CM, *et al*. Identification and functional characterization of a new CYP2C9 variant (CYP2C9*5) expressed among African Americans. *Molecular pharmacology*. 2001 Aug;60(2):382-7.
- [40] Kidd RS, Curry TB, Gallagher S, Edeki T, Blaisdell J, Goldstein JA. Identification of a null allele of CYP2C9 in an African-American exhibiting toxicity to phenytoin. *Pharmacogenetics*. 2001 Dec;11(9):803-8.

- [41] Tai G, Farin F, Rieder MJ, Dreisbach AW, Veenstra DL, Verlinde CL, *et al.* In-vitro and in-vivo effects of the CYP2C9*11 polymorphism on warfarin metabolism and dose. *Pharmacogenetics and genomics*. 2005 Jul;15(7):475-81.
- [42] Linder MW, Looney S, Adams JE, 3rd, Johnson N, Antonino-Green D, Lacefield N, *et al.* Warfarin dose adjustments based on CYP2C9 genetic polymorphisms. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2002 Dec;14(3):227-32.
- [43] Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics*. 2002 Apr;12(3):251-63.
- [44] Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, *et al.* Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *The New England journal of medicine*. 2005 Jun 2;352(22):2285-93.
- [45] Takahashi H, Wilkinson GR, Nutescu EA, Morita T, Ritchie MD, Scordo MG, *et al.* Different contributions of polymorphisms in VKORC1 and CYP2C9 to intra- and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans. *Pharmacogenetics and genomics*. 2006 Feb;16(2):101-10.
- [46] Lee SC, Ng SS, Oldenburg J, Chong PY, Rost S, Guo JY, *et al.* Interethnic variability of warfarin maintenance requirement is explained by VKORC1 genotype in an Asian population. *Clin Pharmacol Ther*. 2006 Mar;79(3):197-205.
- [47] Yin T, Miyata T. Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1 - Rationale and perspectives. *Thrombosis research*. 2007;120(1):1-10.
- [48] Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, *et al.* The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics

upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood*. 2005 Oct 1;106(7):2329-33.

[49] McDowell SE, Coleman JJ, Ferner RE. Systematic review and meta-analysis of ethnic differences in risks of adverse reactions to drugs used in cardiovascular medicine. *Bmj*. 2006 May 20;332(7551):1177-81.

[50] Hunt SA, Baker DW, Chin MH, Cinquegrani MP, Feldman AM, Francis GS, *et al*. ACC/AHA Guidelines for the Evaluation and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation; Endorsed by the Heart Failure Society of America. *Circulation*. 2001 Dec 11;104(24):2996-3007.

[51] Materson BJ. Variability in response to antihypertensive drugs. *The American journal of medicine*. 2007 Apr;120(4 Suppl 1):S10-20.

Table legends

Table 1: Major human polymorphic variant *CYP2D6* alleles and their global distribution (Reproduced from Ingelman-Sundberg *et al.* with journal permission) [22].

Table 2: Incidence of CYP2D6 enzyme phenotypes among different ethnic populations (Reproduced from Bernard *et al.* with journal permission) [23].

Table 3: Population distribution of *CYP2C9* genotype among ethnicity (Reproduced from Lee *et al.* with journal permission) [43].

Table 1

<i>Major variant alleles</i>	<i>Mutation</i>	<i>Consequence</i>	<i>Allele frequencies (%)</i>			
			<i>Caucasians</i>	<i>Asians</i>	<i>Black Africans</i>	<i>Ethiopians and Saudi Arabians</i>
<i>CYP2D6</i> * 2 _{xt}	Gene duplication/multiduplication	Increased enzyme activity	1-5	0-2	2	10-16
<i>CYP2D6</i> * 4	Defective splicing	Inactive enzyme	12-21	1	2	1-4
<i>CYP2D6</i> * 5	Gene deletion	No enzyme	2-7	6	4	1-3
<i>CYP2D6</i> * 10	P34S, S486T	Unstable enzyme	1-2	51	6	3-9
<i>CYP2D6</i> * 17	T107L, R296C, S486T	Altered affinity for substrates	0	0	20-35	3-9

Table 2

Population	PM phenotype (%)	Diminished activity of IMs (%)	UM phenotype (%)	Reference
White		1-2		[1]
American	7.7		4.3	[20, 40]
British	8.9			[26]
Polish	8.3			[73]
Swiss	10			[25]
Danish			0.8	[22]
German	7.7		0.8	[49]
Swedish			1	[50]
Spanish			10	[23]
Turkish	1.5		8.7	
Croatian	3.0		4.0	[74]
African				
African-American	1.9-7.3		4.9	[20, 39-42]
Nigerian	0-8.1			[35, 36]
Ghanaian	6.0			[37]
Ethiopian	1.8		29	[21]
South African	19			[38]
Asian		51		[1]
Japanese	0			[29]
Chinese	<1.0		0.9	[28, 75]
Thai	1.2			[27]
Indian	1.8-4.8			[30-33]
Saudi Arabian	1-2	3-9	21.0	[1, 51, 76]
Hispanic				
Colombian	6.6		1.7	[47]
Mexican	3.2			[46]
Panamanian (Amerindian)	2.2-4.4			[45]
Nicaraguan	3.6			[48]

Abbreviations: IM, intermediate metabolizer; PM, poor metabolizer; UM, ultrarapid metabolizer.

Table 3

Ethnic group	Reference	*1*1	*1*2	*1*3	*2*2	*2*3	*3*3	n
Caucasian	Scordo et al.	102 (65.0%)	24 (16.8%)	22 (14.0%)	4 (2.5%)	3 (1.9%)	2 (1.3%)	157
	Taube et al.	392 (70.0%)	107 (19.0%)	53 (9.5%)	3 (0.5%)	6 (1.0%)	0 (0%)	561
	Margaglione et al.	88 (48.9%)	62 (34.4%)	28 (15.6%)	0 (0%)	2 (1.1%)	0 (0%)	180
	Yasar et al.	287 (66.7%)	80 (18.6%)	50 (11.6%)	2 (0.5%)	8 (1.9%)	3 (0.7%)	430
	Lee et al.	34 (61.8%)	9 (16.4%)	8 (14.5%)	3 (5.5%)	1 (1.8%)	0 (0%)	55
	Total (%)	903 (65.3%)	282 (20.4%)	161 (11.6%)	12 (0.9%)	20 (1.4%)	5 (0.4%)	1383
African-American	Sullivan-Klose et al.	97 (97.0%)	2 (2.0%)	1 (1.0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	100
African	Scordo et al.	130 (87.0%)	13 (8.7%)	7 (4.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	150
Turkish	Aynacioglu et al.	308 (61.7%)	90 (18.0%)	86 (17.2%)	5 (1.0%)	6 (1.1%)	4 (0.8%)	499
Spanish	Garcia-Martin et al.	78 (49.7%)	25 (15.9%)	37 (23.5%)	3 (1.9%)	14 (8.9%)	0 (0%)	157
Japanese	Nasu et al.	209 (95.9%)	0 (0%)	9 (4.1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	218
Chinese	Wang et al.	111 (96.5%)	0 (0%)	4 (3.5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	115
Taiwanese	Sullivan-Klose et al.	93 (91.8%)	0 (0%)	5 (8.2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	98
Korean	Yoon et al.	561 (97.7%)	0 (0%)	13 (2.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	574

Figure legends

Figure 1: Ethnicity can play a major role in pharmacological response. Within a population, patients with the same diagnostic can be divided into two groups: 1) patients with favorable response; and 2) ethnic patients with no response or toxicity. The latter group requires a treatment adjustment with an alternative drug or dose (Adapted and reprinted, with permission, from the *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, Volume 2 ©2001 by Annual Reviews www.annualreviews.org) [43].

Figure 2: Percentage of patients by race/ethnicity who achieved goal blood pressure with the ACE inhibitor captopril (CAP) (Reproduced from Materson *et al.* with permission) [51].

Figure 1

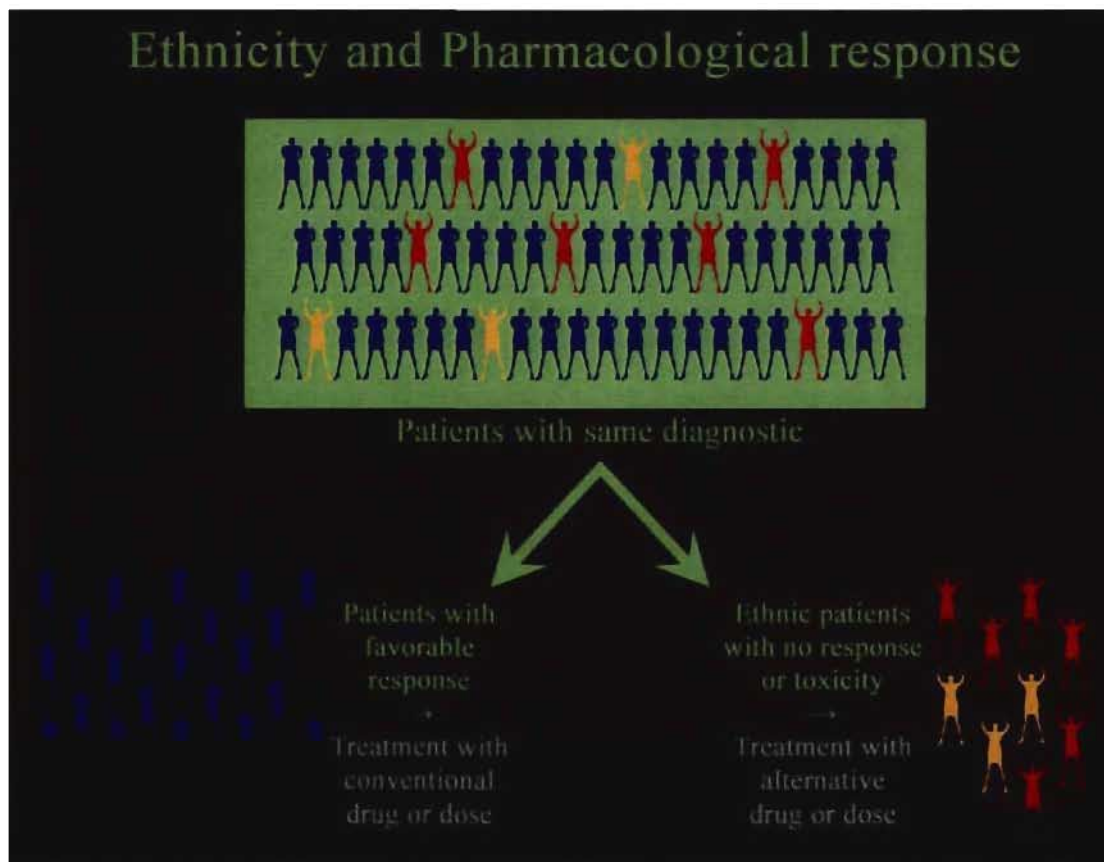
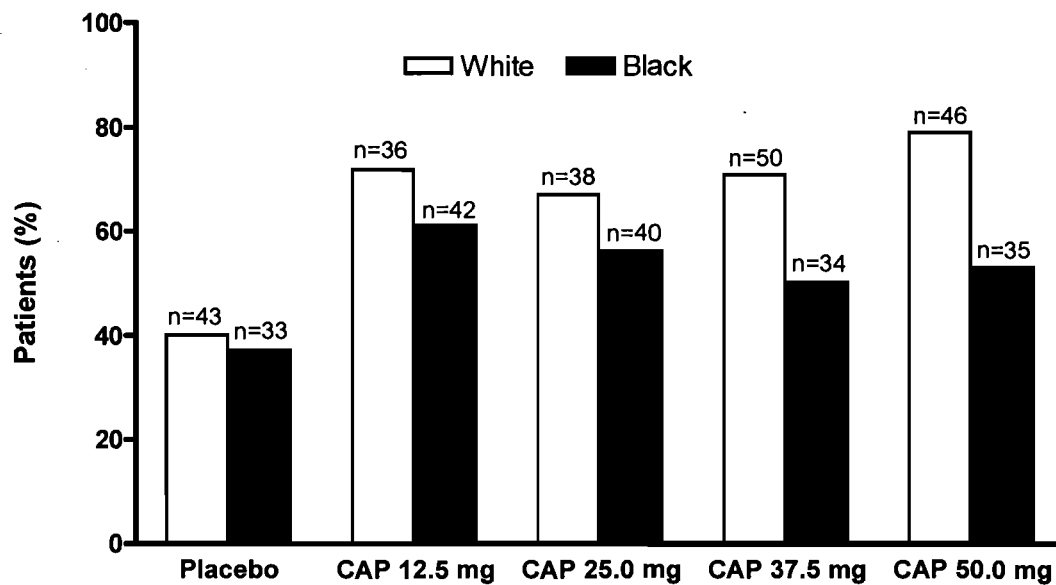


Figure 2



ANNEXE 3

INTERACTIONS MEDICAMENTEUSES ET RISQUE DE TORSADES DE POINTES

Interactions médicamenteuses et risque de torsades de pointes.

(Chronique : En direct de l'unité)

Raymond Hreiche, Pharm.D., M.Sc., Etudiant au Ph.D.

Jacques Turgeon, B.Pharm., Ph.D.*

Faculté de Pharmacie, Université de Montréal

Address for correspondence:

Jacques Turgeon, Ph.D.

Research Center

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal


Hôtel-Dieu, Masson Pavilion room 8-213

3850 Saint Urbain street,

Montreal (QC) H2W 1T7

Tel : (514) 890-8044

Fax : (514) 412-7186



Résumé

a. Objectif : Certaines études pharmacoépidémiologiques font état de plus de 10 000 morts annuellement au Canada suite à l'utilisation inappropriée de médicaments. De plus, on dénote par des études semblables qu'environ 30 % des hospitalisations seraient reliées à des problèmes de pharmacothérapie.

b. Résumé du cas : Une patiente traitée par de la quinidine, de la rispéridone et de l'indapamide se voit prescrire de la clarithromycine pour une sinusite aiguë. Le risque d'interactions médicamenteuses graves est-il présent et quelles en seraient les conséquences ?

c. Discussion et Conclusion : Des modifications dans le métabolisme ou le transport des médicaments présents au dossier pharmacologique de cette patiente risquent de provoquer un allongement important de l'intervalle QT. De plus, ces interactions médicamenteuses peuvent induire une potentialisation des effets électrophysiologiques cardiaques de certains de ces médicaments. Les mécanismes sous-jacents à ces interactions seront discutés menant à la conclusion que l'administration de clarithromycine peut créer une condition prédisposant à des risques de torsades de pointes et de mort subite.

d. Mots clés : Cytochromes P450, interactions médicamenteuses, torsades de pointes, transporteurs ABC, canaux potassiques.

Présentation du cas clinique

Il s'agit d'une patiente J.K. âgée de 53 ans qui se présente à la pharmacie pour se procurer une prescription de Biaxin[®] (Clarithromycine) 500 mg BID pour 10 jours dans le but de traiter une sinusite aiguë à *Streptococcus pneumoniae*. Mme J.K. est traitée depuis 2 ans par le sulfate de quinidine 200 mg TID pour une fibrillation auriculaire. De plus, elle est traitée depuis 6 mois pour des troubles psychotiques par du Risperdal[®] (Rispéridone) 2 mg BID. Enfin, l'hypertension artérielle de Mme J.K. est contrôlée par du Lozide[®] (Indapamide) 2,5 mg ID.

Après avoir consulté son dossier pharmacothérapeutique, le pharmacien hésite à remettre la prescription de clarithromycine en raison du risque majeur d'interactions médicamenteuses pouvant causer des torsades de pointes (TdP). Cette hésitation est-elle justifiée ? Quels sont les facteurs prédisposants et les mécanismes impliqués dans ces interactions ?

Analyse:

Le syndrome du QT long médicamenteux et les torsades de pointes

Le syndrome du QT long (LQTS) est un désordre électrophysiologique caractérisé par un prolongement de l'intervalle QT, une propension à des arythmies ventriculaires sévères telles que les TdP et à des fibrillations ventriculaires pouvant conduire à une syncope et à une mort subite¹. Les agents antiarythmiques associés à une prolongation de la repolarisation cardiaque furent parmi les premiers produits identifiés comme agents

pouvant causer des TdP. Par la suite, et grâce entre autres à la mise en place de programmes de surveillance des effets secondaires des médicaments, plusieurs médicaments de diverses classes pharmacologiques ont également été associés à une prolongation de l'intervalle QT et à une induction de TdP. Des études électrophysiologiques ont démontré que la majorité des médicaments qui prolongent l'intervalle QT sont des bloqueurs puissants d'un canal potassique spécifique au niveau cardiaque soit la composante rapide (I_{Kr}) du courant potassique rectifiant retardé au niveau de la repolarisation ventriculaire. Ainsi, un blocage important d' I_{Kr} a été observé avec des antihistaminiques comme la terfénaire et l'astémizole, des antibiotiques comme l'érythromycine et la clarithromycine, des antifongiques comme le kétoconazole et l'itraconazole². Le cisapride et la dompéridone de même que le sildénafil sont également des bloqueurs d' I_{Kr} ³⁻⁵. Plusieurs antipsychotiques ont été aussi associés à un prolongement de l'intervalle QT, notamment la rispéridone, le pimozide, la clozapine, et plus récemment l'olanzapine et la quétiapine⁶. Plusieurs autres exemples de LQTS médicamenteux furent observés avec des anesthésiques généraux, des antidépresseurs, des antipaludéens...

Facteurs prédisposant au LQTS médicamenteux et aux TdP

1- Mutations génétiques

Des mutations génétiques au niveau des canaux ioniques cardiaques peuvent provoquer un LQTS dit congénital ; en effet, au moins 7 sous-types de LQTS congénital ont été identifiés à ce jour. Les données épidémiologiques indiquent que les formes majeures de LQTS congénital seraient reliées à des mutations au sein des 2 composantes lente (I_{Ks}) et

rapide (I_{Kr}) du courant potassique rectifiant retardé⁷. Il est aussi connu que des patients peuvent présenter des mutations « cliniquement silencieuses » au niveau des gènes codant pour I_{Ks} . Ces patients présentent alors une repolarisation cardiaque d'apparence normale grâce à un courant I_{Kr} normal. Cependant, ils démontrent concrètement une réduction de leur réserve de repolarisation par la diminution d' I_{Ks} . Ainsi, la prise d'un bloqueur d' I_{Kr} élimine le seul courant sortant principal chez ces patients et démasque la déficience latente d' I_{Ks} . Le médicament bloqueur d' I_{Kr} provoque alors un allongement important de l'intervalle QT et augmente significativement le risque de TdP par rapport aux patients ne présentant aucune mutation. De cette façon, la présence éventuelle de mutations non identifiées pourrait être un facteur majeur prédisposant aux TdP médicamenteuses. Cette notion fait naître un intérêt de génotyper les patients à risque.

2- Bradycardie

La repolarisation cardiaque est étroitement liée à la fréquence cardiaque. En effet, plus la fréquence cardiaque est basse, plus la repolarisation cardiaque s'effectuera lentement. Ainsi, une bradycardie importante, voire une pause, peut entraîner un prolongement de l'intervalle QT et une induction de TdP. La majorité des bloqueurs d' I_{Kr} prolonge préférentiellement et d'une façon plus prononcée le potentiel d'action à de basses fréquences de stimulation (bradycardie). Cet effet, plus connu sous le terme de « reverse rate dependence », serait relié à l'accumulation d' I_{Ks} durant une stimulation rapide. En effet, il a été démontré que le courant I_{Ks} , lors d'une stimulation rapide, n'avait pas le temps nécessaire pour se désactiver complètement, ce qui augmentait le potentiel de repolarisation et minimisait les effets des bloqueurs d' I_{Kr} à ces fréquences rapides. Ainsi les bloqueurs d' I_{Kr} augmentent le risque de TdP majoritairement dans une situation de

bradycardie dans la mesure où aucune accumulation d' I_{Ks} à de basses fréquences n'est possible⁸.

3- Sexe

Plusieurs études cliniques indiquent que les femmes sont à plus haut risque de développer des TdP induites par les médicaments. En effet, l'étude de Makkar et coll. en 1993 conclut que 70 % des 332 cas de torsades de pointes induites par des médicaments étaient observés chez des femmes⁹. De plus, au cours de l'étude SWORD (Survival with Oral *d*-Sotalol), le genre féminin fut identifié comme facteur de risque majeur associé à une augmentation du risque de morts par arythmie dans une population en post-infarctus du myocarde¹⁰. Plusieurs investigateurs sont d'avis que les hormones sexuelles et les variabilités inter-sexes dans la densité des canaux ioniques n'ont qu'un rôle mitigé dans l'implication des différences observées entre les hommes et les femmes. Par ailleurs, nous avons proposé que les variations observées au niveau de la pharmacocinétique des médicaments tant au niveau des cytochromes P450 que des transporteurs membranaires pourraient représenter un facteur majeur dans les différences liées au sexe.

4- Troubles électrolytiques : hypokaliémie et hypomagnésémie

Un désordre électrolytique – particulièrement une hypokaliémie – est considéré comme un facteur important de survenue de LQTS. En effet, Roden et coll. ont démontré qu'une hypokaliémie induisait une inactivation rapide et importante d' I_{Kr} , ce qui provoquait une diminution globale des courants repolarisants sortant et une prolongation de la repolarisation. Cette dernière favorisait l'observation d'un prolongement de l'intervalle QT¹¹.

Comme le potassium, une baisse de la concentration extracellulaire de magnésium fut associée à des troubles de la dépolarisation, de la repolarisation et de l'automatisme. Des niveaux bas de magnésium semblent être dépendants des concentrations de calcium et potassium. Contrairement au potassium, le mécanisme par lequel une hypomagnésémie génère des potentiels d'action anormaux reste encore mal connu¹².

5- Interactions médicamenteuses

5.1. Inhibition des cytochromes P450

Les cytochromes P450 constituent une superfamille d'enzymes responsables du métabolisme de la majorité des médicaments utilisés actuellement en clinique¹³. La sous-famille CYP3A est responsable du métabolisme de plus de la moitié de ceux-ci et est présente principalement au niveau du foie et de l'intestin grêle chez l'homme (Figure 1). Des études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques ont démontré que plusieurs substrats des CYP3A possédaient également une conformation structurale démontrant une capacité à se lier à I_{Kr} . Utilisant cette relation, nous avons identifié plusieurs bloqueurs d' I_{Kr} dont l'érythromycine¹⁴, le cisapride³, le droperidol¹⁵, le pimozide¹⁶, le sildénafil⁵, la dompéridone⁴ et la rispéridone¹⁷.

Selon les principes connus de pharmacocinétique, on peut prédire que la coadministration de 2 ou de plusieurs substrats des CYP3A conduit à une interaction médicamenteuse au niveau de cette enzyme. En effet, une inhibition compétitive de l'activité des CYP3A lors de l'usage combiné de substrats de CYP3A provoque une augmentation des concentrations plasmatiques libres et totales de l'un des médicaments.

Il devient ainsi possible de prédire que les concentrations tissulaires d'un de ces médicaments seront augmentées. Si ce médicament s'accumule au niveau cardiaque et qu'il possède une affinité pour le blocage d' I_{Kr} , on pourrait observer une prolongation plus importante du potentiel d'action et un risque élevé de TdP. Par exemple, il fut démontré que la coadministration de terfénadine et d'érythromycine conduisait à une accumulation critique de terfénadine au niveau plasmatique et cardiaque secondairement à l'inhibition des CYP3A par l'érythromycine. Ainsi, la terfénadine, connue pour bloquer I_{Kr} , s'accumulait et provoquait une prolongation importante de la repolarisation cardiaque et un risque majoré de TdP¹⁸.

5.2. Inhibition des transporteurs ABC

L'inhibition des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette), et particulièrement la P-glycoprotéine (P-gp), est un facteur additionnel qui pourrait aider à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à l'induction de la prolongation de l'intervalle QT et des TdP. En utilisant l'hydrolyse de l'ATP, les transporteurs ABC sont capables de transporter à travers les membranes cellulaires une grande variété de xénobiotiques des sites intracellulaires vers le milieu extracellulaire¹⁹. Ainsi, ces transporteurs membranaires peuvent protéger les principaux organes par la modulation des concentrations intracellulaires des médicaments au niveau de leur site d'action.

La P-gp pourrait représenter un facteur important du contrôle de la distribution des médicaments au niveau des tissus exprimant cette protéine en diminuant la concentration intracellulaire des médicaments substrats de ce transporteur membranaire. Par ailleurs, lors d'une diminution de l'activité des P-gp, une accumulation intracellulaire des médicaments pourrait être observée.

De récentes études suggèrent la présence de P-gp au niveau cardiaque, le tout supportant l'hypothèse que l'inhibition de ce transporteur pourrait conduire à une augmentation des concentrations intracardiaques des médicaments (Figure 2). Comme le site de blocage d' I_{Kr} est intracellulaire, l'augmentation des concentrations intracardiaques d'un médicament bloqueur d' I_{Kr} induirait une grande probabilité de diminution du courant repolarisant et augmenterait les risques de TdP.

Nous avons récemment démontré que la prolongation de la repolarisation cardiaque par le cisapride ou la dompéridone induisait une augmentation plus importante du potentiel d'action ventriculaire chez les animaux prétraités au vérapamil (modulateur des transporteurs ABC). En effet, le traitement chronique au vérapamil semblerait diminuer l'expression des P-gp au niveau des cardiomyocytes. Ceci augmenterait les concentrations intracellulaires biodisponibles et induirait une augmentation de l'effet observé sans prétraitement. Pour cela, une attention particulière devrait être accordée lors de l'administration de médicaments prolongeant l'intervalle QT en association avec un substrat ou un inhibiteur des transporteurs ABC. De plus, plus de 50 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ont été identifiés au niveau du gène *MDR1* qui code pour la P-gp. Les SNP en position 3435 et 2677 suscitent le plus d'intérêt car ils ont été associés à des modifications d'expression de la P-gp et/ou des variations cinétiques. Également, le génotype C3435T est associé à des variations d'expression de la P-gp. Ainsi, les personnes présentant des mutations au niveau des transporteurs ABC pourraient être à risque plus élevé de développer des TdP lors de la prise d'un bloqueur d' I_{Kr} . Par ailleurs, des différences liées au sexe dans le processus de transport des substrats endogènes et exogènes ont été reportées dans différents organes chez le rat, la souris et l'homme. L'expression hépatique de la protéine P-gp est deux fois plus importante chez l'homme

que chez la femme, suggérant que la disposition des substrats de P-gp est différente selon le sexe, et expliquerait en partie la prédisposition des femmes aux TdP.

5.3. Prise simultanée de 2 ou plusieurs bloqueurs d'I_{Kr}

Nous avons vu précédemment que la coadministration de 2 ou plusieurs substrats des CYP3A pouvait conduire à une interaction médicamenteuse résultant en l'augmentation des concentrations libres du bloqueur d'I_{Kr} et l'augmentation du risque de TdP. Les médicaments responsables d'une modification métabolique due à une interaction sont le plus souvent des antibiotiques macrolides ou des antifongiques imidazolés qui sont également des bloqueurs d'I_{Kr}. Ceci a laissé croire que l'usage combiné de bloqueurs d'I_{Kr} est dangereux. Cette explication est attirante à première vue mais représente une exagération du mécanisme réel du LQTS médicamenteux. Les données expérimentales n'appuient pas l'hypothèse que l'usage combiné de bloqueurs d'I_{Kr} cause une potentialisation des effets des médicaments. Nous avons effectué des expérimentations sur des modèles animaux avec une combinaison de bloqueurs d'I_{Kr} tels que dofétilide et NAPA, dofétilide et érythromycine, dompéridone et kétoconazole (résultats en cours de publication). Dans tous les cas, nous observons une synergie additive partielle des bloqueurs d'I_{Kr} sur la prolongation de la repolarisation cardiaque, sans aucune potentialisation. En effet, les bloqueurs d'I_{Kr} présentent un site d'action commun, et à une certaine dose, une compétition s'établit au niveau du site de fixation à I_{Kr} sans possibilité d'observer une majoration de l'effet, mais seulement une addition partielle.

5.4. Association d'un bloqueur d'I_{Kr} et d'un bloqueur d'I_{Ks}

Contrairement au blocage d' I_{Kr} par plusieurs agents, nous avons déjà démontré que le blocage concomitant de la composante lente (I_{Ks}) et de la composante rapide (I_{Kr}) du courant potassique rectifiant retardé conduisait à une potentialisation de la prolongation de la repolarisation cardiaque comparativement à la somme des effets du bloqueur d' I_{Kr} et du bloqueur d' I_{Ks} seuls, ce qui prédispose les patients à un risque majoré de TdP et de mort subite²⁰. En fait, le bloc concomitant des 2 composantes se rapproche du scénario présent chez des patients exhibant des mutations génétiques au niveau d' I_{Ks} (réduction de la réserve de repolarisation) lors de l'administration d'un bloqueur d' I_{Kr} .

Retour au cas:

Les cas d'interactions médicamenteuses sont fréquents en pharmacothérapie et certaines sont très simples et prévisibles n'ayant que des conséquences mineures sur l'état du patient. Par contre, d'autres interactions sont plus complexes comportant des effets indésirables majeurs qui peuvent être fatals et souvent imprévisibles. La proarythmie cardiaque constitue l'un des effets indésirables les plus dangereux résultant d'interactions médicamenteuses délétères telles que celles décrites dans notre cas clinique (Tableau I).

Voici donc un sommaire et une analyse de ce cas :

1) Mme J.K. est traitée pour sa fibrillation auriculaire par de la quinidine, un antiarythmique de classe IA, qui possède, outre le blocage des canaux sodiques, des propriétés de prolongation de la repolarisation par blocage des courants potassiques I_{Kr} et I_{Ks} . Le risque de TdP estimé chez les patients traités à la quinidine est de 2 à 8 %. De plus, la quinidine est un substrat du CYP3A4, et un inhibiteur puissant du CYP2D6 et de

la P-gp. La quinidine possède donc un risque élevé d'interactions au niveau du métabolisme et du transport de plusieurs médicaments.

2) La rispéridone est un antipsychotique et un bloqueur d' I_{Kr} . Le blocage d' I_{Kr} peut être observé à des concentrations légèrement supérieures à celles observées en clinique. La rispéridone est éliminée principalement par un métabolisme lié au CYP2D6 et au CYP3A4. L'administration combinée de quinidine chez cette patiente fait en sorte que les voies de métabolisme dépendantes du CYP2D6 sont éliminées. La patiente dépend donc uniquement de son activité en CYP3A4. La coadministration proposée de clarithromycine qui est un inhibiteur puissant du CYP3A4, en association avec la rispéridone et la quinidine, deux substrats du CYP3A4, risquera donc de causer une accumulation très importante de la rispéridone et de la quinidine avec des risques importants d'effets secondaires incluant des TdP.

3) L'hypertension de Mme J.K. est traitée par l'indapamide, un diurétique qui peut provoquer des pertes de potassium et augmenter le risque de TdP. Mais de façon encore plus importante, l'indapamide est un bloqueur d' I_{Ks} . En combinaison avec des bloqueurs d' I_{Kr} , il y aura une potentialisation des effets.

4) Enfin, la clarithromycine est un inhibiteur du CYP3A4, des P-gp, et d' I_{Kr} . Son introduction au régime thérapeutique causera assurément une augmentation des concentrations plasmatiques et tissulaires de quinidine et de rispéridone.

5) La patiente reçoit conjointement plusieurs bloqueurs d' I_{Kr} (quinidine, rispéridone et clarithromycine) et d' I_{Ks} (quinidine et indapamide) conjointement. Il est ainsi fort probable d'observer une prolongation importante de l'intervalle QT chez cette patiente.

6) De plus, Mme J.K. est plus à risque du fait qu'elle est une femme, ce qui la prédispose fortement à développer des TdP. En effet, 2/3 des patients développant des TdP sont des femmes.

7) Finalement, une hypokaliémie causée par l'indapamide pourrait être observée chez Mme J.K. aggravant ainsi le risque de prolongement de l'intervalle QT.

En bref, la patiente se voit prescrire 3 substrats / inhibiteurs du CYP3A4, 2 substrats / inhibiteurs du CYP2D6, 2 substrats / inhibiteurs de P-gp, 3 bloqueurs d'I_{Kr} et 2 bloqueurs d'I_{Ks}. Il nous apparaîtrait alors judicieux d'effectuer un électrocardiogramme de surface chez cette patiente afin d'évaluer un éventuel allongement de son intervalle QT. La prescription du Biaxin[®] nous semblerait, dans ce cas précis, d'un rapport bénéfique / risque très bas et potentiellement torsadogénique, voire même fatal. Cette prescription pourrait être remplacée à titre d'exemple par l'association amoxicilline / acide clavulanique.

Conclusion

Il semble exister un lien étroit entre l'affinité de certains médicaments pour le courant I_{Kr}, les CYP3A4 et les P-gp. L'interaction des médicaments avec chacun des constituants de cette « triade » semble être le mécanisme clé dans la compréhension de la variabilité de la réponse pharmacodynamique de chaque individu. Ceci aboutirait *in fine* à une meilleure évaluation des rapports bénéfique / risque lors des prescriptions médicamenteuses. L'individualisation de la pharmacothérapie de chaque patient en fonction de son bagage génétique, son dossier thérapeutique et ses différents facteurs prédisposants reste un élément majeur à prendre en compte.

Références

1. Antzelevitch C, Shimizu W. Cellular mechanisms underlying the long QT syndrome. *Curr Opin Cardiol.* 2002;17(1):43-51.
2. Owens RC, Jr. QT prolongation with antimicrobial agents: understanding the significance. *Drugs.* 2004;64(10):1091-1124.
3. Drolet B, Khalifa M, Daleau P, Hamelin BA, Turgeon J. Block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current by the prokinetic agent cisapride underlies drug-related lengthening of the QT interval. *Circulation.* 1998;97(2):204-210.
4. Drolet B, Rousseau G, Daleau P, Cardinal R, Turgeon J. Domperidone should not be considered a no-risk alternative to cisapride in the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Circulation.* 2000;102(16):1883-1885.
5. Geelen P, Drolet B, Rail J, Berube J, Daleau P, Rousseau G, Cardinal R, O'Hara GE, Turgeon J. Sildenafil (Viagra) prolongs cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current. *Circulation.* 2000;102(3):275-277.
6. Titier K, Girodet PO, Verdoux H, Molimard M, Begaud B, Haverkamp W, Lader M, Moore N. Atypical antipsychotics : from potassium channels to torsade de pointes and sudden death. *Drug Saf.* 2005;28(1):35-51.
7. Moss AJ. Long QT Syndrome. *Jama.* 2003;289(16):2041-2044.
8. Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific

- block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide. *Circ Res.* 1993;72(1):75-83.
9. Makkar RR, Fromm BS, Steinman RT, Meissner MD, Lehmann MH. Female gender as a risk factor for torsades de pointes associated with cardiovascular drugs. *Jama.* 1993;270(21):2590-2597.
 10. Waldo AL, Camm AJ, deRuyter H, Friedman PL, MacNeil DJ, Pauls JF, Pitt B, Pratt CM, Schwartz PJ, Veltri EP. Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. The SWORD Investigators. Survival With Oral d-Sotalol. *Lancet.* 1996;348(9019):7-12.
 11. Yang T, Snyders DJ, Roden DM. Rapid inactivation determines the rectification and [K⁺]_o dependence of the rapid component of the delayed rectifier K⁺ current in cardiac cells. *Circ Res.* 1997;80(6):782-789.
 12. Chakraborti S, Chakraborti T, Mandal M, Mandal A, Das S, Ghosh S. Protective role of magnesium in cardiovascular diseases: a review. *Mol Cell Biochem.* 2002;238(1-2):163-179.
 13. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics.* 1996;6(1):1-42.
 14. Daleau P, Lessard E, Groleau MF, Turgeon J. Erythromycin blocks the rapid component of the delayed rectifier potassium current and lengthens repolarization of guinea pig ventricular myocytes. *Circulation.* 1995;91(12):3010-3016.

15. Drolet B, Zhang S, Deschenes D, Rail J, Nadeau S, Zhou Z, January CT, Turgeon J. Droperidol lengthens cardiac repolarization due to block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1999;10(12):1597-1604.
16. Drolet B, Rousseau G, Daleau P, Cardinal R, Simard C, Turgeon J. Pimozide (Orap) prolongs cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current in native cardiac myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2001;6(3):255-260.
17. Drolet B, Yang T, Daleau P, Roden DM, Turgeon J. Risperidone prolongs cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;41(6):934-937.
18. Woosley RL, Chen Y, Freiman JP, Gillis RA. Mechanism of the cardiotoxic actions of terfenadine. *Jama.* 1993;269(12):1532-1536.
19. Silverman JA. Multidrug-resistance transporters. In: Amidon, Sadée, eds. *Membrane transporters as drug targets.* New York: Kluwer Academic/Plenum; 1999:353-387.
20. Geelen P, Drolet B, Lessard E, Gilbert P, O'Hara GE, Turgeon J. Concomitant Block of the Rapid (I(Kr)) and Slow (I(Ks)) Components of the Delayed Rectifier Potassium Current is Associated With Additional Drug Effects on Lengthening of Cardiac Repolarization. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 1999;4(3):143-150.

Tableaux

Tableau I : Interactions médicamenteuses dans le cas clinique de Mme J.K.

Tableau I :

	CYP3A4	CYP2D6	P-gp	I_{Kr}	I_{Ks}
Biaxin[®] (Clarithromycine)	Inhibiteur		Inhibiteur	Inhibiteur	
Quinidine	Substrat	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur	Inhibiteur
Risperdal[®] (Rispéridone)	Substrat	Substrat		Inhibiteur	
Lozide[®] (Indapamide)					Inhibiteur

Figures

Figure 1 : Pharmacocinétique des médicaments au niveau de l'intestin et du foie.

Les médicaments sont absorbés par diffusion passive au niveau des entérocytes. Une partie est rejetée dans la lumière intestinale par les P-gp et/ou métabolisée par les CYP. Les médicaments et leurs métabolites sont ensuite circulés par la veine porte vers le foie où ils peuvent également être métabolisés. Ils sont ensuite sécrétés dans le canal biliaire par les P-gp ou diffusés dans la circulation systémique pour procurer l'effet pharmacologique recherché.

Figure 2 : Interaction des médicaments bloqueurs d' I_K au niveau cardiaque.

Les médicaments bloqueurs d' I_{Kr} et d' I_{Ks} traversent la membrane plasmique des cardiomyocytes par diffusion passive. Une partie se fixe aux canaux potassiques pour bloquer les courants repolarisant I_{Kr} ou I_{Ks} selon les affinités. Dans un processus de protection et de détoxification cellulaire, une autre partie est transportée activement par les P-gp vers l'extérieur de la cellule.

Figure 1

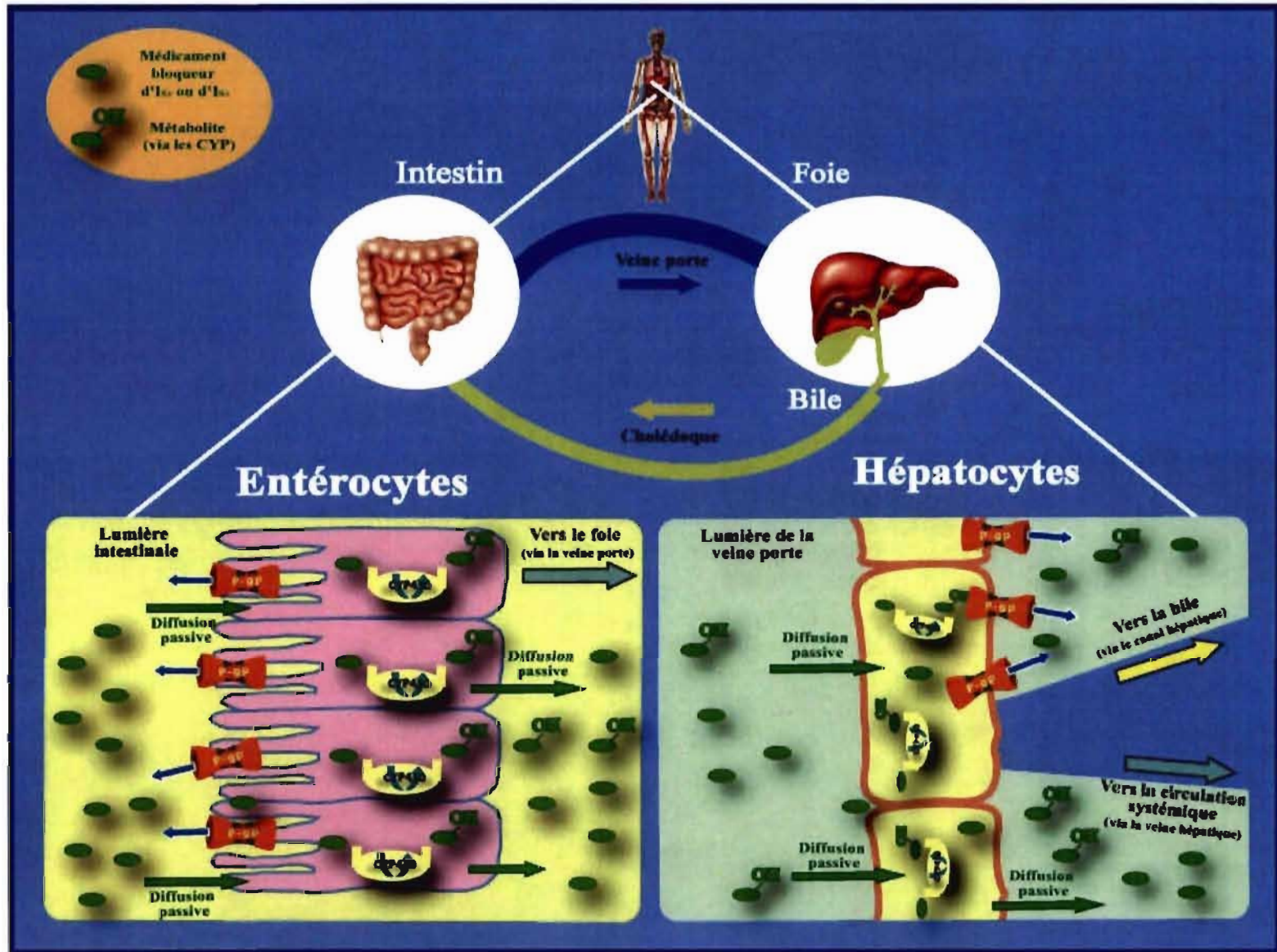
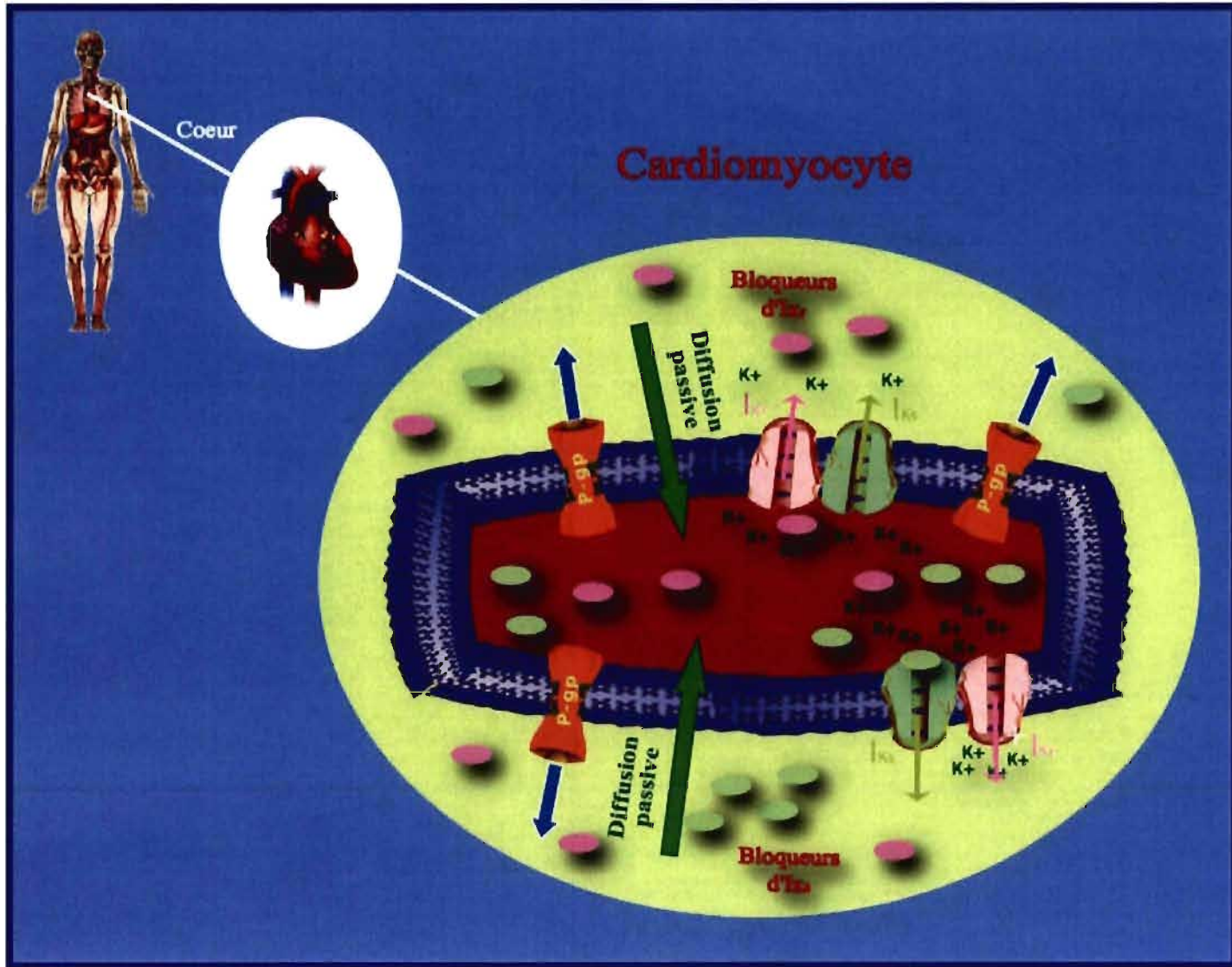


Figure 2



ANNEXE IV

DÉCLARATION DES COAUTEURS