

Université de Montréal

Modulation de la P-glycoprotéine et évaluation  
des répercussions électrophysiologiques cardiaques

par

Pierre Morissette

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

Juin 2005

©Pierre Morissette, 2005



QV  
705  
158  
2006  
1.002

## AVIS

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

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  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :  
Modulation de la P-glycoprotéine et évaluation  
des répercussions électrophysiologiques cardiaques

présenté par :  
Pierre Morissette

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Daniel Lamontagne  
président-rapporteur

Jacques Turgeon  
directeur de recherche

René Cardinal  
membre du jury

Pascal Daleau  
examineur externe

## Résumé français

Au cours de la dernière décennie, plusieurs publications ont fait état d'une prolongation de l'intervalle QT, de torsades de pointes et/ou de morts subites chez des patients traités avec des médicaments dont l'action pharmacologique principale n'était pas de nature cardiaque. Ces études ont de plus indiqué qu'il existait une faible valeur prédictive de traits phénotypiques dont la mesure de l'intervalle QT et l'apparition de torsades de pointes. Nous savons de plus qu'il existe une grande variabilité interindividuelle dans la pharmacodynamique et pharmacocinétique de ces médicaments. Les prolongations de l'intervalle QT surviennent très souvent lors d'interactions médicamenteuses impliquant le cytochrome P450 3A4. D'ailleurs, la majorité des médicaments prolongeant la repolarisation cardiaque sont substrats de ce cytochrome. De plus, les CYP3A4s, les transporteurs membranaires (p-glycoprotéine) et les canaux potassiques  $I_{Kr}$  partagent de nombreux substrats. Comme les bloqueurs d' $I_{Kr}$  accèdent au site de liaison du canal potassique du côté intracellulaire, la modulation des P-glycoprotéines pourrait affecter les concentrations intra-myocytaires des médicaments et ainsi, potentialiser la gravité des effets des médicaments à leur site de liaison sur les canaux potassiques. Afin de mieux comprendre l'implication de la P-glycoprotéine au niveau du tissu cardiaque, nous avons étudié au chapitre III, l'effet d'une modulation de la P-glycoprotéine. Nous avons démontré une augmentation des concentrations intracellulaires et une potentialisation des effets électrophysiologiques d'un bloqueur des canaux potassiques  $I_{Kr}$  lorsqu'il y a modulation de la P-glycoprotéine. Par ailleurs, il existe des différences remarquables reliées au sexe dans le syndrome du QT long d'origine médicamenteuse. En effet, les femmes sont plus susceptibles aux torsades de pointes médicamenteuses que les hommes. Il est connu que l'expression et l'activité des P-gp sont aussi modulées

par le sexe. D'ailleurs, l'activité des P-glycoprotéines semble être moindre chez les femmes. Ainsi, au chapitre IV, nous avons étudié l'implication de la P-glycoprotéine dans les mécanismes sous-jacents aux différences reliées au sexe dans le syndrome du QT long d'origine médicamenteuse. Les cobayes femelles sont apparus plus susceptibles aux modulations du transporteur membranaire; en effet, elles présentent une augmentation des concentrations intracellulaires et des effets électrophysiologiques du cisapride plus importantes comparativement aux cobayes mâles. Enfin, au chapitre V, nous avons évalué l'hypothèse par la négative à savoir si des produits qui ne sont pas substrats du CYP3A4 peuvent aussi inhiber  $I_{Kr}$  et allonger le QT. Nous avons déterminé que l'olanzapine qui n'est pas un médicament substrat des CYP3A4/5 peut prolonger la repolarisation cardiaque en bloquant la composante rapide du courant rectifiant retardé ( $I_{Kr}$ ).

Ces résultats nous mènent à une meilleure compréhension des variabilités interindividuelles et des différences reliées aux sexes observées dans les torsades de pointes médicamenteuses. Ainsi, il sera plus facile de prédire les interactions médicamenteuses causant le syndrome du QT long d'origine médicamenteuse.

**Mots clés :** cytochrome P450, électrophysiologie, intervalle QT, interaction médicamenteuse, métabolisme, P-glycoprotéine, repolarisation cardiaque, transport membranaire.

## Résumé anglais

Over the last decade many cases of prolonged QT, torsades de pointes and/or sudden death were reported with many non-cardiac medications. The predictive value of most phenotypic traits of torsades de pointes remains low for a particular patient and there exists much interindividual variability that have pharmacodynamic and pharmacokinetic consequences on the effect of agents that prolong cardiac repolarization. QT prolongation greatly occurs during drug-drug interactions involving the cytochrome P450 3A4. In fact, many drugs that prolong cardiac repolarization are substrates of this cytochrome. Moreover, many substrates of the CYP3A4/5 are also substrates of the P-glycoprotein membrane transporter and of  $I_{K_r}$  potassium channels. Since  $I_{K_r}$  blockers bind to potassium channels intracellularly, the modulation of P-glycoproteins could affect intra-myocyte concentrations of medications and potentiate the effects of medications on potassium channels. In order to better understand the role of P-glycoprotein in the heart, we studied the effect of modulating this membrane transporter. In chapter III, we determined that intracellular concentrations and electrophysiological effects of an  $I_{K_r}$  blocker, cisapride, are potentiated after modulating P-glycoprotein. Moreover, women are more susceptible to drug induced torsades de pointes than men. It was shown that p-glycoprotein activity can be modulated by gender. In fact, P-glycoprotein activity seems to be less in women. In chapter IV we studied P-glycoprotein implication in the mechanisms involved in sex-related drug-induced long QT syndrome. We observed that females are more susceptible to P-glycoprotein modulation by showing that intracellular concentrations and electrophysiological effects of cisapride were greater in female animals. Finally, in chapter V, we evaluated if non CYP3A4 substrates could also inhibit  $I_{K_r}$  and prolong the QT interval. We determined

that olanzapine, which is not a CYP3A4/5 substrate, can prolong cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current ( $I_{Kr}$ ).

These results lead to a better understanding of interindividual variabilities and gender-related differences observed during drug-induced torsades de pointes. Moreover, these results will help to better predict drug-drug interactions that cause the long QT syndrome.

**Key words:** cardiac repolarization, cytochrome P450, drug-drug interaction, electrophysiology, membrane transport, metabolism, P-glycoprotein, QT interval



## Table des matières

Résumé français	i
Résumé anglais	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des abréviations	x
Remerciements	xiii
<b>CHAPITRE I</b>	<b>1</b>
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
1- Le syndrome du QT long	2
1.1 Historique	2
1.2 Le potentiel d'action cardiaque	2
1.3 L'électrocardiogramme de surface	5
1.4 Repolarisation cardiaque	6
1.5 Le syndrome du QT long d'origine médicamenteuse	7
1.6 Le syndrome du QT long congénital	11
1.7 Les torsades de pointes	13
1.8 Manifestations électrocardiographiques des torsades de pointes	15
1.8.1 Prolongation du potentiel d'action ventriculaire et de l'intervalle QT	15
1.8.2 Post-dépolarisations précoces	16
1.8.3 Hétérogénéité de la repolarisation ventriculaire	19
1.9 Facteurs de risque	21
1.9.1 Les troubles électrolytiques	21
1.9.2 La bradycardie	22
1.9.3 Les toxines	23
1.9.4 Les maladies cérébrovasculaires et la fréquence sinusale	24
1.9.5 Les facteurs génétiques	24
1.9.6 Le sexe	25
2.0 Traitement des torsades de pointes	28
2. Effet du métabolisme	32
2.1 Cytochromes P450	32
2.1.1 Définition et fonctions	32
2.1.2 Composés endogènes	35
2.1.3 Composés exogènes	35
2.2 Le cytochrome 3A4 et ses substrats	36
2.3 Définitions	39
2.3.1 Substrat	39
2.3.2 Inducteur	39
2.3.3 Inhibiteur	40
2.4 Variabilité interindividuelle	41
2.5 Interactions médicamenteuses	43
2.6 Inhibition du métabolisme comme facteur de risque du Syndrome du QT long d'origine médicamenteuse	44
3. Transporteurs ABC : La P-glycoprotéine	46
3.1 Historique	46

3.2 Structure	47
3.3 Expression physiologique de la P-gp	50
3.4 Substrats et sites de liaison	51
3.5 Mécanisme d'action des P-gp	52
3.6 Le cycle catalytique des P-gp	54
3.7 Fonctions physiologiques des P-gp	54
3.8 Modulation de la P-gp	57
3.9 Variabilité interindividuelle	58
4.0 Implication de la P-gp au niveau du coeur	60
4- Relation entre les substrats d'IK <sub>r</sub> , de P-gp et des CYPs 3A4.	62
<b>CHAPITRE II</b>	<b>69</b>
1. Mise en perspective et hypothèse de recherche	69
<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>74</b>
<b>CHAPITRE III</b>	<b>104</b>
<b>MODULATORY ROLE OF ABC TRANSPORTERS ON THE CARDIAC ELECTROPHYSIOLOGICAL EFFECTS OF AN I<sub>Kr</sub> BLOCKER</b>	<b>104</b>
Résumé	106
Abstract	107
Introduction	109
Methods	112
Statistical analysis	117
Results	118
Discussion	121
Conclusion	124
References	125
Figure legends	130
<b>CHAPITRE IV</b>	<b>135</b>
<b>ATP BINDING CASSETTE MEMBRANE TRANSPORTERS AS A KEY DETERMINANT OF SEX-RELATED DIFFERENCES IN DRUG-INDUCED LONG QT SYNDROME</b>	<b>135</b>
Résumé	137
Abstract	138
Introduction	140
Methods	143
Statistical analysis	147
Results	148
Discussion	150
Conclusion	154
Figure legends	158

<b>CHAPITRE V</b>	<b>162</b>
<b>OLANZAPINE (ZYPREXA®) PROLONGS CARDIAC REPOLARIZATION BY BLOCKING THE RAPID COMPONENT OF THE DELAYED RECTIFIER POTASSIUM CURRENT</b>	<b>162</b>
Résumé	164
Abstract	167
Introduction	168
Methods	170
Results	178
Discussion	180
Figure Legends	187
<b>CHAPITRE VI</b>	<b>196</b>
Discussion générale et conclusion	196
<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>211</b>
<b>ANNEXE I</b>	<b>214</b>
<b>DRUG-INDUCED LONG QT SYNDROME AND TORSADES DE POINTES</b>	<b>214</b>
Summary	216
Abstract	217
Résumé	218
The QT interval	220
Myocardial action potential and $I_{Kr}$	221
Early after depolarizations (EADs)	223
Heterogeneity of ventricular repolarization	223
Torsades de pointes	224
Drug induced QT prolongation	226
Predisposing factors to drug-induced torsades de pointes	227
a) Electrolyte imbalance	227
b) Bradycardia	228
c) Toxins	229
d) Gender	229
e) Cerebrovascular disease	230
f) Inhibition of cytochrome P450	231
g) P-glycoprotein	232
Treatment recommendations	233
Conclusion	235
References	239
Figure legends	249
<b>ANNEXE II</b>	<b>254</b>
Résultats des analyses par PCR et Immunobuvardage	254
<b>ANNEXE III</b>	<b>257</b>
Déclaration des coauteurs	257

**Liste des tableaux**

<b>Tableau 1.</b> Médicaments anti-arythmiques qui prolongent le QT.....	8
<b>Tableau 2.</b> Médicaments non anti-arythmiques pouvant prolonger le potentiel d'action.....	10
<b>Tableau 3.</b> Mutations retrouvées dans le syndrome du QT long congénital.....	12
<b>Tableau 4.</b> Liste des principaux médicaments métabolisés par le CYP3A4/5.....	38
<b>Tableau 5.</b> Bloqueurs d'I <sub>Kr</sub> et leur voie métabolique principale.....	45

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Électrocardiogramme de surface et potentiel d'action ventriculaire.....	4
<b>Figure 2.</b> Épisode de torsades de pointes.....	14
<b>Figure 3.</b> Post-dépolarisations précoces (EADs).....	18
<b>Figure 4.</b> Variation de la configuration des potentiels d'action dans les différentes cellules du myocarde.....	20
<b>Figure 5.</b> Évolution des différentes familles des cytochromes P450 humains.....	34
<b>Figure 6.</b> Schéma structurel de la P-glycoprotéine.....	49
<b>Figure 7.</b> Cycle des xénobiotiques dans l'épithélium intestinal.....	56
<b>Figure 8.</b> Structures moléculaires de certains médicaments pouvant causer des torsades de pointes.....	64
<b>Figure 9.</b> Représentation schématique de HERG et localisation de quelques mutations associées au LQTS.....	66
<b>Figure 10.</b> Types d'interactions avec P-gp selon le nombre d'accepteur de lien hydrogène du substrat.....	67

## Liste des abréviations

ABC : ATP-binding cassette

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine di-phosphate

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine triphosphate

BCL : Durée du cycle de stimulation de base

CYP : Cytochrome P450

CYP3A : Cytochrome P450 de la sous-famille 3A

CYP3A4 : Isoenzymes hépatiques du cytochrome P450 3A4

EADs : Post-dépolarisations précoces

ECG : Électrocardiogramme

FDA : Food and Drug Administration

HEK293 : Human embryonic kidney 293 (lignée cellulaire)

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

HPLC: Chromatographie liquide à haute performance

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

$I_K$  : Courant potassique rectifiant retardé

$I_{K250}$  : Courant potassique sortant temps-dépendant, induit par une dépolarisation d'une durée de 250 msec

$I_{K5000}$  : Courant potassique sortant temps-dépendant, induit par une dépolarisation d'une durée de 5000 msec

$I_{Kir}$  : Courant potassique à rectification interne

$I_{Kr}$  : Composante rapide de  $I_K$

$I_{Ks}$  : Composante lente de  $I_K$

$I_{Kur}$  : Courant potassique ultra-rapide

Il : Interleukine

$I_{Na}$  : Courant sodique cardiaque

$I_{to}$  : Courant potassique transitoire

JLN : Syndrome Jervell-Lange-Nielsen

$K_i$  : Constante d'inhibition

$K_m$  : Constante apparente de Michaelis-Menten

*KvLQT1 (KCNQ1)*: Gène codant une protéine-canal potassique voltage-dépendant, sous unité principale ( $\alpha$ ) de  $I_{Ks}$

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

LQTS : Syndrome du QT long

LQT1 : Syndrome du QT long causé par des mutations de *KvLQT1*

LQT2 : Syndrome du QT long causé par des mutations de *HERG*

LQT3 : Syndrome du QT long causé par des mutations de *SCN5A*

LQT4 : Syndrome du QT long causé par des mutations d'ankyrine B

LQT5 : Syndrome du QT long causé par des mutations de *minK*

LQT6 : Syndrome du QT long causé par des mutations de *MiRP1*

LQT7 : Syndrome du QT long causé par des mutations de  $I_{Kir2.1}$

MAP : Potentiel d'action monophasique

MAPD : Durée du potentiel d'action monophasique

MAPD<sub>90</sub> : Durée du potentiel d'action mesurée à 90% de repolarisation

MDR : Multidrug resistance

*minK (KCNE1)*: Gène codant une sous-unité protéique, constituante de  $I_{Ks}$

*MiRP1* : Gène codant une sous-unité protéique, constituante de  $I_{Kr}$

P-gp : P-glycoprotéine

QTc : Intervalle QT corrigé en fonction de la fréquence cardiaque

RW : Syndrome de Romano-Ward

*SCN5A* : Gène codant pour  $I_{Na}$

TdP : Torsades de pointes



## Remerciements

Cette thèse n'aurait pu voir le jour sans le précieux concours de nombreuses personnes. Ainsi, je profite de l'occasion qui s'offre à moi pour exprimer ma sincère reconnaissance et mes respects au docteur Jacques Turgeon pour une direction de doctorat bien menée. Sa rigueur scientifique, ses conseils toujours judicieux et son enthousiasme ont rendu mes études beaucoup plus agréables. J'aimerais aussi le remercier pour la confiance qu'il m'a témoignée. J'espère lui faire honneur dans mes projets à venir et avoir l'occasion de travailler encore avec lui.

Je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire que j'ai côtoyés durant mes années de formation. Leur soutien moral et leurs nombreux encouragements furent toujours très appréciés. J'aimerais remercier plus particulièrement M. Raymond Hreiche et Mme Véronique Michaud pour leur entrain, les heures de discussion précieuses et leur amitié.

Je tiens à remercier de façon spéciale tous mes amis. Plus particulièrement Jeremy et Nicole Drake, Marisa et Erik Cardin qui m'ont soutenu lors des moments les plus difficiles.

Je veux aussi exprimer ma reconnaissance envers Dr Benoît Drolet, Dr Pascal Daleau, M Lynn Atton, M. Gilles De Gagné et Mme Nathalie Morin pour l'aide apportée lors de la réalisation de ces travaux. De plus, je suis reconnaissant envers le Fond de Recherche en

Santé du Québec et la Faculté de Pharmacie de l'Université de Montréal pour leur appui financier.

Je m'en voudrais de passer sous silence le soutien moral indispensable que m'a prodigué ma famille. Merci à mes parents pour m'avoir inculqué les valeurs de rigueur et de persévérance qui m'ont permis de parvenir à un tel niveau de connaissance. Merci à ma sœur pour son soutien moral, mon père pour l'intérêt constant envers mes projets et ma mère pour son amour et les valeurs qu'elle m'a transmises. Je considère la réussite de ce travail comme étant le fruit de leurs encouragements.

Finalement, à Naomi, ce soleil dans ma vie, tu es présente pour édifier et ouvrir mon avenir comme un grand vent de liberté.

## **CHAPITRE I**

### **Introduction**

## **1- Le syndrome du QT long**

### **1.1 Historique**

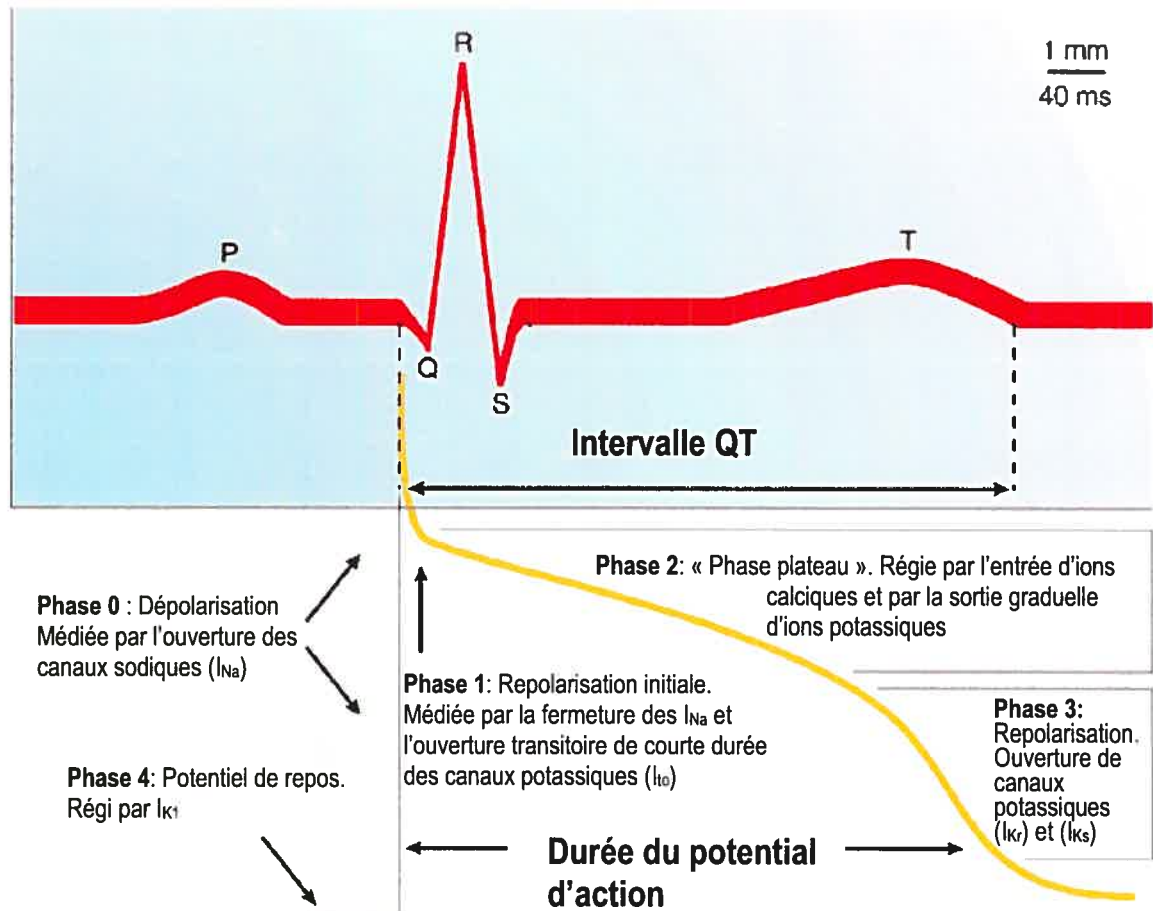
Les arythmies cardiaques, plus particulièrement les arythmies ventriculaires polymorphes dont les torsades de pointes (TdP), sont parmi les effets indésirables les plus néfastes des médicaments chez l'humain. En fait, le prolongement de l'intervalle QT sur un électrocardiogramme de surface (ECG) peut être associé aux TdP et peut entraîner la mort subite. Ce syndrome est nommé le syndrome du QT long. En plus d'être acquis, c'est-à-dire lié à une thérapie médicamenteuse, le syndrome du QT long peut être congénital, c'est-à-dire attribuable à des mutations génétiques dans des canaux ioniques cardiaques et/ou dans les mécanismes de translocation de canaux ioniques vers la membrane. Le syndrome du QT long d'origine médicamenteuse fut premièrement rapporté par Frey en 1918 qui a décrit un phénomène de syncope lors de l'administration de quinidine<sup>1</sup>. C'est seulement en 1962 que Rainer-Pope a associé ce phénomène à une tachyarythmie ventriculaire maligne<sup>2</sup>. Par ailleurs, Selzer et Wray ont observé en 1964 que la quinidine pouvait provoquer une prolongation du QT et induire des pro-arythmies<sup>3</sup>. Depuis cette découverte, la prolongation du QT fut démontrée avec plusieurs autres médicaments. De nos jours, la liste de médicaments associés à une prolongation du QT est très longue et comprend plusieurs médicaments qui ne possèdent pas nécessairement des propriétés anti-arythmiques.

### **1.2 Le potentiel d'action cardiaque**

Dans un état physiologique normal, le cœur pompe le sang régulièrement grâce à une activité électrique intrinsèque coordonnée. Cette activité électrique est principalement due à l'entrée et à la sortie d'ions sodiques, potassiques et calciques par des canaux,

pompes et échangeurs ioniques spécifiques. Lors de chaque battement du cœur les ions traversent la membrane du myocyte de façon coordonnée selon un gradient chimique et électrique afin de dépolariser et repolariser le myocyte. Ce mouvement d'ions de part et d'autre de la membrane produit une variation du voltage transmembranaire. Cette variation du potentiel transmembranaire peut être enregistrée dans le temps sous forme de potentiel d'action <sup>4</sup>. Le potentiel d'action varie selon l'emplacement de la cellule dans le myocarde (oreillettes, ventricules, faisceau de His-Purkinje, nœuds) ou encore, selon l'expression relative des différents canaux ioniques.

Puisque le syndrome du QT long résulte d'une repolarisation ventriculaire prolongée, nous allons nous concentrer sur le potentiel d'action des myocytes ventriculaires <sup>5</sup>. La figure 1 représente un potentiel d'action d'un myocyte ventriculaire et un électrocardiogramme correspondant. Ce potentiel d'action est divisé en cinq phases. La phase 0 représente la dépolarisation de la cellule qui est médiée par l'ouverture de canaux sodiques et l'entrée du sodium dans la cellule. La pente abrupte de cette phase est reliée à la grande vitesse d'entrée des ions sodiques. La phase 1 représente la phase de repolarisation initiale qui est médiée par la fermeture des canaux sodiques et l'ouverture de canaux potassiques transitoires. La phase 2 représente la phase plateau qui est régie par l'entrée d'ions calciques et par la sortie graduelle d'ions potassiques. Le voltage reste stable au cours de cette phase car le changement de potentiel transmembranaire causé par l'entrée de calcium est compensé par la sortie de potassium. Suivant la phase plateau vient la phase de repolarisation ou phase 3. Cette phase implique la sortie massive de potassium de la cellule par des canaux potassiques spécifiques. Enfin, la phase 4 correspond au retour du potentiel transmembranaire du myocyte au potentiel de repos. <sup>4</sup>



**Figure 1.** Électrocardiogramme de surface et potentiel d'action d'un myocyte ventriculaire (adapté de <sup>6</sup>). L'ECG est défini par les ondes P, le complexe QRS et l'onde T. L'onde P représente la dépolarisation des oreillettes, le complexe QRS la dépolarisation des myocytes ventriculaires et l'onde T la repolarisation des ventricules. L'intervalle QT correspond à la durée de dépolarisation et de repolarisation des myocytes ventriculaires ce qui représente la durée d'un potentiel d'action ventriculaire. Au cours d'un potentiel d'action, la phase 0, 1, 2, 3 et 4 représentent respectivement la dépolarisation de la cellule, la repolarisation initiale, la phase plateau, la repolarisation et le retour au potentiel transmembranaire du myocyte au potentiel de repos. Les principaux canaux ioniques impliqués sont indiqués pour chacune des phases dans la figure.

### 1.3 L'électrocardiogramme de surface

En clinique, les mouvements ioniques transmembranaires se traduisent par des changements au niveau de l'électrocardiogramme de surface (ECG). L'ECG représente l'enregistrement vectoriel de l'activité électrique du cœur transmise à la surface du corps. Chez un patient normal, l'ECG consiste en une série d'ondes comprenant l'onde P, le complexe QRS et l'onde T (Figure 1). Suivant une décharge du nœud sinusal (invisible sur l'ECG), l'onde P apparaît sur l'ECG et représente la dépolarisation des oreillettes qui correspond à l'entrée d'ions sodiques dans les myocytes auriculaires. L'intervalle PR est la durée de transmission de l'influx électrique dans les tissus supraventriculaires dont les oreillettes, le nœud auriculoventriculaire et le faisceau de His. Le complexe QRS représente la dépolarisation des myocytes ventriculaires médiée par l'entrée de sodium dans les myocytes ventriculaires (Phase 0 du potentiel d'action). Le segment ST représente le temps pendant lequel les ventricules sont excités uniformément (Phase 1 et 2 du potentiel d'action). Enfin, l'onde T représente la repolarisation des ventricules qui correspond à l'ouverture des canaux potassiques et à la sortie de potassium qui s'en suit (Phase 3 du potentiel d'action).

Par ailleurs, l'intervalle QT correspond à la durée de dépolarisation et de repolarisation des myocytes ventriculaires ce qui représente la durée d'un potentiel d'action ventriculaire. Enfin l'intervalle RR correspond à la fréquence cardiaque.

## 1.4 Repolarisation cardiaque

La repolarisation cardiaque est associée à la sortie d'ions potassiques suite à l'ouverture de différents canaux ioniques. Les courants potassiques ultra-rapide  $I_{Kur}$ , et transitoire,  $I_{to}$ , sont principalement présents dans les cellules auriculaires. Ainsi, la repolarisation rapide observée au début du potentiel d'action (phase 1) des cellules auriculaires serait due à  $I_{to}$ . Le courant  $I_{to}$  est aussi présent dans l'épicarde et, à un moindre niveau dans les cellules M. Les cellules M se retrouvent dans la région midmyocardique entre l'épicarde et l'endocarde. Les cellules M ont un potentiel d'action prolongé due à un faible courant  $I_{Ks}$  et un plus grand courant sodique ( $I_{Na}$ ). Par ailleurs, des études ont démontré l'existence de deux courants potassiques majeurs pour le myocyte ventriculaire chez l'humain,  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$ .  $I_{Kr}$  est la composante rapide et  $I_{Ks}$  la composante lente du courant rectifiant retardé  $I_K$ . Au cours du potentiel d'action, le courant  $I_{Kr}$  s'active rapidement alors qu' $I_{Ks}$  s'active plus tardivement<sup>7</sup>. Ces deux courants contribuent à la repolarisation de façon différente selon la durée du potentiel d'action et de l'activité du système nerveux autonome sympathique. En effet, lorsque la durée du potentiel d'action s'allonge, la contribution du courant  $I_{Ks}$  devient plus importante. Toutefois, en situation physiologique normale, la contribution du courant potassique  $I_{Kr}$  est plus importante car ce canal s'active plus rapidement et  $I_{Ks}$  n'a pas le temps de s'activer complètement.

*KCNQ1 (KvLQT1)* s'associe avec la sous-unité *minK (KCNE1)*, pour former le canal responsable de la composante lente du courant rectifiant retardé ( $I_{Ks}$ )<sup>8</sup>. Bien que *KvLQT1* est exprimé de façon prédominante dans le cœur, il est également retrouvé dans les reins, le pancréas, le placenta et les poumons<sup>9</sup>. La sous-unité minK interagit avec *KvLQT1* et posséderait un rôle de modulateur<sup>8</sup>. Par ailleurs, le canal potassique  $I_{Kr}$  est



codé par le gène *HERG* (*KCNH2*) localisé sur le chromosome 7q35-36<sup>10</sup>. *HERG* code pour la sous-unité majeure de  $I_{Kr}$ . Récemment, il a été démontré que *HERG* peut s'associer avec une petite protéine membranaire, MiRP1 (minK-related peptide 1), pour moduler l'amplitude du courant repolarisant<sup>11</sup>. MiRP1 jouerait un rôle de partenaire quoique son rôle exact reste à déterminer<sup>11</sup>.

### **1.5 Le syndrome du QT long d'origine médicamenteuse**

La diminution des courants repolarisants ou une augmentation des courants dépolarisants causent une prolongation de la durée du potentiel d'action et ainsi une prolongation de l'intervalle QT. L'inhibition de la composante rapide du courant potassique rectifiant retardé ( $I_{Kr}$ ) est le mécanisme prédominant des anti-arythmiques de classe III (ex; dofetilide, sotalol) qui causent une prolongation du potentiel d'action. La prolongation du potentiel d'action et de l'intervalle QT par ces agents peut aussi mener à des tachyarythmies ventriculaires malignes comme les torsades de pointes (TdP). Conséquemment, les anti-arythmiques peuvent supprimer ainsi qu'induire des arythmies.

Cependant, la prolongation de l'intervalle QT n'est pas une propriété unique aux agents anti-arythmiques. En fait, plusieurs agents qui ne sont pas des anti-arythmiques ont des effets secondaires pouvant ressembler aux anti-arythmiques de classe III. D'ailleurs, plusieurs médicaments provenant de classes thérapeutiques différentes ont démontré leur capacité à prolonger le potentiel d'action et l'intervalle QT (Tableau 2). Une étude américaine réalisée chez plus de cinq millions de patients suggère que les médicaments

les plus fréquemment prescrits pouvant causer une prolongation de l'intervalle QT sont les antibiotiques et les antipsychotiques <sup>12</sup>.

Des études électrophysiologiques ont démontré que la plupart des médicaments prolongeant l'intervalle QT inhibent les courants potassiques impliqués dans la repolarisation et possèdent une grande affinité pour la composante rapide du courant potassique à rectification retardée ( $I_{Kr}$ ). Les bloqueurs d' $I_{Kr}$  accèdent au site de liaison du canal potassique du côté intracellulaire <sup>13</sup> et l'analyse de leur site de liaison a démontré un rôle clé des acides aminés situés sur le segment transmembranaire S6 (G648, Y652 et F656)<sup>14</sup>.

**Tableau 1.** Médicaments anti-arythmiques qui prolongent le QT

<b>Classe</b>	<b>Nom Chimique</b>
IA	Disopyramide
	Procaïnamide
	Quinidine
III	Amiodarone
	Sotalol
	Dofétilide
	Ibutilide
	Brétylium
IV	Vérapamil

Les tableaux 1 et 2 énumèrent plusieurs médicaments anti-arythmiques et non anti-arythmiques qui ont le potentiel de prolonger l'intervalle QT. Par exemple, la prolongation de l'intervalle QT et l'apparition de torsades de pointes furent observées au cours du traitement avec un agent modulateur de la motilité gastro-intestinale, le cisapride. On a démontré, chez des cœurs isolés de cobayes, que ce médicament produit une inhibition du courant  $I_{Kr}$  pouvant expliquer l'augmentation de la durée de repolarisation cardiaque rapportée chez les patients <sup>15</sup>. Suite à cette découverte, plusieurs cas de mort subite furent observés et le cisapride fut retiré du marché secondairement à ses effets pro-arythmiques. L'administration d'érythromycine fut aussi associée au prolongement de l'intervalle QT et à des pro-arythmies <sup>16-18</sup>. La prolongation de la repolarisation cardiaque par l'érythromycine a été expliquée par son bloc sélectif du canal  $I_{Kr}$  <sup>19</sup>. Par ailleurs, plusieurs antipsychotiques peuvent aussi prolonger l'intervalle QT <sup>20</sup>. En effet, des cas de prolongation de l'intervalle QT et de mort subite ont été observés avec la rispéridone <sup>21</sup>, le pimozide <sup>22,23</sup>, la clozapine <sup>24</sup> et plus récemment l'olanzapine <sup>24,25</sup>. Des expériences dans des cellules transfectées avec *HERG* suggèrent un effet antagoniste direct de plusieurs antipsychotiques sur  $I_{Kr}$ . Plusieurs autres médicaments ont démontré leur capacité à prolonger l'intervalle QT. Ceux-ci font parti de classes thérapeutiques comme les anesthésiques, les antidépresseurs, les anti-asthmatiques, les antiémétiques et les diurétiques.

**Tableau 2. Médicaments non anti-arythmiques pouvant prolonger le potentiel d'action**

Classe	Nom chimique	Classe	Nom chimique	
Antibiotiques	Clarithromycine	Antiasthmatiques	Fenotérol	
	Érythromycine		Procatérol	
	Grépaflouxacine (retiré du marché)		Salbutamol	
	Pentamidine		Salméterol	
	Sparfloxacine	Antipsychotiques	Amisulpride	
	Sulphaméthoxazole/triméthoprim		Chlorpromazine	
Anesthésiants	Enflurane	Clozapine		
	Fentanyl	Dropéridol		
	Isoflurane	Halopéridol		
	Kétamine	Mésoridazine		
	Pentobarbital	Olanzapine		
	Propofol	Pimozide		
	Thiopental	Prochlorpérazine		
Antidépresseurs	Amitriptyline	Rispéridone		
	Désipramine	Sultopride		
	Doxépine	Thioridazine		
	Fluoxétine	Antiémétiques	Dolasétron	
	Imipramine		Granisétron	
	Maprotiline		Ondansétron	
	Trazodone	Antifongiques	Fluconazole	
	Venlafaxine		Kétoconazole	
Antihistamines	Astémizole (retiré du marché)	Diurétiques	Indapamide	
	Azélastine		Triamtérene	
	Clémastine	Immunosuppresseurs	Tacrolimus	
	Diphenhydramine		Stimulants de la motilité gastro-intestinale	Cisapride (retirée du marché)
	Fexofénadine			Dompéridone
	Terfénadine (retirée du marché)			
Bloqueurs des canaux calciques	Prenylamine			
	Bépridil			
	Térodiline			

## 1.6 Le syndrome du QT long congénital

Le syndrome du QT long congénital fut décrit premièrement en 1957 par Jervell et Lange-Nielsen chez une famille dont plusieurs enfants souffraient de surdité neuronale congénitale, de syncopes et d'une prolongation de l'intervalle QT sur l'électrocardiogramme de surface (ECG) <sup>26</sup>. Au cours des années soixante, une forme plus douce (sans surdité associée) du syndrome congénital fut décrite par Romano et Ward <sup>27,28</sup>.

De nos jours, il est bien connu que le syndrome du QT long congénital est une maladie héréditaire causée par une ou plusieurs mutations retrouvées dans un des 6 gènes codant pour des canaux ioniques qui régulent l'entrée et la sortie de sodium ou de potassium. Plus de 300 mutations dans ces canaux ont été décrites <sup>29</sup>. De plus, des mutations dans un gène du cytosquelette (ankyrine B) sont aussi associées à une prolongation du QT en affectant la cinétique des canaux sodiques <sup>29</sup>.

Parmi les manifestations cliniques du QT long congénital, on retrouve le syndrome Jervell-Lange-Nielsen et le syndrome de Romado-Ward. Le syndrome de Romano-Ward (RW) est un désordre autosomal dominant sans surdité congénitale. Le syndrome RW comprend actuellement sept génotypes moléculaires résultant de canaux ioniques défectueux ou de la protéine ankyrin B défectueuse (Tableau 3). Par ailleurs, le syndrome Jervell-Lange-Nielsen (JLN) est considéré comme un désordre autosomal récessif avec surdité congénitale. Deux polymorphismes ont été identifiés dans les gènes

codant pour les deux sous-unités de la composante lente du courant potassique rectifiant retardé ( $I_{Ks}$ ).

**Tableau 3.** Mutations retrouvées dans le syndrome du QT long congénital

Sous-type de LQTS	Localisation chromosomique	Gène affecté	Courant affecté
<i>Autosomal dominant (Romano-Ward)</i>			
LQT1	11p15.5	<i>KCNQ1 (KVLQT1)</i>	↓ $I_{Ks}$
LQT2	7q35-36	<i>KCNH2 (HERG)</i>	↓ $I_{Kr}$
LQT3	3p21-24	<i>SCN5A</i>	↑ $I_{Na}$
LQT4	4q25-27	<i>Ankyrine B</i>	↑ late $I_{Na}$
LQT5	21q22.1-22.2	<i>KCNE1 (minK)</i>	↓ $I_{Ks}$
LQT6	21q22.1-22.2	<i>KCNE2 (MiRP1)</i>	↓ $I_{Kr}$
LQT7	17q23	<i>KCNJ2</i>	↓ $I_{Kir2.1}$
<i>Autosomal récessif (Jervell and Lange-Nielsen)</i>			
JLN1	11p15.5	<i>KCNQ1 (KvLQT1)</i>	↓ $I_{Ks}$
JLN2	21q22.1-22.2	<i>KCNE1 (MinK)</i>	↓ $I_{Ks}$

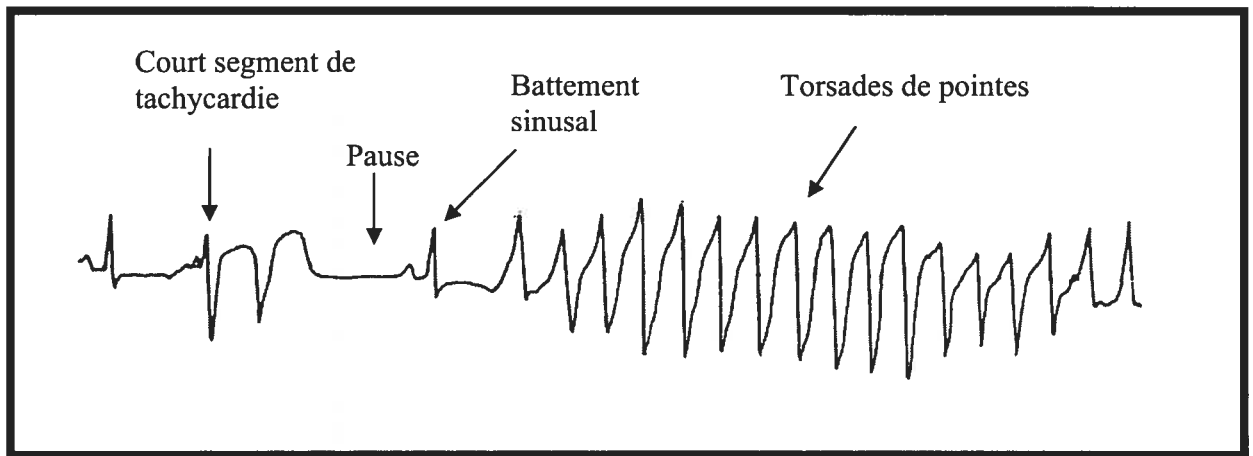
Bien que les polymorphismes génétiques associés au syndrome du QT long congénital soient associés au risque de torsades de pointes, plusieurs personnes atteintes par ces

mutations ne présenterons jamais ce phénotype. De plus, plusieurs médicaments associés à une prolongation de l'intervalle QT et aux TdP ne présentent jamais ce phénotype<sup>12,30</sup>. En effet, il ne semble pas exister de corrélation entre l'incidence des TdP induites par les médicaments et l'augmentation de la durée de l'intervalle QT<sup>31</sup>. Ainsi, plusieurs autres facteurs de risque tels que les troubles électrolytiques, la bradycardie et le genre peuvent moduler l'incidence de torsades médicamenteuses.

### **1.7 Les torsades de pointes**

La torsade de pointes est une tachycardie ventriculaire polymorphe caractérisée par des complexes QRS changeant progressivement d'amplitude et de forme qui apparaissent pivoter autour d'une ligne isoélectrique. Cet aspect typique des torsades est causé par une variation de la polarité qui passe de positive à négative sur le plan frontal (dérivation périphérique) de l'ECG. Les TdP commencent généralement par une dépolarisation ventriculaire prématurée (extrasystole) ou une série de courtes tachycardies. Cette courte série de tachycardies est suivie d'une pause sinusale compensatoire. Le battement suivant présente ainsi une prolongation marquée de l'intervalle QT et la survenue de post-dépolarisations précoces apparaissant en raison de la réouverture de canaux calciques. Par la suite, une séquence de tachycardie polymorphe (TdP) peut être observée. Ce cycle « court-long-court » découvert en 1983 par Kay<sup>30,32</sup> précède souvent l'arrivée des TdP (Figure 2). Les TdP se résorbent le plus souvent par elles-mêmes, mais elles peuvent aussi s'aggraver vers une fibrillation ventriculaire. Dans ce cas, les TdP peuvent causer des syncopes et ultérieurement, la mort subite. Les marqueurs électrophysiologiques associés aux TdP qui peuvent aider à prédire la survenue de ces arythmies comportent 1) une prolongation excessive du potentiel d'action ventriculaire;

2) la génération de post-dépolarisations précoces; et 3) l'augmentation de la dispersion de la repolarisation ventriculaire.



**Figure 2.** Épisode de torsades de pointes sur un ECG de surface. Les torsades de pointes suivent couramment des changements dans la durée du cycle. Dans cet exemple, l'épisode de torsades est précédé par un court segment de tachycardie, une pause compensatoire et un battement sinusal normal.



## 1.8 Manifestations électrocardiographiques des torsades de pointes

### 1.8.1 Prolongation du potentiel d'action ventriculaire et de l'intervalle QT

L'intervalle QT sur l'ECG représente la somme des durées des potentiels d'action ventriculaires. L'intervalle QT est mesuré à partir du début de l'onde Q jusqu'à la fin de l'onde T sur l'électrocardiogramme de surface. Le syndrome du QT long est caractérisé par une repolarisation ventriculaire anormalement longue et une prolongation de l'intervalle QT<sup>33</sup>. L'intervalle QT peut varier selon la dérivation de l'ECG<sup>34</sup>, le rythme circadien<sup>35</sup>, le sexe<sup>36</sup> et selon la thérapie médicamenteuse du patient. L'intervalle QT varie inversement avec la fréquence cardiaque. Il faut donc corriger l'intervalle QT par la fréquence cardiaque (QTc).

Afin de corriger l'intervalle QT, la formule de Bazett ( $QTc = QT / RR^{1/2}$ ) est la plus souvent utilisée. Par contre, il faut noter que les méthodes de correction du QT ont leur limite lorsqu'elles sont appliquées à des changements dus au prolongement du QT par des médicaments. En fait, les médicaments peuvent eux-mêmes altérer la fréquence cardiaque. Ainsi, le médicament n'affecte pas nécessairement le QT mais l'accélération de la fréquence cardiaque provoque une augmentation du QTc. De plus, la formule de Bazett peut sous estimer le QTc lorsque les patients sont traités avec des médicaments qui ralentissent la fréquence cardiaque comme les  $\beta$ -bloqueurs.

Le QTc est considéré prolongé lorsqu'il dépasse 450 msec chez l'homme et 470 msec chez la femme<sup>37</sup>. Cependant, en absence de médicaments, certains patients atteints de LQTS congénital ont présenté un QTc d'environ 430-440 msec, suggérant que des

personnes affectées puissent avoir des intervalles QTc considérés normaux. D'ailleurs, la plupart des gens sains ont un QTc inférieurs à 465 msec et la plupart sont sous 440 msec<sup>38,39</sup>. Les chercheurs s'entendent pour dire qu'un QTc de 440 msec devrait être considéré comme normal, entre 440 et 460 msec comme limite et un QTc supérieur à 460 msec comme prolongé<sup>30</sup>. Selon Santé Canada, on considère généralement que l'atteinte d'une valeur de QTc au-delà de 500 msec ou une augmentation de la durée du QTc de plus de 60 msec par rapport à la valeur de base constituent le seuil à partir duquel un patient est considéré à risque et devrait mettre fin à son traitement médicamenteux<sup>40</sup>.

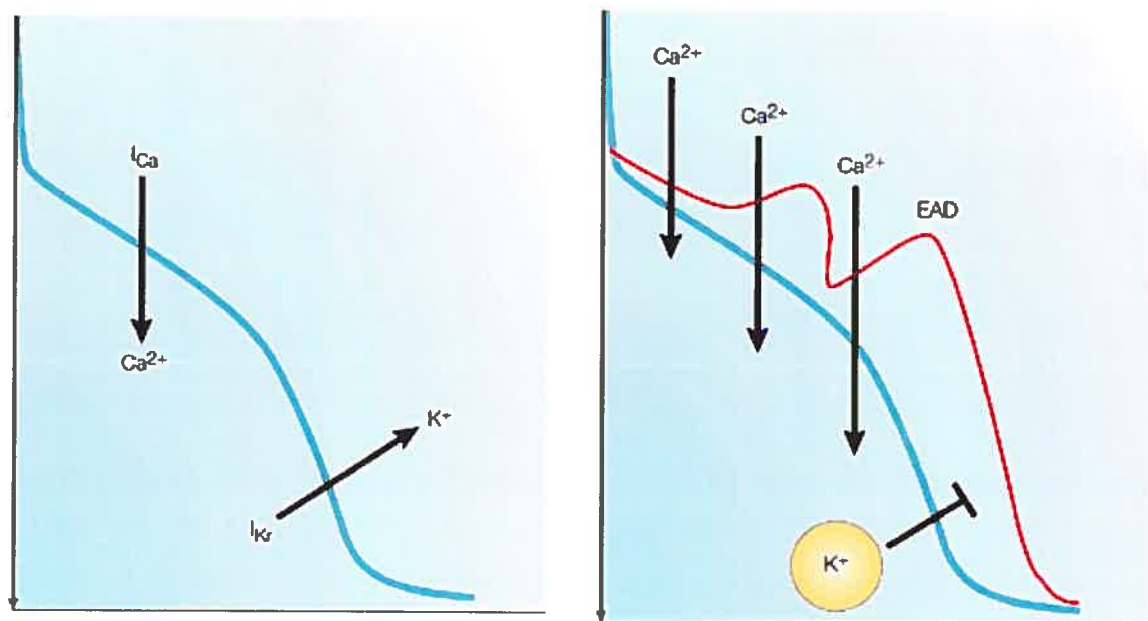
Par ailleurs, les patients atteints de LQTS peuvent présenter plusieurs anomalies morphologiques de l'onde T, notamment une onde T à base élargie, biphasique ou avec une encoche. Les irrégularités de l'onde T sont surtout observées chez les patients atteints du LQTS congénital mais elles peuvent être également observées chez des sujets normaux (62% vs 15%)<sup>41</sup>. De plus, parmi les patients atteints de LQTS congénital, les anomalies de l'onde T sont plus fréquentes chez ceux ayant une histoire de syncope ou d'arrêt cardiaque (81% vs 19%)<sup>41</sup>. Il fut aussi suggéré qu'une encoche sur l'onde T observée pendant la phase de recouvrement lors d'un test d'activité physique est un indice du LQTS congénital.

### 1.8.2 Post-dépolarisations précoces

La prolongation de la durée du potentiel d'action des myocytes ventriculaires chez des sujets atteints de LQTS congénitaux et de LQTS médicamenteux a été identifiée comme l'évènement déclencheur de la séquence menant aux torsades de pointes. Lorsqu'il y a

une prolongation excessive de l'intervalle QT, celle-ci peut être associée à des post-dépolarisations précoces (Early After Depolarizations). En fait, la diminution du courant repolarisant peut prolonger le potentiel d'action et prédisposer le myocarde au développement des EADs (Figure 3). Il a été démontré que les EADs surviennent au cours des phases 2 et 3 du potentiel d'action et peuvent causer des extrasystoles susceptibles de déclencher un épisode de torsades de pointes. Les EADs sont attribuables à la réactivation des courants calciques de type L, ou d'autres courants tels l'échangeur sodium-calcium ou le courant sodique cardiaque <sup>42</sup>.

Par contre, la prolongation excessive du potentiel d'action ne mène pas toujours à des EADs. D'ailleurs, il a été démontré que l'antibiotique azythromycine prolonge le potentiel d'action et le QT plus significativement que l'érythromycine et la clarithromycine dans des cœurs de lapins, mais il n'a pas été démontré que cet antibiotique provoque des EADs ou des TdP <sup>43</sup>. Ainsi, la prolongation du potentiel d'action et la survenue de EADs peuvent être deux manifestations indépendantes l'une de l'autre. Néanmoins, les chercheurs s'entendent pour dire que les torsades de pointes sont généralement initiées par une prolongation du potentiel d'action suivie d'EADs.

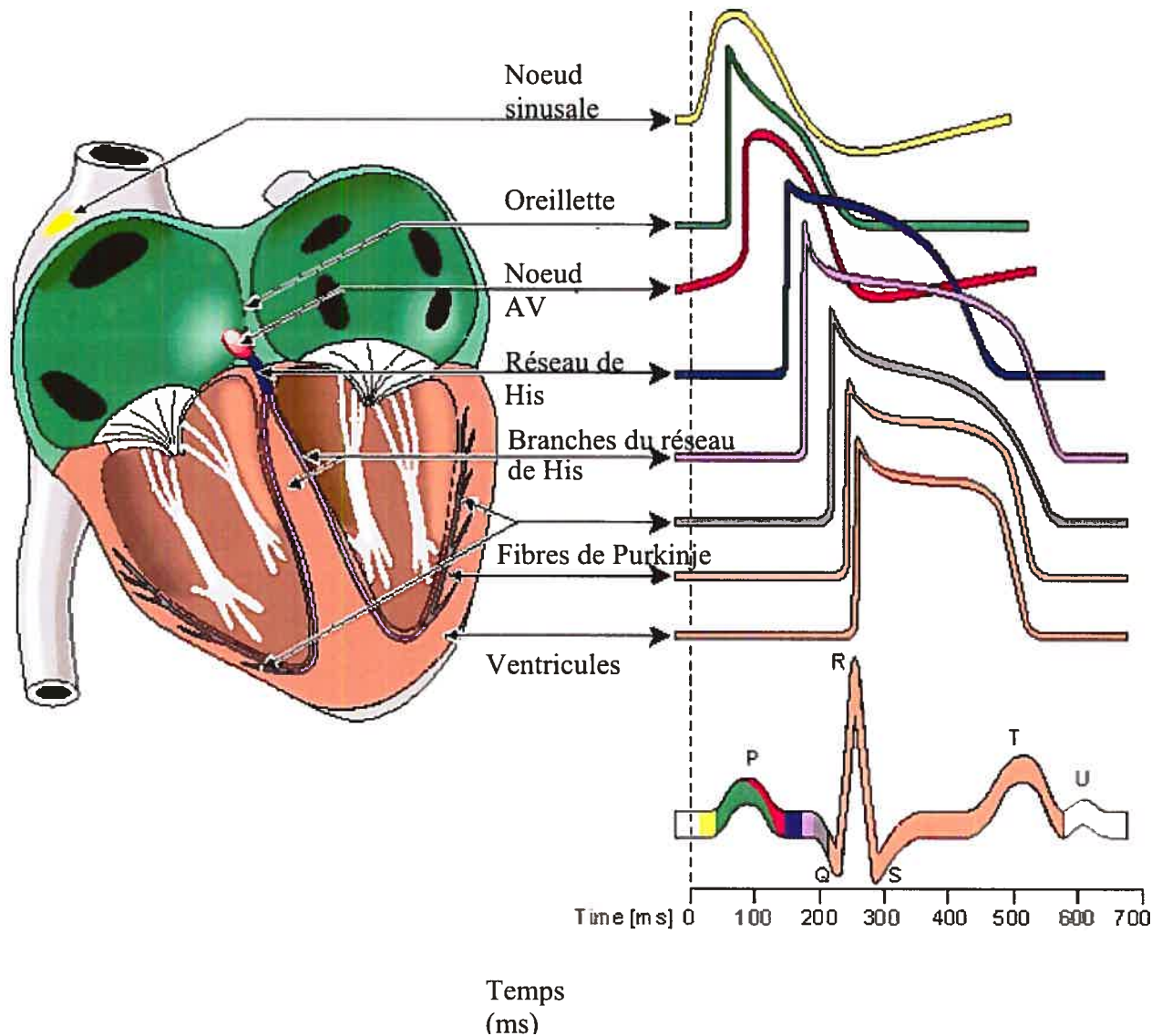


**Figure 3.** Post-dépolarisations précoces (EADs). La diminution du courant potassique repolarisant peut prolonger le potentiel d'action et prédisposer le myocarde au développement des EADs. Les EADs sont principalement attribuables à la réactivation des courants calciques. (adapté de <sup>6</sup>)

### 1.8.3 Hétérogénéité de la repolarisation ventriculaire

La configuration, la durée et les périodes réfractaires des potentiels d'action varient selon les différents types cellulaires du myocarde (Figure 4). Les différences de durée du potentiel d'action et des périodes réfractaires sont dues à l'expression variable de courants ioniques dans les différents types de cellules cardiaques <sup>44</sup>. Ces différences peuvent causer des hétérogénéités de repolarisation entre les cellules.

L'hétérogénéité de la repolarisation dans le LQTS peut s'observer sur l'ECG de surface par l'alternance de l'onde T. En fait, d'un battement à l'autre, la polarité ou l'amplitude de l'onde T (T wave alternans) peut varier. Ce phénomène se présente généralement au cours d'un stress émotif ou physique mais il peut également être observé au repos. Par conséquent, lorsque l'hétérogénéité de la repolarisation et les alternances de l'onde T sont importantes, elles peuvent être précurseurs des TdP et servir de marqueurs électrophysiologiques de cette arythmie. De plus, la dispersion anormale de la repolarisation ventriculaire par des médicaments peut initier les circuits de réentrées et les tachycardies ventriculaires. Par contre, il faut se rappeler que l'hétérogénéité de la repolarisation est un phénomène physiologique normal et très certainement nécessaire



**Figure 4.** Variation de la configuration des potentiels d'action dans les différentes cellules du myocarde. (Adapté de <sup>45</sup>). Les cellules du myocarde expriment des niveaux différents de canaux ioniques causant des variations de configuration des potentiels d'action. Par exemple, les cellules du noeud sinusal et du noeud AV n'expriment pas  $I_{Na}$ . Dans ces cellules,  $I_f$  et  $I_{Ca}$  sont les courants dépolarisant. Par ailleurs, l'ECG de surface reflète l'activité électrique des cellules du myocarde. Ainsi, l'onde P est associée à la dépolarisation du noeud sinusal, des oreillettes et du noeud AV. Par la suite, le complexe QRS est associé à la dépolarisation des fibres de Purkinje et des cellules ventriculaires. Enfin, l'onde T est associée à la repolarisation des cellules ventriculaires.

## 1.9 Facteurs de risque

L'apparition des TdP suite à l'administration d'un médicament ayant la capacité de prolonger le potentiel d'action ventriculaire et causer des EADs est plutôt rare et très imprévisible. Il existe plusieurs facteurs de risque pouvant accroître la menace de la survenue des TdP. Parmi ces facteurs, on retrouve les troubles électrolytiques, la bradycardie, les toxines, le sexe féminin, les maladies cérébrovasculaires et bien sûr, le LQTS congénital. Effectivement, les patients atteints de LQTS congénital ont une réserve de repolarisation insuffisante. Lorsque cette réserve est diminuée davantage par l'administration d'un bloqueur des canaux potassiques, on assiste à l'apparition de TdP. De plus, pour la plupart des médicaments, le risque de TdP s'élève à mesure que la dose et la concentration augmentent. Ainsi, le dysfonctionnement et les inhibitions métaboliques peuvent influencer les concentrations plasmatiques, tissulaires et cellulaires de ces médicaments et pourraient jouer un rôle dans l'apparition de ces arythmies.

### 1.9.1 Les troubles électrolytiques

L'hypokaliémie est un facteur important pour le développement des TdP. Des TdP peuvent se développer chez des patients présentant de l'hypokaliémie ce qui entraîne une augmentation de l'automatisme et une diminution de la conduction. La diminution de la conduction prédispose le patient à des cycles de réentrée car, dans des conditions de déficience potassique extracellulaire sévère, des dépolarisations spontanées peuvent se produire. Récemment, Roden et al. ont démontré que le mécanisme sous-jacent à la prolongation du QT au cours d'une hypokaliémie sévère est secondaire à une

inactivation rapide du courant  $I_{Kr}$ <sup>46</sup>. Une inactivation rapide d' $I_{Kr}$  mène à une diminution nette du courant repolarisant ce qui prolonge la repolarisation.

Une déficience en magnésium est aussi un facteur qui précipite le LQTS et les TdP. Une faible concentration extracellulaire de magnésium est associée à des anomalies de dépolarisation, de repolarisation et d'automaticité. Contrairement au potassium, le mécanisme par lequel de faibles concentrations de magnésium génèrent des potentiels d'action anormaux est mal connu<sup>47,48</sup>.

Par ailleurs, la surcharge calcique intracellulaire peut contribuer au risque de TdP<sup>49,50</sup>. Ceci pourrait entre autres expliquer une incidence plus importantes des TdP induites par les médicaments chez les patients atteints de cardiopathies telles l'insuffisance cardiaque congestive. D'ailleurs, chez ces patients, les désordres de l'homéostasie calcique intracellulaire sont de plus en plus reconnus comme des arythmogènes potentiels<sup>51</sup>.

### 1.9.2 La bradycardie

Plus la fréquence cardiaque est lente, plus la durée de la repolarisation sera longue. Par exemple, une fréquence sinusale lente secondaire à l'hypothyroïdie ou de l'hypothermie peut augmenter l'intervalle QT et par conséquent, les risques de TdP. Par ailleurs, il a été démontré que les médicaments qui bloquent  $I_{Kr}$  prolongent la durée de repolarisation de façon plus importante en présence de fréquences cardiaques lentes. De plus, les troubles électrolytiques de même qu'un QT long d'origine médicamenteuse amplifient le risque de TdP durant une bradycardie.



Chez le patient atteint de QT long congénital, il a été démontré que la fréquence cardiaque au repos est plus basse comparativement aux sujets normaux<sup>52</sup>. Également, lors d'une activité physique modérée à intense, les sujets atteints de QT long congénital ont une fréquence cardiaque plus basse. Un dysfonctionnement du noeud sinusal a aussi été observé chez ces patients<sup>53</sup>. Il a été démontré que les TdP sont surtout observées à partir du deuxième pic après l'encoche sur l'onde T<sup>41</sup>. Par contre, certains présentent un arrêt sinusal et une encoche sur l'onde T lors d'un premier battement suite à une pause sur l'ECG.

Ainsi, la bradycardie semble influencer les risques de TdP. Différents autres facteurs dont des désordres génétiques et la présence de certaines situations pathologiques peuvent affecter le degré de bradycardie et par conséquent augmenter la susceptibilité de développer des TdP.

### 1.9.3 Les toxines

Des cas de TdP ont été associés à un empoisonnement à l'arsenic<sup>54</sup>. Les TdP sont probablement dues à la prolongation de l'intervalle QT et des alternances des ondes TU en présence d'arsenic. En fait, l'arsenic bloque les courants  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  et active les canaux  $I_{K-ATP}$ . Ainsi, le risque de proarythmie à l'arsenic est probablement dû à la variabilité de prolongation du QT causée par la compétition entre l'inhibition et l'activation de plusieurs courants repolarisants<sup>55</sup>. Par ailleurs, la dépendance à la cocaïne peut aussi prolonger l'intervalle QT en bloquant  $I_{Kr}$ <sup>56</sup>. Enfin, les organophosphorés ont également le potentiel de prolonger l'intervalle QT. En fait, les insecticides organophosphorés peuvent être toxiques dus à leur stimulation du nerf vague causé par l'inhibition de la

cholinestérase <sup>57</sup>. La stimulation du nerf vague peut induire une bradycardie et ainsi augmenter le risque de TdP.

#### 1.9.4 Les maladies cérébrovasculaires et la fréquence sinusale

Des patients atteints d'hémorragies sub-arachnoïdiennes, d'encéphalite et/ou d'ischémie cérébrale démontrent souvent une prolongation de l'intervalle QT <sup>58,59</sup>. Les hémorragies sub-arachnoïdiennes et l'influence du système nerveux autonome sur la repolarisation cardiaque sont probablement responsables des arythmies observées. Par contre, la prolongation du QT se résout généralement en moins de quelques semaines suite à un accident cérébrovasculaire.

Par ailleurs, il a été démontré que la fréquence sinusale augmente durant les minutes précédant un épisode de TdP chez des patients atteints du syndrome du long QT congénital <sup>60</sup>. Ceci suggère que des fréquences cardiaques rapides, sous-jacentes à une activation adrénergique, contribuent aux TdP. Ce phénomène pourrait expliquer l'augmentation du risque de TdP suite à une cardioversion récente secondaire à une fibrillation auriculaire. De fait, les cas de TdP sont surtout observés lors d'un effort physique chez les patients atteints de LQT1. Ces patients ont une diminution de l'activité d' $I_{Ks}$  due à une mutation dans *KCNQ1*. Ainsi, ils n'ont pas l'apport du courant d' $I_{Ks}$  lors d'une stimulation adrénergique. Ce courant est normalement très important lors d'une augmentation du rythme cardiaque.

#### 1.9.5 Les facteurs génétiques

Les TdP se développent dans une proportion de 1% à 8% chez les patients qui reçoivent des médicaments qui prolongent l'intervalle QT. Malgré l'identification de plusieurs facteurs de risque, le développement des TdP demeure toujours relativement imprédictible. Ceci suggère qu'il y a d'autres facteurs de risque qui expliqueraient la réponse variable aux médicaments pour la prolongation du QT et le développement de TdP. Roden et al. ont récemment démontré qu'il existe des variations dans la région codante de l'ADN des gènes impliqués dans le QT long congénital. Ces mutations peuvent prédisposer des patients à une prolongation de l'intervalle QT par les médicaments mais ne causeront pas nécessairement le syndrome du QT long congénital<sup>61</sup>. Ainsi, ces mutations seraient un autre facteur de risque pour le développement des TdP médicamenteuses.

#### 1.9.6 Le sexe

Il est maintenant bien connu que les femmes possèdent un risque accru de présenter un syndrome du QT long d'origine médicamenteuse (LQTS) associé à la survenue de TdP. Les premières études qui ont démontré ce fait furent réalisées en 1983 par Abinader et al. Ils reconnurent que les femmes étaient à plus haut risque de développer des TdP avec des médicaments tels que la prénylamine<sup>62</sup>. Par ailleurs, en 1986, Roden et al. étudièrent 24 patients atteints de TdP et de LQTS induits par la quinidine. Ils ont déterminé que 16 étaient des femmes (66%)<sup>63</sup>. En 1993, une analyse de Makkar et al. a étudié 332 cas de TdP induits par des anti-arythmiques. Ils ont démontré que 70 % des TdP étaient observés chez les femmes<sup>64</sup>. Plus récemment, une étude internationale sur le *d*-sotalol, un anti-arythmique de classe III, s'intitulant SWORD (Survival with Oral *d*-Sotalol), a démontré que les femmes sont plus à risque de présenter des arythmies suivant un infarctus du

myocarde <sup>65</sup>. De plus, lors d'une étude regroupant 346 cas extraits de rapports de la FDA sur les effets cardiaques sérieux observés avec l'érythromycine, un antibiotique macrolide largement utilisé, on conclut que 65% des patients présentant une toxicité étaient des femmes <sup>66</sup>. Plus récemment, l'halofantrine, un antipaludéen connu, soutient la même hypothèse soit, 2/3 des cas observés sont chez les femmes <sup>67</sup>. Toutefois, les mécanismes qui en sont responsables n'ont pas été expliqués. Ainsi, il existe désormais plusieurs preuves cliniques claires de l'impact du sexe sur les risques de proarythmies cardiaques par certains médicaments.

Les mécanismes sous-jacents responsables de la prédisposition des femmes aux TdP sont mal connus mais peuvent être reliés au fait que les QTc de base sont plus long chez les femmes que chez les hommes après la puberté <sup>68</sup>. De fait, l'intervalle QT diminue chez les hommes après la puberté contrairement aux femmes où il reste stable. Ces valeurs reviennent à leur niveau de base vers l'âge de 50 ou 60 ans <sup>69</sup>. Ainsi, les hommes ont une protection additionnelle aux TdP comparativement aux femmes.

Ces preuves ont mené à l'hypothèse que les stéroïdes sexuels sont impliqués dans cette différence de QT. Il a été suggéré que la diminution de l'intervalle QTc durant la puberté chez les hommes serait due plutôt aux androgènes (spécifiquement la testostérone) qu'aux estrogènes dans les différences du QTc liées au sexe. 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 <sup>70</sup>. La même étude rapporte que des femmes viriles ont des intervalles JT plus courts comparativement aux hommes castrés et aux femmes normales. De plus, il a été rapporté que des athlètes ayant pris de fortes doses de stéroïdes anabolisants

androgéniques avaient des intervalles QTc plus courts <sup>71</sup>. Par ailleurs, une étude rétrospective ne démontre aucun effet significatif d'une hormonothérapie de remplacement (oestrogène) sur l'intervalle QTc chez les femmes postménopausées, et démontre ainsi l'absence d'effets de l'estrogène sur le QTc <sup>72</sup>. Enfin, les femmes sembleraient à plus haut risque de subir une prolongation du QTc d'origine médicamenteuse durant la menstruation et la phase ovulatoire du cycle menstruel mais ce risque est moindre durant la phase lutéale<sup>73</sup>.

Sachant que les récepteurs à l'oestrogène et à l'androgène se retrouvent dans le myocarde, des études ont tenté de démontrer le rôle modulateur de ces hormones sur les niveaux d'ARNm des canaux cardiaques calciques et potassiques chez le rat, le lapin et le chien <sup>74,75</sup>. Une étude de Hara et al. a évalué les effets de la dihydrotestostérone (DHT) et de l'oestradiol sur le potentiel d'action des muscles papillaires de lapin et conclut que l'oestradiol augmente significativement le potentiel d'action alors que la DHT le diminue significativement <sup>76</sup>. De plus, cette même étude démontre que les hormones sexuelles modulent également la réponse des bloqueurs d'I<sub>Kr</sub>. En effet, le E-4031, un bloqueur spécifique d'I<sub>Kr</sub>, induit une prolongation plus importante dans le groupe traité par l'oestradiol que par le groupe traité par la DHT. De même, Drici et al. ont démontré que la quinidine prolonge l'intervalle QTc dans le groupe traité par l'oestradiol d'une façon plus prononcée que dans le groupe traité par la DHT <sup>77</sup>. Cette étude a aussi démontré que l'effet chronique de l'oestradiol et de la DHT diminue l'expression des ARNm des canaux potassiques responsables du courant ultra-rapide I<sub>Kur</sub> chez le lapin sans effet significatif sur la composante rapide I<sub>Kr</sub>.

Au niveau moléculaire, les différences liées au sexe dans la densité des courants ioniques intrinsèques ont été décrites par Liu et al. <sup>77</sup>. En effet, la densité d' $I_{Kr}$  et d' $I_{K1}$  observée chez les lapins femelles était inférieure à celle observée chez les mâles, ce qui induisait une repolarisation plus lente chez les femelles et une prédisposition au LQTS. Une étude plus récente a analysé l'effet de la déficience en androgène sur la repolarisation ventriculaire chez la souris <sup>78,79</sup>. Une déficience en androgène entraîne une réduction de la densité d' $I_{Kur}$  et du niveau d'expression de Kv1.5 dans les ventricules de même qu'une augmentation du potentiel d'action et de l'intervalle QTc, suggérant ainsi que les hormones mâles contribuent à la différence liée au sexe dans la repolarisation cardiaque.

## **2.0 Traitement des torsades de pointes**

La plupart des syndromes du QT long d'origine médicamenteuse sont directement liés à l'administration de médicaments qui prolongent le QT. Ils sont souvent déclenchés par une surdose ou par la co-administration d'autres médicaments. Bien qu'elles soient rares, les arythmies dues à ces médicaments peuvent être mortelles. Il est donc prudent d'éviter les médicaments qui ont un effet important sur l'intervalle QT. De plus, le retrait du régime thérapeutique du médicament causant le QT long devrait être la première étape dans un traitement préventif des épisodes récurrentes de TdP. Si un médicament peut entraîner une prolongation de l'intervalle QT et doit absolument être administré à un patient, il devrait être soigneusement monitoré et le patient devrait être avisé des autres médicaments qui sont à éviter. Il devrait porter une attention spéciale aux médicaments qui démontrent une compétition au niveau de leur métabolisme ou de leur distribution. Les patients qui ont un intervalle QT limite avant le début d'un

traitement devraient rapporter tout symptôme tel que les quasi syncopes ou les palpitations. De plus, chez les patients susceptibles aux TdP, le QTc devrait être enregistré avant et après l'administration d'un médicament qui prolonge le QT. Le traitement devrait être diminué ou arrêté si le QTc dépasse 500 msec même si aucune valeur absolue ne peut prédire le développement d'une arythmie. En fait, il n'existe aucune corrélation linéaire réelle entre la prolongation du QT et le risque de développer des TdP<sup>31,80</sup>.

Si la prévention ne fonctionne pas, le magnésium intraveineux est l'agent de choix pour le traitement immédiat des TdP congénitales et médicamenteuses<sup>81</sup>. Il n'est pas évident comment le magnésium prévient la récurrence des TdP mais il a été proposé qu'il peut modifier l'activation des canaux potassiques<sup>82</sup>. Si le traitement intraveineux de magnésium échoue, un stimulateur cardiaque temporaire peut être installé. Des stimulations de 90 à 110 battements par minute sont efficaces afin de prévenir la récurrence à court terme des TdP médicamenteuses. La stimulation cardiaque prévient la bradycardie et les pauses qui sont reconnues comme étant arythmogènes<sup>83</sup>.

Le traitement à long terme du QT long congénital est plus complexe. Depuis 1975 le traitement du QT long congénital est associé à l'administration de  $\beta$ -bloqueurs. En fait, Schwartz a observé une diminution de la mortalité de 71% chez les patients traités aux  $\beta$ -bloqueurs comparativement à 6% chez les patients non traités<sup>84</sup>. Par contre, les patients montrant des symptômes avant l'initiation des  $\beta$ -bloqueurs ont six fois plus de chance d'avoir une récurrence que les patients asymptomatiques<sup>85</sup>. Les  $\beta$ -bloqueurs sont plus efficaces chez les patients atteints du LQT1 ( $I_{Ks}$ ) et LQT2 ( $I_{Kr}$ )<sup>85</sup>. Par contre, chez

les patients atteints de LQT3 ( $I_{Na}$ ), les  $\beta$ -bloqueurs n'ont presque pas d'effet. L'objectif du traitement avec les  $\beta$ -bloqueurs est de maintenir la fréquence cardiaque en-deçà de 130 battements minutes. Bien entendu, le sotalol est contre-indiqué à cause de ses propriétés anti-arythmiques de classe III. Le propranolol et le nadolol sont les médicaments les plus utilisés. Un mécanisme possible expliquant l'efficacité des  $\beta$ -bloquants serait l'inhibition de la réactivation du courant calcique entrant. En fait, il a été démontré que le vérapamil, un bloqueur du courant calcique de type L, élimine ou réduit les post-dépolarisations précoces et supprime les TdP chez les patients LQTS qui ont subi des tests de provocation à l'adrénaline <sup>42</sup>. Ainsi, le vérapamil pourrait être une alternative intéressante aux  $\beta$ -bloquants. Enfin, chez les patients qui développent une bradycardie sévère ou un arrêt sinusal significatif, l'installation concomitante d'un stimulateur cardiaque est indiquée.

La combinaison d'un  $\beta$ -bloquant avec un défibrillateur implantable est le traitement le plus sécuritaire pour les patients à haut risque atteints du QT long congénital <sup>86</sup>. Présentement, les défibrillateurs implantables sont utilisés seulement lorsque les épisodes de syncope persistent même après un traitement aux  $\beta$ -bloquants et/ou après l'installation d'un stimulateur cardiaque. Les défibrillateurs implantables ne préviennent pas l'apparition de TdP mais préviennent la mort subite lorsque les TdP dégénèrent en fibrillation ventriculaire. Récemment, des algorithmes de détection furent introduits dans les appareils afin d'éviter des chocs lors de courts épisodes de TdP cessant d'eux-mêmes.



Enfin le traitement adapté au gène est une approche récente pour le traitement du QT long congénital. Par exemple, chez les patients LQT3, des études ont suggéré que les bloquants du canal sodique tel que la mexilétine peuvent prévenir l'ouverture répétitive du canal, raccourcir l'intervalle QT et normaliser la morphologie de l'onde T <sup>87</sup>. De plus, il a été démontré qu'une augmentation de la concentration de potassium extracellulaire aide à augmenter le courant potassique repolarisant chez les patients atteints de LQT2 <sup>88</sup>. Par ailleurs, le nicorandil, un activateur des canaux potassiques sensibles à l'ATP, a démontré pouvoir améliorer les anomalies de repolarisation chez des patients atteints de QT long congénital ayant des épisodes de syncopes réfractaires aux  $\beta$ -bloquants <sup>89</sup>. Les nouvelles thérapies adaptées aux gènes devraient améliorer le traitement des patients atteints de LQTS congénital dans les années futures. Par contre, ils n'ont pas encore fait leur preuve à long terme et ils n'ont pas encore démontré leurs bénéfices par rapport aux modes de traitement actuels.

## 2. Effet du métabolisme

Pour la plupart des médicaments, le risque de TdP s'amplifie à mesure que la dose et la concentration augmentent. Il peut y avoir un accroissement marqué du risque de TdP lors de l'inhibition du métabolisme hépatique. En fait, la plupart des agents bloqueurs du courant  $I_{Kr}$  sont métabolisés par les cytochromes P450<sup>90</sup> (CYP). Au cours de ce chapitre, nous allons revoir le rôle des cytochromes dans le métabolisme et l'implication des CYP3A4 dans le métabolisme des bloquant d' $I_{Kr}$ .

### 2.1 Cytochromes P450

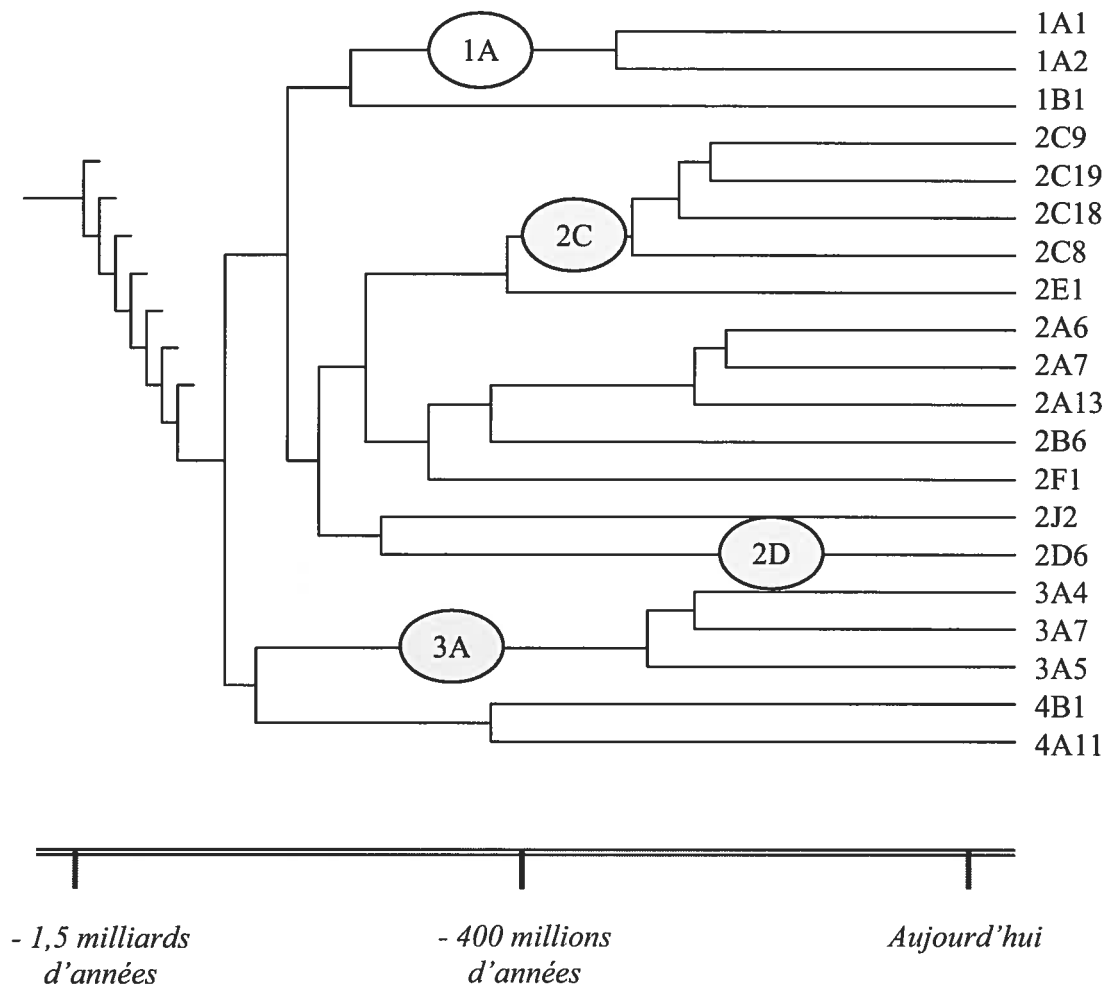
#### 2.1.1 Définition et fonctions

Le cytochrome P450 est un des systèmes enzymatiques majeurs impliqués dans la biotransformation des médicaments et de divers composés chimiques. Ce système enzymatique qui joue un rôle important dans le métabolisme oxydatif de plus de 200 000 produits chimiques est retrouvé chez diverses espèces de plantes, d'insectes, de bactéries et des mammifères incluant l'humain<sup>91</sup> La plupart des réactions catalysées par les CYP sont des réactions d'oxydations<sup>92</sup>. Par contre, les CYP peuvent aussi catalyser d'autres réactions beaucoup moins fréquentes et moins bien caractérisées comme des réactions de réduction, de désaturation, de déshydratation et de déshydrogénation<sup>92</sup>.

La superfamille des cytochromes P450 est constituée de plusieurs isoenzymes dérivées d'un gène ancestral commun (Figure 5). Les différentes isoenzymes du cytochrome CYP sont organisées en famille et ensuite classifiées en sous-familles selon leur ressemblance

en séquences d'acides aminés<sup>93,94</sup>. La superfamille des CYP comprend au total environ 1000 membres, toutes espèces confondues, et 57 gènes ont été identifiés chez l'humain.<sup>95,96</sup>

Les CYP participent au maintien de la santé et au bien-être de l'individu. Ils catalysent une grande variété de réactions qui rendent généralement les produits moins toxiques. En fait, chez l'humain, les isoenzymes du cytochrome P450 jouent un rôle primordial dans la biosynthèse de composés endogènes et dans le métabolisme de nombreux composés exogènes tels que des médicaments, des polluants environnementaux et alimentaires. Bien que le métabolisme de ces composés chimiques résulte fréquemment en un processus de détoxification, l'activité des CYP peut également générer des métabolites toxiques pouvant contribuer à augmenter la susceptibilité au cancer, à la tératogénèse, à la mutagénèse et à la toxicité aux médicaments.



**Figure 5.** Évolution des différentes familles des cytochromes P450 humains (adapté de <sup>97</sup>).

La superfamille des cytochromes P450 est constituée de plusieurs isoenzymes dérivées d'un gène ancestral commun. Les différentes isoenzymes du cytochrome CYP sont organisées en famille et ensuite classifiées en sous-familles selon leur ressemblance en acides aminés.

### 2.1.2 Composés endogènes

Les isoenzymes du CYP possèdent probablement une ou plusieurs fonctions endogènes<sup>98</sup>. Il a été démontré que les cytochromes P450 ont une implication dans une diversité de réactions d'oxydation de produits endogènes<sup>92</sup>. D'ailleurs, des études ont démontré que les CYP seraient impliqués dans des réactions de déhydrogénation. Ces réactions sont importantes dans le métabolisme des acides gras. Il est à noter qu'en plus de certains composés endogènes, l'acide valproïque ainsi que la warfarine sont sujets à ce type de réaction de déhydrogénation<sup>99,100</sup>.

Certains cytochromes P450 participent au métabolisme de l'acide arachidonique qui est transformé en plus de 102 métabolites éicosanoïdes alors que d'autres isoenzymes sont responsables de la biosynthèse d'acides biliaires à partir du cholestérol, de la synthèse et/ou du métabolisme de la vitamine D<sub>3</sub>, des hormones stéroïdiennes et de l'acide rétinoïque<sup>96,98,101</sup>.

### 2.1.3 Composés exogènes

Les CYP constituent le système enzymatique majeur impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques. Ce système enzymatique est caractérisé entre autres par une versatilité importante des diverses réactions qu'il catalyse. Ceci est rendu possible grâce au nombre considérable d'isoenzymes qui le composent. Chez l'humain, les familles majeures impliquées dans le métabolisme des médicaments sont les CYP1, CYP2 et CYP3. La

sous-famille CYP3A est de loin la famille la plus importante contribuant au métabolisme de plus de 50% des médicaments.

Généralement, le processus de biotransformation voit à la conversion de xénobiotiques lipophiles en métabolites plus hydrosolubles permettant de faciliter leur excrétion afin de diminuer la durée d'exposition ou encore, éviter l'accumulation du produit mère dans l'organisme. Le foie représente un organe d'importance dans le processus global de biotransformation lequel peut être divisé en différentes phases. Les transformations métaboliques de phase I comprennent les réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse et introduisent un groupement fonctionnel ou réactif dans la molécule. Par ailleurs, les transformations métaboliques de phase II sont habituellement des réactions de conjugaison du produit mère ou d'un métabolite avec l'acide glucuronique, le glutathion ou un sulfate. Les réactions de conjugaison facilitent le transport et favorisent l'élimination par les voies rénales et biliaires. Les cytochromes P450 sont le système enzymatique majeur catalysant les réactions de phase I d'où leur importance dans la protection de l'organisme face à l'intrusion de xénobiotiques.

## **2.2 Le cytochrome 3A4 et ses substrats**

La première enzyme de la sous-famille CYP3A à avoir été isolée est le CYP3A4, originellement nommée NF25 (P450 capable d'oxyder la nifédipine). Le CYP3A4 joue un rôle majeur dans le métabolisme d'environ 50% des médicaments utilisés de nos jours <sup>101,102</sup>. L'expression importante du CYP3A4 dans les principaux organes contribuant au métabolisme des médicaments ainsi que sa contribution à la

biotransformation de nombreux substrats font de cette isoenzyme, l'isoforme majeure de la sous-famille CYP3A.

D'ailleurs cette isoenzyme peut représenter jusqu'à 70% <sup>103,104</sup> des cytochromes hépatiques totaux. En effet, plus de 150 médicaments sont substrats des CYP3A4/5 tels les corticostéroïdes, les immunosupresseurs, les antihistaminiques de deuxième génération, les inhibiteurs de la HMG-CoA réductase, les modulateurs de la motilité gastrique, les benzodiazépines et certains anti-arythmiques (Tableau 4) <sup>101,105</sup>.

**Tableau 4.** Liste des principaux substrats, inhibiteurs et inducteurs des CYP3A4/5  
(adapté de <sup>97</sup>)

<i>Inhibiteur</i>	<b>Substrats</b>			<i>Inducteurs</i>
	Affinité			
	<i>Élevée</i>	<i>Intermédiaire</i>	<i>Faible</i>	
Érythromycine Clarithromycine Télithromycine Troléandomycine Fluconazole Kétoconazole Itraconazole Métronidazole Miconazole Jus de pamplemousse	Amiodarone Diltiazem Vérapamil Indinavir Nelfinavir Ritonavir Saquinavir	Félodipine Nifédipine Nicardipine Nimodipine Atorvastatine Lovastatine Simvastatine Buspirone Néfazodone Sertraline Cyclosporine Dapsone Étoposide Tamoxifène	Alprazolam Diazépam Midazolam Triazolam Citalopram Mirtazapine Alfentanyl Fentanyl Méthadone Astémizole Terféndine Cisapride Dompéridone Dexaméthasone Méthylprednisolone Éthinyl estradiol Testostérone Amlodipine Bromocriptine Carbamazépine Cérvastatine Ergotamine Finastéride Lidocaine Paclitaxel Pimozide Pravastatine Sildénafil	Barbituriques Carbamazépine Dexaméthasone Phénytoïne Rifampicine Troglitazone



## 2.3 Définitions

### 2.3.1 Substrat

Le substrat se définit comme une molécule endogène ou exogène sur laquelle une enzyme exerce son activité catalytique. En fait, le substrat présente une affinité plus ou moins grande pour une enzyme particulière. L'enzyme effectue une ou des modifications de la structure chimique du substrat et ce dernier est généralement transformé en un métabolite inactif.

### 2.3.2 Inducteur

L'effet d'un inducteur entraîne une augmentation de l'activité d'une isoenzyme en augmentant généralement la concentration intracellulaire de l'enzyme induite. L'augmentation de l'expression de l'enzyme induite est couramment le résultat d'une transcription augmentée du gène associé à cette protéine <sup>104,106</sup>. Ainsi, le terme d'induction est associé aux situations dans lesquelles la synthèse protéique est stimulée <sup>107</sup>. L'induction des isoenzymes peut également être causée par des mécanismes non-transcriptionnels comme une diminution du taux de dégradation de la protéine <sup>108-110</sup>.

Lorsqu'un substrat est administré en concomitance avec un inducteur, son métabolisme sera augmenté et ses concentrations plasmatiques seront plus faibles secondairement à l'induction de son métabolisme. Les isoenzymes du cytochrome P450 ne sont pas toutes sujettes à l'induction. D'ailleurs, il n'existe pas encore d'inducteur connu pour le CYP2D6. De plus, il existe des différences importantes entre les espèces dans la réponse

des isoenzymes à divers inducteurs. En fait, un composé induisant une isoforme particulière chez un animal donné n'induirait pas nécessairement cette enzyme chez l'humain <sup>111</sup>.

### 2.3.3 Inhibiteur

Les inhibiteurs sont des composés qui ont la capacité de réduire l'activité catalytique d'une isoenzyme. L'administration concomitante d'un inhibiteur avec un substrat tend à faciliter l'accumulation de ce dernier dans l'organisme due à l'inhibition de son métabolisme. Un inhibiteur d'une enzyme n'est pas nécessairement un substrat de cette dernière. Ainsi, il n'est pas obligatoirement biotransformé par l'isoenzyme. Par ailleurs, un substrat représente toujours un inhibiteur potentiel envers un autre substrat d'une même isoenzyme. En fait, l'administration de deux substrats dont le métabolisme est catalysé par la même enzyme peut entraîner une compétition pour celle-ci. Cette compétition est influencée par l'affinité de chacun des substrats pour l'isoenzyme donnée ainsi que par leurs concentrations respectives au site enzymatique.

L'affinité d'un substrat pour une enzyme particulière est mesurée à l'aide de sa constante d'affinité ( $K_m$ ). Par ailleurs, la principale mesure de puissance d'inhibition d'un composé est sa constante d'inhibition ( $K_i$ ) <sup>112</sup>. En règle générale, plus la valeur du  $K_m$  est petite, plus le substrat démontre une forte affinité pour son enzyme. Par ailleurs, plus le  $K_i$  est petit, plus un inhibiteur sera efficace envers l'enzyme. Lorsque deux substrats compétitionnent pour la même enzyme, le  $K_m$  fournit un indice de la puissance d'inhibition potentielle de la même façon que le  $K_i$ . Ainsi, un substrat peut devenir

inhibiteur pour un autre substrat qui compétitionne pour la même enzyme. Il faut toutefois indiquer que les constantes d'affinité et d'inhibition représentent deux entités distinctes.

#### **2.4 Variabilité interindividuelle**

Une variabilité interindividuelle de la fonction du CYP3A4/5 peut avoir un impact important sur le devenir d'un médicament dans l'organisme et peut affecter son profil d'efficacité et de toxicité. En effet, il a été démontré que l'expression du CYP3A4/5 varie jusqu'à 40 fois entre différents foies et tissus intestinaux humains<sup>113-115</sup>. De plus, il est possible de retrouver des variations dans son activité pouvant s'élever de 90 fois<sup>116</sup>. La présence de variabilité interindividuelle contribue aux fluctuations observées dans la cinétique de plusieurs substrats des CYP3A4/5. Cette variabilité reflète des effets génétiques ainsi qu'une modulation par des facteurs environnementaux.

Le jus de pamplemousse est un produit de tous les jours qui peut affecter l'activité des CYP3A4/5. Il a été démontré que le jus de pamplemousse fait augmenter la biodisponibilité orale des médicaments en inhibant leur métabolisme des CYP3A4/5. En fait, les furocoumarines dont les plus abondants sont le bergamottin et le 6',7'-dihydrobergamottin sont contenues dans le jus de pamplemousse et constituent des inhibiteurs de l'activité *in vitro* des CYP3A4/5<sup>117</sup>. Par contre, l'inhibition des CYP3A4/5 ne semble pas seulement attribuable au bergamottin. Il semble qu'une combinaison de plusieurs composés serait importante<sup>117</sup>. D'ailleurs, il a été démontré que le bergamottin est concentré dans le jus de lime mais ce jus cause moins d'interaction que le jus de

pamplemousse <sup>117</sup>. Cet effet semble spécifique au jus de pamplemousse car le jus d'orange et le jus d'orange de Séville n'affectent pas l'activité des isoenzymes CYP3A4/5 <sup>118-120</sup>.

Par ailleurs, plusieurs produits naturels peuvent causer de la variabilité. En effet, le diallylsulfide qui est un composé important de l'ail peut induire les isoenzymes CYP3A4/5 <sup>121</sup>. De même, le millepertuis (*Hypericum perforatum*) qui est souvent utilisé pour ses propriétés d'antidépresseur naturel, induit l'activité catalytique des CYP3A4/5 <sup>122-124</sup>. La co-administration peut avoir des répercussions majeures sur la réussite d'un traitement pharmacologique. D'ailleurs, chez des patients ayant subi une transplantation, des rejets d'organes ont été rapportés suivant l'administration concomitante de millepertuis et de l'agent immunosuppresseur, la cyclosporine <sup>125,126</sup>. Enfin, l'huile de menthe poivrée utilisée pour divers troubles gastrointestinaux serait quant à elle un inhibiteur potentiel et réversible des isoenzymes CYP3A4/5 <sup>122</sup>.

D'autre part, certains facteurs endogènes comme les cytokines dont les interleukines Il1, Il2, Il6 et Il10, le facteur de nécrose tumorale (TNF  $\alpha$ ) et l'interféron  $\gamma$  diminuent clairement l'activité des CYP3As <sup>127-132</sup>.

Le CYP3A4 ne semble pas subir l'influence de polymorphismes génétiques. Par contre, plusieurs expériences indiquent une grande variation dans l'expression de l'isoenzyme CYP3A5. La mutation la plus fréquente se situe dans un intron et correspond à l'allèle CYP3A5\*3. Les individus homozygotes pour l'allèle CYP3A5\*3 présentent un niveau de protéine CYP3A5 faible, voire nulle <sup>133</sup>. Par contre, le variant allélique CYP3A5\*3

est plus prévalent que l'allèle sauvage, le CYP3A5\*1, pour la majorité de la population. D'ailleurs la fréquence de l'allèle sauvage s'élève à 10-30% chez les Caucasiens, 25-35% chez les Chinois, 50 % chez les Africain-américains, 15 % chez les Japonais, 25 % chez les Mexicains, 60 % chez les Indien-américains <sup>116,134-136</sup>. Enfin, lorsque exprimée, l'isoenzyme CYP3A5 représente plus de 50% du contenu total hépatique en CYP3A <sup>133</sup>.

## **2.5 Interactions médicamenteuses**

La variabilité interindividuelle et les interactions médicamenteuses ont un impact majeur dans la réponse à un traitement pharmacologique. En effet, l'efficacité ou le profil de toxicité d'un médicament peuvent être affectés par l'administration concomitante d'une autre substance. De nos jours, il est fréquent qu'un patient reçoive une thérapie médicamenteuse qui comprend plusieurs médicaments. Ainsi, les interactions médicamenteuses peuvent être fréquentes et constituent un problème important dans la population. Des études démontrent que 5% des hospitalisations et 4,6% des décès annuels pourraient être reliés à de telles situations <sup>137,138</sup>. Pour ces raisons, les cliniciens doivent posséder une bonne connaissance des interactions médicamenteuses.

Il existe deux types d'interactions médicamenteuses, soit celles d'origine pharmacocinétique et/ou pharmacodynamique. L'interaction pharmacocinétique décrit la relation entre la dose et la concentration d'une substance dans l'organisme. Par ailleurs, l'interaction pharmacodynamique décrit la relation entre la concentration du médicament et ses effets. Lors d'une interaction pharmacodynamique, l'administration concomitante de deux substances peut causer une compétition pour le même site d'action entraînant

une augmentation, une diminution ou encore une annulation de l'effet du médicament. D'autre part, une interaction pharmacocinétique résulte fréquemment d'un changement dans les mécanismes d'élimination du médicament dont les cytochromes P450 qui représentent le mécanisme majeur d'élimination des drogues. De plus, un substrat peut être un inhibiteur ou un inducteur pour les CYP et ainsi influencer la concentration des médicaments dans l'organisme. Le tableau 4 liste les nombreux substrats, inhibiteurs et inducteurs des CYP3A4/5 pouvant causer des interactions pharmacocinétiques lors de l'administration concomitante de plusieurs médicaments.

## **2.6 Inhibition du métabolisme comme facteur de risque du Syndrome du QT long d'origine médicamenteuse**

Nous avons vu que les patients susceptibles aux TdP devraient être sous haute surveillance et que les médicaments connus pour prolonger le QT devraient être diminués ou retirés de l'arsenal thérapeutique du patient. De plus, les médicaments qui inhibent le métabolisme des P450s devraient aussi être évités. D'ailleurs, une inhibition du métabolisme d'un médicament peut entraîner non seulement une augmentation de ses concentrations plasmatiques, mais aussi, une augmentation de ses concentrations tissulaires. Cette augmentation au site d'action du médicament peut accentuer l'effet du médicament. Le tableau 5 présente plusieurs médicaments connus comme bloqueur d'I<sub>Kr</sub> ainsi que leur voie métabolique principale. Si un bloqueur d'I<sub>Kr</sub> est administré simultanément avec un autre substrat ou inhibiteur de la même enzyme responsable de leur métabolisme, il est possible qu'un des deux médicaments s'accumule dans différents tissus dont le coeur et peut entraîner des effets cliniques importants comme le prolongement du QT et l'apparition de TdP. Ainsi, chez les patients avec un QTc limite

(420 – 440 msec), il est prudent d'obtenir leur dossier-patient afin d'éviter des interactions médicamenteuse néfastes.

**Tableau 5.** Bloqueurs d'I<sub>Kr</sub> et leur voie métabolique principale (adapté de <sup>139</sup>)

Médicaments	Voie métabolique majeure (CYP)
Amiodarone	3A4
Amitryptilline	2D6 et 2C19
Astémizole	3A4 et 2D6
Cisapride	3A4
Clarithromycine	3A4
Diphénydramine	2D6
Disopyramide	3A4
Dofétilide	3A4
Érythromycine	3A4
Flécaïnide	2D6
Glibenclamide	2C9
Grépaflouxacine	
Halopéridol	3A4 et 2D6
Imipramine	3A4
Kétoconazole	3A4
Mibéfradil	3A4
Pimozide	3A4 et 1A2
Procaïnamide	2D6
Quinidine	3A4
Rispéridone	2D6 et 3A4
Sildénafil	3A4, 2C9, 2C19 et 2D6
Sertindole	3A4 et 2D6
Sotalol	
Terfénadine	3A4
Thioridazine	3A4 et 2D6
Vérapamil	3A4, 3A5 et 2C8

### 3. Transporteurs ABC : La P-glycoprotéine

Nous avons vu que la plupart des agents bloquants du courant  $I_{Kr}$  sont métabolisés par le CYP3A4. Une modulation de l'activité enzymatique de cette enzyme peut faire varier la concentration plasmatique et tissulaire de ces médicaments. Par ailleurs, il existe d'autres protéines qui peuvent jouer un rôle important sur le contrôle des concentrations des médicaments dont les transporteurs membranaires. Nous allons revoir l'implication de ces protéines dans l'organisme et leur rôle potentiel dans la régulation de la concentration plasmatique et tissulaire des médicaments.

#### 3.1 Historique

Le mécanisme de résistance à plusieurs médicaments a été mis en évidence au début des années 70 dans différentes lignées cellulaires cancéreuses rendues résistantes *in vitro* à des médicaments antinéoplasiques. Biedler et Riehm furent les premiers à démontrer que des cellules tumorales de hamster développaient une résistance croisée vis-à-vis plusieurs agents anticancéreux suite à l'induction d'une résistance initiale à un médicament anticancéreux <sup>140</sup>. En 1973, il fut démontré qu'un efflux actif du médicament expliquait la diminution de l'accumulation intracellulaire et était à l'origine de la résistance <sup>141</sup>. Ce phénomène fut appelé « Multidrug Resistance » (MDR).

En 1976, Juliano et Ling ont identifié une glycoprotéine membranaire de haut poids moléculaire qui est responsable de l'efflux des médicaments et l'appelèrent P-glycoprotéine (P pour perméabilité) <sup>142</sup>. C'est en 1986 que le clonage et le séquençage de



l'ADNc du gène *MDR1* ont permis de connaître la structure primaire de la P-glycoprotéine (P-gp) <sup>143</sup>. Cette protéine fut classée dans la superfamille des transporteurs ABC (ATP binding cassette).

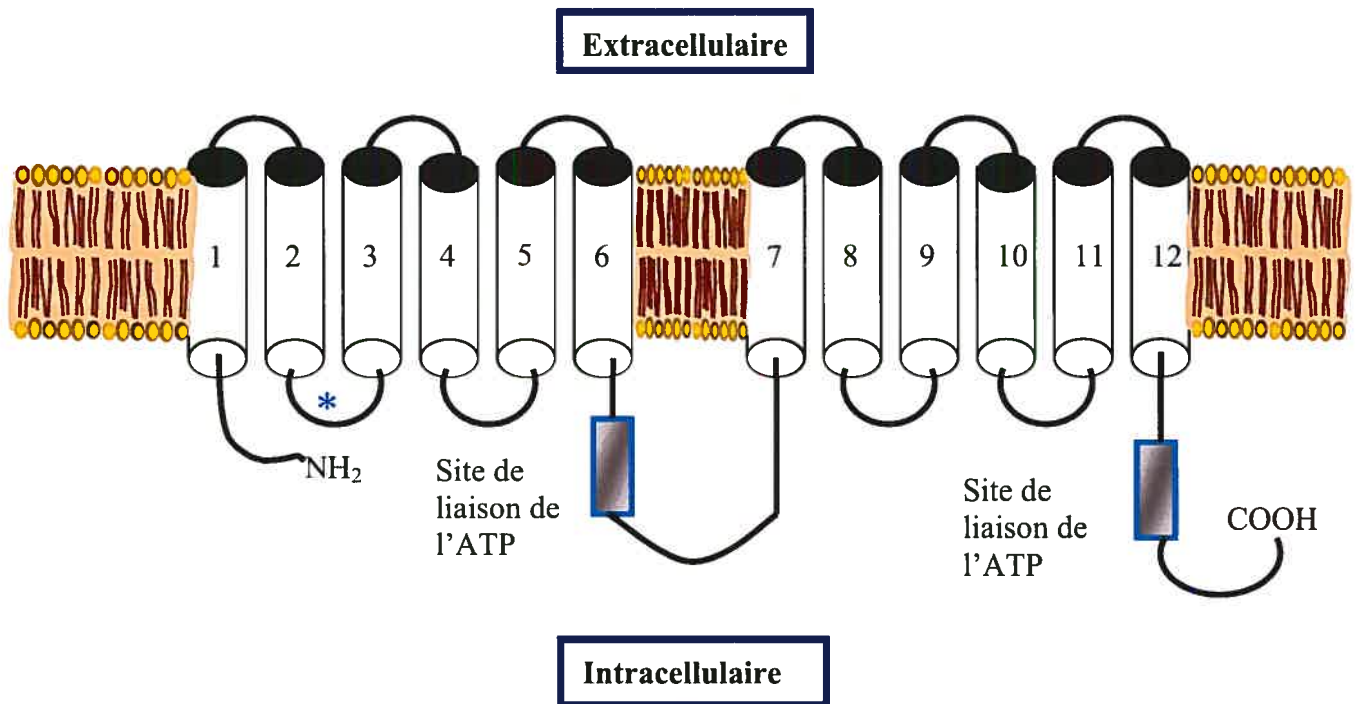
### 3.2 Structure

La P-glycoprotéine humaine a un poids moléculaire de 170 kDa et contient 1280 acides aminés et une cupule glucidique d'environ 30 kDa. Sa structure primaire a permis de proposer un schéma structurel de la protéine (figure 6). Sa structure est composée de deux moitiés qui ont 43% d'homologie <sup>144</sup>. Chacune des deux moitiés contient 6 segments transmembranaires reliés entre eux par des boucles extra et intra-cellulaires. Chaque moitié contient une zone de reconnaissance et de liaison des nucléotides, plus particulièrement de l'ATP. D'ailleurs, il fut démontré que l'ATP est essentiel au bon fonctionnement de la protéine <sup>145</sup>. Par ailleurs, plusieurs modifications post-traductionnelles sont possibles. Par exemple, la première boucle extracellulaire peut être glycosilée sur des séquences spécifiques. Il est proposé que l'ensemble des domaines transmembranaires forme un pore à travers la membrane plasmique afin de laisser passer les molécules <sup>146</sup>.

Chez les primates, deux membres ont été retrouvés; le *MDR1* et le *MDR2* qui est aussi connu sous le nom de *MDR3* <sup>143,147</sup>. Tel que mentionné précédemment, *MDR1* code pour une protéine de transport (P-gp) qui confère la résistance aux médicaments alors que *MDR2* code pour une protéine qui est spécifique à la translocation de la phosphatidylcholine dans la cellule <sup>148,149</sup>. Des expériences de transfection ont permis de

montrer que seul le gène *MDR1* pouvait conférer le phénotype de résistance multidrogue<sup>150</sup>. Par contre, dernièrement il a été observé que *MDR2* serait aussi capable de transporter certains médicaments transportés par *MDR1* mais à un taux beaucoup plus faible.

La souris exprime trois gènes *MDR*, désignés comme *mdr1a*, *mdr1b* et *mdr2*<sup>151,152</sup>. Le *mdr1a* et le *mdr1b* peuvent reproduire un phénotype de résistance multidrogue semblable à *MDR1*. Par contre, la transfection de *mdr2* ne donnerait pas ce même type de phénotype<sup>152-154</sup>.



**Figure 6.** Schéma structurel de la P-glycoprotéine. La P-gp est composée de deux moitiés contenant 6 segments transmembranaires reliés entre eux par des boucles extra et intra-cellulaires. Chacune des deux moitiés comprend un site de liaison de l'ATP en C-terminal. La première boucle intracellulaire de la protéine est indiquée avec un astérisque (\*). Cette boucle et la zone transmembranaire qui lui fait suite (3) sont essentielles dans la reconnaissance des substrats. De plus, plusieurs mutations dans les segments trans-membranaires 5, 6, 11 et 12 ont démontrées affecter la spécificité de certains substrats.

### 3.3 Expression physiologique de la P-gp

La P-gp humaine a surtout été détectée au niveau de la surface apicale des cellules épithéliales des organes excrétoires. Chez l'humain, la P-gp est exprimée au niveau des cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal (jéjunum, iléum, et colon) ce qui suggère une fonction de prévention de l'entrée des substances et probablement une fonction excrétoire à travers la muqueuse du tractus <sup>155</sup>. Au niveau du rein et du foie, la P-gp est présente sur la bordure en brosse et sur la face biliaire ce qui suggère que la P-gp joue un rôle dans l'excrétion de xénobiotiques et de métabolites endogènes vers l'urine et la bile. La P-gp a aussi été localisée sur la surface luminale des cellules endothéliales capillaires du cerveau <sup>156</sup>. Ainsi, il a été suggéré que la P-gp puisse jouer un rôle protecteur au niveau du cerveau <sup>157</sup>. Par ailleurs, de faibles niveaux d'expression ont été retrouvés dans la peau, le muscle squelettique, l'ovaire et les testicules <sup>156</sup>. Les P-gp sont aussi exprimées en faible quantité au niveau de la surface apicale des canalicules du pancréas. La sécrétion exocrine, le suc pancréatique, est assurée par les cellules acineuses (petites cavités tapissées de cellules excrétrices, dont le contenu se déverse dans un canalicule). Elle est acheminée vers l'intestin grêle par le canal de Wirsung. Ainsi, la P-gp joue un rôle excréteur vers l'intestin grêle. Enfin, la P-gp a été retrouvée à la surface de la barrière placentaire ce qui suggère son rôle protecteur pour le fœtus contre des xénobiotiques toxiques <sup>158</sup>. Plus récemment, des études ont démontrés que la P-gp est exprimée au niveau du myocarde <sup>159</sup>.

### 3.4 Substrats et sites de liaison

La P-gp confère une résistance contre un large spectre de composés qui peuvent être hydrophobes ou amphipatiques. Ueda et al. ont démontré que la dimension des substrats se situait entre 300 et 2000 Da <sup>160</sup>. Elle transporte non seulement des agents anticancéreux mais aussi plusieurs agents thérapeutiques de classes pharmacologiques différentes. De plus, les composés sont structurellement diversifiés. Certains portent une charge positive au pH physiologique et comme ils sont tous hydrophobes, ils peuvent entrer dans la cellule par diffusion passive. Par contre, il existe une panoplie de mutations qui peuvent affecter la spécificité du substrat. Ces mutations sont surtout retrouvées dans les domaines trans-membranaires 5, 6, 11 et 12 mais elles peuvent aussi être retrouvées dans le reste de la protéine incluant les boucles intra et extra-cellulaires ainsi que les domaines de liaison de l'ATP. Ces sites ont été identifiés comme des sites de reconnaissance des substrats et ils ont la propriété de contenir des acides aminés qui possèdent des chaînes créant des liens hydrogènes <sup>161</sup>.

La P-gp reconnaît préférentiellement certains substrats par une région de la première boucle intracellulaire. Ceci a pu être démontré lorsque la protéine codée suite à une mutation au niveau de l'acide aminé 185 (gly → val) s'est avérée être plus spécifique à la colchicine et moins spécifique à la vinblastine dans un sous-clone de la lignée KB sélectionnée par la colchicine <sup>162</sup>. Ainsi, cette étude a démontré que la zone correspondante à la première boucle intracellulaire est impliquée dans la spécificité du transport (Figure 6). De plus, il a été démontré que cette spécificité est conférée à la

liaison du produit transporté et non à sa libération. D'ailleurs, cette mutation diminue la liaison de la colchicine à la P-gp mais n'inhibe pas la relâche de la molécule à l'extérieur de la cellule<sup>163</sup>.

Des chimères de *MDR1* et *MDR2* ont été développées afin d'étudier la première boucle intra-cellulaire du transporteur<sup>164</sup>. Lorsque la zone de la P-gp contenant la première boucle intra-cellulaire et la zone transmembranaire qui lui fait suite sont remplacées par l'équivalent de *MDR2*, le transporteur obtenu devient non fonctionnel, bien que seuls 17 acides aminés soient différents. Plus spécifiquement, 4 acides aminés seulement sur les 17 de la chimère peuvent être substitués afin de redonner naissance au transporteur fonctionnel. Enfin, une mutagenèse dirigée sur l'acide aminé 183 provoque une modification de la spécificité de substrat. Ainsi, il est évident que cette région de la première boucle intracellulaire soit essentielle à la reconnaissance des substrats. Par ailleurs, le remplacement de la proline 223 ou 866 retrouvée respectivement dans la zone transmembranaire 4 et 10 réduit de façon importante la résistance à la colchicine, l'actinomycine D et la doxorubicine sans modifier la résistance à la vinblastine<sup>165</sup>.

### 3.5 Mécanisme d'action des P-gp

Le mécanisme d'action des P-gp n'est toujours pas complètement connu. Par contre, il est clair que la P-glycoprotéine a besoin d'énergie pour assurer le transport des substrats. Il a été démontré que la déplétion de la cellule en ATP restaurait l'accumulation intracellulaire de substrats. En effet, Azzaria et son équipe démontraient en 1989 que des mutations dans les sites de liaison des nucléotides du gène *MDR1* abolissent son habilité

à conférer de la résistance <sup>166</sup>. Ces sites de liaison sont situés du côté C-terminal de chacune des moitiés de la P-gp (NBF, figure 1). La fonction d'hydrolyse d'ATP de la P-gp a été reconstituée dans des préparations membranaires enrichies en P-gp; cette fonction est stimulée par les médicaments, et seul le site de liaison aux nucléotides présents dans la première moitié de la protéine est capable d'hydrolyser l'ATP. En effet, des chimères remplaçant ce site par celui de la deuxième moitié ne sont pas fonctionnelles <sup>212</sup>.

Étant donné que la P-gp est composée de deux moitiés quasi homologues, une question importante qui se pose est de savoir si les deux fonctionnent indépendamment ou ensemble. Il a été démontré que l'expression de chaque moitié séparée, codée par des vecteurs baculovirus, dans des cellules d'insectes, n'a procuré qu'une très faible activité de l'ATPase suggérant que l'activité de la P-gp est produite par l'interaction des deux moitiés de la protéine <sup>168</sup>. De même, la délétion du lien central qui unit les deux moitiés résulte en une protéine qui est exprimée à la surface cellulaire à des niveaux similaires à ceux de la protéine sauvage. Par contre, cette protéine n'est pas fonctionnelle pour le transport ainsi que pour l'activité ATPase stimulée par les médicaments <sup>169</sup>. Le remplacement de cette délétion par un peptide qui a une structure secondaire flexible était suffisant pour restaurer les propriétés fonctionnelles de la protéine. Ces données suggèrent donc que l'interaction des deux moitiés soit nécessaire au bon fonctionnement de la protéine. De plus, la découverte qu'un lien peptidique flexible est suffisant à l'interaction des deux moitiés suggère qu'il y ait probablement une interaction entre les deux sites de liaison de l'ATP. Enfin, des données provenant d'études mutagéniques ont démontré que les deux sites de liaison de l'ATP sont nécessaires pour que la protéine

soit fonctionnelle et qu'en fait, l'interaction entre les sites de liaison de l'ATP et les sites de liaison des substrats est essentielle pour que la protéine possède son activité de transport <sup>161</sup>.

### **3.6 Le cycle catalytique des P-gp**

Un mécanisme d'action des P-gp a été proposé par le groupe d'Ambudkar <sup>161</sup>. Premièrement, l'ATP et le substrat se lient de façon indépendante à la P-gp. Lorsque l'ATP est hydrolysé, un changement de conformation diminue l'affinité du substrat au site de liaison. Ainsi, le substrat se dirige vers un deuxième site de liaison transmembranaire qui a maintenant une plus grande affinité pour le substrat. Enfin, le relâchement du substrat vers l'extérieur constitue la dernière étape. Ce relâchement peut se faire avant ou simultanément à la relâche du phosphate provenant de l'hydrolyse de l'ATP en ADP. La formation d'un état transitoire intermédiaire qui a une faible affinité pour le substrat a aussi soulevé l'hypothèse que l'étape finale de ce modèle peut être la relâche de l'ADP. Enfin, il n'est pas clair s'il y a un besoin d'énergie additionnelle pour que le substrat soit relâché de la protéine dans le milieu extracellulaire.

### **3.7 Fonctions physiologiques des P-gp**

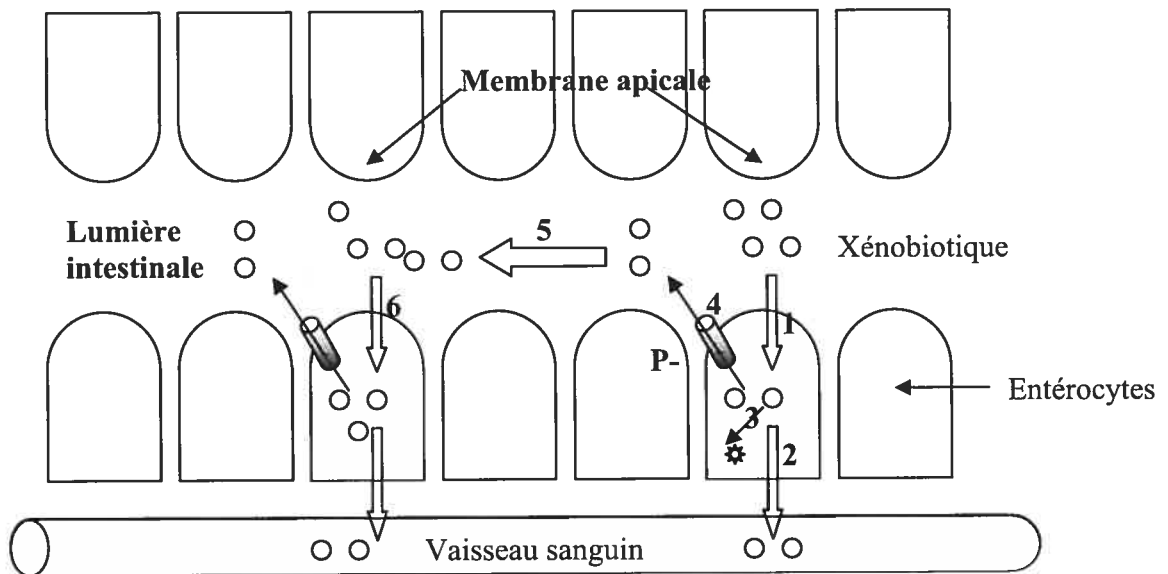
Le rôle premier de la P-gp est de détoxifier l'organisme des xénobiotiques. D'ailleurs, la P-gp peut reconnaître des cancérigènes classiques comme le benzopyrène et le méthylcholantène qui lui donne un rôle protecteur contre la chimiothérapie <sup>170</sup>. Par ailleurs, un aspect intéressant de la P-gp est son interaction avec les enzymes du métabolisme, plus particulièrement le CYP3A4. La P-gp et le CYP3A4 partagent



plusieurs substrats et inhibiteurs. De plus, ils ont une distribution tissulaire très rapprochée <sup>171</sup>. Ces caractéristiques suggèrent qu'il pourrait exister une interaction entre ces deux protéines afin de créer une barrière intestinale coordonnée. Comme nous avons vu antérieurement, le CYP3A4 peut représenter jusqu'à 70% de l'activité des cytochromes dans l'intestin. La P-gp peut donc agir avec le CYP3A4 afin de réduire l'exposition systémique à certains xénobiotiques. Les médicaments entrent par diffusion passive, selon leur coefficient de partage, dans l'entérocyte. Certains passent directement dans la circulation systémique mais la plupart sont métabolisés et deviennent plus hydrosolubles afin d'être éliminés plus facilement par le rein. Certaines molécules échappent à cette conversion métabolique et sont toujours trop liposolubles pour entrer dans la circulation systémique. Ainsi, elles sont retournées au niveau de la lumière intestinale via les P-gp <sup>172</sup>. Les médicaments retournés dans la lumière intestinale peuvent être réabsorbés à un site distal et recommencer le cycle (Figure 7) <sup>173</sup>.

Par ailleurs, les études chez des souris « knock-out » ont apporté plus d'informations sur la fonction pharmacologique de la P-gp. Schinkel et son équipe ont étudié l'inactivation individuelle ou simultanée de ces gènes *mdr1a* et *mdr1b* retrouvés chez la souris <sup>174</sup>. De façon surprenante, ils ont démontré que la perte de l'un ou des gènes n'avait aucun effet sur la viabilité, la durée de vie ou la fertilité des souris. Même s'il peut y avoir une compensation des fonctions des P-gp par d'autres protéines, il est plausible de croire que la P-gp n'est pas essentielle à la survie de l'organisme. Par ailleurs, il a été démontré que le gène *MDR2* est essentiel au transport de la phosphatidylcholine de la membrane des hépatocytes dans la bile. En effet, les souris « knock-out » pour le gène *MDR2*

développent une cirrhose causée par une malformation de micelles provenant de la bile<sup>175</sup>.



**Figure 7.** Cycle des xénobiotiques dans l'épithélium intestinal. (1) Absorption passive des xénobiotiques dans la lumière des entérocytes. (2) Passage du xénobiotique dans la circulation systémique. (3) Métabolisme du xénobiotique. (4) Retour du xénobiotique dans la lumière intestinale par les P-gp. (5) Élimination dans les fèces ou (6) réabsorption et recommencement du cycle.

### 3.8 Modulation de la P-gp

Une des caractéristiques de la résistance multidrogue est sa réversibilité temporaire grâce à des agents pharmacologiques. Dans la majorité des cas, le mécanisme d'action est une inhibition compétitive de l'expulsion des médicaments. En effet, il existe plusieurs agents pharmacologiques pouvant être utilisés pour traiter le MDR lors d'un cancer. Plusieurs études ont démontré un rôle important de la P-gp dans la résistance à la chimiothérapie de certaines tumeurs. Le vérapamil a été le premier agent modulateur testé pour traiter la résistance lors de traitement anti-cancéreux. Par contre, les essais dans les tumeurs de l'ovaire, de la vessie, du côlon et du cancer du poumon se sont soldés par un échec. En effet, la première génération de modulateurs comme le vérapamil et la trifluopérazine ont que rarement montré une efficacité clinique observable <sup>176</sup>. Cet échec a été expliqué par des taux sériques bas de ces modulateurs. Cependant, la deuxième génération d'agents modulateurs des P-gp a permis d'améliorer les niveaux sériques. Par exemple, la cyclosporine est l'agent modulateur de deuxième génération qui a été le plus utilisé car il est facilement dosable et les taux plasmatiques obtenus sont compatibles avec un effet de modulation réel <sup>176</sup>. La cyclosporine est 2 à 3 fois plus active *in vitro* que le vérapamil à des taux sériques de 2 à 4  $\mu\text{M}$ . Ainsi, des rémissions prolongées ont été obtenues par l'inhibition de la population de P-gp <sup>177</sup>. Enfin, des médicaments de troisième génération sont actuellement en essais cliniques afin de trouver un modulateur efficace pouvant améliorer le phénotype MDR d'un patient atteint du cancer.

### 3.9 Variabilité interindividuelle

Comme les CYP, une variabilité interindividuelle de la fonction de la P-gp peut avoir un impact important sur le devenir d'un médicament dans l'organisme et peut affecter son profil d'efficacité et de toxicité. Chez l'humain, plusieurs mutations au niveau du gène codant pour la P-gp ont été identifiées<sup>178,179</sup>. Parmi celles-ci, une mutation silencieuse au niveau de l'exon 26 (C3435T) semble être associée avec une diminution de l'expression et du fonctionnement des P-gp au niveau de l'intestin. D'ailleurs, cette mutation corrèle avec l'expression intestinale de la P-gp et la biodisponibilité orale de la digoxine<sup>180</sup>. Les individus homozygotes T/T pour ce polymorphisme ont une diminution d'expression du gène *MDR1* et les niveaux plasmatiques de digoxine sont nettement plus élevés.

L'expression de la P-gp serait significativement influencée par l'origine ethnique des individus<sup>181</sup>. Les individus de race noire ont un génotype C/C d'environ 70% comparé aux Caucasiens qui présente une prévalence du génotype C/C autour de 30%. Par ailleurs, le génotype T/T serait retrouvé chez environ 5% des personnes de race noire comparativement à 30% chez les Caucasiens<sup>182,183</sup>. La fréquence des génotypes C/C et T/T chez les Orientaux est comparable à celle retrouvée chez les Caucasiens. Enfin, dans la population française québécoise, il a été démontré que 15,6% possède le génotype CC, 55,3% ont le génotype CT et 29,1% sont TT<sup>184</sup>. Par ailleurs, une mutation non silencieuse G2677T (Ala893Ser) fut décrite sur l'exon 21. Cet échange Ala893Ser diminuerait l'expression de la P-gp placentaire<sup>185</sup>.

Par ailleurs, plusieurs flavonoïdes comme les flavonoles et les coumarines peuvent moduler la P-gp<sup>186</sup>. Les flavonoïdes interagissent avec le domaine de liaison des nucléotides et inhibent le transport des médicaments par la P-gp<sup>186</sup>. De plus, des études ont démontré que le jus de pamplemousse pouvait aussi inhiber la P-gp<sup>187</sup>. D'ailleurs, chez le rat, le bergamotol inhibe la P-gp<sup>188</sup>. Non seulement le jus de pamplemousse mais également le jus d'orange peut inhiber la P-gp contrairement aux cytochromes. En fait, ce sont les méthoxyflavones retrouvées dans le jus d'orange qui inhibent la P-gp<sup>189</sup>.

D'autre part, il a été démontré que certains excipients pharmaceutiques peuvent moduler l'activité de la P-gp. L'activité de la P-gp est inhibée complètement dans des cellules Caco-2 par le PEG300 (20% v/v), partiellement par le Cremophore EL (0,1% w/v) et le Tween 80 (0,05%, w/v)<sup>190,191</sup>. Par contre, dans des cellules MDCK-MDR1, le PEG 300 a aussi complètement inhibé la P-gp mais le Crémophore EL et le Tween 80 n'ont eu aucun effet<sup>191</sup>.

Enfin, des différences associées au sexe dans l'expression des transporteurs ABC ont été identifiées dans plusieurs organes de souris, de rats et d'humains dont le foie, les reins, l'intestin et le cerveau<sup>192-195</sup>. Par exemple, l'expression de P-gp hépatiques est deux fois plus élevée chez l'homme que chez la femme ce qui suggère que la disposition des substrats de P-gp peut être différente selon le sexe. Ainsi, l'efficacité et la toxicité des médicaments peuvent varier selon le sexe. Par ailleurs, des différences liées au sexe ont été observées dans le cerveau de souris où les femelles ont une augmentation de l'activité de la P-gp située à la surface de la barrière hémato-encéphalique. Ainsi, il y a une diminution de l'influx de vérapamil dans le cerveau.

#### 4.0 Implication de la P-gp au niveau du coeur

Plusieurs études ont démontré que la P-gp est exprimée au niveau du myocarde <sup>159</sup>. Fojo et al. ont été le premier à observer une faible expression de P-gp dans le coeur <sup>196</sup>. Par la suite, l'équipe de Pavelic a détecté grâce à quatre anticorps anti-*MDRI*, l'expression de P-gp dans le myocarde <sup>197</sup>. Par contre, ils n'ont pas observé de P-gp dans l'épicarde et l'endocarde. En 1997, Sugawara et al. ont également détecté la P-gp dans le tissu cardiaque grâce à l'anticorps anti-*MDRI*, JSB-1 <sup>198</sup>. Plus récemment, le groupe de Meissner a confirmé la présence de P-gp dans le ventricule gauche et dans les oreillettes à l'aide d'une technique immunohistochimique <sup>199</sup>. Ainsi, d'après ces évidences, il est probable que la P-gp serait impliquée dans le transport de médicament au niveau du coeur et par conséquent, pourrait affecter les concentrations des substrats dans le tissu cardiaque.

De nombreux médicaments ont la capacité de moduler l'activité et/ou l'expression de la P-gp. D'ailleurs, il existe plusieurs agents qui servent à diminuer l'expression de la P-gp lors d'un traitement anti-cancéreux. Les inhibiteurs de la P-gp peuvent ainsi augmenter la puissance des agents en chimiothérapie. Comme les transporteurs ABC dont la P-gp sont exprimés dans les tissus non-cancéreux, l'inhibition de ces protéines peut mener à des changements dans la distribution et le métabolisme des agents anti-cancéreux dans ces tissus. Ainsi, une accumulation plasmatique ou tissulaire des médicaments peut survenir et par conséquent augmenter la toxicité de ces médicaments dans les tissus normaux dont le coeur.

Au cours des dix dernières années, plusieurs études ont observé une cardiotoxicité suite à la coadministration d'un agent antinéoplasique en combinaison avec des médicaments qui renversent le phénotype MDR. Par exemple, il y a une potentialisation des effets cardiotoxiques de la doxorubicine et de la daunorubicine chez le rat lorsqu'ils sont co-administrés avec un bloqueur des canaux calciques tel que la nifédipine, la flunarizine ou le vérapamil<sup>200</sup>. De fait, il a été rapporté que la coadministration du vérapamil et de la doxorubicine augmente de 40% les concentrations de doxorubicine dans les cœurs de souris comparativement aux souris traitées à la doxorubicine seule<sup>201</sup>. D'ailleurs, il est connu que le vérapamil est un substrat puissant de la P-gp. Sa très grande affinité pour la P-gp fait en sorte qu'il inhibe la liaison d'autres substrats et ainsi diminue la liaison d'autre substrat au transporteur. De plus, le taux de survie diminue chez les souris traitées avec la doxorubicine en combinaison avec le vérapamil. Par ailleurs, il a été observé que la cyclosporine A et son analogue PSC 833 peuvent augmenter la concentration de la doxorubicine dans plusieurs tissus, dont le cœur<sup>202,203</sup>. Le mécanisme par lequel il y a potentialisation des effets cardiotoxiques est probablement lié à l'inhibition de la P-gp par le vérapamil, la cyclosporine ou le PSC 833. En fait, des chercheurs ont démontré l'implication de la P-gp chez des souris transgéniques. Ils ont observé qu'une surexpression de la P-gp au niveau du myocarde pouvait protéger les souris d'une cardiotoxicité à la doxorubicine<sup>204</sup>. Par contre, chez les souris normales, une seule dose de doxorubicine (10 mg/kg) pouvait mener à de la nécrose cardiaque. Ainsi, ces études procurent des évidences que le gène *mdr1* peut protéger le myocarde d'une toxicité cardiaque due à des médicaments.

Par ailleurs, il a été rapporté qu'il existe des cas de toxicité cardiaque lorsque le vérapamil est administré en concomitance avec l'érythromycine ou la clarithromycine. Les symptômes de bradycardie et d'hypotension développés lors de l'administration du vérapamil en combinaison avec la clarithromycine disparaissent suivant le retrait du vérapamil<sup>205,206</sup>. Il est donc probable que l'inhibition des CYP3A4 et des P-gp soit impliquée dans la cardiotoxicité observée. D'ailleurs, il est bien connu que le vérapamil est un substrat et inhibiteur des P-gp de même que l'érythromycine et la clarithromycine. Ainsi, il est probable que le mécanisme possible expliquant l'augmentation des concentrations tissulaires des médicaments soit l'inhibition des P-gp causant une diminution de l'efflux des médicaments des tissus comme le cœur.

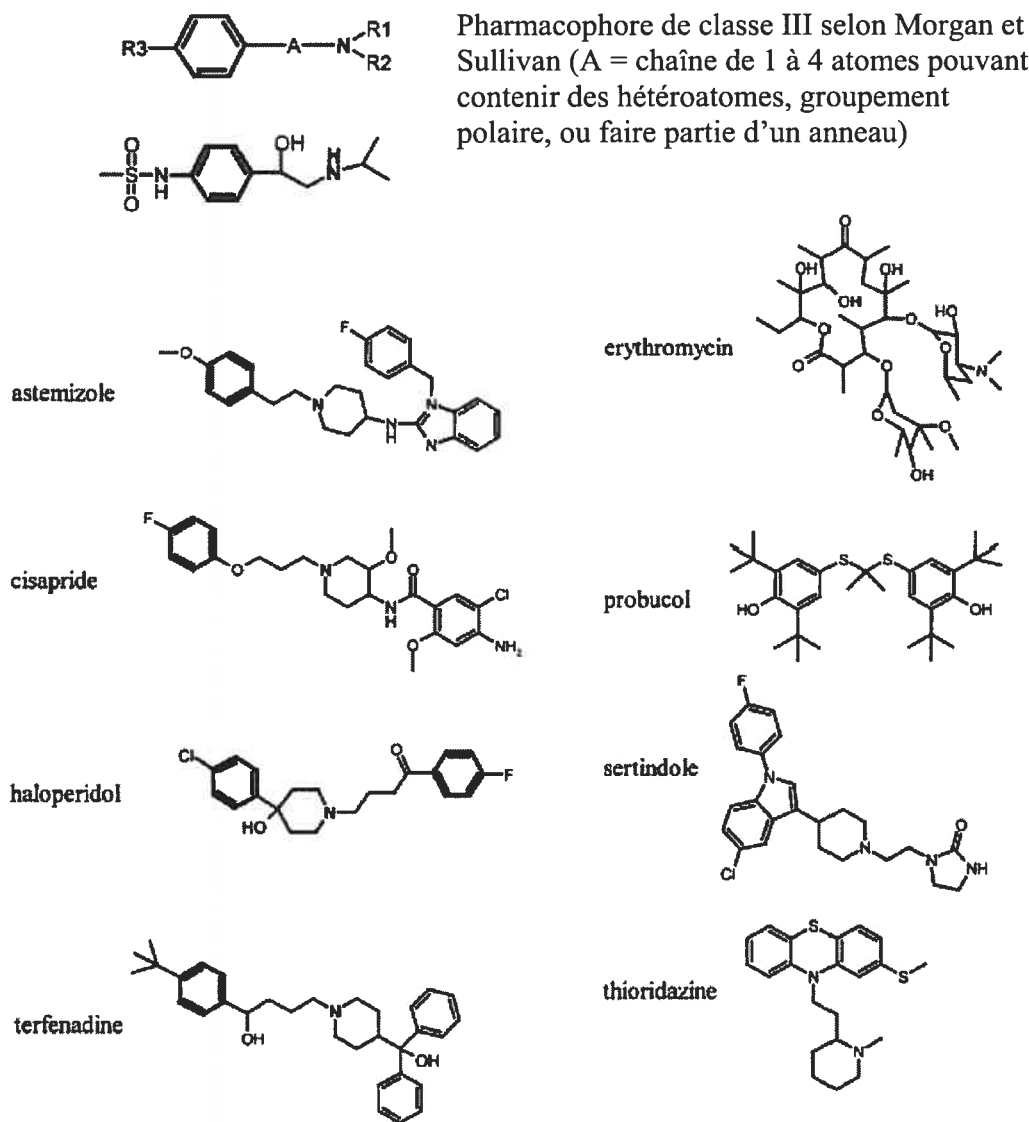
#### **4- Relation entre les substrats d' $I_{Kr}$ , de P-gp et des CYPs 3A4.**

À l'heure actuelle, il est plutôt difficile d'expliquer comment autant de médicaments aux structures chimiques si différentes et provenant de classes thérapeutiques aussi diverses peuvent arriver à bloquer  $I_{Kr}$  de façon spécifique. En fait, il est surprenant qu'encore aujourd'hui, nos connaissances sur les relations structure-activité entre les médicaments et l'effet antiarythmique de classe III soient aussi fragmentaires.

Morgan et Sullivan ont publié une des premières revues sur les relations structure-activité pour les agents antiarythmiques de classe III. Ils ont proposé des exigences structurelles pour un pharmacophore de classe III (Figure 8) : un cycle aromatique substitué en *para*, relié à un atome d'azote basique par une chaîne très variable. Cette chaîne, faite de 1 à 4 atomes, peut contenir des hétéroatomes, des groupements polaires

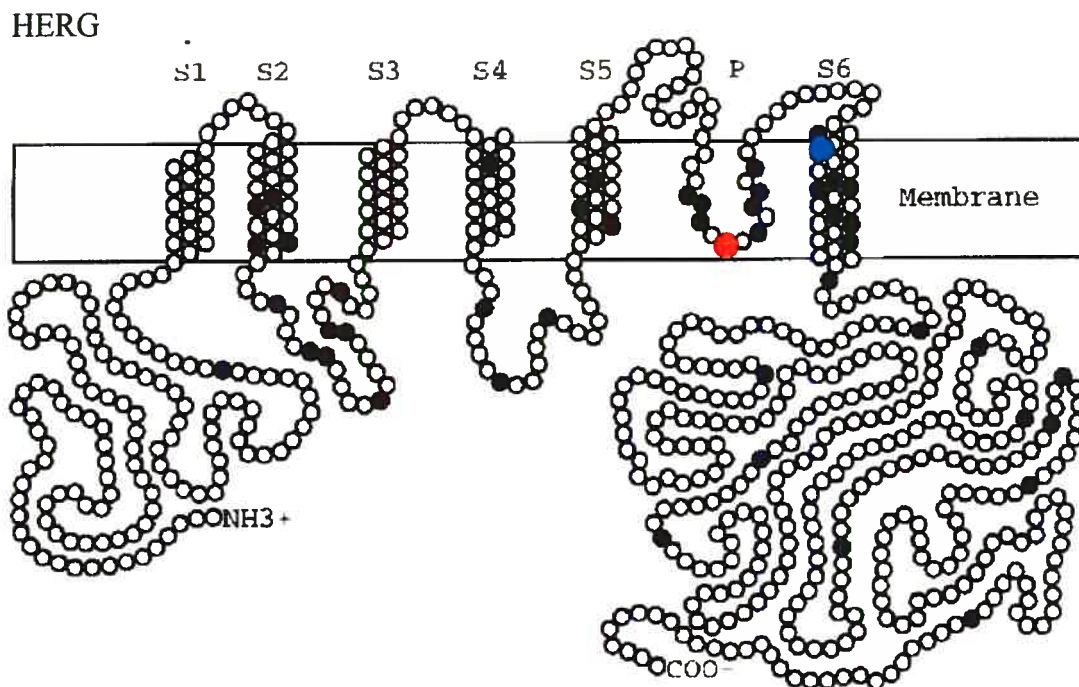


ou faire partie d'un anneau. Lorsqu'on observe de plus près les structures moléculaires de quelques médicaments prolongeant le QT et bloquant HERG/ $I_{Kr}$ , on constate que des molécules telles la terfénadine ou l'astémizole répondent très bien aux critères énoncés pour posséder des propriétés antiarythmiques de classe III. Par contre, force est d'admettre que le pharmacophore de classe III proposé par Morgan et Sullivan est difficilement identifiable sur d'autres médicaments, tels le probucol ou l'érythromycine. Il demeure possible qu'une analyse plus approfondie puisse révéler que dans certains cas, un ou des métabolites, plutôt que la molécule-mère, soient responsables de l'effet antiarythmique de classe III, ou que des courants autres que HERG/ $I_{Kr}$  soient responsables de la prolongation du QT et/ou des tachyarythmies. De plus, la lipophilicité et l'encombrement produit par certaines substitutions sur la structure moléculaire peuvent s'avérer des paramètres cruciaux, conférant différents degrés de bloc des canaux potassiques. Par exemple, le dérivé carboxylé et principal métabolite de la terfénadine, la fexofénadine, est une molécule plus polaire, n'ayant pratiquement aucun effet sur le QTc



**Figure 8. Structures moléculaires de certains médicaments pouvant causer des torsades de pointes, en relation avec le pharmacophore de classe III proposé par Morgan et Sullivan. Dans la colonne de gauche, on retrouve des exemples sur lesquels ce pharmacophore (un cycle aromatique relié à un atome d'azote basique par une chaîne) peut être observé. La colonne de droite présente des exemples de médicaments prolongeant le QT et causant des torsades de pointes, sur lesquels ce pharmacophore est difficilement identifiable.**

En considérant la question sous un autre angle, c'est à dire en examinant la protéine-cible plutôt que le médicament, Mitcheson et Sanguinetti ont proposé les premiers fondements structurels protéiques du LQTS médicamenteux <sup>214</sup>. En utilisant une technique de mutagénèse dirigée, ils ont démontré que les acides aminés Thr623, Ser624 et Val625 localisés à la base du pore de HERG (Figure 9) et les acides aminés Gly648, Tyr652 et Phe656 localisés dans le domaine S6 sont des sites d'interaction de l'antiarythmique de classe III, MK499. Ils ont par la suite démontré que les sites Tyr652 et Phe656 sont les plus importants pour la liaison du médicament au pore. Ces conclusions fournissent une hypothèse structurelle probable afin d'expliquer comment plusieurs composés structurellement différents sont de puissants inhibiteurs de HERG. Comme la plupart des canaux Kv ont une isoleucine ou une valine aux positions de la Tyr652 et de la Phe656, ceci indique que l'aromaticité est importante à ces positions. Les groupements aromatiques de la majorité des substrats de HERG peuvent créer un empilement de type  $\pi$  à ces positions. Par ailleurs, ils ont démontré qu'un azote basique peut également former une interaction  $\pi$  avec ces deux résidus. Ainsi, les molécules aromatiques contenant un azote ont une facilité d'interaction avec le canal. Ceci suggère donc une première explication structurelle protéique qui permettrait de comprendre pourquoi autant de médicaments bloquent HERG mais peu ou pas les autres canaux potassiques dépendants du voltage.



**Figure 9. Représentation schématique de HERG et localisation de quelques mutations associées au LQTS**

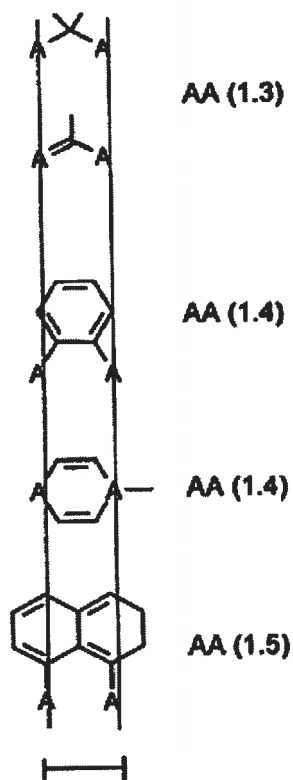
HERG est composé de 6 segments transmembranaires (S1 à S6) et d'un pore (P). Chaque cercle représente un acide aminé. Les cercles noirs situent quelques mutations identifiées à ce jour<sup>215</sup>. Le cercle orange situe de façon approximative les acides aminés Thr623, Ser624 et Val625 et le cercle bleu, les acides aminés Tyr652 et Phe656.

Par ailleurs, en se basant sur plusieurs études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques nous observons que de multiples substrats d'I<sub>Kr</sub> sont aussi substrats des CYP3A4/5. Bien que les études de Sanguinetti nous aident à mieux comprendre l'interaction des substrats d'I<sub>Kr</sub>, il n'existe malheureusement pas un modèle d'interaction des CYP3A4/5 avec leurs substrats. Il existe cependant un exemple similaire de chevauchement entre les substrats des cytochromes P450 et les bloqueurs de courants ioniques. D'ailleurs, il est reconnu que les substrats des CYP2D6 sont

également des antiarythmique de classe I. Par exemple, la procainamide, la quinidine, la mexilitine, la flécainide, la propafenone et l'encainide sont substrats des CYP2D6 ainsi que bloqueurs d'I<sub>Na</sub>.

Enfin, les caractéristiques qui déterminent si un composé est transporté ou non par la P-gp sont mieux comprises. La lipophilicité des molécules semblent être une caractéristique commune aux substrats transportés par la P-gp puisque cette dernière est capable de reconnaître les substrats à partir de la membrane lipidique<sup>216</sup>. Les composés ont donc accès à la protéine grâce à leur coefficient de partition leur permettant d'être suffisamment lipophiles pour traverser la membrane. De plus, Seelig et al., ont proposé que les P-gp reconnaîtraient leurs substrats par deux types d'interactions selon le nombre de donneurs d'électrons. Le type I est formé de deux donneurs d'électrons séparés par 2.5Å. Les substrats de type II auraient deux donneurs d'électron séparé par 4.6Å ou trois donneurs d'électron dont les groupements externes sont séparés par 4.6Å (Figure 10)<sup>216</sup>. Ces groupes donneurs d'électrons formeraient des liens hydrogènes avec la P-gp. De plus, les P-gp sont reconnues pour transporter des composés avec une charge électrique nulle ou encore avec une unité cationique donneuse d'électrons<sup>217</sup>. Ainsi, plusieurs molécules aromatiques planaires reconnues comme bloqueurs de HERG ont des propriétés similaires à celles des substrats des P-gp ce qui pourrait expliquer le chevauchement entre leurs substrats.

TYPE I


 $2.5 \pm 0.5 \text{ \AA}$ 

TYPE II

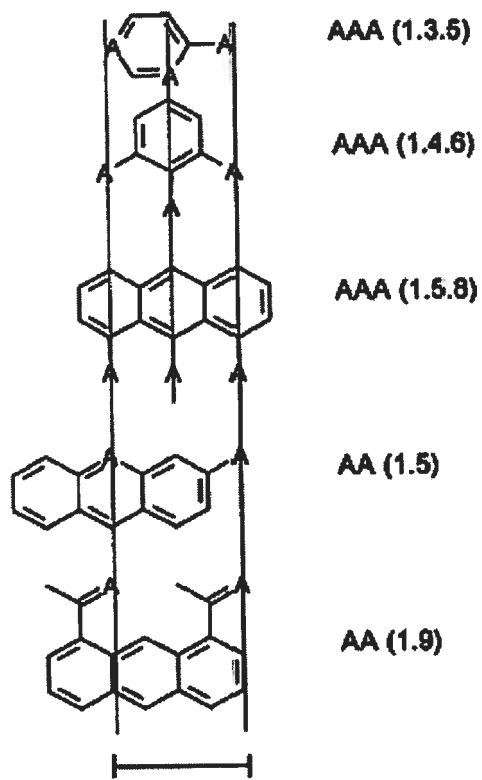

 $4.6 \pm 0.6 \text{ \AA}$ 

Figure 10. Types d'interactions avec P-gp selon le nombre d'accepteur de lien hydrogène du substrat.

*A* représente un accepteur de lien hydrogène (donneur d'électrons). Les substrats de type I consiste en deux donneurs d'électrons séparés par  $2.5 \text{ \AA}$ . Les substrats de type II auraient deux donneurs d'électron séparés par  $4.6 \text{ \AA}$  ou trois donneurs d'électrons dont les groupements externes sont séparés par  $4.6 \text{ \AA}$ .

## CHAPITRE II

### 1. Mise en perspective et hypothèse de recherche

Au cours des dernières années, des éléments clés des mécanismes sous-jacents au syndrome du QT long ont été identifiés. En fait, au cours des 15 dernières années, plusieurs découvertes ont mené à une meilleure compréhension du QT long congénital. De nouveaux canaux potassiques et sodiques ont été identifiés et les mutations pouvant causer le QT long congénital ont également mieux été caractérisées. Ces mêmes protéines ont été reconnues comme les cibles majeures des médicaments qui causent le Syndrome du QT long d'origine médicamenteuse. D'abord, il a été démontré que les canaux potassiques  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  sont les deux cibles principales des médicaments qui bloquent la sortie de potassium et prolongent la durée du potentiel d'action ventriculaire cardiaque. Par ailleurs, certaines conditions prédisposant au syndrome du QT long d'origine médicamenteuse ont été découvertes. Ainsi, il a été démontré qu'une inhibition du métabolisme (surtout les CYP3A4/5) mène à des concentrations plasmatiques élevées des médicaments ce qui peut amplifier leurs effets toxiques. Comme la plupart des bloqueurs des canaux potassiques repolarisants sont substrats des CYP3A4/5, une inhibition du métabolisme peut mener à des effets toxiques majeurs comme les TdP.

Toutefois, certaines observations associées au syndrome du QT long d'origine médicamenteuse demeurent inexplicées. En fait, seulement une minorité de patients qui présentent des facteurs prédisposants vont développer des TdP. D'ailleurs, les traits phénotypiques (prolongation importante du QT, augmentation de la concentration

plasmatique de médicaments, diminution de l'activité des CYP3A4/5, etc...) ne prédisent pas nécessairement l'occurrence de TdP chez les patients.

Le syndrome du QT long d'origine médicamenteuse est observé beaucoup plus fréquemment chez les femmes que chez l'homme. Plusieurs études cliniques et expérimentales s'accordent sur le fait que les hormones sexuelles et les variabilités intersexes dans la densité des canaux ioniques influencent largement les différences observées. Cependant, les scientifiques sont d'avis que ces mécanismes ne peuvent expliquer à eux seuls le risque accru chez la femme. De plus, ces explications ne considèrent pas nécessairement le médicament dans les QT long d'origine médicamenteuse. En effet, elles ne prennent pas en considération les changements d'affinité du médicament à se lier aux canaux ioniques qui pourraient être modulés par les hormones ou le genre. Également, elles ne considèrent pas d'autres facteurs tels que les transporteurs membranaires ou les enzymes qui métabolisent ces médicaments et qui peuvent moduler indirectement l'action du médicament. Pour ces raisons, les scientifiques sont en accord avec le fait que les mécanismes responsables des différences liées au sexe dans le QT long d'origine médicamenteuse restent largement indéfinis  
76,207

Il existe plusieurs facteurs de variabilité interindividuelle qui peuvent avoir des conséquences pharmacodynamiques et pharmacocinétiques sur les bloqueurs de  $d'I_{Kr}$ . La P-glycoprotéine et les CYP, par exemple, peuvent causer beaucoup de variabilités. Nous avons vu que la P-gp peut transporter des médicaments contre un gradient de concentration et moduler les concentrations intracellulaires des médicaments. De plus,



plusieurs chercheurs ont suggéré que des médicaments peuvent moduler l'expression des transporteurs ABC dans les tissus normaux. D'ailleurs, il a été démontré que suite à cinq jours de traitement avec la cyclosporine A chez les rats, il y a une augmentation de 82 % de l'expression de la P-gp comparativement au groupe contrôle <sup>208</sup>. Cet effet est réversible car après l'arrêt du traitement, les niveaux de P-gp reviennent au même niveau que les rats non-traités. Ainsi, la cyclosporine A peut moduler l'expression de la P-gp dans les tissus normaux. Par contre, il est à noter que l'anticorps C219 utilisé pour ces expériences est reconnu pour interagir avec plusieurs autres protéines <sup>209</sup>. Ainsi, il se peut qu'un autre transporteur ABC que la P-gp soit impliqué lors de ces expériences.

Récemment, des recherches chez des souris inoculées avec des cellules tumorales Ehrlich ont démontré qu'après un traitement de rifampicine ou de vérapamil d'une durée de 10 jours, il y avait une augmentation des niveaux de P-gp <sup>210</sup>. Par contre, aucune augmentation du gène *mdr1a* ne fut détectée. Toutefois, une autre étude récente a démontré qu'un traitement de 15 jours à la rifampicine augmentait les niveaux d'ARNm de P-gp et de CYP3A4 chez une lignée cellulaire de tubule rénale <sup>211</sup>. Comme les transporteurs sont présents dans plusieurs tissus dont le cœur, les observations qui suivent sont pertinentes afin de mieux comprendre les mécanismes sous jacents au Syndrome du QT long d'origine médicamenteuse :

- 1- Plusieurs médicaments associés au syndrome du QT long d'origine médicamenteux sont des substrats des CYP3A4/5, des P-gp ainsi que des inhibiteurs des courants potassiques  $I_{Kr}$ . Comme la majorité des bloqueurs d' $I_{Kr}$  accèdent au site de liaison du canal potassique du côté intracellulaire <sup>13</sup>, les P-gp

pourraient assurer la régulation des concentrations intracardiaques de ces médicaments et contrôler la concentration des médicaments à leur site de liaison sur les canaux potassiques voltage-dépendants tel que  $I_{Kr}$ .

- 2- L'expression et l'activité des P-gp sont modulées par le sexe <sup>192-195</sup>. L'activité des P-gp semble être moindre chez les femmes. Ces dernières peuvent ainsi présenter des concentrations intracardiaques des médicaments plus importantes.

Ainsi, l'objectif général de cette thèse est de déterminer si des modulations des transporteurs membranaires cardiaques, plus spécifiquement la P-gp, peut expliquer en partie la variabilité interindividuelle et les différences liées au sexe dans le syndrome du Syndrome du QT long d'origine médicamenteuse. Plus précisément, nous allons ;

- 1- Déterminer la contribution de la P-gp dans le cœur en évaluant les répercussions électrophysiologiques cardiaques d'un bloqueur d' $I_{Kr}$  après l'inhibition de cette protéine.
- 2- Déterminer si la P-gp contribue aux différences mâles/femelles retrouvées dans le prolongement du QT.

Ces connaissances pourront donc amener une meilleure explication des variabilités interindividuelles et des différences liées aux sexes observées dans les torsades médicamenteuses.

Enfin, nous voulons évaluer l'hypothèse par la négative à savoir si des produits qui ne sont pas substrats du CYP3A4 peuvent aussi inhiber *HERG* et allonger le QT. Ainsi, nous allons déterminer si un médicament non substrat des CYP3A4/5 (olanzapine) peut prolonger la repolarisation cardiaque en bloquant la composante rapide du courant potassique rectifiant retardé ( $I_{Kr}$ ).

Ainsi, au cours des trois prochains chapitres rédigés en forme d'article scientifique, nous présenterons les résultats de nos études. Le chapitre III discutera du rôle des transporteurs ABC sur les effets électrophysiologiques d'un bloqueur d'I<sub>Kr</sub>. Ensuite, au chapitre IV, nous discuterons de l'influence des transporteurs ABC sur les différences liées au sexe observées dans le syndrome du long QT. Enfin, au chapitre V, nous évaluerons notre hypothèse par la négative à savoir si l'olanzapine, un substrat des CYP1A2, peut inhiber *HERG*. Il est à noter que la méthodologie pour la perfusion des cœurs isolés est la même pour ces trois chapitres et est décrite en détail au chapitre V aux pages 171 à 173.

## RÉFÉRENCES

1. Frey W. Weitere Erfahrungen mit Chinidin bei absoluter Herzunregelmässigkeit Wien. Med Wochenschr 1918; 55:849-843.
2. Rainier CR, Schrire V, Beck W, Barnard CN. The treatment of quinidine-induced ventricular fibrillation by closed-chest resuscitation and external defibrillation. Am Heart J 1962; 63:582-590.
3. Selzer A, Wray HW. Quinidine syncope. Paroxysmal ventricular fibrillation occurring during treatment of chronic atrial arrhythmias. Circulation 1964; 30:17-26.
4. Keating MT, Sanguinetti MC. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. Cell 2001; 104:569-580.
5. Ackerman MJ. The long QT syndrome: ion channel diseases of the heart. Mayo Clinic Proceedings 1998; 73:250-269.
6. Fermini B, Fossa AA. The impact of drug-induced QT interval prolongation on drug discovery and development. Nature Reviews Drug Discovery 2003; 2:439-447.
7. Zeng J, Laurita KR, Rosenbaum DS, Rudy Y. Two components of the delayed rectifier  $K^+$  current in ventricular myocytes of the guinea pig type. Theoretical formulation and their role in repolarization. Circ Res 1995; 77:140-152.
8. Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G.  $K_vLQT1$  and  $IsK$  (minK) proteins associate to form the  $I_{Ks}$  cardiac potassium current. Nature 1996; 384:78-80.

9. Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, et al. Positional cloning of a novel potassium channel gene: *KVLQT1* mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature Genet* 1996; 12:17-23.
10. Jiang C, Atkinson D, Towbin JA, Splawski I, Lehmann MH, Li H, et al. Two long QT syndrome loci map to chromosomes 3 and 7 with evidence for further heterogeneity. *Nature Genet* 1994; 8:141-147.
11. McDonald TV, Yu Z, Ming Z, Palma E, Meyers MB, Wang KW, et al. A minK-*HERG* complex regulates the cardiac potassium current  $I_{Kr}$ . *Nature* 1997; 388:289-292.
12. Curtis LH, Ostbye T, Sendersky V, Hutchison S, Allen Lapointe NM, Al-Khatib SM, et al. Prescription of QT-prolonging drugs in a cohort of about 5 million outpatients. *Am J Med* 2003; 114:135-141.
13. Zou A, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti MC. Single *HERG* delayed rectifier  $K^+$  channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 1997; 272:H1309-H1314
14. Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti MC. A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:12329-12333.
15. 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; 97:204-210.
16. Nattel S, Ranger S, Talajic M, Lemery R, Roy D. Erythromycin-induced long QT syndrome: concordance with quinidine and underlying cellular electrophysiologic mechanism. *Am J Med* 1990; 89:235-238.

17. Guelon D, Bedock B, Chartier C, Haberer JP. QT prolongation and recurrent "torsades de pointes" during erythromycin lactobionate infusion. *Am J Cardiol* 1986; 58:666.
18. McComb JM, Campbell NPS, Cleland J. Recurrent ventricular tachycardia associated with QT prolongation after mitral valve replacement and its association with intravenous administration of erythromycin. *Am J Cardiol* 1984; 54:922-923.
19. 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; 91:3010-3016.
20. Taylor DM. Antipsychotics and QT prolongation. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 2003; 107:85-95.
21. 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; 41:934-937.
22. Fulop G, Phillips RA, Shapiro AK, Gomes JA, Shapiro E, Nordlie JW. ECG changes during haloperidol and pimozide treatment of Tourette's disorder. *Am J Psychiatry* 1987; 144:673-675.
23. Krahenbuhl S, Sauter B, Kupferschmidt H, Krause M, Wyss PA, Meier PJ. Case report: Reversible QT prolongation with torsades de pointes in a patient with pimozide intoxication. *Am J Med Sci* 1995; 309:315-316.

24. Drici MD, Wang WX, Liu XK, Woosley RL, Flockhart DA. Prolongation of QT interval in isolated feline hearts by antipsychotic drugs. *J Clin Psychopharmacol* 1998; 18:(6)477-481.
25. Gupta N, Malhotra P. Olanzapine: A proarrhythmic drug? *Can J Psychiatry* 2002; 47:683-684.
26. Jervell A, Lange-Nielsen F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J* 1957; 54:59-68.
27. 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. *Clinical pediatric (Bologna)* 1963; 45:656-683.
28. Ward OC. A new familial cardiac syndrome in children. *Journal of the Irish Medical Association* 1964; 54:103-106.
29. Moss AJ. Long QT syndrome. *JAMA* 2003; 289:2041-2044.
30. Yap YG, Camm AJ. Drug induced QT prolongation and torsades de pointes. *Heart* 2003; 89:1363-1372.
31. Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, et al. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc Res* 2003; 58:32-45.

32. 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. *J Am Coll Cardiol* 1983; 5-806.
33. Volders PGA, Vos MA, Szabo B, Sipido KR, de Groot SHM, Gorgels APM, et al. Progress in the understanding of cardiac early afterdepolarizations and torsades de pointes: time to revise current concepts. *Cardiovasc Res* 2000; 46:376-392.
34. Haverkamp W, Breithardt G, Camm AJ, Janse MJ, Rosen MR, Antzelevitch C, et al. 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; 47:219-233.
35. Morganroth J, Brozovich FV, McDonald JT, Jacobs RA. Variability of the QT measurement in healthy men, with implications for selection of an abnormal QT value to predict drug toxicity and proarrhythmia. *Am J Cardiol* 1991; 67:774-775.
36. Drici MD, Clément N. Is gender a risk factor for adverse drug reactions? *Drug Safety* 2001; 24:575-585.
37. Moss AJ. The QT interval and torsade de pointes. *Drug Safety* 1999; 21:5-10.
38. Vincent GM, Timothy KW, Leppert M, Keating M. The spectrum of symptoms and QT interval in carriers of the gene for the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 1992; 327:846-852.



39. Allan WC, Timothy K, Vincent GM, Palomaki GE, Neveux L, Haddow JE. Long QT syndrome in children: the value of the rate corrected QT interval in children who present with fainting. *Journal of Medical Screening* 2001; 8:178-182.
40. Santé Canada. The clinical evaluation of QT/QTc interval prolongation and proarrhythmic potential for non-antiarrhythmic drugs. Preliminary concept paper 2002; Novembre 15.
41. 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. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23:296-301.
42. Shimizu W, Ohe T, Kurita T, Kawade M, Arakaki Y, Aihara N, et al. Effects of verapamil and propranolol on early afterdepolarizations and ventricular arrhythmias induced by epinephrine in congenital long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26:1299-1309.
43. Milberg P, Eckardt L, Bruns HJ, Biertz J, Ramtin S, Reinsch N, et al. Divergent proarrhythmic potential of macrolide antibiotics despite similar QT prolongation: fast phase 3 repolarization prevents early afterdepolarizations and torsade de pointes. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303:218-225.
44. Dumaine R, Antzelevitch C. Molecular mechanisms underlying the long QT syndrome. *Current Opinion in Cardiology* 2002; 17:36-42.

45. Malmivu J, Plonsey R. Principles and applications of bioelectric and biomagnetic fields. In: Anonymous Bioelectromagnetism. New York: Oxford University Press, 1995.
46. Yang T, Synders DJ, Roden DM. Rapid inactivation determines the rectification and  $[K^+]_o$  dependence of the rapid component to the delayed rectifier  $K^+$  current in cardiac cells. *Circ Res* 1997; 80:782-789.
47. 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; 238:163-79.
48. Altura BM, Altura BT. New perspectives on the role of magnesium in the pathophysiology of the cardiovascular system. II. Experimental aspects. *Magnesium* 1985; 4:245-271.
49. Carlsson L, Drew 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; 279:231-239.
50. Wu Y, Roden DM, Anderson ME. Calmodulin kinase inhibition prevents development of the arrhythmogenic transient inward current. *Circ Res* 1999; 84:906-912.
51. Tomaselli GF, Rose J. Molecular aspects of arrhythmias associated with cardiomyopathy. *Current Opinion in Cardiology* 2000; 15:202-208.

52. Schwartz PJ, Periti M, Malliani A. The long Q-T syndrome. *Am Heart J* 1975; 89:378-390.
53. Swan H, Viitasalo M, Piippo K, Laitinen P, Kontula K, Toivonen L. Sinus node function and ventricular repolarization during exercise stress test in long QT syndrome patients with KvLQT1 and HERG potassium channel defects. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:823-829.
54. Little RE, Kay GN, Cavender JB, Epstein AE, Plumb VJ. Torsade de pointes and T-U wave alternans associated with arsenic poisoning. *PACE* 1990; 13:164-170.
55. Drolet B, Simard C, Roden DM. Unusual effects of a QT-prolonging drug, arsenic trioxide, on ca potassium currents. *Circulation* 2004; 109:26-29.
56. Zhang S, Rajamani S, Chen Y, Gong Q, Rong Y, Zhou Z, et al. Cocaine blocks HERG, but not KvLQT1+minK, potassium channels. *Mol Pharmacol* 2001; 59:1069-1076.
57. Ludomirsky A, Klein HO, Sarelli P, Becker B, Hoffman S, Taitelman U, et al. Q-T prolongation and polymorphous ("torsade de pointes") ventricular arrhythmias associated with organophosphorus insecticide poisoning. *Am J Cardiol* 1982; 49:1654-1658.
58. Di Pasquale G, Pinelli G, Andreoli A, Manini GL, Grazi P, Tognetti F. Torsade de pointes and ventricular flutter-fibrillation following spontaneous cerebral subarachnoid hemorrhage. *Int J Cardiol* 1988; 18:163-172.

59. Sen S, Stober T, Burger L, Anstatt T, Rettig G. Recurrent torsade de pointes type ventricular tachycardia in intracranial hemorrhage. *Intensive Care Medecine* 1984; 10:263-264.
60. Locati EH, Maison-Blanche P, Dejode P, Cauchemez B, Coumel P. Spontaneous sequences of onset of torsade de pointes in patients with acquired prolonged repolarization: quantitative analysis of holter recordings. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25:1564-1575.
61. 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.
62. Abinader EG, Shahar J. Possible female preponderance in prenylamine-induced 'torsade de pointes' tachycardia. Short communication. *Cardiology* 1983; 70:37-40.
63. Roden DM, Woosley RL, Primm RK. Incidence and clinical features of the quinidine-associated long QT syndrome: implications for patient care. *Am Heart J* 1986; 111:1088-1093.
64. 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 Dec 1;270(21):2590-7.
65. Pratt CM, Camm AJ, Cooper W, Friedman PL, MacNeil DJ, Moulton KM et al. Mortality in the Survival With ORal D-sotalol (SWORD) trial: why did patients die? *Am J Cardiol*. 1998 Apr 1;81(7):869-76.

66. Drici MD, Knollmann BC, Wang WX, Woosley RL. Cardiac actions of erythromycin. Influence of female sex. *JAMA* 1998; 280:1774-1776.
67. Wesche DL, Schuster BG, Wang WX, Woosley RL. Mechanism of cardiotoxicity of halofantrine. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 67:521-529.
68. Hulot JS, Démolis JL, Rivière R, Strabach S, Christin-Maitre S, Funck-Brentano C. Influence of endogenous oestrogens on QT interval duration. *Eur Heart J* 2003; 24:1663-1667.
69. Kleinman LI, Loewenstein MS, Goldstein L. Sex difference in the transport of *p*-aminohippurate by the rat kidney. *Endocrinology* 1966; 78:403-406.
70. Bidoggia H, Maciel JP, Capalozza N, Mosca S, Blacksley EJ, Valverde E, et al. Sex differences on the electrocardiographic pattern of cardiac repolarization: possible role of testosterone. *Am Heart J* 2000; 140:678-683.
71. 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. *Am J Cardiol* 1999; 84:364-366.
72. Larsen JA, Tung RH, Sadananda R, Goldberger JJ, Horvath G, Parker MA, et al. Effects of hormone replacement therapy on QT interval. *Am J Cardiol* 1998; 82:993-995.
73. Rodriguez I, Kilborn MJ, Liu XK, Pezzullo JC, Woosley RL. Drug-induced QT prolongation in women during the menstrual cycle. *JAMA* 2001; 285:1322-1326.

74. 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; 94:1471-1474.
75. Brouillette J, Trépanier-Boulay V, Fiset C. Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *J Physiol* 2003; 546:403-413.
76. 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; 285:1068-1072.
77. Liu XK, Katchman A, Drici MD, Ebert SN, Ducic I, Morad M, et al. Gender difference in the cycle length-dependent QT and potassium currents in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285:672-679.
78. Trépanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res* 2001; 89:437-444.
79. Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C. Functional properties of K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 2004; 559:777-798.
80. van Opstal JM, Schoenmakers M, Verduyn SC, de Groot SHM, Leunissen JDM, van der Hulst FF, et al. Chronic amiodarone evokes no torsade de pointes arrhythmias despite QT lengthening in an animal model of acquired long-QT syndrome. *Circulation* 2001; 104:2722-2727.
81. Tzivoni D, Banai S, Schuger C, Benhorin J, Keren A, Gottlieb S, et al. Treatment of torsades de pointes with magnesium sulfate. *Circulation* 1988; 77:392-397.

82. Terlau H, Ludwig J, Steffan R, Pongs O, Stuhmer W, Heinemann SH. Extracellular  $Mg^{2+}$  regulates activation of rat eag potassium channel. *European Journal of Physiology* 1996; 432:301-312.
83. Eldar M, Griffin JC, Van Hare GF, Witherell C, Bhandari A, Benditt D, et al. Combined use of beta-adrenergic blocking agents and long-term cardiac pacing for patients with the long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20:830-837.
84. Schwartz PJ. Idiopathic long QT syndrome: Progress and questions. *Am Heart J* 1985; 109:399-411.
85. Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Benhorin J, et al. Effectiveness and limitations of  $\beta$ -blocker therapy in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 2000; 101:616-623.
86. Zareba W, Moss AJ, Daubert JP, Hall WJ, Robinson JL, Andrews M. Implantable cardioverter defibrillator in high-risk QT syndrome patients. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003; 14:337-341.
87. Priori SG, Napolitano C, Cantu F, Brown AM, Schwartz PJ. Differential response to  $Na^+$  channel blockade,  $\beta$ -adrenergic stimulation, and rapid pacing in a cellular model mimicking the SCN5A and HERG defects present in the long-QT syndrome. *Circ Res* 1996; 78:1009-1015.
88. Compton SJ, Lux RL, Ramsey MR, Strellich KR, Sanguinetti MC, Green LS, et al. Genetically defined therapy of inherited long-QT syndrome. Correction of abnormal repolarization by potassium. *Circulation* 1996; 94:1018-1022.

89. Sato T, Hata Y, Yamamoto M, Morita H, Mizuo K, Yamanari H, et al. Early afterdepolarization abolished by potassium channel opener in a patient with idiopathic long QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1995; 6:279-282.
90. Roden DM. Pharmacogenetics and drug-induced arrhythmias. *Cardiovasc Res* 2001; 50:224-231.
91. Lewis DFV, Eddershaw PJ, Dickins M, Tarbit MH, Goldfarb PS. Structural determinants of cytochrome P450 substrate specificity, binding affinity and catalytic rate. *Chemico-Biological Interactions* 1998; 115:175-199.
92. Guengerich FP. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* 2001; 14:611-650.
93. Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell* 1991; 10:1-14.
94. Nebert DW, Nelson DR. P450 gene nomenclature based on evolution. *Methods in Enzymology* 1991; 206:3-11.
95. Nelson DR. Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P450 evolution. *Arch Biochem Biophys* 2003; 409:18-24.
96. Hasler JA, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevila J, et al. Human cytochromes P450. *Molecular Aspects of Medicine* 1999; 20:1-137.



97. Michaud V. L'utilisation de la dompéridone comme substrat marqueur de l'activité *in vitro* des CYP3A4 et CYP3A5. 2003; Faculté de Pharmacie de l'Université de Montréal [mémoire de maîtrise].
98. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 2002; 360:1155-1162.
99. Rettie AE, Rettenmeier AW, Howald WN, Baillie TA. Cytochrome P-450 - catalyzed formation of  $\alpha^4$ -VPA, a toxic metabolite of valproic acid. *Science* 1987; 235:890-893.
100. Porter WR, Wheeler C, Trager WF. Changes in the metabolic profiles of *R*- and *S*-warfarin and *R*- and *S*-phenprocoumon as a probe to categorize the effect of inducing agents on microsomal hydroxylases. *Biochem Pharmacol* 1981; 30:3099-3104.
101. Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev* 1997; 29:413-580.
102. Li AP, Kaminski DL, Rasmussen A. Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4. *Toxicology* 1995; 104:1-8.
103. Kivisto KT, Bookjans G, Fromm MF, Griese EU, Munzel P, Kroemer HK. Expression of CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7 in human duodenal tissue. *Br J Clin Pharmacol* 1996; 42:387-389.
104. Ortiz de Montellano P. Cytochrome P450: structure, mechanism and biochemistry. 2nd ed. New York: Plenum Press, 2001.

105. Dresser GK, Spence JD, Bailey DG. Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet* 2000; 38:41-57.
106. Okey AB. Enzyme induction in the cytochrome P450 system. In: Kalow W, editor. *Pharmacogenetics of drug metabolism*. New York: Pergamon Press, 1992:549-608.
107. Hollenberg PF. Characteristics and common properties of inhibitors, inducers, and activators of CYP enzymes. *Drug Metab Rev* 2002; 31:17-35.
108. 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; 261:6264-6271.
109. Koop DR, Crump BL, Nordblom GD, Coon MJ. Immunochemical evidence for induction of the alcohol-oxidizing cytochrome P-450 of rabbit liver microsomes by diverse agents: ethanol, imidazole, trichloroethylene, acetone, pyrazole, and isoniazid. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82:4065-4069.
110. Song BJ, Veech RL, Park SS, Gelboin HV, Gonzalez FJ. Induction of rat hepatic *N*-nitrosodimethylamine demethylase by acetone is due to protein stabilization. *J Biol Chem* 1989; 264:3568-3572.
111. Lin JH, Lu AYH. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 1998; 35:361-390.

112. Pelkonen O, Maenpaa J, Taavitsainen P, Rautio A, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* 1998; 28:1203-1253.
113. Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, et al. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283:1552-1562.
114. de Waziers I, Cugnenc PH, Yang CS, Leroux JP, Beaune PH. Cytochrome P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferase in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 253:387-394.
115. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270:414-423.
116. Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, et al. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2001; 11:773-779.
117. Bailey DG, Dresser GK, Bend JR. Bergamottin, lime juice, and red wine as inhibitors of cytochrome P450 3A4 activity: comparison with grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73:529-537.
118. Yee GC, Stanley DL, Pessa LJ, Costa TD, Beltz SE, Ruiz J, et al. Effect of grapefruit juice on blood cyclosporin concentration. *Lancet* 1995; 345:955-956.

119. Bailey DG, Spence JD, Munoz C, Arnold JMO. Interaction of citrus juices with felodipine and nifedipine. *Lancet* 1991; 337:268-269.
120. Malhotra S, Bailey DG, Paine MF, Watkins PB. Seville orange juice-felodipine interaction: comparison with dilute grapefruit juice and involvement of furocoumarins. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69:14-23.
121. Haber D, Siess MH, de Waziers I, Beaune P, Suschetet M. Modification of hepatic drug-metabolizing enzymes in rat fed naturally occurring allyl sulphides. *Xenobiotica* 1994; 24:169-182.
122. Dresser GK, Wachter V, Wong S, Wong HT, Bailey DG. Evaluation of peppermint oil and ascorbyl palmitate as inhibitors of cytochrome P4503A4 activity in vitro and in vivo. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72:247-255.
123. Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, Williams DK, Gentry WB, Cui Y, et al. Cytochrome P450 phenotypic ratios for predicting herb-drug interactions in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72:276-287.
124. Wang Z, Gorski JC, Hamman MA, Huang SM, Lesko LJ, Hall SD. The effects of St John's wort (*Hypericum perforatum*) on human cytochrome P450 activity. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 70:317-326.
125. Ruschitzka F, Meier PJ, Turina M, Luscher TF, Noll G. Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet* 2000; 355:548-549.
126. Barone GW, Gurley BJ, Ketel BL, Abul-Ezz SR. Herbal supplements: a potential for drug interactions in transplant recipients. *Transplantation* 2001; 71:239-241.

127. Jover R, Bort R, Gomez-Lechon MJ, Castell JV. Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin-6: molecular mechanism and transcription factors involved. *FASEB J* 2002; 16:1799-1801.
128. Gorski JC, Hall SD, Becker P, Affrime MB, Cutler DL, Haehner-Daniels B. In vivo effects of interleukin-10 on human cytochrome P450 activity. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 67:32-43.
129. Tinel M, Elkahwaji H, Robin MA, Fardel N, Descatoire V, Haouzi D, et al. Interleukin-2 overexpresses c-myc and down-regulates cytochrome P-450 in rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289:649-655.
130. Tapner M, Liddle C, Goodwin B, George J, Farrell GC. Interferon gamma down-regulates cytochrome P450 3A genes in primary cultures of well-differentiated rat hepatocytes. *Hepatology* 1996; 24:367-373.
131. Muntané-Relat J, Ourlin JC, Domergue J, Maurel P. Differential effects of cytokines on the inducible expression of CYP1A1, CYP1A2, and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture. *Hepatology* 1995; 22:1143-1153.
132. Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A, Gautier JC, Corcos L, Turlin B, et al. Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol* 1993; 44:707-715.
133. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nature Genet* 2001; 27:383-391.

134. King BP, Leathart JBS, Mutch E, Williams FM, Daly AK. CYP3A5 phenotype-genotype correlations in a British population. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 55:625-629.
135. Balram C, Zhou Q, Cheung YB, Lee EJD. *CYP3A5*\*3 and \*6 single nucleotide polymorphisms in three distinct Asian populations. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2003; 59:123-126.
136. Hiratsuka M, Takekuma Y, Endo N, Narahara K, Hamdy SI, Kishikawa Y, et al. Allele and genotype frequencies of CYP2B6 and CYP3A5 in the Japanese population. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2002; 58:417-421.
137. Einarson TR. Drug-related hospital admissions. *Ann Pharmacother* 1993; 27:832-840.
138. Bates DW, Cullen DJ, Laird N, Petersen LA, Small SD, Servi D, et al. Incidence of adverse drug events and potential adverse drug events. *JAMA* 1995; 274:29-34.
139. Simard C. Modulation de l'activité métabolique du cytochrome P4503A4 (CYP3A4) et évaluation des répercussions électrophysiologiques cardiaques. 2002; Université de Montréal [thèse de doctorat].
140. Biedler JL, Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res* 1970; 30:1174-1184.
141. Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1973; 323:466-483.

142. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1976; 455:152-162.
143. Chen C, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the MDR1 (P-glycoprotein) gene from multidrug resistant human cells. *Cell* 1986; 47:381-389.
144. Gerlach JH, Endicott JA, Juranka PF, Henderson G, Sarangi F, Deuchars KL. Homology between P-glycoprotein and a bacterial hemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* 1986; 324:485-489.
145. Horio M, Gottesman MM, Pastan I. ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug resistant cells. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85:3580-3584.
146. Georges E, Tsuruo T, Ling V. Topology of P-glycoprotein as determined by epitope mapping of MRK-16 monoclonal antibody. *J Biol Chem* 1993; 268:1792-1798.
147. Ueda K, Clark PD, Chen CJ, Roninson IB, Gottesman MM, Pastan I. The human multidrug-resistance (*mdr1*) gene: cDNA cloning and transcription initiation. *J Biol Chem* 1987; 262:505-508.
148. Smith AJ, De Vree JML, Ottenhoff R, Oude Elferink RPJ, Schinkel AH, Borst P. Hepatocyte-specific expression of the human *MDR3* P-glycoprotein gene restores the biliary phosphatidylcholine excretion absent in *Mdr2* (-/-) mice. *Hepatology* 1998; 28:530-536.

149. Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual Review of Biochemistry* 1993; 62:385-427.
150. Gros P, Neriah Y, Croop JM, Housman DE. Isolation and expression of a complementary cDNA that confers multidrug resistance. *Nature* 1986; 323:728-731.
151. Gros P, Croop J, Housman D. Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 1986; 47:371-380.
152. DeVault A, Gros P. Two members of the mouse *mdr* gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Molecular and Cellular Biology* 1990; 10:1652-1663.
153. Raymond M, Rose E, Housman DE, Gros P. Physical mapping, amplification, and overexpression of the mouse *mdr* gene family in multidrug-resistant cells. *Molecular and Cellular Biology* 1990; 10:1642-1651.
154. Gros P, Raymond M, Bell J, Housman D. Cloning and characterization of a second member of the mouse *mdr* gene family. *Molecular and Cellular Biology* 1988; 8:2770-2778.
155. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84:7735-7738.
156. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the



multidrug transport protein, P170: evidence for localization in brain capillaries and cross-reactivity of one antibody with a muscle protein. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1989; 37:159-164.

157. Cordon-Cardo C, O'Brien J, Casals P, Rittman-Grauer L, Biedler J, Melamed MR, et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:695-698.

158. Arceci RJ, Croop JM, Horwitz SB, Housman DE. The gene encoding multidrug resistance is induced and expressed at high levels during pregnancy in the secretory epithelium of the uterus. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85:4350-4354.

159. Meissner K, Sperker B, Karsten C, Meyer zu Schwabedissen H, Seeland U, Bohm M, et al. Expression and localization of P-glycoprotein in human heart: effects of cardiomyopathy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2002; 50:1351-1356.

160. Ueda K, Taguchi Y, Morishima M. How does P-glycoprotein recognize its substrates? *Cancer Biology* 1997; 8:151-159.

161. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39:361-398.

162. Choi K, Chen CJ, Kriegler M, Roninson IB. An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the *MDR1* (P-glycoprotein) gene. *Cell* 1988; 53:519-529.

163. Safa AR, Stern RK, Choi K, Agresti M, Tamai I, Mehta ND, et al. Molecular basis of preferential resistance to colchicine in multidrug-resistant human cells conferred by gly-185/val-185 substitution in P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:7224-7229.
164. Currier SJ, Kane SE, Willingham MC, Candarelli CO, Pastan I, Gottesman MM. Identification of residues in the first cytoplasmic loop of P-glycoprotein involved in the function of chimeric human MDR1-MDR2 transporters. *J Biol Chem* 1992; 267:25153-25159.
165. Loo TW, Clarke DM. Functional consequences of proline mutations in the predicted transmembrane domain of P-glycoprotein. *J Biol Chem* 1993; 268:3143-3149.
166. Azzaria M, Schurr E, Gros P. Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol Cell Biochem* 1989; 9:5289-5297.
167. Gallagher JD. Effects of halothane and quinidine on intracardiac conduction and QTc interval in pentobarbital-anesthetized dogs. *Anesth Analg* 1992; 75:688-695.
168. Loo TW, Clarke DM. Reconstitution of drug-stimulated ATPase activity following co-expression of each half of human P-glycoprotein as separate polypeptides. *J Biol Chem* 1994; 269:7750-7755.

169. Hrycyna CA, Airan LE, Germann UA, Ambudkar SV, Pastan I, Gottesman MM. Structural flexibility of the linker region of human P-glycoprotein permits ATP hydrolysis and drug transport. *Biochem* 1998; 37:13660-13673.
170. Thorgeisson SG, Silverman JM, Gant TW, Marino PA. Multidrug resistance gene family and chemical carcinogens. *Pharmacol Ther* 1991; 49:283-292.
171. Wacher VJ, Wu CY, Benet LZ. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Molecular Carcinogenesis* 1995; 13:129-134.
172. Hall SD, Thummel KE, Watkins PB, Lown KS, Benet LZ, Paine MF, et al. Molecular and physical mechanisms of first-pass extraction. *Drug Metab Disp* 1999; 27:161-166.
173. Suzuki H, Sugiyama Y. Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2000; 12:3-12.
174. Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CAAM, van Deemter L, Smit JJM, et al. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:4028-4033.
175. Smit JJM, Schinkel AH, Oude Elferink RPJ, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, et al. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 1993; 75:451-462.

176. Oudard S, Marie JP, Pjade LE. Résistance à la chimiothérapie de type MDR en pratique clinique. *Bulletin du Cancer* 1996; 83:609-618.
177. Sonneveld P, Schoester M, Leeuw KD. Clinical modulation of multidrug resistance in multiple myeloma: effect of cyclosporine on resistant tumor cells. *Journal of Clinical Oncology* 1994; 12:1584-1591.
178. Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schaffeler E, Fischer J, Schwab M, et al. The C3435T mutation in the human *MDR1* gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. *Pharmacogenetics* 2001; 11:293-298.
179. Mickley L, Lee J, Weng Z, Zhan Z, Alvarez M, Wilson W, et al. Genetic polymorphism in MDR-1: a tool for examining allelic expression in normal cells, unselected and drug-selected cell line and human tumors. *Blood* 1998; 91:1749-1756.
180. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, et al. 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* 2000; 97:3473-3478.
181. Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, et al. *MDR1* pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 2001; 11:217-221.

182. Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69:169-174.
183. Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Penger A, Asante-Poku S, Zanger UM, et al. Frequency of C3435T polymorphism of *MDR1* gene in African people. *Lancet* 2001; 358:383-384.
184. Morin N, Simard C, Turgeon J. Distribution allélique du polymorphisme du gène *MDR-1* dans la population française québécoise. *M/S* 2001; 17:29
185. Siegmund W, Ludwig K, Giessmann T, Dazert P, Schroeder E, Sperker B, et al. The effects of the human *MDR1* genotype on the expression of duodenal P-glycoprotein and disposition of the probe drug talinolol. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72:572-583.
186. Sun J, He ZG, Cheng G, Wang SJ, Hao XH, Zou MJ. Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. *Medicine Sciences Monitoring* 2004; 10:RA5-RA14
187. Bailey DG, Dresser GK. Interactions between grapefruit juice and cardiovascular drugs. *American Journal of Cardiovascular Drugs* 2004; 4:281-297.
188. Mohri K, Uesawa Y. Effects of furanocoumarin derivatives in grapefruit juice on nifedipine pharmacokinetics in rats. *Pharm Res* 2001; 18:177-182.
189. Takanaga H, Ohnishi A, Yamada S, Matsuo H, Morimoto S, Shoyama Y, et al. Polymethoxylated flavones in orange juice are inhibitors of P-glycoprotein but not cytochrome P450 3A4. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293:230-236.

190. Hugger ED, Audus KL, Borchardt RT. Effects of poly(ethylene glycol) on efflux transporter activity in caco-2 cell monolayers. *J Pharm Sci* 2002; 91:1980-1990.
191. Hugger ED, Novak BL, Burton PS, Audus KL, Borchardt RT. A comparison of commonly used polyethoxylated pharmaceutical excipients on their ability to inhibit P-glycoprotein activity in vitro. *J Pharm Sci* 2002; 91:1991-2002.
192. Orzes N, Bellentani S, Aldini R, Simoni P, Ferretti I, Lunazzi GC, et al. Sex differences in the hepatic uptake of sulphobromophthalein in the rat. *Clin Sci* 1985; 585-587.
193. Anton FM, Garcia PJ, Ramos T, Gonzalez P, Ordas J. Sex differences in uric acid metabolism in adults: evidence for a lack of influence of estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) on the renal handling of urate. *Metabolism* 1986; 35:343-348.
194. Morissette M, Di Paolo T. Sex and estrous cycle variations of rat striatal dopamine uptake sites. *Neuroendocrinology* 1993; 58:16-22.
195. Uhland-Smith A, DeLuca HF. 1,25-dihydroxycholecalciferol analogs cannot replace vitamin D in normocalcemic male rats. *Journal of Nutrition* 1993; 123:1777-1785.
196. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84:265-269.

197. Pavelic ZP, Reising J, Pavelic L, Kelley DJ, Stambrook PJ, Gluckman JL. Detection of P-glycoprotein with four monoclonal antibodies in normal and tumor tissues. *Archives of Otolaryngology Head And Neck Surgery* 1993; 119:753-757.
198. Sugawara I, Akiyama S, Scheper RJ, Itoyama S. Lung resistance protein (LRP) expression in human normal tissues in comparison with that of MDR1 and MRP. *Cancer Letters* 1997; 112:23-31.
199. Meissner K, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H, 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.
200. Santostasi G, Kutty RK, Krishna G. Increased toxicity of anthracycline antibiotics induced by calcium entry blockers in cultured cardiomyocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991; 108:140-149.
201. Sridhar R, Dwivedi C, Anderson J, Baker PB, Sharma HM, Desai P, et al. Effects of verapamil on the acute toxicity of doxorubicin in vivo. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:1653-1660.
202. Nakajima T, Kurachi Y, Ito H, Takikawa R, Sugimoto T. Anti-cholinergic effects of quinidine, disopyramide, and procainamide in isolated atrial myocytes: mediation by different molecular mechanisms. *Circ Res* 1989; 64:297-303.

203. Colombo T, Gonzalez Paz O, D'Incalci M. Distribution and activity of doxorubicin combined with SDZ PSC 833 in mice with P388 and P388/DOX leukaemia. *British Journal of Cancer* 1996; 73:866-871.
204. Dell'Acqua G, Polishchuck R, Fallon JT, Gordon JW. Cardiac resistance to adriamycin in transgenic mice expressing a rat  $\alpha$ -cardiac myosin heavy chain/human multiple drug resistance 1 fusion gene. *Human Gene Therapy* 1999; 10:1269-1279.
205. Kaeser YA, Brunner F, Drewe J, Haefeli WE. Severe hypotension and bradycardia associated with verapamil and clarithromycin. *Am J Health-Syst Pharm* 1998; 55:2417-2418.
206. Steenbergen JA, Stauffer VL. Potential macrolide interaction with verapamil. *Ann Pharmacother* 1998; 32:387-388.
207. Pham TV, Rosen MR. Sex, hormones, and repolarization. *Cardiovasc Res* 2002; 53:740-751.
208. Jetté L, Beaulieu E, Leclerc JM, Béliveau R. Cyclosporin A treatment induces overexpression of P-glycoprotein in the kidney and other tissues. *Am J Physiol* 1996; 270:F756-F765
209. Liu B, Sun D, Xia W, Hung MC, Yu D. Cross-reactivity of C219 anti-p170(*mdr-1*) antibody with p185(c-erbB2) in breast cancer cells: cautions on evaluating p170(*mdr-1*). *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1473-1476.



210. Granzotto M, Drigo I, Candussio L, Rosati A, Bartoli F, Giraldi T, et al. Rifampicin and verapamil induce the expression of P-glycoprotein in vivo in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Letters* 2003; 205:107-115.
211. Magnarin M, Morelli M, Rosati A, Bartoli F, Candussio L, Giraldi T, et al. Induction of proteins involved in multidrug resistance (P-glycoprotein, MRP1, MRP2, LRP) and of CYP 3A4 by rifampicin in LLC-PK<sub>1</sub> cells. *Eur J Pharmacol* 2004; 483:19-28.
212. Buschman E, Gros P. Functional analysis of chimeric genes obtained by exchanging homologous domains of the mouse *mdr1* and *mdr2* genes. *Mol Cell Biol* 1991 Feb;11:595-603.
213. Scherer CR, Lerche C, Decher N, et al. The antihistamine fexofenadine does not affect I(Kr) currents in a case report of drug-induced cardiac arrhythmia. *Br J Pharmacol* 2002;137(6):892-900.
214. Sanguinetti MC, Mitcheson JS. Predicting drug-hERG channel interactions that cause acquired long QT syndrome. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26(3):119-24.
215. Splawski I, Shen J, Timothy KW, et al. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000;102(10):1178-85.
216. Seelig A, Gatlik-Landwojtowicz E. Inhibitors of multidrug efflux transporters: their membrane and protein interactions. *Mini Rev Med Chem* 2005;5(2):135-51.

## **CHAPITRE III**

# **MODULATORY ROLE OF ABC TRANSPORTERS ON THE CARDIAC ELECTROPHYSIOLOGICAL EFFECTS OF AN $I_{Kr}$ BLOCKER**

**Modulatory role of ABC transporters on the  
cardiac electrophysiological effects of an  $I_{Kr}$  blocker.**

Pierre Morissette MSc and Jacques Turgeon PhD.

Faculté de Pharmacie, Université de Montréal.

**Running title:** Block of  $I_{Kr}$  modulated by ABC transporters.

**Acknowledgements:** This study was supported by the Heart and Stroke Foundation of Quebec. P. Morissette is the recipient of a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

**Corresponding author:**

Jacques Turgeon, PhD

Faculté de Pharmacie, Université de Montréal

C.P. 6128 succursale Centre-ville

Montréal, Québec, Canada

H3C 3J7

Tel: (514) 343-6440

Fax: (514) 343-7377



## Résumé

Il a été démontré que les transporteurs membranaires ABC sont exprimés au niveau du cœur. Notre hypothèse est qu'une diminution de l'expression des transporteurs ABC pourrait augmenter l'accumulation des médicaments dans les myocytes et favoriser l'action de certains médicaments dont les bloqueurs des canaux ioniques. De plus, nous croyons que le vérapamil pourrait inhiber l'expression des transporteurs dans le myocarde. Ainsi, les transporteurs ABC furent modulés en pré-traitant des cobayes Hartley mâles durant 5 jours avec du vérapamil. Les cœurs furent perfusés en mode Langendorf, et la durée du potentiel d'action mesurée à 90% de repolarisation (MAPD<sub>90</sub>) au contrôle et après 6 min de perfusion avec du cisapride (50 nM). Le cisapride a provoqué une augmentation de 17±5 msec du MAPD<sub>90</sub> chez les cœurs de cobayes non pré-traités. Par contre, le cisapride a provoqué une augmentation de 42±11 msec (147 %) chez les cœurs de cobayes pré-traités au vérapamil (15 mg/kg/j). Les effets du pré-traitement ont eu tendance à démontrer un effet dose-dépendant (1.5 à 15 mg/kg/j) et sont dépendants du temps (1 à 7 jours). Dans une seconde série d'expériences, les myocytes ventriculaires d'animaux pré-traités au vérapamil (11.6 mg/kg/j) furent isolés et incubés 3 heures en présence de cisapride (100 ng/mL) afin d'évaluer les concentrations intracellulaires. Les concentrations intracellulaires de cisapride étaient de 13±4 ng/mg de protéine dans les myocytes de cobayes non pré-traités. Par contre, les myocytes provenant de cœurs pré-traités (11.6 mg/kg/jour) avaient des concentrations de 21±4 ng/mg de protéine (p<0.01). L'augmentation intracellulaire et la potentialisation des effets électrophysiologiques du cisapride suggèrent que les transporteurs ABC modulent les concentrations intra-cardiaques de certains bloqueurs d'I<sub>Kr</sub>. Ces effets

pourraient être important pour une meilleure compréhension des mécanismes menant au Syndrome du QT long d'origine médicamenteuse.

### **Abstract**

ATP binding cassette (ABC) proteins that transport substrates across cell membranes have been identified in cardiac myocytes. We hypothesized that down regulation or inhibition of efflux ABC transporters could favor accumulation of drugs in cardiac myocytes and promote drug actions such as block of ion channels. We also hypothesized that verapamil could diminish the expression of the transporters in the myocardium. Modulation of the activity of cardiac ABC transporters was accomplished by pre-treating guinea-pigs for 5 days with verapamil. Hearts were then isolated, perfused in the Langendorff mode and monophasic action potential duration measured (MAPD<sub>90</sub>) at baseline and following perfusion with the I<sub>Kr</sub> blocker cisapride (50 nM). In hearts obtained from animals pre-treated with vehicle, cisapride prolonged MAPD<sub>90</sub> by 17±5 msec. In contrast, cisapride prolonged MAPD<sub>90</sub> 42±11 msec in hearts isolated from animals pre-treated with verapamil 15 mg/kg/day (p<0.01). Pre-treatment effects had a dose-dependent tendency (1.5 to 15 mg/kg/day) and were time-dependent (1 to 7 days). In a second series of experiments cardiac myocytes were isolated from hearts of animals pre-treated with vehicle or verapamil. Myocytes obtained were incubated for 3 hours with cisapride (100 ng/mL). Intracellular concentrations of cisapride determined in cardiac myocytes from animals pre-treated with verapamil (11.6 mg/kg/day) were higher (21±4 ng/mg of proteins) compared to concentrations determined in myocytes from vehicle pre-treated animals (13±4 ng/mg of proteins, p<0.01). Increase in intracellular concentrations and potentiation of cisapride electrophysiological effects suggest that

cardiac ABC transporters regulate intra-cardiac concentrations of certain  $I_{Kr}$  blocking drugs. These effects could be important determinants of the overall mechanism underlying drug-induced Long QT syndrome.

## Introduction

Repolarization of cardiac ventricular myocytes in guinea pigs, dogs and humans is mostly accomplished by the delayed rectifier potassium current ( $I_K$ ) that comprises both a rapidly activating component ( $I_{Kr}$ ) and a slowly activating component ( $I_{Ks}$ )<sup>1-3</sup>. A certain degree of block of  $I_{Kr}$  is of therapeutic value and represents the underlying mechanism of action of several Class III antiarrhythmic agents. However, excessive block of  $I_{Kr}$ , manifested on the surface ECG by a prolonged QT interval, is associated with the risk of proarrhythmic events and life-threatening ventricular arrhythmias<sup>4; 5</sup>. This condition, known as the acquired form of the Long QT syndrome, has been shown to occur 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<sup>6</sup>. Indeed, block of  $I_{Kr}$  and prolongation of the QT interval is observed not only with Class III antiarrhythmics but is a property shared by several non-cardiovascular drugs.

Consequently, drug surveillance programs have been very active recently in the monitoring of drug-induced prolongation of the QT interval. In fact, several drugs such as terfenadine,<sup>7; 8</sup> erythromycin,<sup>9; 10</sup> pimozide,<sup>11; 12</sup> thioridazine,<sup>13; 14</sup> risperidone,<sup>15</sup> droperidol,<sup>16; 17</sup> and the gastrointestinal prokinetic agents domperidone<sup>18</sup> and cisapride<sup>19; 20</sup> have been associated with block of  $I_{Kr}$ , QT prolongation and torsades de pointes. Unexpected action of these drugs on cardiac repolarization in patients could be related to a decrease in drug disposition processes especially due to competitive inhibition of the cytochrome P450 isozymes CYP3As. For example, proarrhythmic events were observed during the concomitant administration of the histamine-H1 antagonist terfenadine and

the macrolide antibiotic erythromycin <sup>21</sup>. Inhibition of CYP3As during erythromycin administration caused a 10 fold increase in plasma levels of terfenadine leading to block of  $I_{Kr}$ , prolongation of cardiac repolarization (QT) and torsades de pointes <sup>21</sup>.

On the other hand, elevated drug levels in plasma may not be the sole determinant of increased drug action on  $I_{Kr}$ . Intracellular concentrations of drugs may be a key factor. In fact, it is noteworthy that  $I_{Kr}$  blockers gain access to their binding site on the  $\alpha$  subunit of the ion channel from an intracellular site. Intracellularly but not extracellularly applied  $I_{Kr}$  blockers exhibit block of HERG channels (human ether-a-go-go-related gene; the  $\alpha$  subunit of  $I_{Kr}$ ) <sup>22; 23</sup>. Consequently, modulation of the intracellular concentration of  $I_{Kr}$  blockers may regulate drug action on ion channels.

In addition to drug metabolizing enzymes, ATP-binding cassette (ABC) proteins that transport substrates across membranes using ATP hydrolysis are believed to be key factors of drug elimination and distribution <sup>24</sup>. P-glycoprotein and many ABC transporters are not restricted to tumor cells but are highly expressed in normal tissues such as kidneys, the bile canalicular membrane of hepatocytes, intestinal epithelial cells, brain capillaries, testes and skin <sup>25</sup>. These locations, especially in the excretory organs, are indicative of a role of ABC transporters and P-gp in the protection against xenobiotics accumulation, either by accelerating their excretion or by preventing their uptake in tissues. Recent studies indicated that ABC transporters in addition to P-glycoprotein, are expressed in cardiomyocytes <sup>26; 27</sup> and in human heart <sup>28</sup>.



Hence, we hypothesized that modulation of the activity of ABC transporters could alter effects of cisapride, a very potent  $I_{Kr}$  blocker that is also a potential substrate of ABC transporters, on cardiac repolarization. Experiments were designed to look at the effect of the modulation of ABC transporter activity with an established inhibitor rather than to look at the effect of direct competitive inhibition of ABC transporters on  $I_{Kr}$  block. In brief, experiments were based on the premise that 1) intracellular concentrations of several non-cardiovascular drugs that are also  $I_{Kr}$  blockers may be a major determinant of drug actions on ion channels, 2) P-gp and ABC transporters that may be capable of transporting several of these drugs are present in cardiac myocytes.

## **Methods**

Experiments were performed in accordance with institutional guidelines of the University of Montreal on animal use in research. Animals were housed, maintained and treated in compliance with the Guide to the care and use of experimental animals of the Canadian Council on animal care.

## **Reagents**

Cisapride was a gift from Janssen-Ortho (Toronto, Ontario, Canada). Solutol<sup>®</sup> HS 15 was obtained from BASF (Ludwigshafen, Germany). Sodium hydroxyde pellets and ammonium acetate were obtained from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, United States) while acetonitrile (HPLC grade) and *tert*-butyl methyl ether were obtained from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, United States). All other reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, United States).

## **Pre-treatment with verapamil**

Male Hartley guinea pigs (n=8 per group; weight, 300 to 350 g; Charles River Laboratories, Montreal, Quebec, Canada) were given verapamil 0, 1.5, 4.8, 8.2, 11.6 or 15 mg/kg once daily subcutaneously for a period that varied between 1 to 7 days. The last injection was given 12 hours prior to heart isolation and the conduct of electrophysiological studies.

## **Experiments with buffer-perfused guinea pig isolated hearts**

Heart isolation, Langendorff perfusion technique and electrophysiological measurements have been described previously<sup>20</sup>. Briefly, hearts were perfused at 37°C via the aorta

with Krebs-Henseleit buffer during a control period of 10 minutes to assess the stability of the monophasic action potential signal. Thereafter, perfusion was performed for 6 minutes with Krebs-Henseleit buffer containing cisapride 50 nM. Perfusion with buffer containing no drug was then restarted during a 10 minute washout period to assess reversal of drugs effects. Throughout the experiment, monophasic action potentials from the left ventricle were recorded at a basic cycle length of 250 msec by a pressure-maintained action potential catheter (Langendorff probe model 225, EP Technologies Inc, Sunnyvale, CA, United States) every 30 seconds for a duration of 1 second. 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 left ventricle.

#### **Determination of verapamil concentrations in cardiac tissue**

Concentrations of verapamil in cardiac tissue were evaluated in hearts isolated from animals (n=4) following a 5 day pre-treatment (15 mg/kg/day) period. Hearts were extirpated, cannulated and retrogradely perfused via the aorta with Krebs-Henseleit buffer containing no drug for a 10 minute period. Heart ventricle samples (100 mg) were then collected and homogenized in 1 mL of Krebs-Henseleit buffer for quantification of verapamil concentrations by HPLC.

#### **HPLC analysis of verapamil**

A slightly modified HPLC method was used to evaluate verapamil concentrations<sup>29</sup>. Briefly, a stock solution of verapamil was prepared in Krebs-Henseleit buffer by dissolving 10 mg of verapamil in 10 mL of Krebs-Henseleit buffer. A stock solution of

imipramine (10 µg/mL), used as internal standard, was prepared in distilled water. A calibration curve of verapamil was constructed using five concentrations (12.5, 25, 50, 100, 200 ng/mL) made by further diluting the stock solution with appropriate volumes of Krebs buffer. An amount of 100 mg of ventricular tissue from untreated animals was added to each calibration point. Liquid-liquid extraction of samples from the calibration curve or from tissue samples from pre-treated animals with verapamil was performed following addition of the internal standard (125 ng/mL), 125 µL of sodium perchlorate 1M adjusted to pH 12 with NaOH and 6 mL *tert*-butyl methyl ether. The samples were vortexed and centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes. The organic supernatant was transferred to another tube and was evaporated to dryness under nitrogen. The extraction residue was dissolved in 100 µL of acetonitrile for chromatography.

The HPLC system (Thermo Finnigan, San Jose, CA, United States) consisted in a Spectra System P4000 chromatographic pump, a AS3000 automatic injector, a UV3000 ultraviolet detector and a PC1000 spectra system computer interface controller. The column was a Beckman Ultrasphere C8, 250 mm x 4.6 mm (Fullerton, CA, United States), maintained at 25°C. Separations were conducted using a mobile phase of acetonitrile and 0.05 M ammonium acetate (68:32). The mobile phase was filtered under vacuum through a 0.45 µM pore size membrane filter before use. The flow rate was set at 1 mL/min and the detection wavelength was set at 238 nm. Retention time of verapamil was 6.5 minutes while that of imipramine was 16.5 minutes. Detection limit of verapamil was 6 ng/mL.

### **Determination of cisapride intracellular concentrations in isolated cardiac myocytes**

Guinea pigs were pre-treated with verapamil (0 or 11.6 mg/kg/day; n=12) for 5 days. Twelve hours after the last dose, cardiac myocytes were isolated from the heart of these animals by use of a previously described enzymatic dissociation technique<sup>20</sup>. Isolated cells were incubated (6 incubations were performed for each heart) in 2 mL of Tyrode's solution containing 100 ng/mL cisapride (10 µL of a stock solution) for 3 hours at 37°C. Cisapride stock solution was prepared in 0.1% solutol<sup>®</sup> HS 15 solution by dissolving 10 mg of cisapride in 1 mL solutol<sup>®</sup> HS 15 and diluted to 1 L with distilled water. Following the incubation period, isolated cells were centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes. The supernatant was discarded and the cells were washed with 2 mL of fresh Tyrode's solution. One part was kept for the determination of intracellular cisapride concentration while the other was utilized for protein quantification.

### **HPLC analysis of cisapride**

Determination of cisapride concentrations in cardiac cells was performed according to a slightly modified HPLC method<sup>30</sup>. The HPLC pump, injector, detector and computer interface controller were the same as those described previously. The column was a Thermo-Hypersil-Keystone BDS C18, 250 mm x 4.6 mm, and was maintained at 25°C. Separation was conducted using a mobile phase consisting of acetonitrile and 0.05 M potassium dihydrogen phosphate (48:52) adjusted to pH 5.5 with NaOH 1 M. Triethylamine (0.04 M) was added. The mobile phase was filtered under vacuum through a 0.45 µM pore size membrane filter before use. The flow rate was set at 1 mL/min and the detection wavelength was set at 276 nm.

Isolated cardiac myocytes incubated with cisapride were extracted with 5 mL of butylchloride-isopropanol solution (95:5) following the addition of the internal standard (metoclopramide 100  $\mu$ L; 10 mg/L stock solution) and 1 mL of NaOH 2 M. The organic supernatant was removed and evaporated under nitrogen at 37°C. The extraction residue was dissolved in 100  $\mu$ L acetonitrile prior to injection into the chromatograph.

#### **Determination of rhodamine 123 concentrations in cardiac tissue**

Following a five day pre-treatment period with verapamil (0, 11.6 and 15 mg/kg/day), guinea pig hearts (n=24) were isolated and perfused using the Langendorff technique for 30 minutes at 37°C with Krebs-Henseleit buffer containing 30  $\mu$ M rhodamine 123. Thereafter, hearts were washed with phosphate-buffered saline solution and snap frozen at -80°C for subsequent analyses. Heart ventricular tissue was weighed (500 mg) and a volume of icecold Tris-HCl buffer (0.05 M, pH 7.4) 5 times the weight of the tissue was added. Ventricular heart tissue was thoroughly homogenized on ice and a 500  $\mu$ L aliquot was mixed with 1 volume of HCl 1M and 4 volumes of water. The mixture was vortexed and centrifuged (4°C, 4000 rpm, 20 min). The supernatant was decanted and measured by fluorimetry at an excitation wavelength of 498 nm and an emission wavelength of 525 nm. A calibration curve was constructed by adding rhodamine 123 to homogenized control heart tissue. Following the addition of rhodamine 123, the same extraction technique as above was pursued.

#### **Protein Quantification**

To correct for the exact amount of tissue assayed in experiments conducted for the determination of cisapride and rhodamine 123 concentrations, proteins were quantified using the BCA protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL, United States). Briefly, 1  $\mu$ L of each unknown sample (myocytes or homogenized heart tissue) was added to 1 mL of BCA working reagent. The mixture was incubated 1 hour at room temperature. The absorbance of each test tube was measured at 562 nm. A standard curve was constructed with 5 bovine serum albumine standards to determine the protein concentration of each unknown sample.

### **Statistical analysis**

#### *Buffer-perfused isolated hearts*

Only hearts with reversal of cisapride effects on reperfusion with buffer containing no drug were included in the analysis. Data on the magnitude of cisapride effects were analyzed with a Student's t test. All values are expressed as mean  $\pm$  S.D. Level of statistical significance was set at  $p < 0.01$ .

#### *Cisapride and rhodamine 123 concentrations*

All values are expressed as mean  $\pm$  S.D. Intracellular concentrations of cisapride were compared using Student's t test. Intracellular concentrations of rhodamine 123 were compared by ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test. Level of statistical significance was set at  $p < 0.01$ . Prolongations of MAPD90 by cisapride as a function of the dose of verapamil, as well as a function of time were compared by ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test. Level of statistical significance was set at  $p < 0.01$ .

## Results

### Experiments with isolated buffer-perfused guinea pig hearts

Typical examples of monophasic action potentials recorded at baseline and during perfusion of cisapride 50 nM in guinea pig hearts at a pacing cycle length of 250 msec are illustrated in figure 1A. In this example, MAPD<sub>90</sub> determined in a heart isolated from an animal pre-treated with vehicle was prolonged 17 msec by cisapride 50 nM. In contrast, MAPD<sub>90</sub> was prolonged 42 msec ( $p < 0.01$ ) in a heart isolated from an animal pre-treated with verapamil (15 mg/kg/day for 5 days). Data obtained from each pre-treated heart with 0, 1.5, 4.8, 8.2, 11.6 and 15 mg/kg/day verapamil are shown in figure 1B. An increase in MAPD<sub>90</sub> was noticed in all hearts tested during perfusion of cisapride 50 nM.

Pre-treatment with verapamil shows a dose-dependent effect on the increase in MAPD<sub>90</sub> produced by cisapride 50 nM ( $F = 59.8$ ,  $p = 5.2E-18$ ) (figure 2). Indeed, prolongation of MAPD<sub>90</sub> increased to a maximum observed after a dose of verapamil 15 mg/kg/day for 5 days. Time-dependant effects of verapamil treatment (11.6 mg/kg/day) on MADP<sub>90</sub> prolongation by cisapride 50 nM were also investigated. After five days of treatment, pre-treatment effect appears to reach a plateau (figure 3).

### Verapamil residual concentration in pre-treated hearts



Residual concentrations of verapamil found in cardiac tissues 12 hours after the last dose of a pre-treatment period were investigated to assure that effects observed were not related to direct modulation by verapamil of block of  $I_{Kr}$ . After a five day pre-treatment at the highest verapamil dose (15 mg/kg/day), verapamil could not be detected in any heart tested with the assay used which possessed a detection limit of 6 ng/mL.

#### **Intracellular concentrations of cisapride.**

To evaluate effects of ABC transporter modulation on intracellular accumulation of  $I_{Kr}$  blockers, we incubated cardiomyocytes isolated from guinea pigs pre-treated with vehicle or verapamil (11.6 mg/kg/day) in the presence of cisapride (100 ng/mL). Cardiomyocytes from pre-treated animals showed a significantly greater intracellular cisapride concentration than cardiomyocytes isolated from guinea pigs pre-treated with vehicle. Indeed, cisapride concentrations were  $13 \pm 4$  ng/mg protein in cells from hearts of vehicle pre-treated guinea pigs ( $n=6$ ) compared to  $21 \pm 4$  ng/mg protein ( $p < 0.01$ ) in cells from hearts of verapamil pre-treated animals (11.6 mg/kg/day;  $n=6$ ) (figure 4).

#### **Accumulation of rhodamine 123 in cardiac tissue**

To characterize further modulation by verapamil of ABC transporter activity in the heart, rhodamine 123 accumulation was chosen as a sensitive indicator of P-glycoprotein activity; a specific substrate of ABC transporter.<sup>31</sup> In fact, Rhodamine 123 is a well-known substrate of the P-gp transporter. Hearts isolated from verapamil pre-treated animals were perfused with rhodamine 123 and its concentration was evaluated in

cardiac tissues by fluorimetry. Hearts from vehicle pre-treated animals and animals pre-treated with verapamil 11.6 mg/kg/day or 15 mg/kg/day showed rhodamine 123 intracellular concentrations of  $37 \pm 5$  (n=8),  $40 \pm 4$  (n=8) and  $45 \pm 4$  ng/mg protein (n=8), respectively (F = 6.7, p = 0.0056 ; 15 mg/kg/day vs control).

## Discussion

Results obtained in this study demonstrate that pre-treatment of guinea-pigs with verapamil potentiates the cardiac electrophysiological effects of cisapride. This effect is most likely due to a modulation in the activity of ABC transporters present in cardiac myocytes. Indeed, we have shown that 1) Prolongation of cardiac repolarization by cisapride in isolated guinea pig hearts was significantly augmented when animals were pre-treated with the ABC transporter modulator, verapamil 2) Pre-treatment effects of verapamil had a tendency to follow the dose (1.5 to 15 mg/kg/day) and were time-dependent (1-7 days); 3) Verapamil was not present at significant levels in the hearts of pre-treated animals 12 hours following the last pre-treatment dose and during electrophysiological studies 4) Accumulation of rhodamine 123 was significantly greater in pre-treated hearts 5) Intracellular concentrations of cisapride were significantly greater in myocytes from pre-treated animals. These results strongly suggest that the activity of ABC transporters was down-regulated in cardiac ventricular myocytes following pre-treatment with verapamil. Our results indicate that intracellular concentrations of the drug or access to its binding site on  $I_{Kr}$  were increased. Therefore, we propose that verapamil pre-treatment down-regulates the activity or expression of ABC transporters which results in a potentiation of cisapride electrophysiological effects.

Several studies have used verapamil as a multidrug resistance modulator and have shown that this drug can alter the pharmacokinetics of many other drugs that are transported by P-glycoprotein<sup>32, 33</sup>. In the present study we intended not to look at a

direct competitive inhibition of ABC transporters by verapamil but rather at modulation of ABC transporter activity following pre-treatment with a known substrate. This study design was used since direct block of  $I_{Kr}$  by verapamil has been well described and would have prevented us to conclude on the extent of  $I_{Kr}$  block by other drugs<sup>23</sup>. In order to eliminate any unwanted  $I_{Kr}$  block by verapamil, the last pre-treatment was given 12 hours before heart isolation. As well, a 10 minute control period was used to assess stability of the monophasic action potential and allow for washout of any unwanted verapamil effects. We confirmed that verapamil was not a factor in  $I_{Kr}$  block by determining its concentration in hearts that were pre-treated at the highest verapamil dose. According to the limit of detection of the assay, intracellular concentrations of verapamil were lower than 6 ng/mL. This concentration is well below the  $IC_{50}$  for  $I_{Kr}$  block by verapamil. In fact, verapamil causes block of HERG channels that encode for  $I_{Kr}$  at an  $IC_{50}$  of 143 nM (65 ng/mL) and does not show any HERG binding below 10 nM (5 ng/mL)<sup>23</sup>.

Intracellular concentrations of cisapride were determined in myocytes isolated from hearts of animals pre-treated with verapamil. Our study demonstrates that intracellular concentrations were almost doubled in cardiac myocytes isolated from guinea pigs pre-treated with verapamil compared to those pre-treated with vehicle suggesting that efflux transport mechanisms were modulated by verapamil. In addition, we measured the accumulation of rhodamine 123, a known fluorescent P-gp substrate in guinea-pig hearts. Our study demonstrated that accumulation of rhodamine 123 was significantly greater in hearts from guinea pigs pre-treated with verapamil compared to those pre-treated with vehicle indicating that the intra-tissue concentration of P-gp substrates could

be modulated by pre-treatment with verapamil. On the other hand, the increase in concentrations of rhodamine 123 were less than that of intracellular cisapride concentrations in cardiomyocytes from pre-treated animals suggesting that P-gp may not be the only transporter modulated by verapamil. In fact, it was shown that verapamil can also modulate MRP1 and MRP2. ABC transporters are known to have similar homologies and have similar substrate specificity. In fact many drugs that are MRP1 substrates are also P-gp substrates. Thus,  $I_{Kr}$  blockers that are also substrates of ABC efflux transporters may get, through an increase in their intracellular concentration, a greater access to their binding site on potassium channels. Unfortunately, many interactions of ABC transporters have yet to be discovered which prohibits us from determining which ABC transporter can be most influential in determining intracellular cisapride concentrations. These results correlate with potentiation of cisapride's electrophysiological effects observed in hearts isolated from animals pre-treated with verapamil.

Cardiac toxicity during treatment with cisapride is explained by the block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current ( $I_{Kr}$ )<sup>20</sup>. It has been proposed that the degree of prolongation of cardiac repolarization associated with cisapride therapy depends on plasma concentrations of the drug, on the individual biotransformation capacity (CYP3A4 activity), and on the coadministration of other drugs causing pharmacokinetic (inhibition of CYP3A4) and/or pharmacodynamic (additional block of cardiac potassium currents) interactions<sup>19; 20</sup>. In fact, our group has shown that several drugs that are  $I_{Kr}$  blockers are also substrates of CYP3As isozymes<sup>10; 12; 14; 18; 20</sup>. These

characteristics led us to believe that competitive inhibition of CYP3A4/5 activity observed during the combined use of CYP3A4/5 substrates causes an increase in total and free plasma concentrations of drugs. Consequently, drugs can distribute more to tissues, including the heart, and drugs with  $I_{Kr}$  binding affinity can cause a greater inhibition of this protein. More  $I_{Kr}$  block leads to greater action potential prolongation and an increased risk of torsades de pointes. Based on the present study, ABC transporters should be considered as another contributor to elevated intra-cardiac concentrations of  $I_{Kr}$  blockers when these transporters are inhibited or down-regulated.

### **Conclusion**

Results obtained in this study demonstrate that the activity of ABC transporters can be modulated by pre-treatment with substrates such as verapamil. Modulation of these transporters can alter intra-cardiac concentrations of other ABC transporter substrates and may cause increase in their pharmacodynamic effects in this tissue. Clinical awareness is warranted in susceptible patients, particularly those receiving multi-drug regimens with  $I_{Kr}$  blockers.

## References

1. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK: Two components of cardiac delayed rectifier  $K^+$  current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 1995;96:195-215
2. Gintant GA: Two components of delayed rectifier current in canine atrium and ventricle. Does  $I_{Ks}$  play a role in the reverse rate dependences of class III agents. *Circ Res* 1996;78:26-37
3. Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S: Evidence for two components of delayed rectifier  $K^+$  current in human ventricular myocytes. *Circ Res* 1996;78:689-696
4. Morganroth J: Relations of  $QT_c$  prolongation on the electrocardiogram to torsades de pointes: definitions and mechanisms. *Am J Cardiol* 1993;72:10B-13B
5. Roden DM, Lazzara R, Rosen M, Schwartz PJ, Towbin J, Vincent GM: Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. *Circulation* 1996;94:1996-2012
6. Roden DM: Torsade de pointes. *Clin Cardiol* 1993; 16:683-686.
7. MacConnell TJ, Stanners AJ: Torsades de pointes complicating treatment with terfenadine. *Br Med J* 1991;302:1469
8. Ming Z, Nordin C: Terfenadine blocks time-dependent  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ , and  $K^+$  channels in guinea pig ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26:761-769

9. Brandriss MW, Richardson WS, Barold SS: Erythromycin-induced QT prolongation and polymorphic ventricular tachycardia (Torsades de pointes): case report and review. *Clinical Infectious Diseases* 1994;18:995-998
10. 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;91:3010-3016
11. Krahenbuhl S, Sauter B, Kupferschmidt H, Krause M, Wyss PA, Meier PJ: Case report: reversible QT prolongation with torsades de pointes in a patient with pimozide intoxication. *Am J Med Sci* 1995;309:315-316
12. 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. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 2001;6:255-260
13. Kemper AJ, Dunlap R, Pietro DA: Thioridazine-induced torsades de pointes: successful therapy with isoproterenol. *JAMA* 1983;249:2931-2934
14. Drolet B, Vincent F, Rail J, Chahine M, Deschênes D, Nadeau S, Khalifa M, Hamelin BA, Turgeon J: Thioridazine lengthens repolarization of cardiac ventricular myocytes by block of the delayed rectifier potassium current. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288:1261-1268



15. 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;41:934-937
16. Guy JM, André-Fouet X, Porte J, Bertrand M, Lamaud M, Verneyre H: Torsades de pointes et allongement de la durée de l'intervalle QT après injection de droperidol. *Ann Cardiol Angéiol* 1991;40:541-545
17. Drolet B, Zhang S, Deschênes 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;10:1597-1604
18. 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
19. Vitola J, Vukanovic J, Roden DM: Cisapride-induced torsades de pointes. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;9:1109-1113
20. 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;97:204-210
21. 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;52:231-238

22. Zou A, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti MC: Single HERG delayed rectifier K<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 1997;272:H1309-H1314
23. Zhang S, Zhou Z, Gong Q, Makielski JC, January CT: Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circ Res* 1999;84:989-998
24. Wacher VJ, Wu CY, Benet LZ: Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Molecular Carcinogenesis* 1995;13:129-134
25. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR: Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1990;38:1277-1287
26. Estevez MD, Wolf A, Schramm U: Effect of PSC 833, verapamil and amiodarone on adriamycin toxicity in cultured rat cardiomyocytes. *Toxicology in Vitro* 2000;14:17-23
27. Dazert P, Meissner K, Vogelgesang S, Heydrich B, Eckel L, Bohm M, Warzok R, Kerb R, Brinkmann U, Schaeffeler E, Schwab M, Cascorbi I, Jedlitschky G, Kroemer HK: Expression and localization of the multidrug resistance protein 5 (MRP5/ABCC5), a cellular export pump for cyclic nucleotides, in human heart. *Am J Pathol* 2003;163:1567-1577
28. Meissner K, Sperker B, Karsten C, Meyer zu Schwabedissen H, Seeland U, Bohm M, Bien S, Dazert P, Kunert-Keil C, Vogelgesang S, Warzok R, Siegmund W, Cascorbi I, Wendt M, Kroemer HK: Expression and localization of P-glycoprotein in human

heart: effects of cardiomyopathy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2002;50:1351-1356

29. Campanero MA, Escolar M, Arango MA, Sadaba B, Azanza JR: Development of a chromatographic method for the determination of saquinavir in plasma samples of HIV patients. *Biomedical Chromatography* 2002;16:7-12

30. Simard C, O'Hara GE, Prévost J, Guilbaud R, Massé R, Turgeon J: Study of the drug-drug interaction between simvastatin and cisapride in man. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2001;57:229-234

31. Efferth T, Lohrke H, Volm M: Reciprocal correlation between expression of P-glycoprotein and accumulation of rhodamine 123 in human tumors. *Anticancer Research* 1989;9:1633-1638

32. Leu BL, Huang JD: Inhibition of intestinal P-glycoprotein and effects on etoposide absorption. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1995;35:432-436

33. Terwogt JMM, Beijnen JH, ten Bokkel Huinink WW, Rosing H, Schellens JHM: Co-administration of cyclosporin enables oral therapy with paclitaxel. *Lancet* 1998;352:285

**Figure legends**

**Figure 1.** Panel A shows monophasic action potential signals recorded at baseline and after 6 minutes of cisapride 50 nM for vehicle (control) and verapamil pre-treated guinea pigs. Panel B shows MAPD<sub>90</sub> in msec for control and pre-treated guinea pigs at baseline (B) and with 50 nM cisapride (C). Increase in MAPD<sub>90</sub> were 17±5 msec in hearts from vehicle pre-treated animals and 22±8 msec, 26±3 msec, 26±9 msec, 29±9 msec and 42±11 msec in hearts from animals pre-treated with verapamil 1.5, 4.8, 8.2, 11.6 and 15 mg/kg/day, respectively.

**Figure 2.** Prolongation of MAPD<sub>90</sub> by cisapride 50 nM as a function of the dose of verapamil used for a five day pre-treatment period (n=8 for each dose).

**Figure 3.** Prolongation of MAPD<sub>90</sub> by cisapride 50 nM as a function of pre-treatment duration with verapamil (11.6 mg/kg/day ; n=8 for each duration of pre-treatment).

**Figure 4.** Intracellular concentrations of cisapride in ventricular cardiac myocytes isolated from hearts of animals pre-treated with vehicle or verapamil 11.6 mg/kg/day (n=6 animals for each treatment group; 6 incubations were performed with cells isolated from each heart).

Figure 1

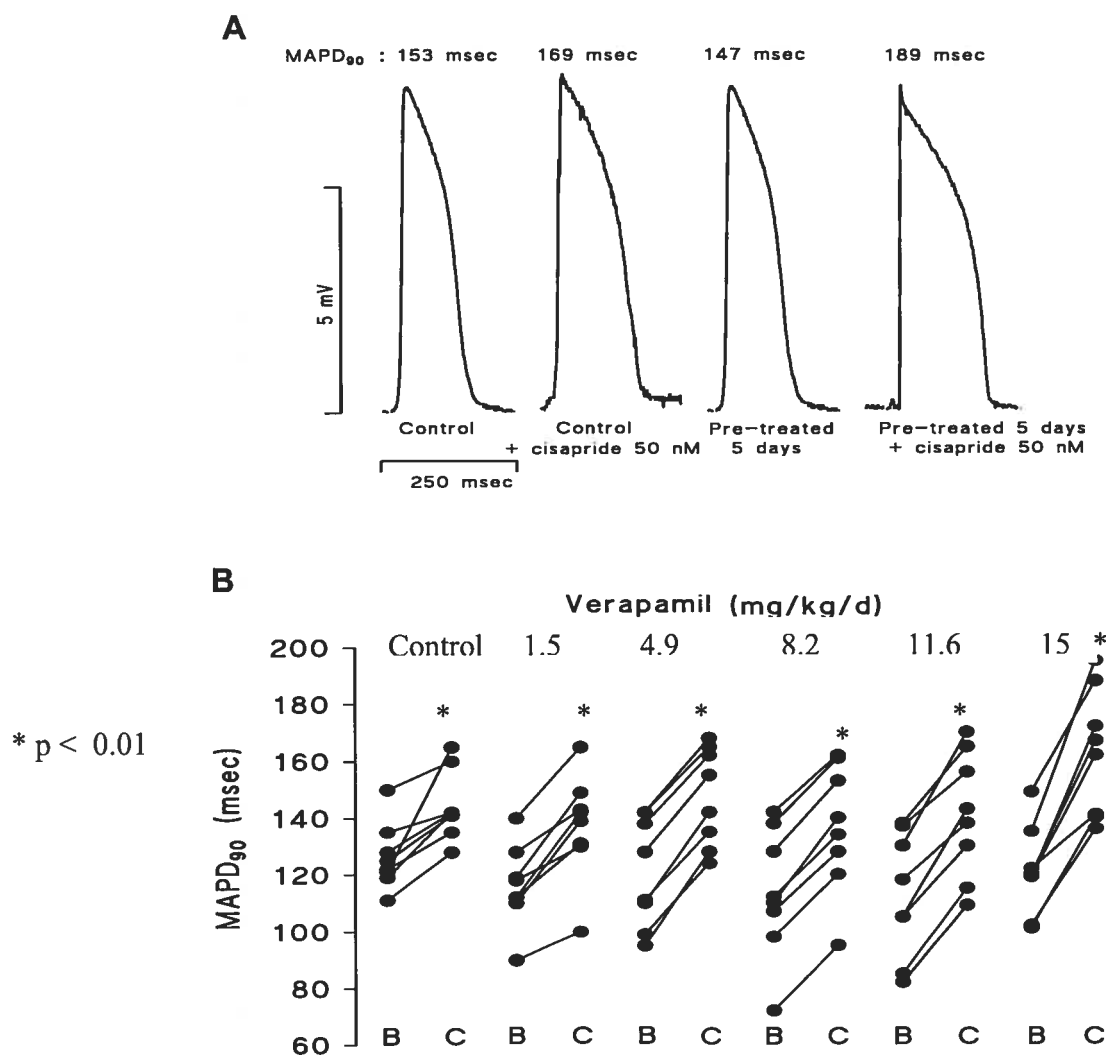
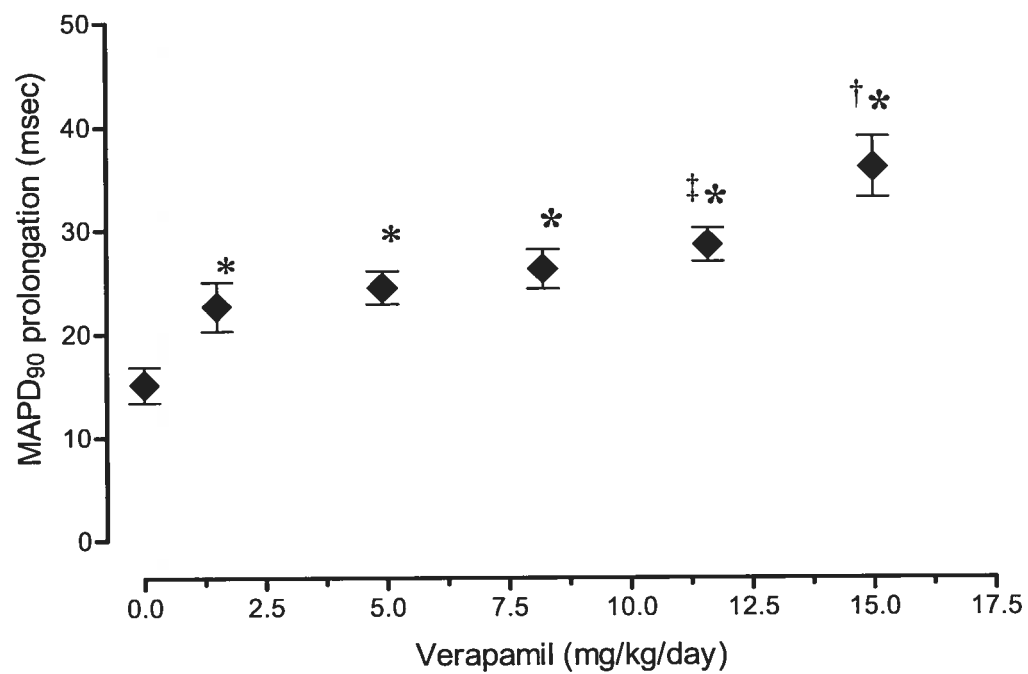


Figure 2



\* : p< 0.01 vs control

‡ : p<0.01 vs 8.9 mg/kg/day

† : p<0.01 vs 11.6 mg/kg/day

Figure 3

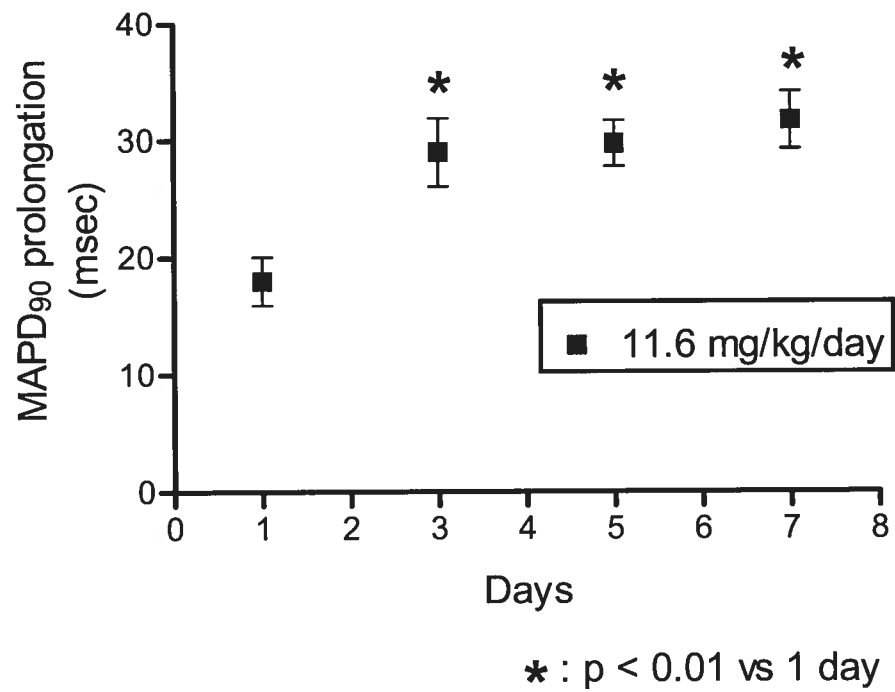
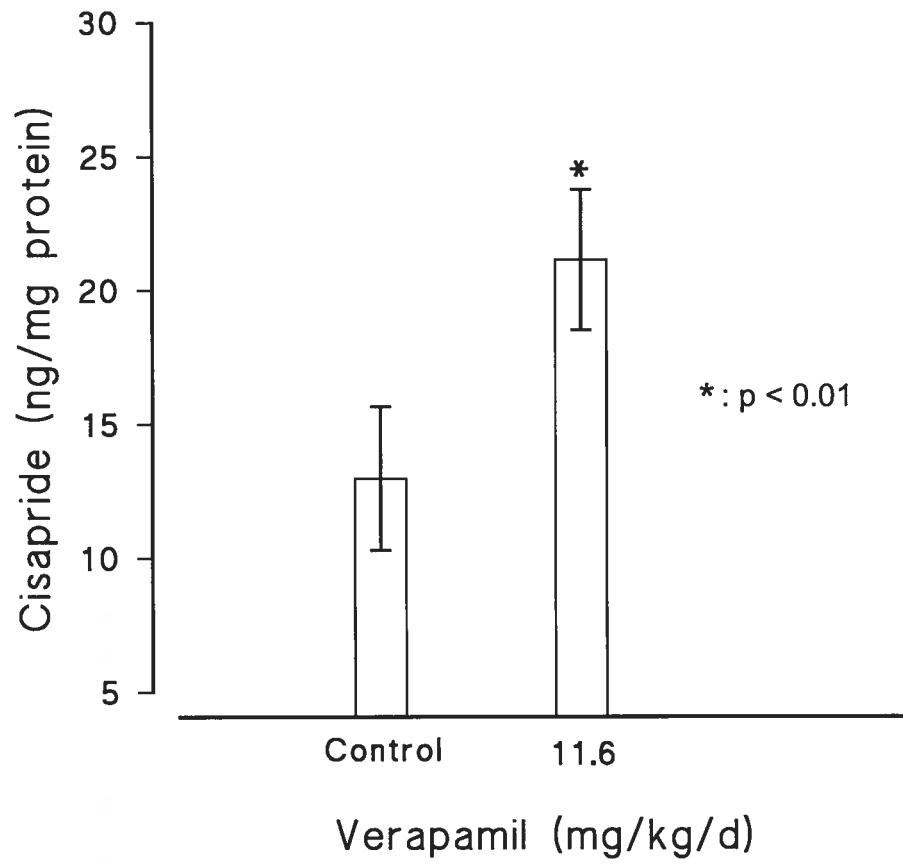


Figure 4





**CHAPITRE IV****ATP BINDING CASSETTE MEMBRANE TRANSPORTERS AS A  
KEY DETERMINANT OF SEX-RELATED DIFFERENCES IN  
DRUG-INDUCED LONG QT SYNDROME**

**ATP binding cassette membrane transporters as a key determinant of sex-related differences in drug-induced Long QT syndrome**

Pierre Morissette M.Sc., Raymond Hreiche M.Sc., Jacques Turgeon PhD.

Faculté de Pharmacie, Université de Montréal

**Running title:** ATP transporters in drug-induced Long QT syndrome

**Acknowledgements:** This study was supported by the Heart and Stroke Foundation of Quebec and the Canadian Health Institutes. P. Morissette is the recipient of a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

**Corresponding author:** Jacques Turgeon, PhD

Faculté de Pharmacie, Université de Montréal

C.P. 6128 succursale Centre-Ville

Montréal, Québec, Canada

H3C 3J7

Tel: (514) 343-6440

Fax: (514) 343-7377



## Résumé

Il est bien connu qu'il existe des différences reliées au sexe dans la prédisposition au syndrome du QT long d'origine médicamenteuse. Récemment, notre laboratoire a démontré que les transporteurs ABC jouent un rôle important dans la régulation des concentrations intracellulaires et de la toxicité cardiaque. Sachant qu'il existe des différences reliées au sexe dans les processus de transport, nous avons examiné si une modulation de l'efflux des transporteurs ABC pourrait favoriser l'accumulation des médicaments dans les myocytes de cobayes femelles et potentialiser l'action d'un bloqueur des canaux potassiques. Les transporteurs ABC furent modulés en pré-traitant des cobayes Hartley mâles et femelles durant 5 jours avec du vérapamil. Les cœurs furent perfusés en mode Langendorff, et la durée du potentiel d'action mesurée à 90% de repolarisation (MAPD<sub>90</sub>) au contrôle et après 6 min de perfusion avec du cisapride (50 nM). Le cisapride a provoqué une augmentation de 17±5 msec du MAPD<sub>90</sub> et de 22 ± 6 msec chez les mâles et femelles non pré-traités vs 28±6 msec chez les mâles et de 42 ± 7 msec chez les femelles (p<0.001) d'animaux pré-traités au vérapamil (11.6 mg/kg/j). Dans une seconde série d'expériences, les myocytes ventriculaires d'animaux pré-traités et non pré-traités au vérapamil (11.6 mg/kg/j) furent isolés et incubés 3 heures en présence de cisapride (100 ng/mL) afin d'évaluer les concentrations intracellulaires. Les concentrations intracellulaires de cisapride étaient de 13±4 et 16±3 ng/mg de protéine dans les myocytes de cobayes mâles et femelles. Les myocytes provenant de cœurs pré-traités (11.6 mg/kg/jour) avaient des concentrations de 21±3 et 29±2 ng/mg de protéine, respectivement (p<0.01). Les résultats de cette étude démontrent qu'une modulation des transporteurs ABC peut potentialiser le bloc d'I<sub>Kr</sub> par des agents non-antiarythmique comme le cisapride. De plus,

nos recherches démontrent pour la première fois l'implication des transporteurs ABC dans le mécanisme sous-jacent aux différences reliées au sexe dans le syndrome du QT long d'origine médicamenteuse.

### **Abstract**

Sex-related differences in the predisposition to drug-induced Long QT syndrome are well recognized. Recently, our laboratory has demonstrated that ATP binding cassette (ABC) membrane transporters play a key role in the regulation of intracellular drug accumulation and cardiac toxicity. Knowing that gender-associated differences in transport processes exist, we investigated if down regulation or inhibition of efflux ABC transporters could favour accumulation of drugs in female cardiac myocytes which would promote drug actions such as block of ion channels. Modulation of cardiac ABC transporters was accomplished by pre-treating male and female guinea-pigs for 5 days with verapamil. Duration of monophasic action potential duration measured at 90% repolarization (MAPD<sub>90</sub>) was evaluated at baseline and following a 5 minute perfusion period with cisapride (50 nM). Intracellular cisapride concentrations were evaluated in myocytes of pre-treated animals using an HPLC method. MAPD<sub>90</sub> was prolonged by cisapride 17±5 msec in male but 22±6 msec in female hearts from vehicle pre-treated animals. In contrast, a much greater increase in MAPD<sub>90</sub> was noticed in hearts isolated from animals pre-treated with verapamil (11.6 mg/kg/day). Indeed, MAPD<sub>90</sub> was prolonged 28 ± 6 msec in male but 42 ± 7 msec in female hearts (p<0.001). Additional experiments were conducted to demonstrate increase in intracellular concentrations of cisapride in pre-treated animals. Cisapride concentrations were 13 ± 4 and 16 ± 3 ng/mg protein in control male and female hearts, respectively. Much higher concentrations of cisapride were observed in hearts from

pre-treated animals with verapamil (11.6 mg/kg/day): intracellular concentrations were  $21 \pm 3$  and  $29 \pm 2$  ng/mg protein, respectively ( $p < 0.01$ ). Results obtained in our study demonstrate that ABC membrane transporter activity modulates  $I_{Kr}$  block by non-antiarrhythmic agents such as cisapride. Our studies identify for the first time ABC transporters as a key determinant of mechanisms underlying sex-related differences in drug-induced Long QT syndrome.

## Introduction

Drugs that prolong cardiac repolarization induce lengthening of the QT interval on the electrocardiogram and are associated with the occurrence of a polymorphic ventricular arrhythmia known as torsades de pointes. Torsade de pointes (TdP) were first described by the French cardiologist, Dessertenne in 1966 <sup>1</sup>. It was named after its characteristic electrocardiographic pattern, that is, “twisting of the points” of the QRS. The trademark for TdP is prolonged QT and QTc intervals immediately before the arrhythmic event occurs. The first cases reported of QT prolongation were seen in patients treated with the antiarrhythmic drug quinidine <sup>2</sup>. Clinical cases of TdP later showed to occur with many other drugs and in patients with congenital prolongation of the QT interval on the electrocardiogram. Most QT prolongation and TdPs have been shown to occur 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 <sup>3</sup>. Another important predisposing factor for TdP and prolonged QT intervals is gender. In fact, women are known to have longer cycle length dependent QT interval than men. This may contribute to their increased risk to cardiac arrhythmias such as TdPs in comparison with men.

It has been known for more than half a century that the QT interval tends to be longer in adult females than in males <sup>4</sup>. In 1993, Makkar <sup>5</sup> published an analysis of the gender distribution of 332 cases of TdP induced by antiarrhythmic drugs. The results of this study clearly demonstrated that women were at an increased risk of developing TdP. Larger studies with the d-isomer of sotalol also found female gender as the major risk factor associated with increased risk of arrhythmia in a post-myocardial infarction

population <sup>6</sup>. The mechanism 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 <sup>4</sup>. 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 60 <sup>1</sup>. These evidences led to the hypothesis that sex steroids are the cause for the prolonged QTc observed. In fact, studies have demonstrated that there is an important down regulation of mRNA concentrations encoding for the IsK and KV 1.5 potassium genes when ovariectomized rabbits were treated with 17 $\beta$ -estradiol or dihydrotestosterone (DHT) <sup>7</sup>. A more recent study has indicated that menstrual cycle differences exist in QTc responses to ibutilide with the greatest increase in QTc during menses and ovulation of the menstrual cycle <sup>8</sup>. These results provide strong evidence that sex hormones can modulate the expression of ion channels. However, scientists agree that mechanisms responsible for gender-related differences in the risk of proarrhythmia from drugs remain largely undefined.

On the other hand, some researchers have tried to explain drug induced long QT syndrome while examining sex differences in the pharmacokinetics of drugs. It as been shown that the activity of the hepatic enzyme CYP3A4 which is often involved in the metabolism of drugs that prolong repolarization, is higher in women than in men <sup>9</sup>. 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 humans <sup>10-13</sup>. 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 genders <sup>14</sup>.

Very few studies have looked at the potential for gender-related differences in transport of drugs to the heart. Recently, we have obtained results indicating that transporters are present in cardiac ventricular tissue and that its modulation can potentiate the electrophysiological effects of an  $I_{Kr}$  blocker, cisapride. Based on these results, we hypothesized that modulation of the activity of ABC transporters could alter effects of cisapride on cardiac repolarization more greatly in female than in male guinea pigs. The purpose of the present study was to determine if the activity of ABC transporters could explain, in part, the increased susceptibility of women to cardiac toxicity.



## **Methods**

Experiments were performed in accordance with institutional guidelines of the University of Montreal on animal use in research. Animals were housed, maintained and treated in compliance with the Guide to the care and use of experimental animals of the Canadian Council on animal care.

## **Reagents**

Sodium hydroxyde pellets and ammonium acetate were obtained from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, United States) while acetonitrile (HPLC grade) and *tert*-butyl methyl ether were obtained from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, United States). Cisapride was a gift from Janssen-Ortho (Toronto, Ontario, Canada). Solutol<sup>®</sup> HS 15 was obtained from BASF (Ludwigshafen, Germany). All other reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, United States).

## **Pre-treatment with verapamil**

Male and female Hartley guinea pigs (n=8 per group, per sex; weight, 250 to 300 g; Charles River Laboratories, Montreal, Quebec, Canada) were given verapamil 0, 1.5, 4.8, 8.2, 11.6, 15 mg/kg once daily subcutaneously for a five day period. Female guinea pigs did not receive the 15 mg/kg dose. The last injection was given 12 hours prior to heart isolation and the conduct of electrophysiological studies.

## *Experiments with buffer-perfused guinea pig isolated hearts*

Heart isolation, Langendorff perfusion technique and electrophysiological measurements have been described previously<sup>15</sup>. Briefly, hearts were perfused at 37°C during a control

period of 10 minutes to assess the stability of the monophasic action potential signal. Thereafter, perfusion was performed for 6 minutes with Krebs-Henseleit buffer containing cisapride 50 nM. Perfusion with buffer containing no drug was then restarted to assess reversal of drugs effects. Monophasic action potentials from the left ventricle were recorded at a basic cycle length of 250 msec by a pressure-maintained action potential catheter throughout the experiment (Langendorff probe model 225, EP Technologies Inc, Sunnyvale, CA, United States) every 30 seconds for a duration of 1 second.

#### **Determination of verapamil concentrations in cardiac tissue**

Concentrations of verapamil in cardiac tissue were evaluated in hearts isolated from animals (n=4) following a 5 day pre-treatment (15 mg/kg/day) period. Hearts were extirpated, cannulated and retrogradely perfused via the aorta with Krebs-Henseleit buffer containing no drug for a 10 minute period. Heart ventricle samples (100 mg) were then collected and homogenized in 1 mL of Krebs-Henseleit buffer for quantification of verapamil concentrations by HPLC.

#### **HPLC analysis of verapamil**

A slightly modified HPLC method was used to evaluate verapamil concentrations <sup>16</sup>. Briefly, a stock solution of verapamil was prepared in Krebs-Henseleit buffer by dissolving 10 mg of verapamil in 10 mL of Krebs-Henseleit buffer. A stock solution of imipramine (10 µg/mL), used as internal standard, was prepared in distilled water. A calibration curve of verapamil was constructed using five concentrations (12.5, 25, 50, 100, 200 ng/mL) made by further diluting the stock solution with appropriate volumes of

Krebs buffer. An amount of 100 mg of ventricular tissue from untreated animals was added to each calibration point. Liquid-liquid extraction of samples from the calibration curve or from tissue samples from pre-treated animals with verapamil was performed following addition of the internal standard (125 ng/mL), 125  $\mu$ L of sodium perchlorate 1M adjusted to pH 12 with NaOH and 6 mL *tert*-butyl methyl ether. The samples were vortexed and centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes. The organic supernatant was transferred to another tube and was evaporated to dryness under nitrogen. The extraction residue was dissolved in 100  $\mu$ L of acetonitrile for chromatography.

The HPLC system (Thermo Finnigan, San Jose, CA, United States) consisted in a Spectra System P4000 chromatographic pump, a AS3000 automatic injector, a UV3000 ultraviolet detector and a PC1000 spectra system computer interface controller. The column was a Beckman Ultrasphere C8, 250 mm x 4.6 mm (Fullerton, CA, United States), maintained at 25°C. Separations were conducted using a mobile phase of acetonitrile and 0.05 M ammonium acetate (68:32). The mobile phase was filtered under vacuum through a 0.45  $\mu$ M pore size membrane filter before use. The flow rate was set at 1 mL/min and the detection wavelength was set at 238 nm. Retention time of verapamil was 6.5 minutes while that of imipramine was 16.5 minutes. Detection limit of verapamil was 6 ng/mL.

#### **Determination of cisapride intracellular concentrations in isolated cardiac myocytes**

Male and female guinea pigs were pre-treated with verapamil (0, 4.8 or 11.6 mg/kg/day; n=36) for 5 days. Twelve hours after the last dose, cardiac myocytes were isolated from

the heart of these animals by use of a previously described enzymatic dissociation technique<sup>15</sup>. Isolated cells were incubated (6 incubations were performed for each heart) in 2 mL of Tyrode's solution containing 100 ng/mL cisapride (10 µL of a stock solution) for 3 hours at 37°C. Cisapride stock solution was prepared in 0.1% solutol<sup>®</sup> HS 15 solution by dissolving 10 mg of cisapride in 1 mL solutol<sup>®</sup> HS 15 and diluted to 1 L with distilled water. Following the incubation period, isolated cells were centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes. The supernatant was discarded and the cells were washed with 2 mL of fresh Tyrode's solution. One part was kept for the determination of intracellular cisapride concentration while the other was utilized for protein quantification.

#### **HPLC analysis of cisapride**

Determination of cisapride concentrations in cardiac cells was performed according to a slightly modified HPLC method<sup>17</sup>. The HPLC pump, injector, detector and computer interface controller were the same as those described previously. The column was a Thermo-Hypersil-Keystone BDS C18, 250 mm x 4.6 mm, and was maintained at 25°C. Separation was conducted using a mobile phase consisting of acetonitrile and 0.05 M potassium dihydrogen phosphate (48:52) adjusted to pH 5.5 with NaOH 1 M. Triethylamine (0.04 M) was added. The mobile phase was filtered under vacuum through a 0.45 µM pore size membrane filter before use. The flow rate was set at 1 mL/min and the detection wavelength was set at 276 nm.

Isolated cardiac myocytes incubated with cisapride were extracted with 5 mL of butylchloride-isopropanol solution (95:5) following the addition of the internal standard (metoclopramide 100 µL; 10 mg/L stock solution) and 1 mL of NaOH 2 M. The organic

supernatant was removed and evaporated under nitrogen at 37°C. The extraction residue was dissolved in 100 µL acetonitrile prior to injection into the chromatograph.

### **Protein Quantification**

To correct for the exact amount of tissue assayed in experiments conducted for the determination of cisapride concentrations, proteins were quantified using the BCA protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL, United States). Briefly, 1µL of each unknown sample (myocytes or homogenized heart tissue) was added to 1 mL of BCA working reagent. The mixture was incubated 1 hour at room temperature. The absorbance of each test tube was measured at 562 nm. A standard curve was constructed with 5 bovine serum albumine standards to determine the protein concentration of each unknown sample.

### **Statistical analysis**

Only hearts with reversal of cisapride effects on reperfusion with buffer containing no drug were included in the analysis. Prolongations of MAPD<sub>90</sub> by cisapride as a function of the dose of verapamil, as well as the intracellular concentrations of cisapride in ventricular myocytes were compared by ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test. Level of statistical significance was set at  $p < 0.01$ .

## Results

### Experiments with isolated buffer-perfused guinea pig hearts

Typical examples of monophasic action potentials recorded at baseline and during perfusion of cisapride 50 nM in male guinea pig hearts at a pacing cycle length of 250 msec are illustrated in figure 1A. In this example, MAPD<sub>90</sub> determined in a heart isolated from an animal pre-treated with vehicle was prolonged 17 msec by cisapride 50 nM. In contrast, MAPD<sub>90</sub> was prolonged 42 msec ( $p < 0.01$ ) in a heart isolated from an animal pre-treated with verapamil (15 mg/kg/day for 5 days). Data obtained from each male pre-treated heart with 0, 1.5, 4.8, 8.2, 11.6 and 15 mg/kg/day verapamil are shown in figure 1B. Figure 1C shows data obtained from each female pre-treated hearts (0, 1.5, 4.8, 8.2 and 11 mg/kg/day). An increase in MAPD<sub>90</sub> was noticed in all hearts tested during perfusion of cisapride 50 nM. The increase in MAPD<sub>90</sub> in female hearts tends to be greater than in male hearts.

Dose-dependent effects are observed with verapamil pre-treatment on the increase in MAPD<sub>90</sub> prolongation produced by cisapride 50 nM (figure 2) in female animals ( $F = 165.9$ ,  $p = 3.1E-22$ ). Male animals have an MAPD<sub>90</sub> prolongation, which has a tendency to follow the dose ( $F = 59.8$ ,  $p = 5.2E-18$ ). MAPD<sub>90</sub> prolongations in male guinea pigs were previously described<sup>22</sup> and results from these studies were used to compare against the female MAPD<sub>90</sub> values. Prolongation of MAPD<sub>90</sub> increased to a maximum observed after a dose of verapamil 15 mg/kg/day for 5 days. Female pre-treated animals also showed a dose-dependent effect on the increase in MAPD<sub>90</sub> with cisapride. Female pre-

treated animals show statistically greater MAPD<sub>90</sub> prolongation than male at 4.9, 8.2 and 11.6 mg/kg/day ( $p < 0.01$ ).

### **Verapamil residual concentration in pre-treated hearts**

Verapamil residual concentrations found in cardiac tissues 12 hours after the last dose of a pre-treatment period were investigated to assure that effects observed were not related to direct modulation by verapamil of block of I<sub>Kr</sub>. After a five day pre-treatment at the highest verapamil dose (15 mg/kg/day), verapamil could not be detected in any heart tested with the assay used which possessed a detection limit of 6 ng/mL.

### **Intracellular concentrations of cisapride.**

To evaluate effects of ABC transporter modulation on intracellular accumulation of I<sub>Kr</sub> blockers, we incubated cardiomyocytes isolated from male and female guinea pigs pre-treated with vehicle or verapamil (4.9 and 11.6 mg/kg/day) in the presence of cisapride (100 ng/mL). Cardiomyocytes from pre-treated animals showed a significantly greater intracellular cisapride concentration than cardiomyocytes isolated from guinea pigs pre-treated with vehicle (males;  $F = 20.02$ ,  $p = 1.36E-5$ , females;  $F = 47.6$ ,  $p = 1.58E-8$ ). Indeed, for vehicle, 4.9 and 11.6 mg/kg/day verapamil pre-treated guinea pigs, we observed concentrations of  $12.9 \pm 2.7$ ,  $15.9 \pm 1.2$  and  $21.1 \pm 2.6$  ng/mg proteins respectively in males versus  $15.5 \pm 2.8$ ,  $21.4 \pm 0.9$  and  $29.3 \pm 2.3$  ng/mg proteins in females ( $p < 0.01$  vs males at 4.9 and 11.6 mg/kg/day). In addition to having significantly

greater intracellular cisapride concentrations than male animals, females have a significantly greater increase from cardiomyocytes pre-treated with vehicle to myocytes pre-treated with 4.9 mg/kg/day verapamil ( $p < 0.01$ ) compared to males.

## **Discussion**

Results obtained in this study identify for the first time ABC transporters as a key determinant of mechanisms underlying sex-related differences in drug-induced Long QT syndrome. Indeed, we demonstrate that pre-treatment of guinea-pigs with verapamil potentiates the cardiac electrophysiological effects of cisapride more greatly in females than in male guinea pigs. We have shown that 1) Prolongation of cardiac repolarization by cisapride in isolated guinea pig hearts was significantly augmented when animals were pre-treated with the ABC transporter modulator, verapamil 2) This prolongation was significantly greater in female animals 3) Pre-treatment effects of verapamil had a tendency to follow the dose (1.5 to 15 mg/kg/day) in both sexes; 4) Verapamil was not present at significant levels in the hearts of pre-treated animals 12 hours following the last pre-treatment dose and during electrophysiological studies 5) Intracellular concentrations of cisapride were significantly greater in myocytes from female pre-treated animals than male. These results strongly suggest that the activity of ABC transporters was down-regulated in cardiac ventricular myocytes of both sexes following pre-treatment with verapamil. Our results indicate that intracellular concentrations of the drug or access to its binding site on  $I_{Kr}$  were increased, and this, more greatly in females. Therefore, we propose that verapamil pre-treatment down-regulates the activity or expression of ABC transporters which results in a potentiation of cisapride electrophysiological effects. This effect is greater in female animals which suggest that



ABC transporters play an important role in the greater QT prolongation differences found in drug-induced Long QT syndrome in women.

MAPD<sub>90</sub> prolongation was determined in isolated hearts from male and female animals pre-treated with verapamil. Our study demonstrates that MAPD<sub>90</sub> prolongation is significantly greater when the animals were pre-treated with verapamil. In fact, several studies have used verapamil as a multidrug resistance modulator and have shown that it can alter the pharmacokinetics of many other drugs that are transported by P-glycoprotein<sup>18,19</sup>. In the present study, experiments were designed not to look at the effects of direct competitive inhibition of ABC transporters on I<sub>Kr</sub> block but rather at the effect of a modulation of their activity following pre-treatment with verapamil. In brief, experiments were based on the premise that 1) intracellular concentrations of several non-cardiovascular drugs that are also I<sub>Kr</sub> blockers may be a major determinant of drug actions on ion channels, 2) P-gp and ABC transporters may be capable of transporting several of these drugs are present in cardiac myocytes and 3) Gender-associated differences in transport processes for endogenous and exogenous substrates have been reported in various organs of the body for rats, mice and humans<sup>10-13</sup>. In fact, we observed that MAPD<sub>90</sub> prolongation is significantly greater in female pre-treated animals suggesting that the expression or the activity of ABC transporters is distinct from males. Furthermore, our study demonstrates that intracellular concentrations of cisapride were almost doubled in myocytes isolated from hearts of animals pre-treated with verapamil. This accumulation was significantly greater in female cardiomyocytes supporting once again that the expression or activity of ABC transporters was modulated. .

Many studies have tried to explain gender based differences in the QT interval by looking at sex steroids. It was found that ovariectomy in rabbits produces a shorter QT interval and that both estradiol and dihydrotestosterone can lengthen the QT interval by about 15%<sup>7</sup>. It was also shown that the hormone induced lengthening of the QT interval was associated with a down regulation of the expression of mRNA for  $I_{sK}$  and HK2 potassium channels<sup>7</sup>. Others have observed that during the menstrual cycle, there are differences in the QTc response to ibutilide with the greatest increase in QTc corresponding to the first half of the menstrual cycle<sup>8</sup>. They observed a 38% prolongation during the menses phase compared to the luteal phase of the cycle. The first half of the cycle is known to have lower estradiol, progesterone and testosterone concentrations. Recently, Hulot et al. looked more specifically at the effect of estradiol on ventricular repolarization within the physiological concentration range of this hormone<sup>20</sup>. No significant change in QT interval duration was observed within the range of E2 variation found in the menstrual cycle. Moving away from the effects of sex steroids, it was observed that female rabbit ventricular myocytes have significantly lower  $I_{Kr}$  and  $I_{K1}$  outward current densities than do male cells<sup>21</sup>. This could also explain for the gender based differences found in drug induced long QT syndrome. We can agree from these observations that females have greater QT prolongation than males but the mechanism by which it is accomplished is still not well understood. Our study is novel in the sense that we identify for the first time ABC transporters as a key determinant of mechanisms underlying sex-related differences in drug-induced Long QT syndrome. The degree of prolongation of cardiac repolarization associated with a drug depends on 1) its plasma concentration, 2) its biotransformation capacity, CYP activity 3) the coadministration of other drugs causing pharmacokinetic and/or

pharmacodynamic interactions and on 4) its intracellular concentration. Therefore, ABC transporters expression can play a major role in increasing intracellular  $I_{Kr}$  blocker concentrations which will lead to greater action potential prolongation and an increased risk of torsades de pointes. In fact, we found that monophasic action potential prolongation by cisapride was more than 50% greater in female guinea-pigs after a verapamil pre-treatment. This increase is greater than anyone seen with sex steroids or with drugs alone. Based on these results, ABC transporters should be considered as another contributor to greater intra-cardiac concentrations of  $I_{Kr}$  blockers and greater QT prolongation in female hearts.

**Conclusion**

Results obtained in this study demonstrate that intracellular concentrations of an  $I_{Kr}$  blocker can be altered in the presence of an ABC transporter modulator, verapamil. Modulation is greater in female animals which lead to greater intra-cellular concentration of  $I_{Kr}$  blockers that prolong cardiac repolarization. ABC transporters should therefore be considered part of the mechanism leading to greater QT interval prolongation in women.

## References

1. Dessertre F. Ventricular tachycardia with 2 variable opposing foci. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1966; 59:263
2. Selzer A, Wray HW. Paroxysmal ventricular fibrillation occurring during treatment of chronic atrial arrhythmias. *Circulation* 1964; 30:17
3. Roden DM. Torsade de pointes. *Clin Cardiol* 1993; 16:683-686.
4. Bazett HC. An analysis of the time relationship of electrocardiograms. *Heart* 1920; 7:353-370.
5. 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; 270:2590-2597.
6. Waldo AL, Camm AJ, deRuyter H, Friedman PL, MacNeil DJ, Pauls JF, et al. Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. *Lancet* 1996; 348:7-12.
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; 94:1471-1474.
8. Rodriguez I, Kilborn MJ, Liu XK, Pezzullo JC, Woosley RL. Drug-induced QT prolongation in women during the menstrual cycle. *JAMA* 2001; 285:1322-1326.

9. Hunt CM, Westerkam WR, Stave GM. Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A. *Biochem Pharmacol* 1992; 44:275-283.
10. Morris ME, Lee HJ, Predko LM. Gender differences in the membrane transport of endogenous and exogenous compounds. *Physiol Rev* 2003; 55:229-240.
11. Kleinman LI, Loewenstein MS, Goldstein L. Sex difference in the transport of *p*-aminohippurate by the rat kidney. *Endocrinology* 1966; 78:403-406.
12. Orzes N, Bellentani S, Aldini R, Simoni P, Ferretti I, Lunazzi GC, et al. Sex differences in the hepatic uptake of sulphobromophthalein in the rat. *Clin Sci* 1985; 5:587.
13. Anton FM, Garcia PJ, Ramos T, Gonzalez P, Ordas J. Sex differences in uric acid metabolism in adults: evidence for a lack of influence of estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) on the renal handling of urate. *Metabolism* 1986; 35:343-348.
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; 275:1011-1018.
15. 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; 97:204-210.
16. Campanero MA, Escolar M, Arango MA, Sadaba B, Azanza JR. Development of a chromatographic method for the determination of saquinavir in plasma samples of HIV patients. *Biomedical Chromatography* 2002; 16:7-12.

17. Simard C, O'Hara GE, Prévost J, Guilbaud R, Massé R, Turgeon J. Study of the drug-drug interaction between simvastatin and cisapride in man. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2001; 57:229-234.
18. Leu BL, Huang JD. Inhibition of intestinal P-glycoprotein and effects on etoposide absorption. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1995; 35:432-436.
19. Terwogt JMM, Beijnen JH, ten Bokkel Huinink WW, Rosing H, Schellens JHM. Co-administration of cyclosporin enables oral therapy with paclitaxel. *Lancet* 1998; 352:285
20. Hulot JS, Démolis JL, Rivière R, Strabach S, Christin-Maitre S, Funck-Brentano C. Influence of endogenous oestrogens on QT interval duration. *Eur Heart J* 2003; 24:1663-1667.
21. Liu XK, Katchman A, Drici MD, Ebert SN, Ducic I, Morad M, et al. Gender difference in the cycle length-dependent QT and potassium currents in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285:672-679.
22. Morissette P, Morin N, Turgeon J. Cardiac electrophysiological effects of an  $I_{Kr}$  blocker are influenced by P-glycoprotein modulation. *Can J Clin Pharm* 2003; 10 (3): 153 [abstract].

**Figure legends**

**Figure 1.** *Panel A* shows monophasic action potential signals recorded at baseline and after 6 minutes of cisapride 50 nM for vehicle (control) and verapamil pre-treated guinea pigs. *Panel B* shows MAPD<sub>90</sub> in msec for control and pre-treated guinea pigs at baseline (B) and with 50 nM cisapride in female guinea pig hearts (C). *Panel C* shows MAPD<sub>90</sub> in msec for control and pre-treated guinea pigs at baseline (B) and with 50 nM cisapride in male guinea pig hearts (C)

**Figure 2.** Prolongation of MAPD<sub>90</sub> by cisapride 50 nM as a function of the dose of verapamil used for a five day pre-treatment period in male and female guinea pig hearts (n=8 for each dose).

**Figure 3.** Intracellular concentrations of cisapride in ventricular cardiac myocytes isolated from hearts of female and male animals pre-treated with vehicle or verapamil 11.6 mg/kg/day (n=6 animals for each treatment group; 6 incubations were performed with cells isolated from each heart).



Figure 1

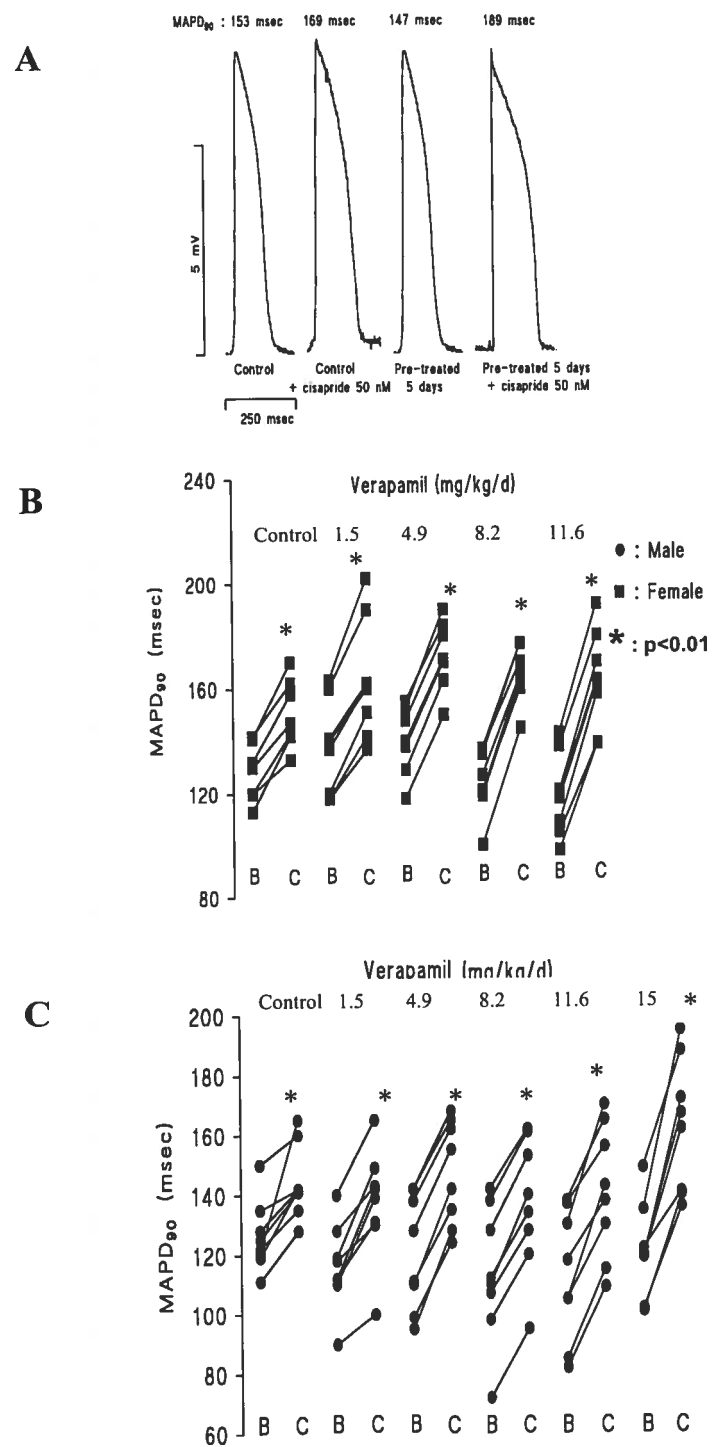


Figure 2

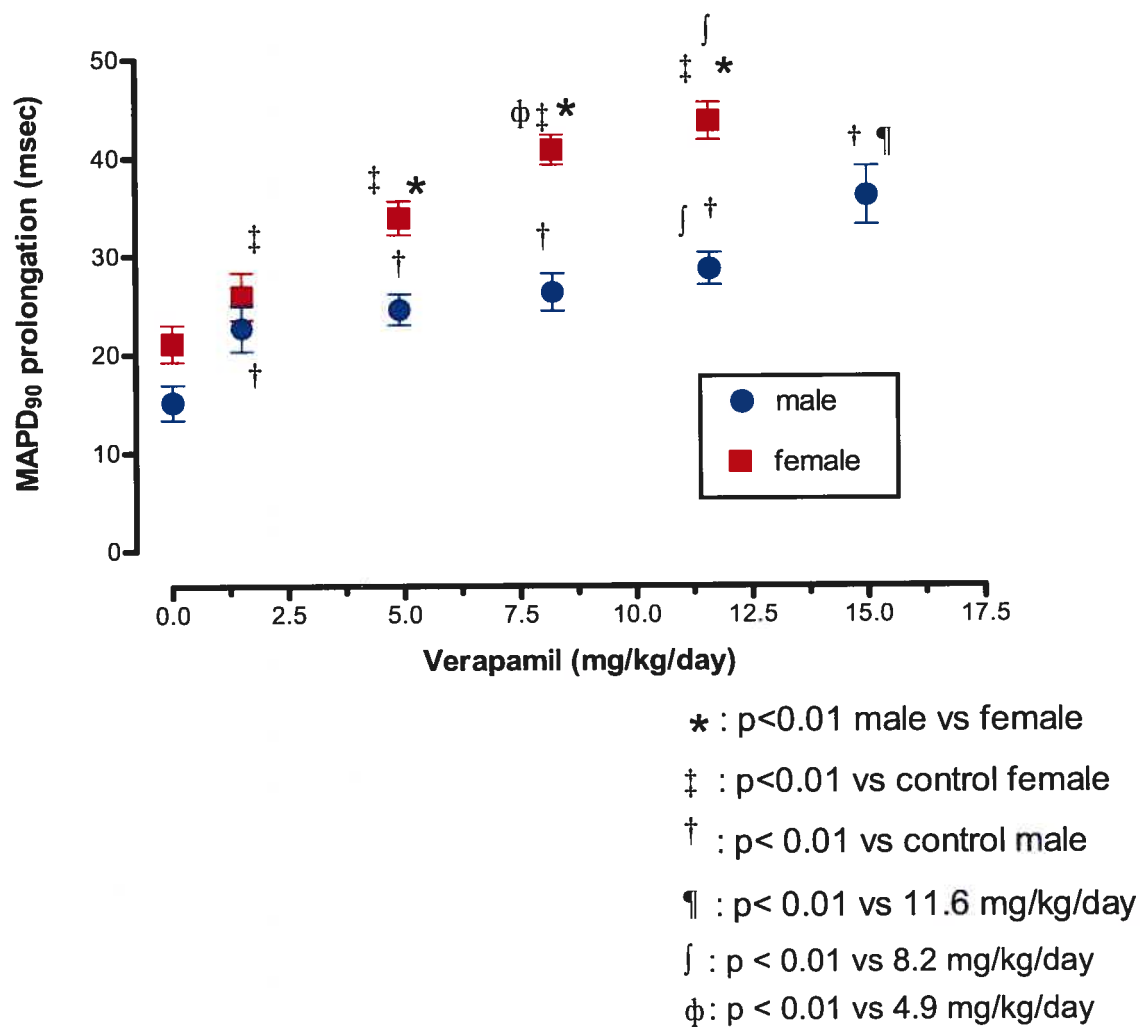
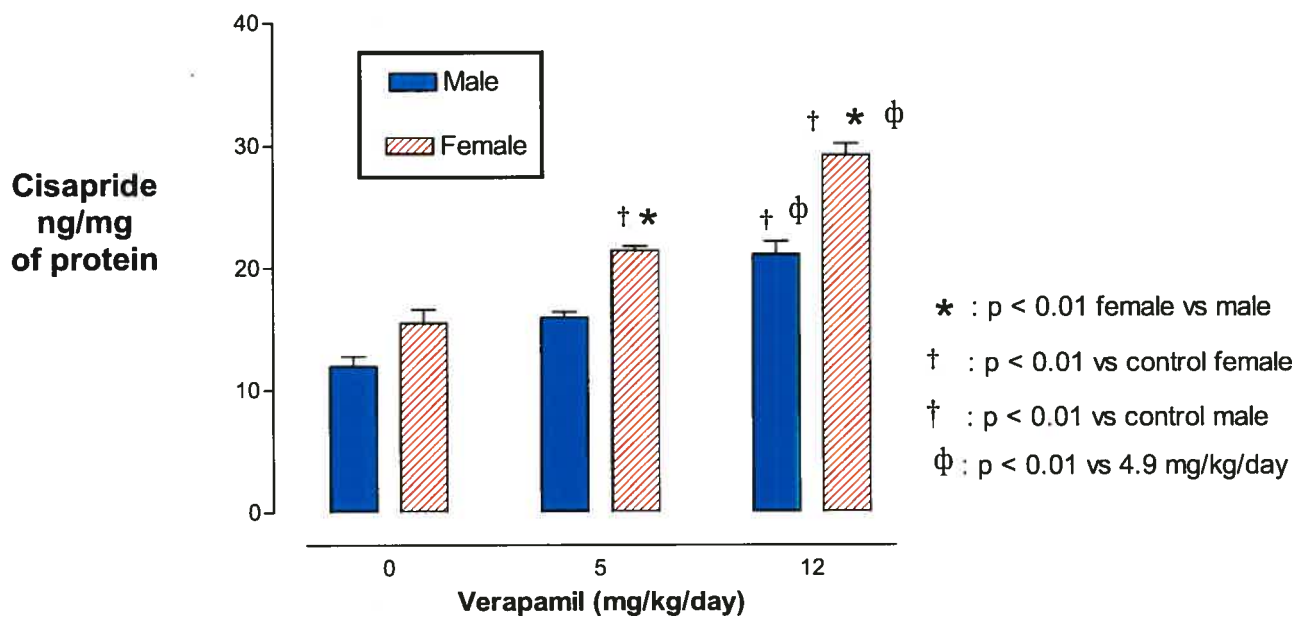


Figure 3



**CHAPITRE V****OLANZAPINE (ZYPREXA®) PROLONGS CARDIAC  
REPOLARIZATION BY BLOCKING THE RAPID COMPONENT  
OF THE DELAYED RECTIFIER POTASSIUM CURRENT**

**Olanzapine (Zyprexa<sup>®</sup>) prolongs cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current.**

Pierre Morissette<sup>1</sup>, Raymond Hreiche<sup>1</sup>, Louise Mallet<sup>1</sup>, Dean Vo<sup>2</sup>, Edward E Knaus<sup>2</sup>, Jacques Turgeon<sup>1</sup>.

1. Faculty of Pharmacy, Université de Montréal.
2. Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical sciences, University of Alberta.

**Acknowledgements:** P. Morissette is the recipient of a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). R. Hreiche is the recipient of a studentship from a Valorisation Recherche Québec (VRQ) initiative. The laboratory is supported by the Heart and Stroke Foundation of Québec, the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

**Running Title:** Olanzapine blocks  $I_{Kr}$

**Address for correspondence:** Jacques Turgeon, PhD  
Faculté de Pharmacie, Université de Montréal  
C.P. 6128 succursale Centre-Ville  
Montréal, Québec, Canada  
H3C 3J7  
Tel: (514) 343-6440  
Fax: (514) 343-7377

## Résumé

**Introduction:** Plusieurs cas de prolongation de l'intervalle QT furent observés au cours d'un traitement à l'olanzapine, un agent antipsychotique. Récemment, un cas impliquant l'olanzapine fut porté à notre attention. Un homme de 84 ans a été amené à l'urgence avec des symptômes de fièvre, vomissements, et des antécédents d'hypertension, de défaillance rénale chronique, de goutte, dépression, arthrite temporale, hypothyroïdie et souffrant aussi d'une insuffisance cardiaque avec une fraction d'éjection de 35%, d'une maladie coronaire et d'une insuffisance en vitamine B12. À son arrivée à l'hôpital, les médicaments suivants ont été prescrits : furosémide 40 mg/jour, fosinopril 20 mg/jour, clopidrogel 75 mg/jour, prednisone 5 mg/jour, allopurinol 100 mg/jour, citalopram 20 mg/jour, oméprazole 20 mg/jour, tamsulosine 0.4mg/jour, lévothyroxine 0.088mg/jour, métoprolol 25 mg 2 fois/jour, olanzapine 2.5 ,g/jour, alendronate 70 mg une fois par semaine le dimanche, carbonate de calcium 500 mg 2 fois/jour et de la vitamine D 400U deux fois par jour. Le patient n'est pas connu pour avoir des allergies. Les analyses de laboratoire étaient toutes dans les valeurs normales à part la valeur sérique de la créatinine de 177 mmol/l. Aucune anormalité électrolytique n'était détectable. La valeur de clairance de la créatinine calculée utilisant la formule de Cockcroft et Gault était de 31 ml/min. Les tropines étaient modérément élevées à 0,25. Un diagnostic d'uroseptisme provoqué par une infection à la *Klebsiella pneumonia* a été établi.

Une heure suite à son arrivée à l'urgence, ce patient a été retrouvé sans pulsation cardiaque. L'électrocardiogramme a montré un allongement à l'onde QT de 539 msec et un QTc de 586. Des répétitions de torsades de pointes ont été enregistrées. Une cardioversion a été requise suivie d'une administration intra veineuse de sulfate de

magnésium et une administration d'amiodarone per os. Suite à cette intervention, le patient a su récupérer et a été traité pour son infection du tractus urinaire.

L'olanzapine a été prescrite, trois mois précédant l'admission de ce patient à l'hôpital. L'olanzapine a été cessée suite à aux épisodes de torsades subites par ce patient car un lien a été proposé entre l'utilisation d'olanzapine et la présence de torsades de pointe. Après trois mois sans olanzapine, ce patient a subi un électrocardiogramme qui a démontré un intervalle QTc de 500. En ce moment ce patient reçoit de l'amiodarone 200mg/jour en combinaison avec d'autres médicaments.

Suite à ce cas et aux autres cas déjà publiés, nos objectifs étaient de 1) de caractériser les effets de l'olanzapine sur la repolarisation cardiaque et 2) d'évaluer les effets de l'olanzapine sur un important courant potassique sortant impliqué dans la repolarisation cardiaque ( $I_{Kr}$ ).

**Méthode et résultats :** Des cœurs de cobayes isolés ( $n=40$ ) ont été stimulés à différents cycles de stimulation (150 à 250 msec) et soumis à des concentrations d'olanzapine variant de 1 à 100  $\mu\text{mol/L}$ . L'olanzapine a augmenté la durée du potentiel d'action monophasique mesurée à 90% de repolarisation ( $\text{MAPD}_{90}$ ), de façon concentration-dépendante; de  $6.7 \pm 0.7$  à 3  $\mu\text{mol/L}$  mais de  $26.0 \pm 4.3$  à 100  $\mu\text{mol/L}$  (cycle de stimulation 250 msec). L'augmentation de la  $\text{MAPD}_{90}$  est également inversement proportionnelle à la fréquence de stimulation; l'olanzapine 30  $\mu\text{mol/L}$  augmente la  $\text{MAPD}_{90}$  de  $27.0 \pm 2.1$  msec à un cycle de stimulation de 250 msec, mais de  $18.9 \pm 2.2$  msec à un cycle de stimulation de 150 msec. Des expériences de patch-clamp dans des cellules HEK293 transfectées avec le gène HERG ont démontré que l'olanzapine bloque la composante

rapide du courant potassique rectifiant retardé ( $I_{Kr}$ ). Le courant de queue a été réduit de 50% par l'olanzapine à 3.9  $\mu\text{mol/L}$ .

**Conclusion :** L'olanzapine possède des effets électrophysiologiques cardiaques similaires à ceux du cisapride et des antiarythmiques de classe III. Ces effets peuvent être observés à des concentrations retrouvées lorsque l'élimination du médicament est compromise : en présence d'insuffisance rénale ou hépatique, durant la coadministration d'un autre substrat/inhibiteur du CYP3A, ou après un surdosage. Ces observations offrent une nouvelle explication potentielle aux prolongations de l'intervalle QT suite à l'utilisation de l'olanzapine.



## Abstract

**Introduction:** Recently many cases have been observed in patients presenting prolongation of the QT interval that appeared to be related to treatment with the antipsychotic agent olanzapine. Our objectives were to 1) characterize the effects of olanzapine on cardiac repolarization and 2) evaluate effects of olanzapine on a major time-dependent outward potassium current involved in cardiac repolarization, namely  $I_{Kr}$ .

**Methods and results:** Isolated, buffer-perfused guinea pig hearts (n=40) were stimulated at different pacing cycle lengths (150-250 msec) and exposed to olanzapine at concentrations ranging from 1 to 100  $\mu$ M. Olanzapine increased monophasic action potential duration measured at 90% repolarization (MAPD<sub>90</sub>) in a concentration-dependent manner by  $6.7 \pm 0.7$  msec at 3  $\mu$ M but by  $26 \pm 4.3$  msec at 100  $\mu$ M (250 msec cycle length). Increase in MAPD<sub>90</sub> was also reverse frequency-dependent; olanzapine 30  $\mu$ M increased MAPD<sub>90</sub> by  $28 \pm 6.2$  msec at a pacing cycle length of 250 msec but by only  $18.9 \pm 2.2$  msec at a pacing cycle length of 150 msec. Experiments in HERG-transfected HEK293 cells (n=36) demonstrated concentration-dependent block of the rapid component ( $I_{Kr}$ ) of the delayed rectifier potassium current: tail current was decreased 50% at olanzapine 3.8  $\mu$ M.

**Conclusions:** Olanzapine possesses direct cardiac electrophysiological effects similar to those of Class III antiarrhythmic drugs. These effects were observed at concentrations that can be found in conditions of impaired drug elimination such as renal or hepatic insufficiency, during co-administration of other CYP1A2 substrates/inhibitors or after drug overdose. These results offer a new potential explanation for QT prolonging effects observed during olanzapine treatment in patients.

## Introduction

Olanzapine is an atypical antipsychotic of the thienobenzodiazepine class that shows high affinity for the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor. Although structurally and functionally related to clozapine, it possesses a more favourable side-effect profile<sup>1</sup>. The symptoms observed in overdose are somnolence, blurred vision, respiratory depression, hypotension and anticholinergic effects<sup>2</sup>. In recent years, lengthening of the QT interval has been noticed during treatment with olanzapine<sup>3-6</sup>.

Recently, there has been a wide variety of non-cardiovascular drugs, such as histamine-H<sub>1</sub> receptor antagonists, macrolide antimicrobials and the gastrointestinal prokinetic agents cisapride and domperidone that have been associated with QT prolongation and induction of torsades de pointes<sup>7-12</sup>. As well, it has been shown that antipsychotic drugs such as haloperidol, droperidol, pimozide and risperidone can modulate potassium currents involved in cardiac repolarization, and prolong the QT interval<sup>13-16</sup>. Electrophysiological studies have shown that most of the QT prolonging drugs modulate potassium currents involved in cardiac repolarization and possess a high affinity for the rapid component of the delayed rectifier potassium current (I<sub>Kr</sub>). Excessive blockade of I<sub>Kr</sub> carries the risk of predisposing patients to polymorphic ventricular tachyarrhythmia, proarrhythmia and induction of torsades de pointes.

Extrapolation of the currently known electrophysiological mechanisms associated with drug-induced QT prolongation to the clinical observation of olanzapine-induced cardiac toxicity suggests that this agent would modulate cardiac repolarization. Therefore, the goals of the present studies were to evaluate 1) the action potential-lengthening effects

of olanzapine in isolated guinea pig hearts perfused in the Langendorff mode using a monophasic action potential signal measured at 90% repolarization (MAPD<sub>90</sub>) as an index of cardiac repolarization; and 2) the effects of olanzapine on potassium currents involved in repolarization of guinea pig ventricular myocytes and of HEK293 cells expressing high levels of HERG (*human ether-à-gogo-related gene*) current, using the whole cell configuration of the patch-clamp technique.

## Methods

Experiments were performed in accordance with our institutional guidelines on animal use in 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.

### Synthesis of Olanzapine 2-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-4*H*-thieno[2,3-*b*][1,5]-benzodiazepine (9)

The synthesis of olanzapine was carried out using the four step reaction sequence illustrated in Figure 1 according to a reported procedure<sup>18</sup>. Briefly, reaction of propionaldehyde (1) with elemental sulfur (2) and malononitrile (3) gave 2-amino-5-methylthiophene-3-carbonitrile (4, 77%). Subsequent condensation of 4 with 2-fluoronitrobenzene (5) afforded 2-(2-nitroanilino)-5-methylthiophene-3-carbonitrile (6, 65%) which was cyclized to yield 4-amino-2-methyl-10*H*-thieno[2,3-*b*][1,5]benzodiazepine hydrochloride (7) in near quantitative yield. Treatment of 7 with *N*-methylpiperazine (8) afforded the target product olanzapine (9, 63%) as a yellow solid after crystallization from acetonitrile: mp 193°C (lit<sup>18</sup> mp 195°C); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 2.32 (s, 3H, C-2 CH<sub>3</sub>), 2.35 (s, 3H, piperazinyl CH<sub>3</sub>), 2.48-2.51 (m, 4H, piperazinyl H-3, H-5), 3.51-3.55 (m, 4H, piperazinyl H-2, H-6), 4.97 (s, 1H, NH, exchanges with D<sub>2</sub>O), 6.30 (s, 1H, H-1), 6.60 (dd, *J* = 7.3, 1.5 Hz, 1H, H-5), 6.87 (ddd, *J* = 7.3, 7.3, 1.5 Hz, 1H, H-7), 6.98 (dd, *J* = 7.3, 1.5 Hz, 1H, H-8), 7.01 (ddd, *J* = 7.3, 7.3, 1.5 Hz, 1H, H-6). This product, olanzapine (9), was of very high purity since there were no extraneous peaks due to impurities visible in the <sup>1</sup>H NMR spectrum listed above, and it exhibited a single spot on a Mackery-Nagel Polygram Sil G/UV<sub>254</sub> silica gel plate (0.2 mm in

diameter) using either ethyl acetate:ethanol (1:1, v/v;  $R_f = 0.35$ ), or ethyl acetate:methanol (3:2, v/v;  $R_f = 0.44$ ), as development solvent.

## **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). Thirty minutes later, animals were killed by cervical dislocation, and the hearts were rapidly extirpated and immersed in cold (4°C) Krebs-Henseleit buffer containing (mM) glucose 11.2, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, NaCl 118.5, MgSO<sub>4</sub> 2.5, and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 H<sub>2</sub>O. To permit rapid exchange in perfusion solutions, a double "Baker" heart perfusion system (Ealing Scientific Ltd) 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 left 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 recorded on a computer for a duration of 1 second (digital sampling rate, 1 kHz) and stored on hard disk for analysis. Monophasic action potential duration was determined by analyzing all complete beats in the 1-second data file. These values were averaged by use of a routine designed specifically for this purpose and incorporated into the computer program (CVRP97 Cardiovascular Research Partner, Datton System Enr).

### **Protocols**

Hearts were perfused at  $37^{\circ}\text{C}$  via the aorta with Krebs-Henseleit buffer during a control period of 10 minutes to assess the stability of the monophasic action potential signal. Thereafter, perfusion was performed for 6 minutes with Krebs-Henseleit buffer containing olanzapine (1, 3, 10, 30 and  $100\ \mu\text{M}$ ,  $n=8$  per concentration)). Perfusion with buffer containing no drug was then restarted during a 10 minute washout period to assess reversal of drug effects.

To assess reverse frequency-dependent properties, monophasic action potential signals were recorded at a basic cycle length of 250 msec. Then, basic cycle length was changed to 200 msec, and the heart was paced for 1 minute before the monophasic action potential signal was recorded. The same procedure was repeated for the cycle length of stimulation of 150 msec. Thereafter, perfusion was performed with Krebs-Henseleit buffer containing olanzapine  $10\ \mu\text{M}$  for a period of 6 minutes. Monophasic action potential signals were recorded again at basic cycle lengths of 250, 200, and 150 msec.

Perfusion with Krebs-Henseleit buffer containing no drug was then restarted to assess reversibility of drug effects.

### **Statistical Analysis**

Only hearts with reversal of olanzapine effects on reperfusion with buffer containing no drug were included in the analysis. Data on the magnitude of olanzapine effects were analyzed with a Student's paired *t* test. Frequency-dependent effects were compared with an ANOVA test combined with a bonferoni post-hoc test. All values are expressed as mean±SD. Statistical significance was set at  $p<0.05$ .

### **Patch-clamp experiments**

#### **Preparation of guinea pig ventricular myocyte solutions**

Experiments were performed on single ventricular myocytes obtained from adult guinea pig hearts by use of an enzymatic dissociation technique. All solutions used during the cell isolation procedure were oxygenated and maintained at 37°C. The hearts were mounted on a Langendorff apparatus and retroperfused for 5 minutes with solution A containing (mM) NaCl 132, KCl 4.8, MgCl<sub>2</sub> 1.2, HEPES 10, glucose 5, and CaCl<sub>2</sub> 1.8; pH was adjusted to 7.45 with NaOH. The hearts were then rinsed for 2 minutes with a calcium-free solution (solution B) containing (mM) NaCl 132, KCl 4.8, MgCl<sub>2</sub> 1.2, HEPES 10, and glucose 5; pH was adjusted to 7.45 with NaOH. At the end of this period, perfusion with a low-sodium/high-potassium HEPES-buffered solution (solution C, in mM: NaCl 29, KCl 4.8, potassium glutamate 128, MgCl<sub>2</sub> 1.2, HEPES 10, and glucose 5; pH was adjusted to 7.45 with KOH) containing collagenase (final

concentration, 300 U/mL; Boehringer) was started and continued until the system pressure dropped to 15 mm Hg (≈15 minutes). Hearts were then perfused for 3 minutes with a solution (collagenase-free) made of a mixture of solution C and solution A (85:15) containing 0.3 mM CaCl<sub>2</sub>. Hearts were finally perfused with a solution made of 60% solution C and 40% solution A containing 0.75 mM CaCl<sub>2</sub>. At this point, the ventricles were cut down and minced slightly. After centrifugation at 1000 rpm for 2 minutes, the supernatant containing the myocytes was resuspended in solution A and maintained at 30°C before use.

The external solution used to superfuse cells during the recording of currents contained (mM) NaCl 145, KCl 4, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, and glucose 5. Nisoldipine (Donated by Bayer Leverkusen) 0.2 μM was added to eliminate the slow calcium inward current, and Ca<sup>2+</sup> was omitted in the extracellular solution to shift *I*<sub>Ks</sub> activation to positive potentials. The pipette solution contained (mM) MgCl<sub>2</sub> 2, CaCl<sub>2</sub> 1, EGTA 11, MgATP 5, K<sub>2</sub>ATP 5, and HEPES 10. The pH was adjusted to 7.2 with KOH, and the final potassium concentration was fixed at 505 mM with KCl.

Olanzapine solutions of 1, 3, 10, 30, 100 μM were prepared daily by dissolving required amounts of olanzapine in extracellular bath solution.

### **Electrophysiological measurements in guinea pig ventricular myocytes**

A small aliquot of dissociated cells was placed in a 0.5-mL chamber mounted on the stage of an inverted microscope (Axiovert 35, Zeiss). Cells were allowed to adhere to the coverslip on the bottom of the chamber and were then superfused continuously with the external solution at room temperature (22-23°C). In our experiments, complete



replacement of external solution contained in the chamber was achieved within 2 minutes when the superfusion rate was 2 mL/min.

All currents were recorded in the whole-cell, voltage-clamp configuration of the patch-clamp technique using an Axopatch-200A amplifier (Axon Instruments Inc). Voltage-clamp command pulses were generated by a 12-bit digital-to-analog converter (model TL-1, Axon Instruments Inc) controlled by the PCLAMP software package (version 6, Axon Instruments Inc). Heat-polished patch-clamp pipette electrodes used (capillary glass from World Precision Instruments, OD 1.5 mm) had a tip resistance of 1 to 3 M $\Omega$  (when filled with the pipette solution).

Effects of olanzapine on the rapidly ( $I_{Kr}$ ) and slowly ( $I_{Ks}$ ) activating components of  $I_K$  were studied in cells held at -40 mV (to inactivate  $I_{Na}$ ) and depolarized by pulses lasting either 250 msec ( $I_{K250}$ ) or 5000 msec ( $I_{K5000}$ ). Test potentials of depolarizing pulses varied between -40 and +40 mV for  $I_{K250}$  but between 0 and +50 mV for  $I_{K5000}$ . Activating current amplitude of  $I_K$  was measured by subtracting minimal amplitude of current measured during the first 20 msec of the pulse (outside the capacitive current) to the amplitude of activating current measured at the end of these pulses. Tail current amplitudes were measured as the difference between the peak current recorded at the end of the pulse and current recorded after 4 seconds ( $I_{K5000}$ ) or 750 msec ( $I_{K250}$ ) at the holding potential.

### **HEK 293 cell preparation, solutions and electrophysiological measurements**

HERG-transfected HEK 293 cells were kindly donated by Dr C January (University of Iowa). The stably transfected cells were cultured in minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100  $\mu$ M non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate and 400  $\mu$ g/mL G-418. Prior to electrophysiological studies the cells were harvested from the culture dish by trypsinization, washed twice with standard MEM medium, and stored in this medium at room temperature for later use. Cells were studied within 8 h of harvest. Cells were transferred to a 0.5 mL bath mounted on the stage of an inverted microscope (Axiovert 35, Zeiss) and were superfused with HEPES-buffered Tyrode solution containing (in mM) 137 NaCl, 4 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucose, and 10 HEPES (pH 7.4 with NaOH). Solution exchanges were completed within 1 min. Membrane currents were recorded in whole cell configuration using suction pipettes and leak compensation was not used. The pipettes had inner diameters of 1.5  $\mu$ m and a tip resistance of 1 to 3 M $\Omega$ . When filled with the internal pipette solution contained (in mM) 130 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 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. Olanzapine solution was prepared daily by dissolving required amount of the drug in the Tyrode solution perfusing the cells. All experiments were performed at room temperature (22-23°C). Effects of olanzapine on the HERG current were studied in cells clamped at holding potential of -80mV. Depolarizing steps were applied for 4 seconds to voltages between -50 and +50mV in 10 mV increments. Cells were then repolarized at -50mV for 5.7 seconds, before they returned to the holding potential (-80 mV).

### **Data Storage and Analysis**

Currents were low-pass filtered at either 2 kHz ( $I_{K250}$ ) or 100 Hz ( $I_{K5000}$ ) by a four-pole Bessel filter (-3 dB/octave). Currents were sampled at 2 kHz ( $I_{K250}$ ), and 1 kHz ( $I_{K5000}$ ), by use of a 12-bit analog-to-digital converter (TL-1 DMA, Axon Instruments Inc) and stored on hard disk for subsequent analysis.

## Results

### *Experiments with buffer-perfused guinea pig isolated hearts*

Typical examples of monophasic action potentials recorded at baseline and during perfusion of olanzapine at 30  $\mu\text{M}$ , at a pacing length of 250 msec, are illustrated in Figure 2A. Data obtained in each heart tested for the increase in  $\text{MAPD}_{90}$  at a pacing cycle length of 250 msec, using olanzapine at 1, 3, 10, 30 and 100  $\mu\text{M}$  are shown in Figure 2B. Experiments performed in buffer perfused isolated guinea pig hearts ( $n=40$ ;  $n=8$  for each concentration tested) demonstrated that olanzapine caused a concentration and reverse frequency-dependent increase in  $\text{MAPD}_{90}$  ( $F = 17.8$ ,  $p = 3.0\text{E-}5$ ). Figure 3 shows that when hearts were exposed to olanzapine 10  $\mu\text{M}$  at decremental pacing cycle lengths of 250, 200 and 150 msec;  $\text{MAPD}_{90}$  was increased  $27\pm 2.3$ ,  $23.7\pm 2.1$ , and  $18.9\pm 2.2$  msec, respectively. This reverse frequency-dependant effect of the drug was also concentration-dependent ( $F = 102.2$ ,  $p = 8.5\text{E-}19$ ). In fact, when hearts were stimulated at a pacing cycle length of 250 msec, olanzapine 1, 3, 10, 30 and 100  $\mu\text{mol/L}$  increased  $\text{MAPD}_{90}$  by  $2.1\pm 3.3$ ,  $6.7\pm 0.7$ ,  $21.4\pm 3.6$ ,  $27.6\pm 6.2$  and  $26\pm 4.3$  msec respectively (Figure 4). Estimated  $\text{EC}_{50}$  for  $\text{MAPD}_{90}$  prolongation is 5.7  $\mu\text{M}$ .

### *Patch-clamp experiments*

#### *HERG- transfected HEK 293 cells*

The mechanism of the action potential-prolonging effect of olanzapine was elucidated by patch-clamp experiments in ventricular myocytes and HEK 293 cells. Figure 5A shows activating and tail currents of  $I_K$  elicited in HEK 293 cell perfused under control conditions, after 10 minutes of olanzapine 5.7  $\mu\text{M}$  and after 10 minutes of washout. In this cell, olanzapine 5.7  $\mu\text{M}$  caused a 48% reduction of the activating current, whereas

the reduction of the tail current was 45%. Figure 5B shows tail current amplitude for one cell throughout the experiment (baseline, olanzapine 5.7  $\mu\text{M}$  and washout). Inhibition of  $I_{K_r}$  was assessed by exposing cells from 300 nM to 30  $\mu\text{M}$  olanzapine. Estimated  $\text{IC}_{50}$  for  $I_{K_r}$  block was 3.8  $\mu\text{M}$  (Figure 6).

*Isolated guinea pig ventricular myocytes*

Figure 7A shows activating and tail currents of  $I_K$  elicited by a 250 msec pulse to 0 mV, followed by repolarization to -40 mV in a guinea pig ventricular myocyte perfused under control conditions and after 10 minutes of olanzapine 5.7  $\mu\text{M}$ . In this cell, olanzapine 5.7  $\mu\text{M}$  caused a 32% reduction of the activating current, whereas the reduction of the tail current was 36%. After a 10 minute washout there was a partial recovery of the current. Figure 7B shows an example of activating and tail currents of  $I_K$  elicited by a 5000 msec pulse to +50 mV, followed by repolarization to -40 mV in a guinea pig ventricular myocyte perfused under control conditions and in the presence of olanzapine 30  $\mu\text{M}$ . Activating and tail currents of  $I_{K5000}$  recorded under control conditions were only slightly changed by the highest olanzapine dose tested (30  $\mu\text{M}$ ).

## Discussion

Results obtained in this study indicate that olanzapine possesses direct cardiac electrophysiological effects. We have demonstrated that olanzapine can prolong cardiac repolarization in a reverse rate-dependent manner by blocking  $I_{Kr}$ . In fact, we have shown that olanzapine 5.7  $\mu\text{M}$  caused a significant prolongation of cardiac repolarization (13%) which is comparable to the effect of cisapride 100 nM under similar conditions<sup>19</sup>. Patch-clamp experiments revealed significant block  $I_{Kr}$  in guinea pig ventricular myocytes and in HERG transfected HEK 293 cells. It is believed that blocking of  $I_{Kr}$  by olanzapine gives an explanation for prolonged cardiac repolarization and potentially proarrhythmia observed in some patients treated with the drug.

Inhibition of HERG current was demonstrated in HEK 293 cells. Estimated  $IC_{50}$  for the inhibition of  $I_{Kr}$  (3.8  $\mu\text{M}$ ) is higher than mean plasma concentrations at usual doses of the drug. The steady state concentrations of olanzapine at daily doses of 5-20 mg range from 5 to 50  $\mu\text{g/L}$  (0.016 to 0.16  $\mu\text{M}$ )<sup>17</sup>. Consequently, lengthening of cardiac repolarization is not to be expected in most patients treated with the drug.

The results of this study are similar to previous results from Kongsamut et al. which had shown an  $IC_{50}$  of 6 $\mu\text{M}$  for HERG block. These studies were performed in a CHO-HERG expressing cell line. Unfortunately,  $I_{Ks}$  block was not determined and the effect of olanzapine on native cardiomyocytes was not studied.

Many adult and pediatric case reports suggest a propensity of olanzapine to cause arrhythmogenic effects during treatment with therapeutic doses or after overdose<sup>3-6</sup>. Indeed, olanzapine QTc lengthening has been observed most frequently in patients with multiple risk factors. Although olanzapine has been reported to be relatively safe, the results of our study multiple case reports published reveal its potential risk of QTc prolongation in patients carrying risk factors such as female sex, old age and concomitant medication. Likewise, during overdosing or limited elimination of olanzapine, block of  $I_{Kr}$  could lead to excessive lengthening of cardiac repolarization and cardiac toxicity.

Drug metabolism studies have clearly demonstrated that CYP1A2 and CYP2D6 are the major enzymes involved in the biotransformation of olanzapine<sup>20</sup>. Since the degree of QT prolongation associated with olanzapine therapy can depend on plasma concentrations of the drug, on the individual biotransformation capacity (CYP1A2 and CYP2D6 activity), and on the coadministration with other drugs causing pharmacokinetic (inhibition of CYP1A2 and CYP2D6) and/or pharmacodynamic (additional block of cardiac potassium currents) interactions, clinical monitoring is warranted in patients with several risk factors. In fact, it has been observed that coadministration of inhibitors or inducers of the CYP1A2 or CYP2D6 may alter the plasma concentrations of antipsychotics, possibly leading to clinically significant effects<sup>23-24</sup>. For instance, inducers of CYP1A2 such as tobacco smoke and carbamazepine decrease olanzapine concentrations whereas, fluvoxamine, an inhibitor of CYP1A2, increases plasma concentrations of olanzapine in individuals by as much as 4-fold.<sup>21,22</sup>. Conversely, it has been observed that olanzapine does not affect significantly the activity

of CYP450 isoenzymes and is not expected to impair the elimination of other medications<sup>21</sup>.

In conclusion, results obtained in this study demonstrated that olanzapine has direct cardiac electrophysiological effects. The drug significantly blocks HERG current, providing an explanation for the observed concentration and reverse frequency-dependent prolongation of cardiac repolarization. It has been observed in situations where there is metabolic inhibition, that the plasma concentrations of olanzapine can increase as much as 4-fold. This could create conditions in certain patients favourable for block of  $I_{Kr}$  and QT prolongation. Therefore, care should be taken in susceptible patients when prescribing olanzapine, particularly in patients with hepatic or renal insufficiency or suffering from congenital long QT syndrome, and in patients receiving multi-drug regimens



## References

1. Gomez J.C., Sacristan J.A., Hernandez J., Breier A., Ruiz Carrasco P., Anton S., et al. The safety of olanzapine compared with other antipsychotic drugs: results of an observational prospective study in patients with schizophrenia (EFESO Study). *Pharmacoepidemiologic Study of Olanzapine in Schizophrenia. J Clin Psychiatry.* 2000; 61: 335-43.
2. Dobrusin M., Lokshin P. Belmaker R.H. Acute olanzapine overdose. *Hum Psychopharmacol* 1999; 14: 355-356.
3. Su KP, Lane HY, Chuang CL, Chen KP, Shen WW. Olanzapine-induced QTc prolongation in a patient with Wolff-Parkinson-White syndrome. *Schizophrenia Research* 2004; 66:191-192.
4. Gurovich I, Vempaty A, Lippmann S. QTc prolongation: Chlorpromazine and high-dosage olanzapine. *Can J Psychiatry* 2003; 48:348
5. Dineen S, Withrow K, Voronovitch L, Munshi F, Nawbary MW, Lippmann S. QTc prolongation and high-dose olanzapine. *Psychosomatics* 2003; 44:174-175.
6. Drici MD, Wang WX, Liu XK, Woosley RL, Flockhart DA. Prolongation of QT interval in isolated feline hearts by antipsychotic drugs. *J Clin Psychopharmacol* 1998; 18:(6)477-481.
7. Zimmermann M, Duruz H, Guinand O, Broccard O, Levy P, Lacatis D, et al. Torsades de pointes after treatment with terfenadine and ketoconazole. *Eur Heart J* 1992; 13:1002-1003.

8. Koh KK, Rim MS, Yoon J, Kim SS. Torsade de pointes induced by terfenadine in a patient with long QT syndrome. *J Electrocardiol* 1994; 27:343-346.
9. Broadhurst P, Nathan AW. Cardiac arrest in a young woman with the long QT syndrome and concomitant astemizole ingestion. *Br Heart J* 1993; 70:469-470.
10. Nattel S, Ranger S, Talajic M, Lemery R, Roy D. Erythromycin-induced long QT syndrome: concordance with quinidine and underlying cellular electrophysiologic mechanism. *Am J Med* 1990; 89:235-238.
11. Pettignano R, Chambliss CR, Darsey E, Heard M, Clack R. Cisapride-induced dysrhythmia in a pediatric patient receiving extracorporeal life support. *Crit Care Med* 1996; 24:1268-1271.
12. Bran S, Murray WA, Hirsch IB, Palmer JP. Long QT syndrome during high-dose cisapride. *Arch Intern Med* 1995; 155:765-768.
13. Hassaballa HA, Balk RA. Torsade de pointes associated with the administration of intravenous haloperidol: a review of the literature and practical guidelines for use. *Expert Opinion Drug Safety* 2003; 2:543-547.
14. Drolet B, Zhang S, Deschênes D, Rail J, Nadeau S, Zhou Z, et al. Droperidol lengthens cardiac repolarization due to block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1999; 10:1597-1604.
15. 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. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 2001; 6:255-260.
16. 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; 41:934-937.
17. Nemeroff CB. Dosing the antipsychotic medication olanzapine. *J Clin Psychiatry* 1997; 58:45-49.
18. Chakrabarti, J.K., Hotten, T.M. AND Tupper, D. E. 2-Methyl-thieno-benzodazepine, United States Patent 5,229,282, July 20, 1993.
19. 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; 97:204-210.
20. Ring BJ, Catlow J, Lindsay TJ, Gillespie T, Roskos LK, Cerimele BJ, et al. Identification of the human cytochromes P450 responsible for the *in vitro* formation of the major oxidative metabolites of the antipsychotic agent olanzapine. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 276:658-666.
21. Callaghan JT, Bergstrom RF, Ptak LR, Beasley CM. Olanzapine. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile. *Clin Pharmacokinet* 1999; 37:177-193.

22. Weigmann H, Gerek S, Zeisig A, Muller M, Hartter S, Hiemke C. Fluvoxamine but not sertraline inhibits the metabolism of olanzapine: Evidence from a therapeutic drug monitoring service. *Ther Drug Monit* 2001; 23:410-413.
23. Nykamp DL, Blackmon CL, Schmidt PE, Roberson AG. QTc prolongation associated with combination therapy of levofloxacin, imipramine, and fluoxetine. *Ann Pharmacother* 2005;39(3):543-6.
24. Granfors MT, Backman JT, Neuvonen M, Neuvonen PJ. Ciprofloxacin greatly increases concentrations and hypotensive effect of tizanidine by inhibiting its cytochrome P450 1A2-mediated presystemic metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 2004;76(6):598-606.

## Figure Legends

**Figure 1** Reagents and conditions for olanzapine synthesis; a) Et<sub>3</sub>N, dry DMF, 5-10°C, and then 15-20°C for 1 h; b) NaH, THF, nitrogen atmosphere, 25°C, 24 h; c) dry SnCl<sub>2</sub>, 5N HCl, EtOH, 50°C, and then reflux for 1.5 h; d) *N*-methylpiperazine, dry DMSO, toluene, nitrogen atmosphere, reflux, 20 h.

**Figure 2** Panel A shows monophasic action potential signals recorded at baseline and after 6 minutes of olanzapine 30 μM at a BCL of 250 msec. Panel B shows effects of olanzapine on MAPD determined in isolated, buffer-perfused guinea pig hearts, at a pacing cycle length of 250 msec. MAPD<sub>90</sub> was measured at baseline (Bas) and during perfusion of olanzapine (Olz) 1, 3, 10, 30 μM (n = 8 at each concentration). Asterisks indicate significant changes from baseline value (P < 0.05).

**Figure 3** Figure 3 shows serial changes in MAPD<sub>90</sub> at BCL of 250, 200 and 150 msec in hearts (n=12) sequentially perfused with olanzapine 10 μM.

**Figure 4** Figure 4 shows prolongation of MAPD<sub>90</sub> by olanzapine at concentrations of 1, 3, 10, 30 μM (n = 8 at each concentration) in isolated, buffer-perfused guinea pig hearts, at a pacing cycle length of 250 msec.

**Figure 5** Panel A shows activating and tail currents elicited by a 4 second step to +20 mV in a HERG-transfected HEK 293 cell under control conditions, after 10 minutes of olanzapine 5,7 μM, and after a 10 minutes of washout period. Panel B shows HERG

tail current amplitude, measured at +20 mV in HEK 293 cell (n = 1) through the course of one experiment.

**Figure 6** Figure 6 shows HERG tail current amplitude, measured at the +20 mV activation step in HEK 293 cells (n = 8 per concentration), normalized to control, plotted as a function of olanzapine concentration. Estimated  $IC_{50}$  for  $I_{Kr}$  is also illustrated.

**Figure 7** Panel A shows recordings of activating and tail currents elicited by short pulses ( $I_{K250}$ ) to 0 mV under control conditions, during exposure to olanzapine 5.7  $\mu$ M and after a 10 minute washout. Panel B shows recordings of activating and tail currents elicited by long pulses ( $I_{K5000}$ ) to +50 mV under control conditions and after a 10 minute exposure to olanzapine (30  $\mu$ M).

Figure 1.

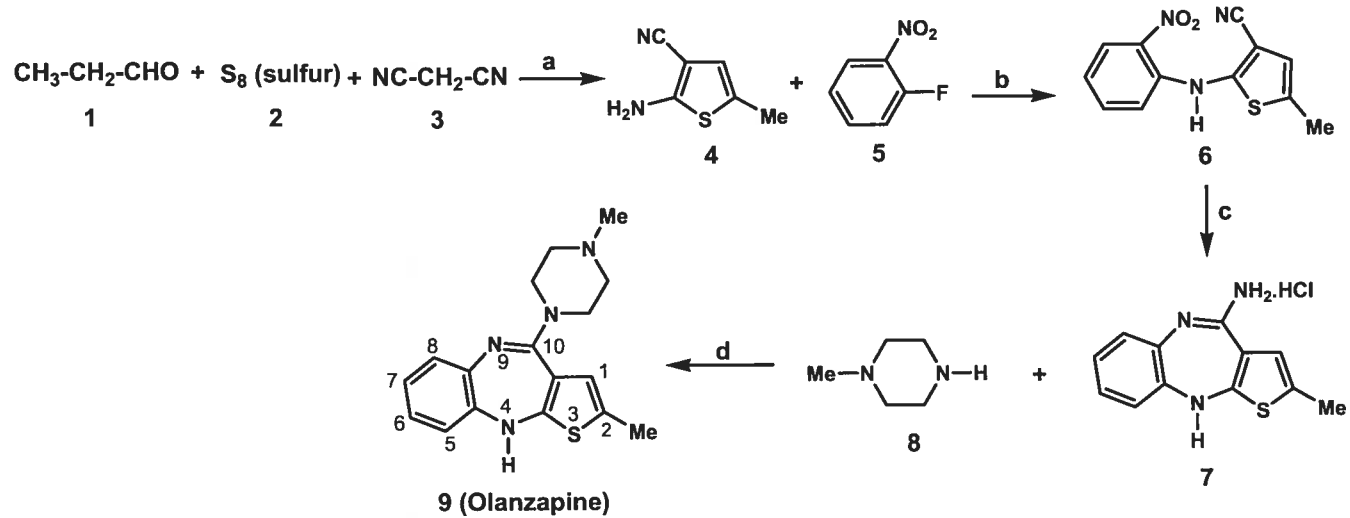


Figure 2.

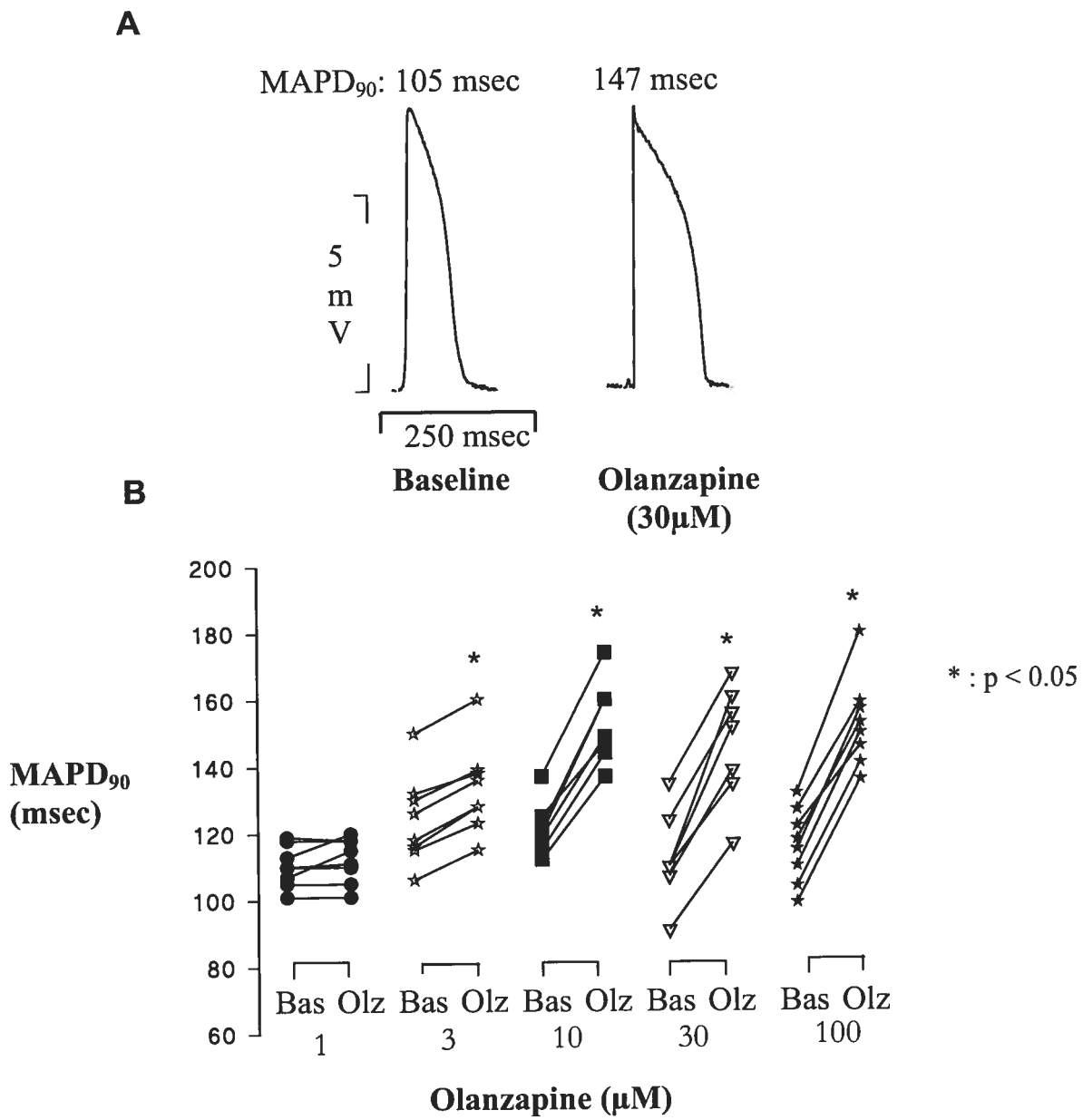




Figure 3.

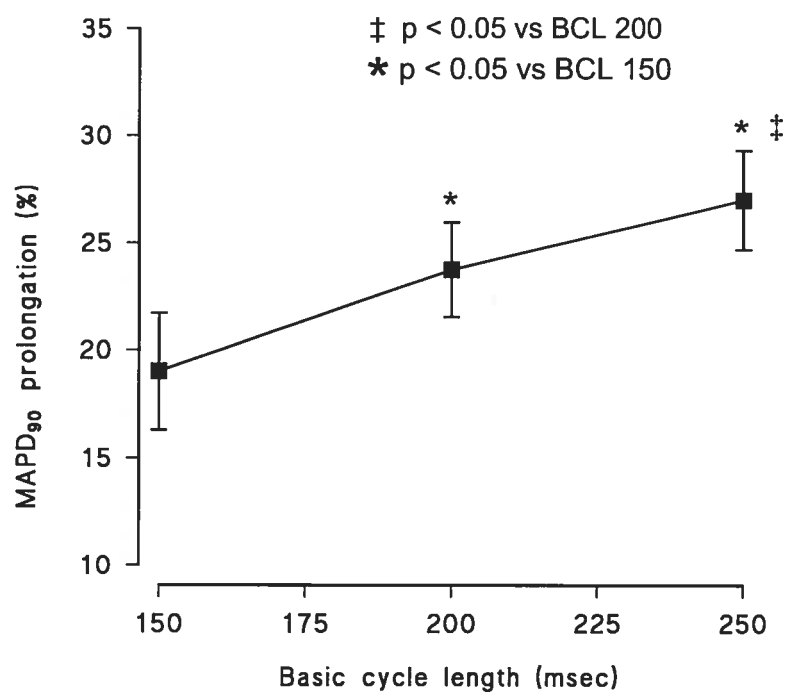
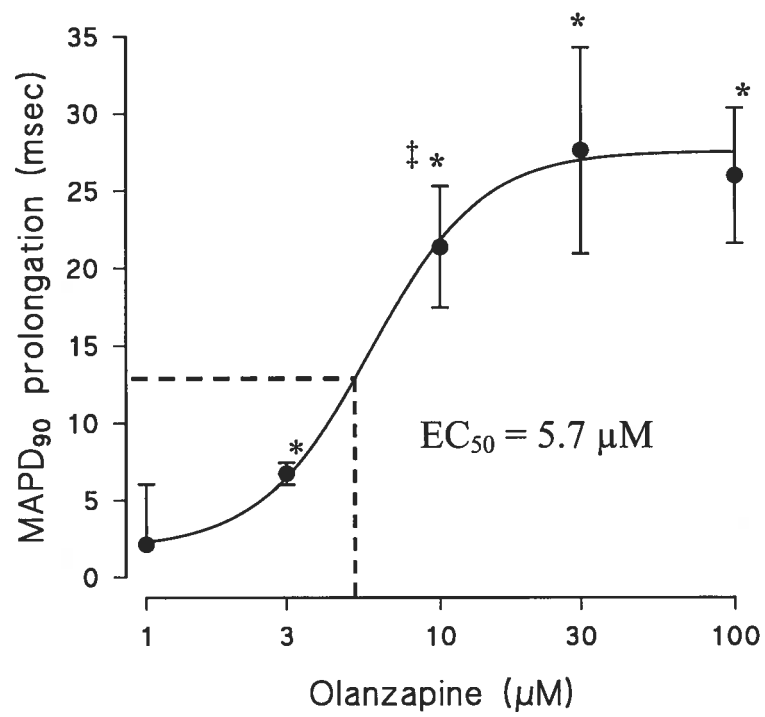


Figure 4.



\* :  $p < 0.05$  vs control

‡ :  $p < 0.05$  vs 3  $\mu\text{M}$

Figure 5.

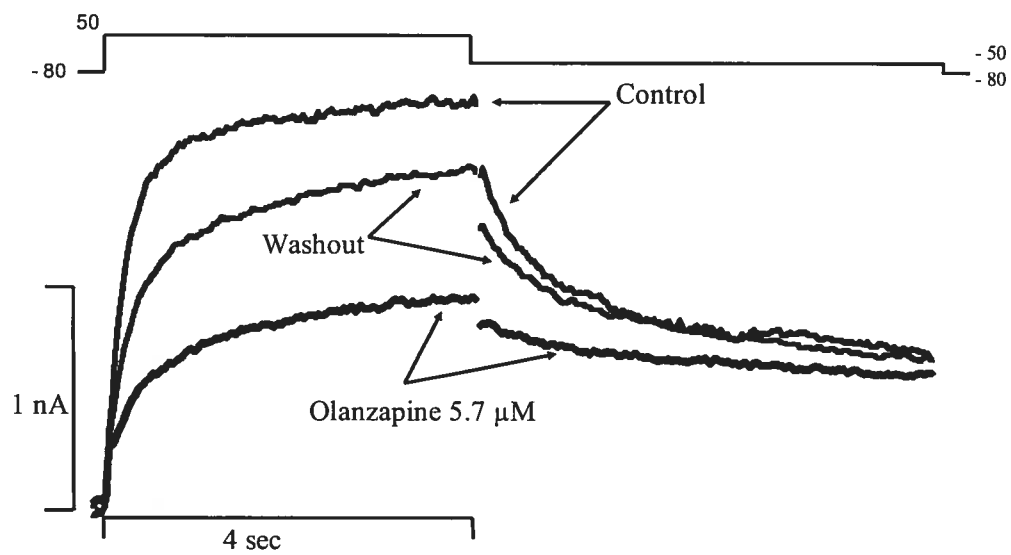
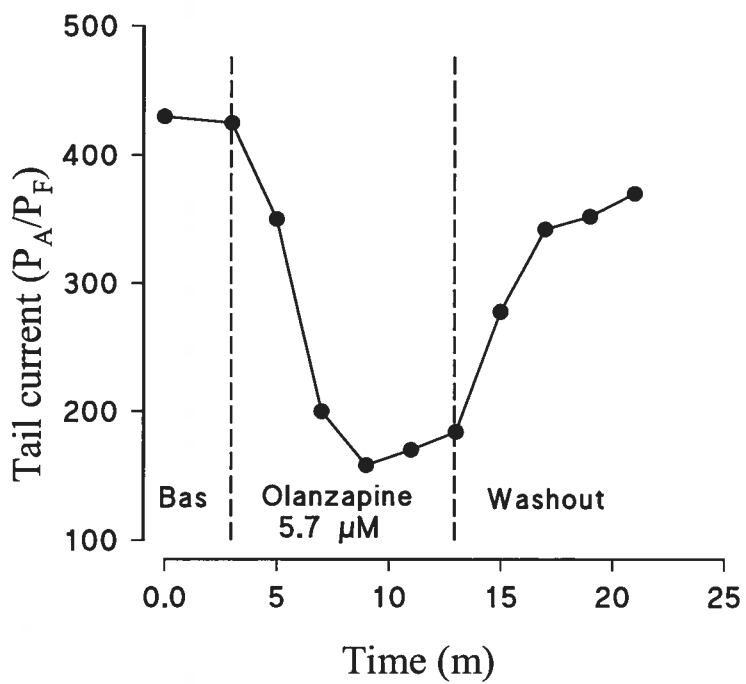
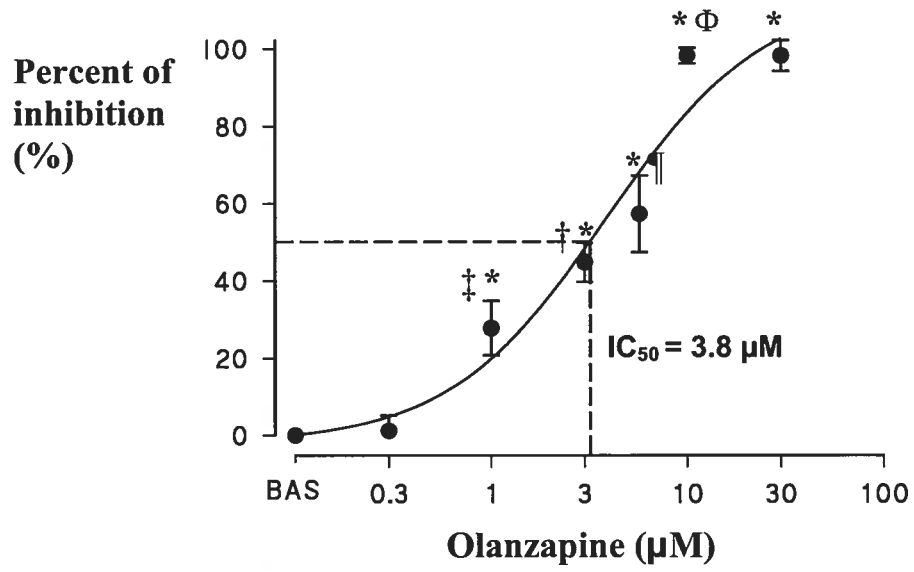
**A****B**

Figure 6.



\* : p < 0.05 vs baseline

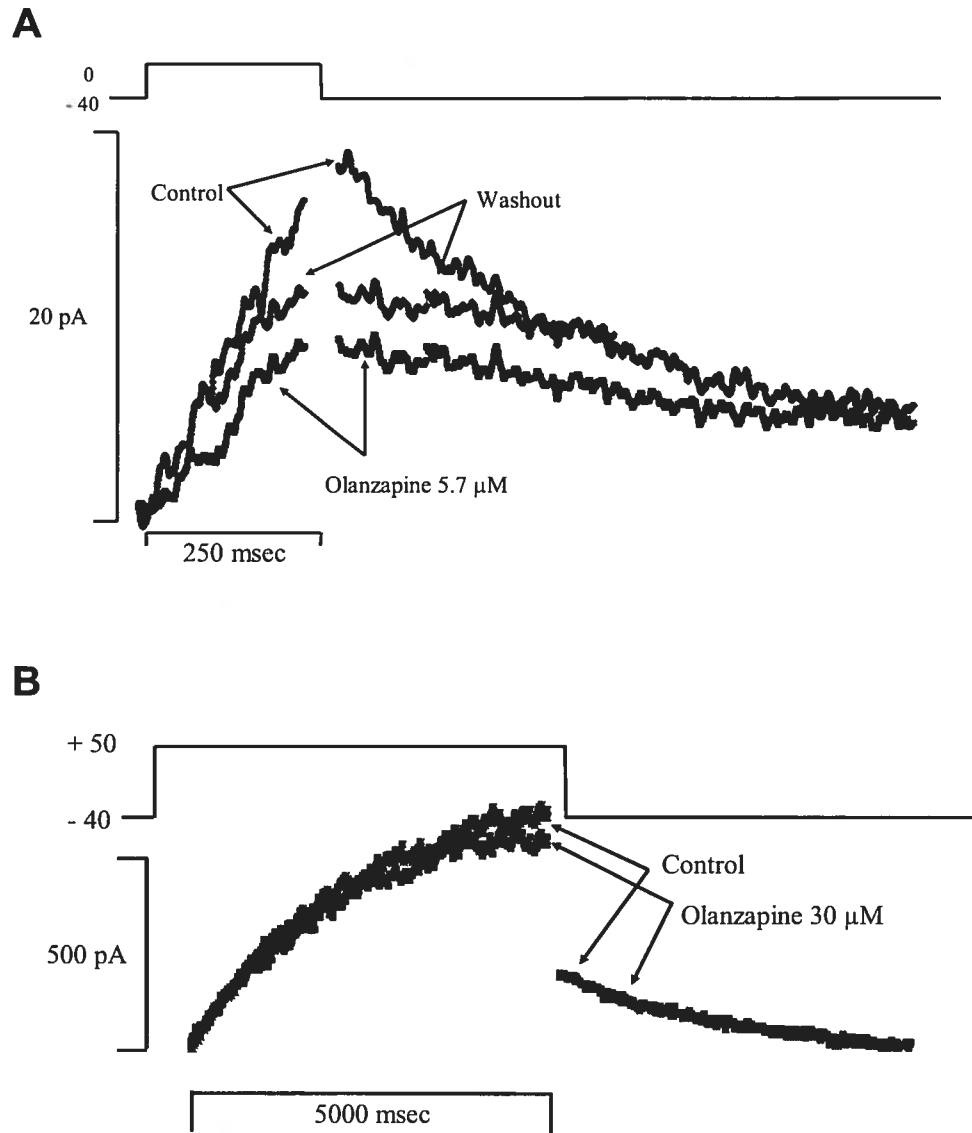
Φ : p < 0.05 vs 5.7 µM

¶ : p < 0.05 vs 3.0 µM

† : p < 0.05 vs 1.0 µM

‡ : p < 0.05 vs 0.3 µM

Figure 7.



## CHAPITRE VI

### Discussion générale et conclusion

Les traits phénotypiques (QT>500 msec, augmentation des concentrations plasmatiques des médicaments, diminution de l'activité des CYP3As, sexe, etc...) ont une faible valeur prédictive dans la survenue des TdP. De plus, il existe une grande variabilité interindividuelle dans la pharmacodynamiques et pharmacocinétiques des médicaments qui prolongent l'intervalle QT. L'objectif de notre étude consistait à démontrer la contribution de la P-gp dans la variabilité interindividuelle de la prolongation du QT en évaluant les répercussions électrophysiologiques cardiaques d'un bloqueur d'I<sub>Kr</sub> après la modulation de l'activité de ce transporteur. De plus, nous voulions déterminer la contribution de cette protéine dans les différences liées au sexe retrouvées dans le syndrome du QT long d'origine médicamenteuse. Pour ce faire, nous avons provoqué une modulation de l'activité de la P-gp chez des cobayes pour ensuite isoler leurs cœurs qui ont été rétroperfusés par l'aorte selon la technique de Langendorff. Cette technique a servi à déterminer l'effet du cisapride (bloqueur d'I<sub>Kr</sub>) sur la dépolarisation et/ou sur la repolarisation cardiaque après l'inhibition de la P-gp. Dans un deuxième temps, nous avons déterminé si l'expression ou l'activité de la P-gp pouvait avoir un rôle dans les différences liées au sexe retrouvées chez les patients atteints de TdP médicamenteuses.

Lors de nos études nous avons rétroperfusé les cœurs isolés par l'aorte et mesurer les potentiels d'action avec une électrode de contact. De plus nous avons utilisé la technique de patch clamp pour étudier plus spécifiquement l'activité du canal potassique I<sub>Kr</sub>. Bien que ces techniques soient communément utilisées, il faut soulever leur fiabilité et leurs

limites. Les études électrophysiologiques *in vitro* et *ex vivo* nous fournissent de l'information quant à l'effet d'une molécule sur la durée du potentiel d'action et des courants ioniques impliqués. Ces expériences jouent un rôle important dans l'évaluation de la capacité d'un médicament à prolonger le potentiel d'action et l'intervalle QT. De plus, elles aident à expliquer certains mécanismes cellulaires affectant la repolarisation. Les études *in vitro* peuvent être accomplies sur une cellule unique (cellules transfectées, myocytes isolés) ou sur des préparations multicellulaires telles que les fibres de Purkinje isolées et le muscle papillaire. Par ailleurs, la majorité des études *ex vivo* sont accomplies sur un cœur perfusé. Les préparations multicellulaires sont des systèmes stables conçus pour d'étudier la durée des potentiels d'action. Par ailleurs, les préparations unicellulaires sont plus fragiles mais minimisent les barrières de diffusion à leur site d'action. Ces modèles sont fiables pour analyser plusieurs paramètres tels que les changements de  $V_{max}$ , d'APD à  $APD_{90}$  et de triangulation afin d'obtenir une meilleure idée du canal ionique impliqué dans un changement du potentiel d'action. Bien que les études réalisées sur des cellules isolées soient techniquement plus difficiles, elles ont l'avantage de nous procurer de l'information sur les courants ioniques impliqués. Par ailleurs, les systèmes d'expressions hétérologues, dans lesquels une protéine est exprimée dans une lignée cellulaire noncardiaque stable peuvent être utilisés afin d'étudier un canal ionique spécifique. Ainsi, les études réalisées dans les systèmes multicellulaires et *ex vivo* peuvent nous aider à mieux orienter notre recherche avant d'entreprendre les études unicellulaires.

Les études *ex vivo* tel que la perfusion du cœur en mode Langendorff peuvent fournir de l'information sur les mécanismes de proarythmies. Les potentiels d'actions

monophasiques (MAP) enregistrés avec une électrode de contact (de type Franz) peuvent être facilement utilisés lors d'expériences *ex vivo* comme dans la rétro-perfusion de cœurs isolés afin d'acquérir de l'information sur les processus de dépolarisation et de repolarisation d'une région spécifique du myocarde. Contrairement aux électrogrammes de surface qui représentent la somme de l'activité électrique du cœur, les MAPs nous donnent une indication des changements locaux de potentiel transmembranaire. Cet enregistrement donne au chercheur une meilleure idée de l'électrophysiologie d'une région spécifique du myocarde.

Par contre, les MAPs ne sont pas représentatifs des changements d'amplitude réelle du potentiel transmembranaire. D'ailleurs, il est impossible de déterminer avec fiabilité l'amplitude de la phase de dépolarisation (phase 0) du potentiel d'action transmembranaire. De plus, l'amplitude des MAPs est moindre que le potentiel transmembranaire réel. Cette différence peut être expliquée par le fait que l'électrode de contact enregistre une région de cellules qui se dépolarisent séquentiellement dans le temps. Bien qu'on ne puisse pas observer la différence réelle de voltage transmembranaire, les MAPs représentent avec fidélité les changements de voltage dans le temps.

Par ailleurs, les potentiels d'action peuvent également être enregistrés dans des préparations multicellulaires telles que des fibres de Purkinje et le muscle papillaire. Lors de ces expériences, une microélectrode de verre rupture la membrane afin d'enregistrer les changements de potentiels de cette dernière. Si l'enregistrement est bien



fait, les ces enregistrements peuvent refléter le potentiel d'action d'une cellule unique avec grande précision.

Par ailleurs, la technique de patch clamp est couramment utilisée pour établir l'activité électrique d'une cellule au repos et au cours de son activité électrique (potentiel d'action). De plus, la technique de patch clamp permet d'étudier les courants ioniques de la membrane cytoplasmique entière ou d'étudier un canal spécifique tel que  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$  ou  $I_{Na}$ . Il est aussi possible d'étudier le courant produit par les transporteurs comme la pompe  $Na^+/K^+$  ou l'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$ . Pour cette technique, une micropipette est doucement appuyée sur la membrane cytoplasmique afin de former un « gigaseal ». En appliquant une légère succion (pression négative) il est possible de rompre la membrane afin que la solution intrapipette se mélange à celle intracytoplasmique. L'environnement ionique de la cellule devient donc similaire à celle de la pipette. Il est donc possible de contrôler la composition du cytoplasme et d'étudier un courant ionique particulier. Cette variante de la technique est nommée le mode « whole cell ». Par ailleurs, le mode « inside-out » ou « outside-out » permet d'étudier un canal ionique spécifique. En mode « inside-out » il est possible de retirer la pipette après avoir obtenu un « gigaseal » afin que la surface interne de la membrane soit dans le bain et que la surface externe soit exposée à la solution intra pipette. Comme la face intracellulaire de la membrane est exposée au bain, ceci nous permet d'étudier certains modulateurs intracellulaires pour un canal ionique spécifique. Enfin, la technique « outside-out » permet d'exposer la face extracellulaire au bain et la face intracellulaire à la solution intrapipette. Ce mode est obtenu en retirant la pipette en mode « whole-cell ». Ainsi, cette technique permet d'étudier des modulateurs sur la face extracellulaire de la membrane pour un canal

ionique spécifique. Lors de nos expériences, nous avons choisi d'utiliser le mode « whole cell » car il était essentiel de déterminer si la molécule étudiée puisse traverser la membrane cytoplasmique par diffusion passive et interagir avec le canal ionique étudié. Les molécules qui interagissent avec HERG bloquent le canal du côté cytoplasmique après sa diffusion dans la cellule. Ainsi, ce mode était le plus approprié pour nos études.

Le grand désavantage des enregistrements *in vitro* et *ex vivo* est qu'aucun métabolite n'est généré dans ces systèmes. Ainsi, il faut se retourner à des expériences *in vivo* pour étudier l'impact des métabolites sur les potentiels d'actions.

#### *Modulation de la P-g et effets électrophysiologiques*

Le niveau d'expression de même que la fonctionnalité de la P-gp pourraient avoir un effet substantiel sur l'accumulation des médicaments dans le cœur. D'ailleurs, au chapitre III nous avons déterminé l'influence potentielle de l'expression des P-gp sur la distribution d'un médicament bloqueur d' $I_{Kr}$  au niveau du tissu cardiaque. Pour ce faire, nous avons effectué un pré-traitement avec le vérapamil dans le but de moduler la P-gp et nous avons déterminé l'effet de cette modulation sur les caractéristiques électrophysiologiques du cisapride. Nos résultats démontrent que la durée de repolarisation par le cisapride est significativement prolongée lorsque les cobayes sont pré-traités avec le verapamil. Par ailleurs, des études semi-quantitatives par PCR furent accomplies afin de déterminer s'il y avait une diminution de l'expression de l'ARNm de *MDR1* (résultats en annexe II). Nous avons observé une augmentation de l'expression

d'ARNm dans les coeurs pré-traités avec 15 mg/kg/jour de vérapamil. Nous avons donc supposé qu'à cette dose la grande diminution de l'activité de P-gp mène à une réponse compensatoire qui augmente la transcription du gène *MDR1*. Par contre, nous n'observons pas de différence d'expression entre l'expression de l'ARNm chez les coeurs contrôles et les coeurs pré-traités à 11.6 mg/kg/jour. Il est difficile de conclure avec ces résultats semi-quantitatifs. Ainsi, il faudrait faire cette analyse avec une méthode plus quantitative telle que l'analyse par PCR en temps réel. De plus, une modulation de l'expression de l'ARNm ne mène pas toujours à une modulation de la protéine. Il faudrait donc une étude par immunobuvardage afin de déterminer cette modulation. Nous avons été capable de détecter la P-gp dans les coeurs de cobayes en utilisant un anticorps anti-Pgp humain (résultats en annexe II). Par contre, cet anticorps (C219) détecte la P-gp de cobaye très faiblement. Ainsi, une analyse quantitative afin de déterminer la modulation de l'expression de la protéine avec cet anticorps serait impossible. Malheureusement, aucun anticorps anti-cobaye n'est disponible présentement. Ainsi, nous avons évalué l'accumulation d'un substrat fluorescent de la P-gp après le pré-traitement afin d'évaluer la modulation de la P-gp plutôt que d'analyser les modulations directes de l'expression de la protéine. Nous avons observé que la rhodamine 123, un substrat fluorescent de la P-gp s'accumule dans les coeurs de cobayes pré-traités. Enfin, nous avons démontré que les concentrations intracellulaires de cisapride étaient significativement augmentées dans les myocytes des animaux pré-traités. Ces résultats ont donc démontré pour la première fois l'influence d'une modulation de la P-gp au niveau du tissu cardiaque. Ainsi, une modulation de l'activité ou de l'expression des transporteurs ABC peut affecter les concentrations intracellulaires de certains médicaments dans le tissu cardiaque.

Lors de nos recherches, nous avons associé le vérapamil à la diminution de l'expression de la P-gp. Nous pouvons expliquer ce mécanisme par une diminution de la translocation du facteur de transcription AP-1. D'ailleurs, il a récemment été démontré que le vérapamil peut réduire la translocation du facteur de transcription AP-1 au noyau<sup>1</sup>. Ce facteur de transcription est surtout impliqué dans la prolifération cellulaire, la progression du cycle cellulaire et certaines cascades associées à une réponse hormonale. De plus, le facteur de transcription AP-1 est impliqué dans la surexpression du gène *MDR1* dans plusieurs cancers<sup>2</sup>. Ainsi, il est probable que le mécanisme par lequel le vérapamil diminue l'expression de la P-gp soit par une inhibition de la translocation d'AP-1 au noyau et la diminution subséquente de la transcription de *MDR1*. Il serait intéressant de déterminer si ce mécanisme est plus important chez les femelles que chez les mâles. Ceci pourrait apporter une explication aux différences mâles-femelles observées dans nos études. De plus, plusieurs autres facteurs de transcription dont SP-1, YB-1, HSP, NF-IL6 et p56 sont impliqués dans l'expression de *MDR1*. Il serait intéressant de déterminer si le vérapamil module l'expression ou la translocation au noyau de ces facteurs de transcriptions.

Par ailleurs, il est possible que le vérapamil puisse induire des symptômes similaires à ceux de la défaillance cardiaque et ainsi moduler la synthèse de certaines protéines impliquées lors d'une réponse hypertrophique. De fait, le symptôme le plus communément observé lors d'une défaillance cardiaque est une diminution de la fraction d'éjection. Les bloqueurs des canaux calciques, dont le vérapamil, ont un effet inotrope négatif et peuvent altérer la fraction d'éjection. Le vérapamil inhibe la contraction du

muscle lisse vasculaire et peut causer une vasodilatation des coronaires. Par contre, les effets sympathiques résultant de cette vasodilatation peuvent réduire les effets inotropes négatifs du vérapamil. Il est cependant possible que les effets inotropes négatifs du vérapamil prédominent à fortes doses. Ainsi, à forte dose, il existe une certaine similitude entre l'effet du vérapamil et les symptômes de la défaillance cardiaque pouvant mener à une modulation de plusieurs protéines.

En effet, il a été démontré que le vérapamil peut inhiber l'anhydrase carbonique. Cette enzyme est surtout détectée dans les globules rouges et joue un rôle important dans le maintien de l'équilibre acido-basique. L'inhibition de cette enzyme induit une augmentation du pH<sup>3</sup>. Ainsi, on devrait s'attendre à une augmentation du pH intracellulaire en présence de vérapamil. Fuller et al. ont démontré que l'augmentation du pH peut mener à une augmentation de la synthèse protéique. Plus précisément, ils ont constaté qu'une augmentation de 0.1 du pH mène à une accélération de la synthèse protéique de 40%<sup>4</sup>. Cette augmentation de la synthèse protéique peut contribuer à une hypertrophie du cœur. Lors d'une hypertrophie due à la défaillance cardiaque, le sodium intracellulaire est augmenté<sup>5,6</sup>. Cette augmentation est médiée par une augmentation de l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ <sup>5,7</sup>. L'augmentation du sodium intracellulaire favorise l'augmentation du calcium intracellulaire par l'entrée en jeu de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$  (NCX); cet échangeur prend la relève afin de restabiliser le sodium de la cellule. Ainsi, il peut y avoir une augmentation du calcium intracellulaire lors de la diastole pouvant mener à des post-dépolarisations tardives (DADs)<sup>5</sup>. De plus, il a été démontré que les post-dépolarisation précoces peuvent être dues à la prolongation du potentiel d'action causé par l'altération de l'expression des canaux potassiques et possiblement de

l'activité du NCX<sup>8-10</sup>. En effet, les myocytes isolés d'un cœur hypertrophié retiennent les propriétés morphologiques d'un cœur intact mais démontrent une prolongation du potentiel d'action par une diminution du courant transitoire  $I_{to}$ <sup>11,12</sup>. La densité des autres courants qui modulent la durée du potentiel d'action dont,  $I_{Ca}$  et le courant potassique rectifiant retardé ne sont pas modifiés.

Bien que le vérapamil puisse avoir des effets autres que la simple inhibition de la P-gp lors de nos études, il est peu probable qu'il mène aux symptômes retrouvés lors d'une hypertrophie cardiaque. Les doses utilisées sont similaires à celles retrouvées chez l'humain (3 à 8 mg/kg/j). Comme le système sympathique prend la relève et permet de contrebalancer les effets inotropes négatifs du vérapamil, nous observerons peu d'effets similaires à ceux induits lors d'une défaillance cardiaque chronique. De plus, si le vérapamil a un effet sur le pH, il pourrait avoir des effets sur les propriétés du canal ionique HERG. De fait, Bérubé et al. ont démontré qu'une élévation du pH mène à une augmentation du courant de HERG<sup>19</sup>. Ceci viendrait à l'encontre de nos résultats. Ainsi, les effets hémodynamiques et/ou hypertrophiques du vérapamil sont peu probables. Par contre, il ne faut pas complètement ignorer ces effets aux doses plus élevées (11.6 et 15 mg/kg/j mg/kg/j). Ainsi, il aurait été intéressant d'étudier les effets hémodynamiques du vérapamil en enregistrant la pression ventriculaire de nos cœurs pré-traités.

Au chapitre IV, nous avons évalué l'implication de la P-gp dans les différences liées au sexe dans le syndrome du QT long d'origine médicamenteuse. Encore une fois, nous démontrons que la prolongation de la durée de repolarisation par le cisapride est significative lorsque les cobayes sont pré-traités avec le verapamil. Cette prolongation

est nettement plus importante chez les cobayes femelles. De plus, les concentrations intracellulaires de cisapride sont plus importantes chez les cobayes femelles que chez les mâles après un pré-traitement au vérapamil. Ainsi, on peut soupçonner que l'expression basale de cette protéine est plus faible au niveau du tissu cardiaque des cobayes femelles. Cette caractéristique rendrait les femelles plus susceptibles aux augmentations de la concentration des substrats de P-gp. Ainsi, un substrat des P-gp qui est aussi substrat d' $I_{Kr}$  se retrouverait en concentration plus importante dans les myocytes. Par conséquent, la durée de repolarisation serait d'avantage augmentée.

Récemment, plusieurs études ont essayé d'expliquer les différences mâles-femelles dans le syndrome du QT long médicamenteux. Il fut observé que le QT devient plus court chez l'homme après la puberté mais reste stable chez la femme tout au long de sa vie<sup>13-15</sup>. Ainsi, des études ont tenté d'expliquer cette différence en déterminant s'il y avait des alternances d'expression des canaux ioniques entre les mâles et les femelles. Liu et al. ont démontrés que les lapins mâles ont plus de courant  $I_{Kr}$  et  $I_{K116}$ . Par ailleurs, Fiset et al. ont démontrés que les souris mâles ont une réduction de courant  $I_{Kur}$  et une réduction de l'expression de son gène  $Kv1.5$  comparés aux femelles<sup>17</sup>. Plus récemment, ils ont aussi démontré que des souris mâles castrés ont une réduction de courant  $I_{Kur}$  et une réduction de l'expression de son gène  $Kv1.5$ . Ainsi, ils ont associée que la différence de repolarisation entre les mâles et les femelles chez les souris sont associées aux androgènes<sup>18</sup>. Nos résultats chez le cobaye démontrent aussi une plus grande susceptibilité des femelles à une prolongation de la durée de repolarisation. Par contre, lors de notre étude, nous associons cette plus grande susceptibilité à une modulation de l'expression de la P-gp. Les femelles semblent plus sensibles à une modulation de la P-

gp. Ainsi, l'expression des transporteurs ABC vient s'ajouter aux effets hormonaux déjà observés par d'autres chercheurs afin d'expliquer la plus grande susceptibilité des femelles à la prolongation de la durée de repolarisation. Dans le futur, il serait intéressant d'évaluer l'effet des hormones et plus particulièrement des androgènes sur l'expression des transporteurs ABC dont la P-gp.

Au cours de l'introduction, nous avons rapporté que plusieurs substrats des CYP3A4/5 sont aussi substrats des P-gp et qu'ils possèdent souvent une affinité pour la composante rapide du courant potassique rectificant retardé ( $I_{Kr}$ ). De plus, nous avons soulevé les similitudes des structures des substrats de ces protéines. Ainsi, nous pouvons suggérer qu'il existe un lien étroit entre les substrats des CYP3A4 et des P-gp, mais également avec les antagonistes de *HERG*. Donc, une diminution du métabolisme CYP3A4 et/ou de l'activité des P-gp peut mener à une augmentation de la concentration plasmatique des médicaments. Cette augmentation peut mener à une augmentation tissulaire et finalement, à une augmentation intracellulaire de la concentration du médicament. Comme il a été démontré que la majorité des bloqueurs d' $I_{Kr}$  accèdent à leur site de liaison du côté intracellulaire, une modulation de l'expression de la P-gp peut jouer un rôle important dans la toxicité des bloqueurs d' $I_{Kr}$ .

Par ailleurs, nous avons évalué l'hypothèse par la négative à savoir si des produits qui ne sont pas substrats du CYP3A4 peuvent aussi inhiber *HERG* et allonger le QT. Nous avons ainsi évalué les effets de l'olanzapine, un antipsychotique, sur la durée du potentiel d'action monophasique ( $MAPD_{90}$ ), à des cycles de stimulation décroissants. Nos résultats démontrent que l'olanzapine augmente le  $MAPD_{90}$  en fonction de sa



concentration. De plus, l'olanzapine augmente davantage le  $\text{MAPD}_{90}$  à des cycles de stimulation long par rapport aux cycles de stimulation courts. Cette caractéristique « reverse-rate dependence » est une caractéristique commune aux anti-arythmiques de classe III. Par ailleurs, nous avons caractérisé les effets de l'olanzapine sur la composante rapide du courant potassique rectifiant retardé ( $I_{Kr}$ ). Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de patch-clamp et une lignée cellulaire HEK293 transfectée avec le gène *HERG*. Nos résultats démontrent que l'olanzapine inhibe sélectivement *HERG* de façon concentration-dépendante. D'autre part, à l'aide de myocytes ventriculaires nous avons déterminé l'effet de l'olanzapine sur les composantes lentes ( $I_{Ks}$ ) et rapides ( $I_{Kr}$ ) du courant potassique rectifiant retardé. Comme dans les cellules transfectées, l'olanzapine diminue significativement le courant  $I_{Kr}$ . Par contre, nous avons déterminé que le bloc d' $I_{Ks}$  par ce médicament est presque nul.

Les résultats de cette thèse nous mènent à une meilleure compréhension des variabilités inter-individuelles retrouvées dans le syndrome du QT long d'origine médicamenteuse. Les résultats de l'étude présentés au chapitre III et IV démontrent bien que la modulation de la P-gp puisse être un facteur important qui aide à contrôler la concentration intracellulaire de médicaments dans les myocytes. Il en résulte un changement pharmacocinétique des effets électrophysiologiques du cisapride. L'augmentation, même minime, de la concentration intra-myocardique du cisapride pourrait entraîner des conséquences graves. Cette augmentation pourrait survenir lors d'une inhibition du métabolisme ou du transport membranaire par la P-gp. Il faut retenir que les interactions médicamenteuses ne surviennent pas seulement entre un substrat et un inhibiteur et/ou inducteur mais aussi entre deux substrats de la même protéine et/ou

enzyme. Ainsi, deux substrats de la P-gp peuvent compétitionner et l'un d'eux peut se retrouver en plus grande concentration dans la cellule. Si ce médicament a des effets proarythmiques ou qu'il entraîne le blocage des canaux potassiques, on peut se retrouver avec des effets toxiques fatals.

Par ailleurs, le sexe est un autre facteur important pouvant augmenter le risque de torsades de pointes. Les mécanismes sous-jacents responsables de la prédisposition des femmes au Syndrome du QT long d'origine médicamenteuse sont mal connus. Nous avons démontré pour la première fois que la P-gp est impliquée dans les différences mâles/femelles retrouvées dans le syndrome du QT long d'origine médicamenteuse. Cette observation vient s'ajouter aux facteurs hormonaux déjà décrits et démontre l'implication de la P-gp dans les différences mâles/femelles retrouvées dans le syndrome du QT long d'origine médicamenteuse.

Il semble exister un lien étroit entre le CYP3A4, la P-gp et *HERG*. Bien que la plupart des substrats de CYP3A4 soient aussi substrats de P-gp et de *HERG*, il existe toujours des exceptions à cette « triade » d'interaction. Cette triade pourrait amener une explication supplémentaire dans la compréhension des variations interindividuelles dans la prolongation du QT. Par contre, nous avons démontré que l'olanzapine qui est métabolisé par le CYP1A2 bloque également *HERG*. Étant un substrat de la P-gp, l'olanzapine obéit seulement à une portion de la « triade ». Ainsi, il est essentiel de continuer la documentation des médicaments afin d'identifier tous les bloqueurs de *HERG* qui font exception à la règle de la « triade ».

Pour faire suite à nos études il serait intéressant de développer une lignée cellulaire qui exprime ces trois protéines. Ainsi, nous pourrions manipuler chacune des protéines afin d'observer en patch-clamp l'effet direct sur le courant repolarisant. Par ailleurs, un inducteur spécifique de la P-gp serait utile afin de déterminer si, après un pré-traitement, on observe une diminution des concentrations intracellulaires des substrats de ce transporteur et ainsi une diminution de l'effet inhibiteur de HERG. De plus, il serait intéressant d'évaluer l'effet des hormones et plus particulièrement des androgènes sur l'expression de la P-g. Enfin, nous pourrions étudier le mécanisme par lequel le vérapamil module l'expression de la P-gp. Ainsi, une avenue à étudier serait de déterminer si la modulation de la translocation du facteur de transcription AP-1 par le vérapamil est variable chez les femelles comparés aux mâles afin d'expliquer les différences entre les sexes.

Les résultats de cette thèse nous aident à mieux comprendre les variations interindividuelles dans le syndrome du QT long d'origine médicamenteuse. Les transporteurs ABC, comme la P-gp, s'ajoutent à la liste de facteurs pouvant entraîner des variabilités interindividuelles et des différences retrouvées entre les sexes dans le syndrome du QT long d'origine médicamenteuse. La « triade » d'interaction entre la P-gp, le CYP3A4 et *HERG* devrait être sous haute surveillance chez les patients à risque élevé tel que les patients avec un QT prolongé, un métabolisme inhibé (CYP3A4) ou chez les femmes. Ce dernier facteur devrait être d'autant plus surveillé lorsqu'un inhibiteur de la P-gp est administré en association avec un bloqueur d' $I_{Kr}$ . Il faut noter qu'avec le vieillissement de la population, la polythérapie est de plus en plus fréquente. Ainsi, il y a une augmentation du risque de provoquer des interactions médicamenteuses

dont celles pouvant entraîner une augmentation du QT. Comme les personnes âgées sont des plus susceptibles aux effets toxiques, les interactions médicamenteuses peuvent avoir des effets néfastes significatifs chez ces personnes. Ainsi, la vigilance clinique et le jugement des médecins et des pharmaciens sont importants lors de la co-administration d'un inhibiteur du métabolisme des CYP3A4 et/ou de l'activité des transporteurs P-gp avec un bloqueur des courants potassiques  $I_{Kr}$ .

## RÉFÉRENCES

1. Cuschieri J, Gourlay D, Garcia I, Jelacic S, Maier RV. Slow channel calcium inhibition blocks proinflammatory gene signaling and reduces macrophage responsiveness. *J Trauma* 2002;52(3):434-42.
2. Daschner PJ, Ciolino HP, Plouzek CA, Yeh GC. Increased AP-1 activity in drug resistant human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 1999;53(3):229-40.
3. Maren TH. Carbonic anhydrase: chemistry, physiology, and inhibition. *Physiol Rev* 1967;47(4):595-781.
4. Fuller SJ, Gaitanaki CJ, Sugden PH. Effects of catecholamines on protein synthesis in cardiac myocytes and perfused hearts isolated from adult rats. Stimulation of translation is mediated through the alpha 1-adrenoceptor. *Biochem J* 1990;266(3):727-36.
5. Baartscheer A, Schumacher CA, van Borren MM, Belterman CN, Coronel R, Fiolet JW. Increased Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchange activity is the cause of increased [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> and underlies disturbed calcium handling in the rabbit pressure and volume overload heart failure model. *Cardiovasc Res* 2003;57(4):1015-24.
6. Despa S, Islam MA, Weber CR, Pogwizd SM, Bers DM. Intracellular Na<sup>(+)</sup> concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged. *Circulation* 2002;105(21):2543-8.
7. Baartscheer A, Schumacher CA, van Borren MM, et al. Chronic inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger attenuates cardiac hypertrophy and prevents cellular remodeling in heart failure. *Cardiovasc Res* 2005;65(1):83-92.

8. Nuss HB, Kaab S, Kass DA, Tomaselli GF, Marban E. Cellular basis of ventricular arrhythmias and abnormal automaticity in heart failure. *Am J Physiol* 1999;277(1 Pt 2):H80-91.
9. Sipido KR, Volders PG, Schoenmakers M, De Groot SH, Verdonck F, Vos MA. Role of the Na/Ca exchanger in arrhythmias in compensated hypertrophy. *Ann N Y Acad Sci* 2002;976:438-45.
10. Sipido KR, Volders PG, de Groot SH, et al. Enhanced Ca(2+) release and Na/Ca exchange activity in hypertrophied canine ventricular myocytes: potential link between contractile adaptation and arrhythmogenesis. *Circulation* 2000;102(17):2137-44.
11. Knollmann BC, Knollmann-Ritschel BE, Weissman NJ, Jones LR, Morad M. Remodelling of ionic currents in hypertrophied and failing hearts of transgenic mice overexpressing calsequestrin. *J Physiol* 2000;525 Pt 2:483-98.
12. McIntosh MA, Cobbe SM, Kane KA, Rankin AC. Action potential prolongation and potassium currents in left-ventricular myocytes isolated from hypertrophied rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30(1):43-53.
13. Rautaharju PM, Zhou SH, Wong S, et al. Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Can J Cardiol* 1992;8(7):690-5.
14. Locati EH, Zareba W, Moss AJ, et al. 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):2237-44.
15. Zareba W, Moss AJ, Locati EH, et al. Modulating effects of age and gender on the clinical course of long QT syndrome by genotype. *J Am Coll Cardiol* 2003;42(1):103-9.

16. Liu XK, Katchman A, Drici MD, et al. Gender difference in the cycle length-dependent QT and potassium currents in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;285(2):672-9. 5.
17. Trepanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res* 2001;89(5):437-44.
18. Brouillette J, Trepanier-Boulay V, Fiset C. Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *J Physiol* 2003;546(Pt 2):403-13.
19. Bérubé J, Chahine M, Daleau P. Modulation of HERG potassium channel properties by external pH. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 1999; 438:419-22.

**ANNEXE I**

**DRUG-INDUCED LONG QT SYNDROME AND TORSADES DE  
POINTES**



**Drug-induced long QT syndrome and torsades de pointes**

Pierre Morissette, M.Sc., Raymond Hreiche, M.Sc., Jacques Turgeon, Ph.D.

Faculté de pharmacie, Université de Montréal.

**Running Title:** Drug-induced long QT syndrome.

**Acknowledgements:** Pierre Morissette is the recipient of a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Raymond Hreiche is the recipient of a studentship from a Valorisation Recherche Québec (VRQ) initiative. The laboratory is supported by the Heart and Stroke Foundation of Quebec, the FRSQ and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

**Address for correspondence:** Jacques Turgeon, PhD

Faculté de Pharmacie, Université de Montréal

C.P. 6128 succursale Centre-Ville

Montréal, Québec, Canada

H3C 3J7

Tel: (514) 343-6440

Fax: (514) 343-7377



December 3<sup>rd</sup> 2004

## Summary

The list of drugs associated with a prolongation of the QT interval and induction of torsades de pointes is lengthening everyday. Due to the clinical consequences of drug-induced torsades de pointes, the benefits of prescribing a QT prolonging drug must clearly outweigh the risk of inducing torsades de pointes. This review summarizes the electrophysiological mechanisms underlying drug-induced torsades de pointes. We shed light on the risk of proarrhythmia and sudden death associated with many drugs, especially in the context of polypharmacy. Moreover, we review the many factors that contribute to the development of torsades de pointes.

**Abstract**

Several medications, including drugs prescribed for non-cardiac indications, have been associated with a prolongation of the QT interval on the surface ECG. Under certain circumstances, this clinical manifestation may reflect an increased risk for patients of presenting a polymorphic ventricular tachycardia known as torsades de pointes. Drugs that prolong QT interval belong to several pharmacological classes but most of them share one pharmacological effect; they lengthen cardiac repolarization mostly through the block of specific cardiac potassium channels. Potent block of cardiac potassium channels and excessive lengthening of cardiac repolarization favor the development of membrane oscillations (early after depolarizations; EADs) due to calcium/sodium reentry. EADs when propagated may trigger torsades de pointes. In addition to excessive lengthening of the QT interval, other predisposing factors to drug-induced torsades de pointes include bradycardia, electrolyte imbalance, female gender and genetic polymorphisms in various ion channel constituents. In brief, drug-induced torsades de pointes is a relatively rare event in the entire population which nonetheless carries the risk of lethal consequences. Consequently, drug surveillance programs are very active in identifying drugs that induce prolongation of the QT interval. Recent data allow us to better understand the underlying electrophysiological mechanisms of the syndrome and better identify predisposing factors.

**Keywords:** Long QT syndrome, torsades de pointes, QT prolongation, potassium channel blockers.

## Résumé

Plusieurs médicaments incluant des agents pharmacologiques non anti-arythmiques ont été associés à une prolongation de l'intervalle QT et à un risque accru de proarythmie. Dans certaines conditions, cette prolongation du QT peut augmenter le risque de tachycardies ventriculaires polymorphes connues sous le nom de torsades de pointes. Bien que la majorité des médicaments prolongeant l'intervalle QT appartiennent à diverses classes pharmacologiques, ils possèdent une caractéristique commune; ils prolongent la repolarisation cardiaque par le blocage de canaux potassiques spécifiques. Le blocage des canaux potassiques et la prolongation excessive de la repolarisation cardiaque favorisent le développement d'oscillations du potentiel d'action membranaire suite à la réentrée de calcium/sodium (post dépolarisations précoces; EADs). Ces dépolarisations précoces peuvent se propager et provoquer des torsades de pointes. La bradycardie, les troubles électrolytiques, le genre féminin et certains polymorphismes au niveau des canaux ioniques comptent parmi les facteurs qui prédisposent à une prolongation du QT. Dans cet article, nous allons résumer les mécanismes électrophysiologiques et les facteurs prédisposant aux torsades de pointes. Bien que cette arythmie soit rare dans la population, elle peut entraîner des conséquences fatales. Par conséquent, des programmes de surveillances sont très actifs afin d'identifier les médicaments pouvant prolonger l'intervalle QT. Les recherches récentes nous permettent de mieux comprendre les mécanismes électrophysiologiques sous-jacents à la prolongation de l'intervalle QT et de mieux identifier les facteurs prédisposants.

**Mots clés:** Syndrome du QT long, torsades de pointes, prolongation du QT, bloqueurs des canaux potassiques.

The long QT syndrome (LQTS) was first described in 1957 by Jervell and Lange-Nielson in a family which several children presented congenital bilateral neural deafness<sup>1</sup>. Soon thereafter, a milder clinical form of congenital long QT syndrome was described by Romano and Ward<sup>2,3</sup>. In addition to these congenital syndromes, Selzer and Wray observed in 1964 that quinidine could also provoke QT prolongation and proarrhythmias<sup>4</sup>, a condition which was further described with several antiarrhythmic agents. Today, the list of drugs associated with a prolongation of the QT interval is rather long and this observation becomes increasingly intriguing as medications with no apparent cardiac actions are added to the list.

Consequently, drug surveillance programs have been very active recently in the monitoring of drug-induced prolongation of the QT interval. As well, basic research has provided data helping us understand the phenomenon: 1) Drugs that have been associated with a prolongation of the QT interval belong to several pharmacological classes. 2) Most of them share one pharmacological effect; they block specific cardiac potassium channels. 3) Block of cardiac potassium channels causes prolongation of the QT interval. 4) Excessive QT prolongation may favour the development of membrane oscillations (early after depolarizations; EADs). 5) EADs have been associated with the induction of a polymorphic ventricular tachycardia known as torsades de pointes. 6) This type of ventricular tachycardia can resolve spontaneously but it usually results in syncope. It can also be associated with sudden death<sup>5</sup>.

## The QT interval

The hallmark of all long QT syndromes is an abnormal ventricular repolarization marked by a prolonged QT interval on the surface electrocardiogram (ECG). This characteristic has been considered as one of the first markers of drug-induced torsades de pointes. The QT interval is defined as the time that elapses from the beginning of the QRS complex to the end of the T wave (Figure 1). The QT interval reflects ventricular repolarization and represents the summation of the duration of action potentials of ventricular cardiomyocytes. The QT interval duration and shape vary according to ECG lead <sup>6</sup>, time of day <sup>7</sup>, gender <sup>8</sup> and drug therapy. More importantly, cardiac repolarization vary inversely with the heart rate; it is therefore important to correct the QT interval for the heart rate (QTc).

QTc is considered prolonged when it is above 450 msec in men but 470 msec in women and children <sup>9</sup>. It could be tempting to say that anything below these values would be considered normal. But this is not true. In fact, in the absence of drug therapy, several patients with congenital long QT syndrome have a QTc of less than 450 msec, even 430 msec, while, healthy patients may present with a QTc up to 465 msec <sup>10,11</sup>. Some authors suggest that a QTc of less than 420 msec should be considered normal; a QTc between 420 and 440 msec borderline; and a QTc longer than 440 msec, long <sup>21</sup>.

Since most congenital long QT syndrome patients have QTc between 420 and 440 msec and many healthy volunteers are also in those regions, determining the risk for drug-induced torsades de pointes can become problematic. Consequently, there are no normal

QTc values for patients receiving drugs that prolong the QT interval. On the other hand, high risk patients such as known patients with long QT syndrome or patients that have a QTc greater than 500 ms should be monitored closely and evaluated by an expert (see treatment and recommendations).

Clinicians should be aware that all methods that have been proposed to derive a rate corrected QT value have their limitations. These limitations are mostly seen when applied to drug-induced changes in QT interval. The reason for this is that drugs may themselves alter heart rate. For example, the popular Bazett formula tends to overestimate the QTc at higher heart rates. Thus, a drug that does not affect the QT but accelerates heart rate could show an increase in QTc. In contrast the Bazett formula could underestimate the QTc when patients are treated with drugs, such as  $\beta$ -blockers, that slow heart rate.

### **Myocardial action potential and $I_{Kr}$**

Electrical excitation and action potential duration in the heart depend on the ion conductance activity of voltage-gated ion channels in cardiac cells. Without getting into great details, one can summarize that the action potential consists of three major phases (Figure 2). First, the depolarization phase which is mediated largely by the increase in  $Na^+$  permeability is due to the opening of voltage-sensitive  $Na^+$  channels. During the second phase, “the plateau phase”, the cell remains depolarized owing to the inward movement of  $Ca^{2+}$  ions through voltage-sensitive  $Ca^{2+}$  channels. Thirdly, the repolarization phase is mediated mostly by the activation of voltage-sensitive  $K^+$

channels that control the outward movement of  $K^+$  ions. Cardiac repolarization is the result of the outward electric current that reflects the difference between decreasing inward currents and increasing outward currents in the heart. Finally,  $K^+$  channels will also set the resting membrane potential of the cell and their threshold.

The most studied voltage-dependent  $K^+$  current is the delayed rectifier potassium current ( $I_K$ ). This current is composed of at least two kinetically and pharmacologically distinct potassium components; a rapidly-activating ( $I_{Kr}$ ) and a slowly-activating ( $I_{Ks}$ ) component.  $I_{Kr}$  that activates rapidly relative to  $I_{Ks}$  is encoded by the human ether-a-go-go-related gene (*HERG*; *KCNH2*). *HERG* is highly expressed in the heart and it codes for a protein which possesses six transmembrane segments <sup>12</sup>. More specifically, *HERG* codes for the major subunit of  $I_{Kr}$  that is the major current responsible for the repolarization phase of the action potential in human <sup>13</sup>. Blockade of  $I_{Kr}$  current manifests clinically as a prolonged QT interval and the emergence of other T or U wave abnormalities on the body surface ECG. Most drugs known to cause torsades de pointes have been shown to block  $I_{Kr}$ .

On the other hand, the coassembly of two gene products, *KCNQ1* (*KvLQT1*) and *KCNE1* (*minK*) forms the slowly activating component of the delayed rectifier potassium current ( $I_{Ks}$ ) which is also voltage-dependent and  $K^+$  selective <sup>14</sup>. A decrease in  $I_{Ks}$  may also predispose patients to torsades de pointes.



### **Early after depolarizations (EADs)**

EADs have been described as oscillations in the membrane potential that arise during the repolarization phase of the action potential. The cellular basis for early after depolarizations is the reopening of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  and/or  $\text{Na}^+$  channels during the plateau phase of the action potential. In fact, as the cells begin to repolarize, they enter into a relative refractory period, during which  $\text{Na}^+$  and/or  $\text{Ca}^{2+}$  channels can be reactivated. As a result, the action potential not only fails to repolarize but also depolarizes again, creating characteristic humps in the action potential (Figure 3). A reduction in net outward current (eg.  $\text{K}^+$  ions) and an increase in inward current (eg.  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Na}^+$ ) can potentially facilitate the development of EADs. If conducted in a significant region of the heart, EADs may cause ectopic beats. Furthermore, EAD-induced ectopic beats can trigger re-entrant tachycardia.

### **Heterogeneity of ventricular repolarization**

QT prolongation and EADs should not be the sole factors considered when judging the risk of proarrhythmia associated with a drug. In fact, differences in action potential duration and refractory periods among various cell types in the myocardium may cause heterogeneity of repolarization and can provide a substrate to re-entrant tachycardia. In fact, Purkinje fibers and midmyocardial cells have been shown to have the longest action potential durations compared to epicardial and endocardial cells. Differences among cell types in their repolarization phase are due to the variable expression and density of ionic currents<sup>15</sup>.

It is well known that tachycardia dependent T-wave alternans occur in the genetic and drug-induced forms of the long QT syndrome and may be a warning for the onset of torsades de pointes. T-wave alternans are a change in the morphology and/or the amplitude of a component the T wave on the body surface ECG <sup>16</sup>. Alternans may reflect an underlying dispersion of repolarization in the heart <sup>17</sup>.

Recently, the electrophysiologic basis of arrhythmogenicity of T alternans in the long QT syndrome was shown to be primarily caused by the greater degree of spatial dispersion of repolarization during alternans <sup>18</sup>. Local repolarization dispersion was predominant between midmyocardial and epicardial zones in the left ventricular (LV) free wall. Considerable degree of repolarization dispersion may develop between various regions of the ventricle. Under these conditions, propagation of the activation wavefront can be blocked between these zones which could initiate re-entrant excitation and polymorphic ventricular tachyarrhythmias. Increased dispersion of repolarization across the LV wall is an important initiating factor for torsades de pointes in the long QT syndrome <sup>15,19</sup>.

### **Torsades de pointes**

Torsades de pointes are polymorphic ventricular tachyarrhythmias characterized by a twisting of the QRS complex around the isoelectric line of the body surface ECG. This twisting is caused by a polarity switch which goes from positive to negative on the frontal plan of the ECG. Excessive prolongation of the QT interval occurs when there is

a net decrease in repolarizing current that can predispose the myocardium to early after depolarizations (EADs).

A characteristic initiating sequence of torsades de pointes was described by Kay in 1983 and titled the *short-long-short ventricular cycle length*<sup>20,21</sup>. This sequence describes a series of cycle length changes just prior to the initiation of an episode of torsades de pointes. In this sequence, an ectopic beat or short run of tachycardia is followed by a compensatory pause and a normal sinus beat (Figure 4). The QT interval of this sinus beat is markedly prolonged because of the apparent significant slowing in heart rate. The longer repolarization phase allows the development of EADs and the induction of torsades de pointes. As discussed previously, T-wave alternans and heterogeneity in ventricular repolarization may also contribute significantly to the induction of the re-entrant circuit leading to torsades de pointes.

Torsades de pointes can cause symptoms ranging from short lived dizziness to syncope. Moreover, torsades are very unstable arrhythmias. They can stop spontaneously or deteriorate to ventricular fibrillation, ultimately leading to cardiac arrest. Due to the severity of this arrhythmia, it is imperative that patients presenting torsades de pointes symptoms be monitored for genetically-related causes or have a complete drug history for the identification of drug-induced long QT. As noted previously, electrophysiological markers of torsades de pointes include; 1) a decrease in net repolarizing currents that lead to prolonged QT intervals; 2) generation of early after depolarizations and; 3) increased heterogeneity of repolarization leading to re-entrant circuits.

## Drug induced QT prolongation

As early as 1918, Frey described the phenomenon of syncope induced by quinidine<sup>22</sup>. It was only in 1962 that Rainier-Pope related this phenomenon to malignant ventricular tachyarrhythmias<sup>23</sup>. Selzer and Wray finally introduced the term “quinidine syncope” into our vocabulary when they published their observations on the occurrence of torsades de pointes in eight patients treated with quinidine<sup>4</sup>.

It is now well accepted that many antiarrhythmic agents prolong the QT interval and can suppress, as well as induce, tachyarrhythmic events. In addition, drug surveillance programs have been very active recently in the monitoring of drug-induced prolongation of the QT interval and a variety of non-cardiovascular drugs have also been associated with QT prolongation and induction of torsades de pointes. Electrophysiological studies have shown that most of the QT prolonging drugs modulate potassium currents involved in cardiac repolarization and possess a high affinity for the rapid component of the cardiac delayed rectifier potassium channel ( $I_{Kr}$ ).  $I_{Kr}$  blockers gain access to their binding site on the HERG subunit from an intracellular site<sup>24</sup> and characterization of the binding site of several  $I_{Kr}$  blockers indicate the key role of amino acids located on the S6 transmembrane domain (G648, Y652, and F656)<sup>25</sup>.

Table 1 and 2 list many cardiac and non-cardiac drugs that have the potential to prolong the QT interval. For example, lengthening of the QT interval and torsades de pointes resulting in cardiac arrest have been observed during treatment with the gastrointestinal

prokinetic agent cisapride. Using isolated guinea pig hearts, we determined that block of  $I_{Kr}$  could explain the lengthening of cardiac repolarization observed in patients<sup>26</sup>. Following these observations, and several case reports of sudden death with the drug, cisapride was withdrawn from the market because of its proarrhythmic effects.

Erythromycin administration to humans has also been associated with lengthening of the QT interval and proarrhythmia<sup>27,28,29</sup>. Prolongation of cardiac repolarization by erythromycin was explained by its selective block of  $I_{Kr}$ <sup>30</sup>. Moreover, many antipsychotics have also been found to prolong the QT interval<sup>31</sup>. Indeed, cases of QT prolongation and sudden death have been observed with risperidone<sup>32</sup>, pimozide<sup>33,34</sup>, clozapine,<sup>35</sup> and more recently olanzapine<sup>35,36</sup>. Accordingly, experiments using *HERG* transfected cells suggest a direct antagonistic effect of many antipsychotics on  $I_{Kr}$ <sup>37,38</sup>,<sup>39</sup>. Many other examples of QT prolonging drugs are found in agents used as general anaesthetics, antidepressants, antiasthmatics, antiemetics and diuretics. The impressive list of drugs already on the market or under development that can induce QT prolongation makes it crucial to investigate any new chemical entities for QT interval prolongation before its first use in man.

## **Predisposing factors to drug-induced torsades de pointes**

### **a) Electrolyte imbalance**

Electrolyte disorders, particularly hypokalemia, can be considered as important factors for the occurrence of torsades de pointes and acquired long QT syndrome. Arrhythmias may develop in hypokalemic patients due to enhanced normal automaticity or slowed

conduction. Slowed conduction may predispose to re-entrant repetitive rhythms since under conditions of severe extracellular potassium deficiency, depolarization of cell membrane can occur. More recently, Roden and his colleagues demonstrated that the mechanism underlying QT prolongation at low  $[K^+]_O$  is based on a more extensive fast inactivation of  $I_{Kr}$ <sup>40</sup>. Faster inactivation of  $I_{Kr}$  leads to an overall decrease in outward repolarizing currents and prolonged repolarization.

Magnesium deficiency has also been suggested as a precipitating factor for long QT syndrome and torsades de pointes. Like potassium, a low extracellular magnesium concentration has been associated with abnormalities of depolarization, repolarization and automaticity. On the other hand, effects of low magnesium levels appear to be dependent on the concentrations of calcium and potassium. Contrary to potassium, the mechanism by which low magnesium levels generate abnormal action potentials is not clearly understood<sup>41, 42</sup>.

#### **b) Bradycardia**

The slower the heart rate, the longer the repolarization will be. Marked bradycardia caused by slow sinus rhythm, hypothyroidism or hypothermia may enhance the chances of developing torsades de pointes by prolonging the QT interval in M and Purkinje cells due to their longer repolarization times. It is well known that  $I_{Kr}$  blockers prolong the repolarization time more greatly at slower heart rates. This reverse use-dependence characteristic of  $I_{Kr}$  blockers can also account for the prolongation of the QT interval with subsequent development of EADs observed at slow heart rates.

### c) Toxins

Cases of torsades de pointes associated with arsenic poisoning have been reported<sup>43</sup>. They can be due to QT prolongation and TU wave alternans in presence of arsenic. Cocaine abuse and organophosphorous toxicity have also been reported to prolong the QT interval<sup>44</sup>. Organophosphorous insecticides can be toxic due to their production of marked vagal stimulation by cholinesterase inhibition<sup>45</sup>.

### d) Gender

Many clinical observations indicate that females are at higher risk of developing drug-induced torsades de pointes. In 1993, Makkar published an analysis of the gender distribution of 332 cases of torsades de pointes induced by antiarrhythmic drugs<sup>46</sup>. They observed that 70% of the torsades occurred in women. These results clearly demonstrated for the first time that women were at an increased risk of developing torsade de pointes. Larger studies with the *d*-isomer of sotalol also found female gender as the major risk factor associated with increased risk of arrhythmia in a post-myocardial infarction population<sup>47</sup>. Relative to placebo, *d*-sotalol was associated with a 4.7-fold increased risk of death in women and a 1.4-fold increase in men.

The mechanism responsible for the predisposition of women to torsades de pointes are unknown but may be related to the fact that the baseline QTc interval is naturally longer in women than in men after puberty<sup>48</sup>. 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 in men around the age of 50 or 60<sup>49</sup>. This shortening of the QT interval gives an added protection to torsades de pointe in males compared to females.

These evidences led to the hypothesis that sex steroids are the cause for the prolonged QTc observed. In fact, studies have demonstrated that there is an important down regulation of mRNA concentrations encoding for the IsK ( $I_{Ks}$ ) and Kv 1,5 ( $I_{Kur}$ ) potassium genes when ovariectomized rabbits were treated with  $17\beta$ -estradiol or dihydrotestosterone (DHT)<sup>50</sup>. A more recent study has indicated that menstrual cycle differences exist in QTc responses to ibutilide with the greatest increase in QTc during menses and ovulation of the menstrual cycle<sup>51</sup>. These results provide some evidences that sex hormones can modulate the expression of ion channels. However, scientists agree that mechanisms responsible for gender-related differences in the risk of proarrhythmia from drugs remain largely undefined.

#### **e) Cerebrovascular disease**

Marked QT prolongation has been observed during subarachnoidal haemorrhage, cerebral strokes, encephalitis and intracranial trauma<sup>52, 53</sup>. In subarachnoidal haemorrhages, the influence of the autonomic system on cardiac repolarization is likely responsible for the arrhythmia in this situation. However, QT prolongation usually resolves in a matter of days or weeks in most patients that have suffered from cerebrovascular accidents.



### **f) Inhibition of cytochrome P450**

The cytochrome P450 is a superfamily of hemoproteins classified into families and sub-families according to similarities in amino acid sequences<sup>54</sup>. It is believed that 4 of these families are primarily involved in the metabolism of therapeutic compounds, namely CYP1, CYP2, CYP3 and CYP4. CYP3As are the predominant P450 found in human adult liver and are also expressed at high levels in the small intestine<sup>46</sup>.

It is apparent from pharmacokinetic and pharmacodynamic studies that several compounds that possess the structure requirements for being a substrate of CYP3As also possess structural requirements for binding to  $I_{Kr}$ . We have screened for potential  $I_{Kr}$  blockers using this strategy and identified drugs such as erythromycin<sup>55</sup>, cisapride<sup>26</sup>, droperidol<sup>38</sup>, pimozone<sup>56</sup>, sildenafil<sup>57</sup>, thioridazine<sup>58</sup> and domperidone<sup>59</sup>.

One must realize that coadministration of CYP3A substrates may lead to drug-drug interactions. Indeed, competitive inhibition of CYP3As activity observed during the combined use of CYP3As substrates leads to increased total and free plasma concentrations of one of the drugs. The drug can then distribute more to tissues, including the heart, and drugs with  $I_{Kr}$  binding affinity can cause greater inhibition of this protein. More  $I_{Kr}$  block leads to greater action potential prolongation and an increased risk of torsades de pointes. For example, co-administration of terfenadine along with the macrolide antibiotic erythromycin can lead to a critical accumulation of terfenadine due to the inhibition of CYP3As by erythromycin<sup>60</sup>. Inhibition of terfenadine metabolism by CYP3As during erythromycin administration caused

accumulation of terfenadine in plasma and in the heart leading to prolongation of cardiac repolarization and torsades de pointes. The underlying mechanism of QT prolongation by terfenadine was obviously shown to be related to  $I_{Kr}$  block <sup>61</sup>.

#### **g) P-glycoprotein**

An additional factor that could contribute to the induction of QT prolongation and torsades de pointes is P-glycoprotein inhibition. P-glycoprotein (P-gp) is a member of the ABC (ATP-binding cassette) superfamily of active transporters. These transporters hydrolyse ATP to drive the flux of their substrate against a concentration gradient. As so, P-gp is a versatile, energy-dependent efflux transporter that is able to pump a wide variety of xenobiotics from intracellular towards extracellular sites <sup>62</sup>. P-gp is widely expressed in normal tissues and may play an important role in the disposition of drugs. P-gp is localized at the apical surface of cells in the intestinal epithelium, biliary canaliculi, renal proximal tubules and blood-brain barrier <sup>62</sup>. Therefore, P-gp can be an important factor in the distribution of drugs to these tissues and it can modulate the intracellular concentration of its substrate drugs. In fact, under conditions of decreased activity an intracellular accumulation of drugs can be observed.

Recent studies suggest that P-gp is also expressed in the heart <sup>63</sup>. Hence, inhibition of this transporter could lead to elevated intracardiac concentrations of drugs and could potentially cause dangerous accumulation of these drugs in this tissue. We recently demonstrated that prolongation of cardiac repolarization by cisapride is significantly augmented when guinea pigs are pre-treated with a P-gp modulator, verapamil <sup>64</sup>.

Therefore, special attention should be given when administering a QT prolonging medication in combination with a P-gp modulator.

### **Treatment recommendations**

Most drug-induced forms of the long QT syndrome are the consequence of an overdose or drug-drug pharmacokinetic interaction. Even if very rare, an arrhythmia from a non-cardiac drug may be devastating and therefore, it seems prudent to avoid drugs that have a notable effect on the QT interval when possible. When a drug is known to cause clinically significant QT prolongation, it should be carefully monitored and the patient should be advised about what other medications to avoid, especially drugs known to compete for their metabolism or distribution. Patients with borderline prolonged QT interval at baseline before treatment should be carefully monitored when administered a QT prolonging drug. Patients should be advised to report any symptoms such as near syncope, syncope, palpitations or the intake of other new therapy including natural products that could potentiate the QT prolonging effects. Routine ECG during treatment to detect abnormal QT prolongation may also be considered in high risk patients.

The prevention of drug-induced torsades de pointes should begin with the identification and the correction of the risk factors such as bradycardia or hypokalemia. In high risk patients, pre and post-treatment QTc intervals should be recorded and the treatment should be diminished or stopped when the QTc is above 500 msec, although no absolute value of QTc predicts the development of arrhythmias in all patients<sup>65, 66</sup>.

Patients who developed drug-induced torsades de pointes should be carefully monitored. In these patients, drugs that are known to prolong the QT interval or to produce torsades de pointes should be avoided. Furthermore, drugs that decrease drug metabolism by inhibiting the cytochrome P450 system should also be avoided. In patients with borderline QTc intervals (420 – 440 msec) it is necessary to obtain a careful history with special attention to symptoms such as palpitations, dizziness and syncope. Admitting patients for in-hospital monitoring at drug initiation could be an option to keep a close look at the warning signs that precede torsades de pointes such as a QTc greater than 500 msec, biphasic T waves or prominent U waves. Any of these signs should alert the physician to exercise great care during the course of treatment who may have to discontinue the therapy for other medications that are not associated with QT prolongation.

When prevention has failed, intravenous magnesium is the agent of choice for immediate treatment of torsades de pointes associated with the drug-induced form of the long QT syndrome<sup>67</sup>. It is not clear how magnesium can prevent the recurrence of torsades de pointes but it has been proposed that it could modulate gating of ether-a-go-go potassium channels<sup>68</sup>. If intravenous magnesium therapy fails to stop torsades de pointes a temporary transvenous pacemaker can be installed. Temporary pacing at 90 to 110 beats per minute can be effective at preventing short-term recurrences of torsades de pointes associated with drug induced form of the long QT syndrome. Pacing, atropine and/or isoproterenol infusion can correct for bradycardia, pauses and EADs which have been shown to be pro-arrhythmic<sup>69</sup>.

## **Conclusion**

Drug-induced forms of the long QT syndrome may be associated with life-threatening torsades de pointes. Although the occurrence of torsades de pointes is relatively rare, its importance lies in the potential lethality associated to this ventricular tachyarrhythmia and to the failure to recognize and treat symptomatic patients. Since the first symptoms can be sudden death, high-risk patients should be carefully monitored. Fatalities are most likely to occur when drug-induced QT prolongation are associated with other risk factors, such as bradycardia, hypokalemia, hypomagnesemia, polypharmacy or gender. Therefore special care should be given when there is administration of high risk drugs to high risk patients. When the choice is made to prescribe a QT prolonging medication to patients, the benefits must clearly outweigh the risk of inducing torsades de pointes.

**Table 1.** Antiarrhythmic drugs with QT prolonging potential

<b>Class</b>	<b>Chemical name</b>
IA	Disopyramide
	Procainamide
	Quinidine
III	Amiodarone
	Sotalol
	Dofetilide
	Ibutilide
	Bretylum
IV	Verapamil

**Table 2.** Non-antiarrhythmic drugs with QT prolonging potential (this list is not exhaustive)

Class	Chemical name	Class	Chemical name
Antibiotics	Clarithromycin	Antiasthmatics	Fenoterol
	Erythromycin		Procaterol
	Grepafloxacin (withdrawn from market)		Salbutamol
	Pentamidin		Salmeterol
	Sparfloxacin	Antipsychotics	Amisulpride
	Sulphamethoxazole/trimethoprim		Chlorpromazine
Anaesthetic drugs	Enflurane	Clozapine	
	Fentanyl	Droperidol	
	Isoflurane	Haloperidol	
	Ketamine	Mesoridazine	
	Pentobarbital	Olanzapine	
	Propofol	Pimozide	
	Thiopental	Prochlorperazine	
Antidepressant	Amitriptyline	Risperidone	
	Desipramine	Sultopride	
	Doxepin	Thioridazine	
	Fluoxetine	Antiemetics	Dolasetron
	Imipramine		Granisetron
	Maprotiline		Ondansetron
	Trazodone		Antifungals
	Venlafaxine	Ketoconazole	
Antihistamines	Astemizole (withdrawn from market)	Diuretic	Indapamide
	Azelastine		Triamterene
	Clemastin		

	Diphenhydramine		
	Fexofenadine	Gastrointestinal prokinetics	Cisapride (withdrawn from market)
	Terfenadine (withdrawn from market)		Domperidone
Calcium channel blockers	Prenylamine	Immunosuppressant	Tacrolimus
	Bepidil		
	Terodiline		



## References

1. Jervell A, Lange-Nielsen F: Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J* 1957;54:59-68
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. *Clinical pediatric (Bologna)* 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. Selzer A, Wray HW: Quinidine syncope. Paroxysmal ventricular fibrillation occurring during treatment of chronic atrial arrhythmias. *Circulation* 1964;30:17-26
5. Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ: Torsade de Pointes. Mechanisms and management. *Drugs* 1994;47:51-65
6. 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 proarrhythmia by non-antiarrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a policy conference of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2000;21:1216-1231
7. Morganroth J, Brozovich FV, McDonald JT, Jacobs RA: Variability of the QT measurement in healthy men, with implications for selection of an abnormal QT value to predict drug toxicity and proarrhythmia. *Am J Cardiol* 1991;67:774-775

8. Drici MD, Clément N: Is gender a risk factor for adverse drug reactions? *Drug Safety* 2001;24:575-585
9. Moss AJ: The QT interval and torsade de pointes. *Drug Safety* 1999;21:5-10
10. Vincent GM, Timothy KW, Leppert M, Keating M: The spectrum of symptoms and QT interval in carriers of the gene for the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 1992;327:846-852
11. Allan WC, Timothy K, Vincent GM, Palomaki GE, Neveux L, Haddow JE: Long QT syndrome in children: the value of the rate corrected QT interval in children who present with fainting. *Journal of Medical Screening* 2001;8:178-182
12. Smith PL, Baukrowitz T, Yellen G: The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 1996;379:833-836
13. Zehelein J, Zhang W, Koenen M, Graf M, Heinemann SH, Katus HA: Molecular cloning and expression of cERG, the ether à go-go-related gene from canine myocardium. *European Journal of Physiology* 2001;442:188-191
14. Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT: Coassembly of  $K_vLQT1$  and minK (IsK) proteins to form cardiac  $I_{Ks}$  potassium channel. *Nature* 1996;384:80-83
15. Belardinelli L, Antzelevitch C, Vos MA: Assessing predictors of drug-induced torsade de pointes. *TIPS* 2003;24:619

16. Walker ML, Rosenbaum DS: Repolarization alternans: implications for the mechanism and prevention of sudden cardiac death. *Cardiovasc Res* 2003;57:599-614
17. El-Sherif N, Turitto G, Pedalino RP, Robotis D: T-wave alternans and arrhythmia risk stratification. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2001;6:323-332
18. El-Sherif N, Turitto G: Torsade de pointes. *Current Opinion in Cardiology* 2003;18:6-13
19. Shimizu W, Antzelevitch C: Cellular basis for the ECG features of the LQT1 form of the long-QT syndrome. Effects of  $\beta$ -adrenergic agonists and antagonists and sodium channel blockers on transmural dispersion of repolarization and torsade de pointes. *Circulation* 1998;98:2314-2322
20. 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. *J Am Coll Cardiol* 1983;5:806
21. Yap YG, Camm AJ: Drug induced QT prolongation and torsades de pointes. *Heart* 2003;89:1363-1372
22. Frey W: Weitere Erfahrungen mit Chinidin bei absoluter Herzunregel-massigkeit Wien. *Med Wochenschr* 1918;55:849-843
23. Rainier CR, Schrire V, Beck W, Barnard CN: The treatment of quinidine-induced ventricular fibrillation by closed-chest resuscitation and external defibrillation. *Am Heart J* 1962;63:582-590

24. Zou A, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti MC: Single HERG delayed rectifier  $K^+$  channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 1997;272:H1309-H1314
25. Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti MC: A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:12329-12333
26. 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;97:204-210
27. Nattel S, Ranger S, Talajic M, Lemery R, Roy D: Erythromycin-induced long QT syndrome: concordance with quinidine and underlying cellular electrophysiologic mechanism. *Am J Med* 1990;89:235-238
28. Guelon D, Bedock B, Chartier C, Haberer JP: QT prolongation and recurrent "torsades de pointes" during erythromycin lactobionate infusion. *Am J Cardiol* 1986;58:666
29. McComb JM, Campbell NPS, Cleland J: Recurrent ventricular tachycardia associated with QT prolongation after mitral valve replacement and its association with intravenous administration of erythromycin. *Am J Cardiol* 1984;54:922-923
30. 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;91:3010-3016
31. Taylor DM: Antipsychotics and QT prolongation. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 2003;107:85-95

32. 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;41:934-937
33. Fulop G, Phillips RA, Shapiro AK, Gomes JA, Shapiro E, Nordlie JW: ECG changes during haloperidol and pimozide treatment of Tourette's disorder. *Am J Psychiatry* 1987;144:673-675
34. Krahenbuhl S, Sauter B, Kupferschmidt H, Krause M, Wyss PA, Meier PJ: Case report: Reversible QT prolongation with torsades de pointes in a patient with pimozide intoxication. *Am J Med Sci* 1995;309:315-316
35. Drici, M. D., Wang, W. X., Liu, X K., Woosley, R. L., and Flockhart, D. A. Prolongation of QT interval in isolated feline hearts by antipsychotic drugs. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 1998; 18 (6), 477-481.
36. Gupta N, Malhotra P: Olanzapine: A proarrhythmic drug? *Can J Psychiatry* 2002;47:683-684
37. Tie H, Walker BD, Singleton CB, Bursill JA, Wyse KR: Clozapine and sudden death. *J Clin Psychopharmacol* 2001;21:630-631
38. Drolet B, Zhang S, Deschênes 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;10:1597-1604
39. Hancox JC, Witchel HJ: Psychotropic drugs, HERG, and the heart. *Lancet* 2000;356:428

40. Yang T, Synders DJ, Roden DM: Rapid inactivation determines the rectification and  $[K^+]_o$  dependence of the rapid component to the delayed rectifier  $K^+$  current in cardiac cells. *Circ Res* 1997;80:782-789
41. 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;238:163-79
42. Altura BM, Altura BT: New perspectives on the role of magnesium in the pathophysiology of the cardiovascular system. II. Experimental aspects. *Magnesium* 1985;4:245-271
43. Little RE, Kay GN, Cavender JB, Epstein AE, Plumb VJ: Torsade de pointes and T-U wave alternans associated with arsenic poisoning. *PACE* 1990;13:164-170
44. Singh N, Singh HK, Singh PP, Khan IA: Cocaine-induced torsades de pointes in idiopathic long Q-T syndrome. *American Journal of Therapeutic* 2001;8:299-302
45. 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. *Am J Cardiol* 1982;49:1654-1658
46. Kolars JC, Lown KS, Schmiedlin-Ren P, Ghosh M, Fang C, Wrighton SA, Merion RM, Watkins PB: CYP3A gene expression in human gut epithelium. *Pharmacogenetics* 1994;4:247-259

47. Itazaki K, Shigeri Y, Fujimoto M: Molecular cloning and characterization of the angiotensin receptor subtype in porcine aortic smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1993;245:147-156
48. Bazett HC: An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart* 1920;7:353-370
49. Kleinman LI, Loewenstein MS, Goldstein L: Sex difference in the transport of p-aminohippurate by the rat kidney. *Endocrinology* 1966;78:403-406
50. 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;94:1471-1474
51. Rodriguez I, Kilborn MJ, Liu XK, Pezzullo JC, Woosley RL: Drug-induced QT prolongation in women during the menstrual cycle. *JAMA* 2001;285:1322-1326
52. Di Pasquale G, Pinelli G, Andreoli A, Manini GL, Grazi P, Tognetti F: Torsade de pointes and ventricular flutter-fibrillation following spontaneous cerebral subarachnoid hemorrhage. *Int J Cardiol* 1988;18:163-172
53. Sen S, Stober T, Burger L, Anstatt T, Rettig G: Recurrent torsade de pointes type ventricular tachycardia in intracranial hemorrhage. *Intensive Care Medicine* 1984;10:263-264
54. 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;6:1-42

55. Harris S, Hilligoss DM, Colangelo PM, Eller M, Okerholm R: Azithromycin and terfenadine: lack of drug interaction. *Clin Pharmacol Ther* 1995;58:310-315

56. 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 and Ther* 2001;6:255-260

57. Geelen P, Drolet B, Rail J, Bérubé 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;102:275-277

58. Drolet B, Vincent F, Rail J, Chahine M, Deschênes D, Nadeau S, Khalifa M, Hamelin BA, Turgeon J: Thioridazine lengthens repolarization of cardiac ventricular myocytes by block of the delayed rectifier potassium current. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288:1261-1268

59. 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

60. 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;52:231-238



61. Woosley RL, Chen Y, Freiman JP, Gillis RA: Mechanism of the cardiotoxic actions of terfenadine. *JAMA* 1993;269:1532-1536
62. Silverman JA: Multidrug-resistance transporters. In: Amidon GL and Sadée W, eds. *Membrane transporters as drug targets*: Kluwer Academic/Plenum, 1999: 353-387
63. Meissner K, Sperker B, Karsten C, Meyer zu Schwabedissen H, Seeland U, Bohm M, Bien S, Dazert P, Kunert-Keil C, Vogelgesang S, Warzok R, Siegmund W, Cascorbi I, Wendt M, Kroemer HK: Expression and localization of P-glycoprotein in human heart: effects of cardiomyopathy. *J Histochem Cytochem* 2002;50:1351-1356
64. Morissette P, Morin N, Turgeon J: ATP binding cassette membrane transporters as a key determinant for sex-related differences in drug-induced long QT syndrome. *Heart Rhythm* 2004;1:S93(Abstract)
65. Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, Siegl PK, Strang I, Sullivan AT, Wallis R, Camm AJ, Hammond TG: Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc Res* 2003;58:32-45
66. van Opstal JM, Schoenmakers M, Verduyn SC, de Groot SHM, Leunissen JDM, van der Hulst FF, Molenschot MMC, Wellens HJJ, Vos MA: Chronic amiodarone evokes no torsade de pointes arrhythmias despite QT lengthening in an animal model of acquired long-QT syndrome. *Circulation* 2001;104:2722-2727

67. Tzivoni D, Banai S, Schuger C, Benhorin J, Keren A, Gottlieb S, Stern S: Treatment of torsades de pointes with magnesium sulfate. *Circulation* 1988;77:392-397
68. Silverman WR, Tang CY, Mock AF, Huh KB, Papazian DM.: Mg(2+) modulates voltage-dependent activation in ether- $\bar{A}$ -go-go potassium channels by binding between transmembrane segments S2 and S3. *J Gen Physiol.* 2000;116 (5):663-78.
69. Damiano BP, Rosen MR: Effects of pacing on triggered activity induced by early afterdepolarizations. *Circulation* 1984;69:1013-1025
70. Alonzo AJ, Levesque PC, Blana. Overview : The role of potassium channels in cardiac arrhythmias. In: Archer SL, Rusch NJ, eds. *Potassium channels in cardiovascular biology*: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001:727-52
71. Roden DM, Iansmith DHS. Effects of low potassium or magnesium concentrations on isolated cardiac tissue. *Am J Med* 1987; 82 (suppl 3A): 18-23

### Figure legends

**Figure 1.** The QT interval of a classic surface electrocardiogram. QT interval is defined as the time that elapses from the beginning of the QRS complex to the end of the T wave.

**Figure 2.** Ventricular monophasic action potential and its three major phases. First, the depolarization phase is mediated by the opening of voltage-sensitive  $\text{Na}^+$  channels. Second, “the plateau phase”, the cell remains depolarized owing to the inward movement of  $\text{Ca}^{2+}$ . Thirdly, the repolarization phase is mediated by the outward movement of  $\text{K}^+$  ions.

**Figure 3.** Prolongation of the action potential can facilitate the occurrence of early afterdepolarizations (EADs) which often occurs before the initiation of torsades de pointes. EADs have been demonstrated in patients with congenital and acquired long QT syndrome. Adapted from <sup>70</sup>.

**Figure 4.** Rhythm recording in a patient with drug-induced torsades de pointes. The initiating sequence is composed of a short run of tachycardia followed by a compensatory pause and a subsequent normal sinus beat. The QT interval of this sinus beat is prolonged and torsades de pointes begin after the peak of the T-wave of this prolonged QT. Adapted from <sup>71</sup>.

Figure 1

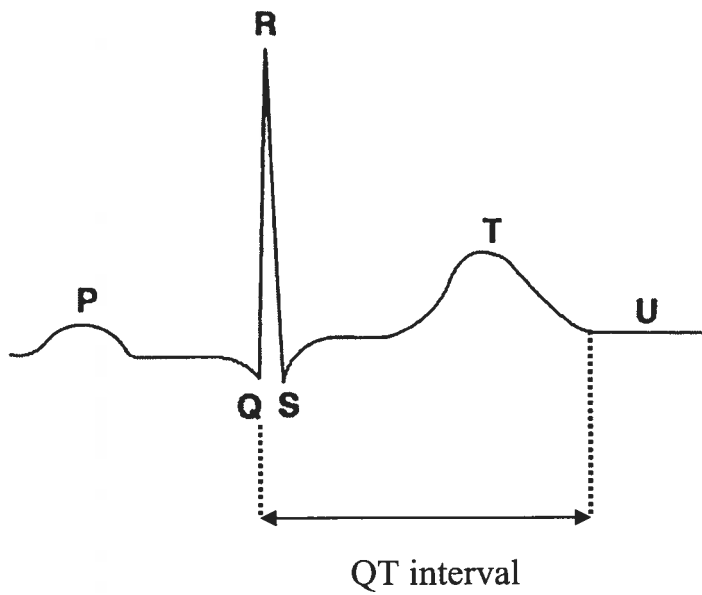
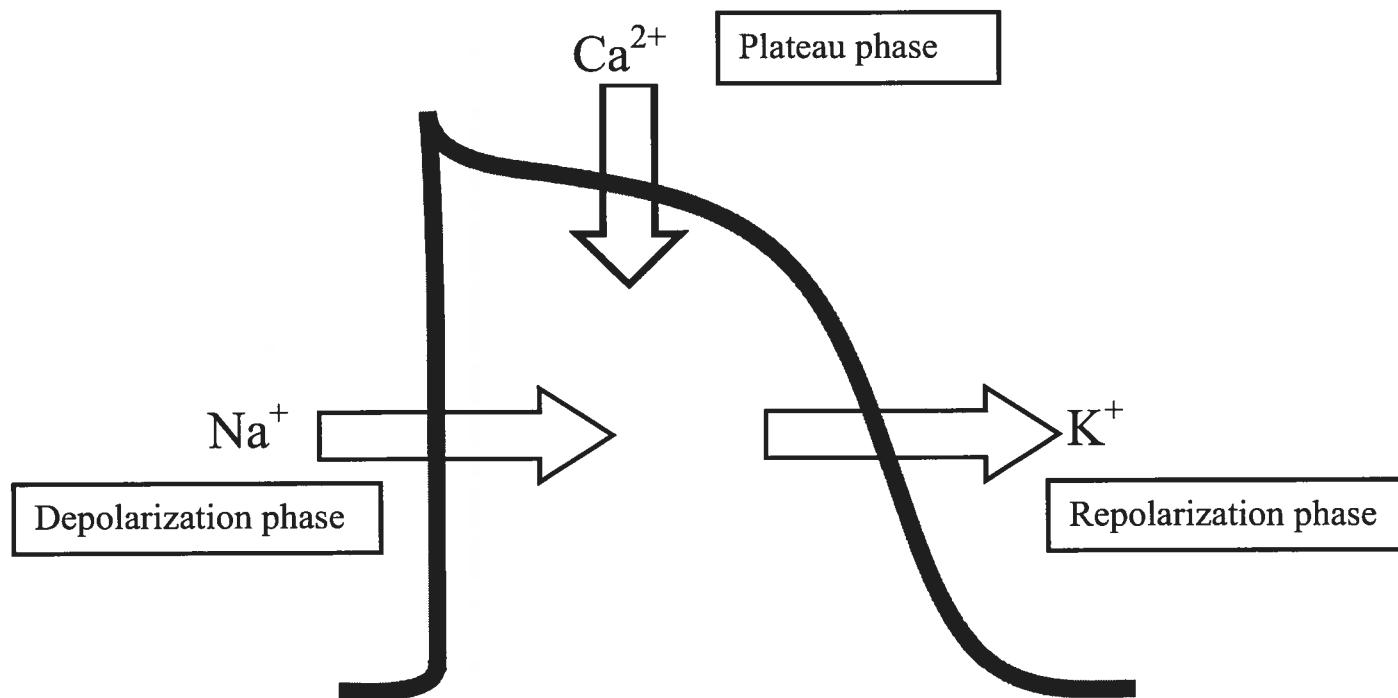


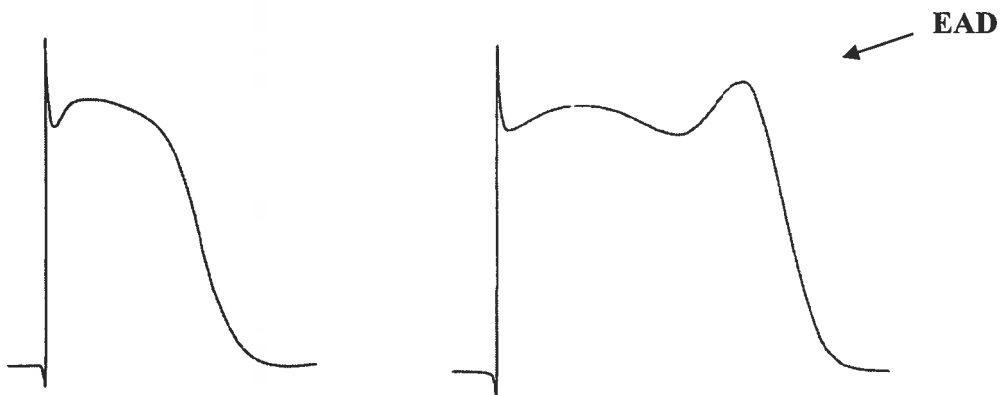
Figure 2

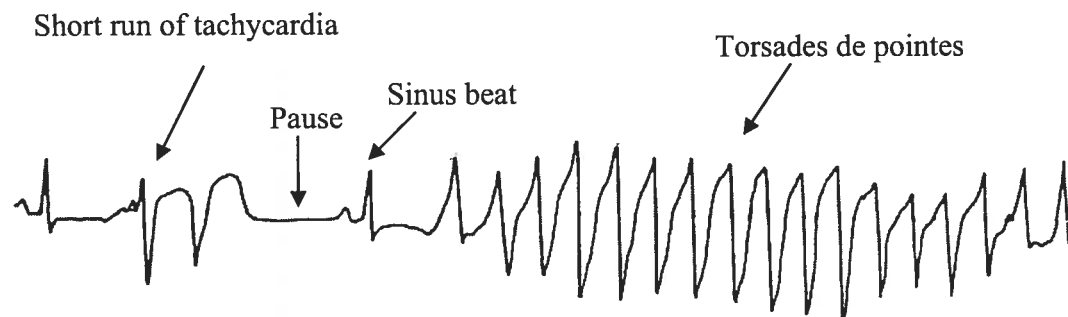


**Figure 3**

**Normal action potential**

**Prolonged action potential**



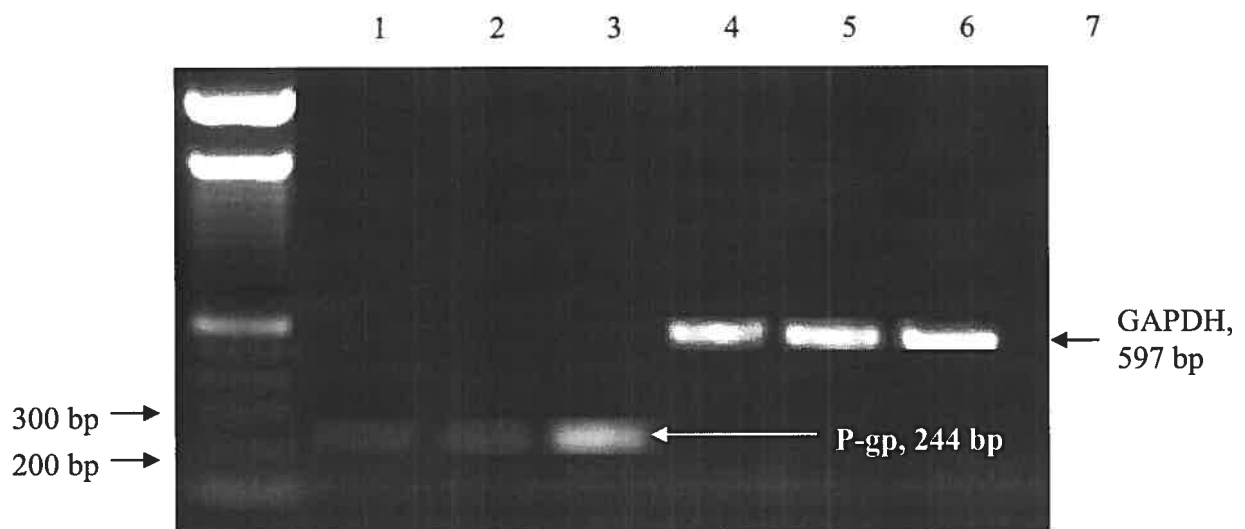
**Figure 4**

**ANNEXE II**

**Résultats des analyses par PCR et Immunobuvardage**

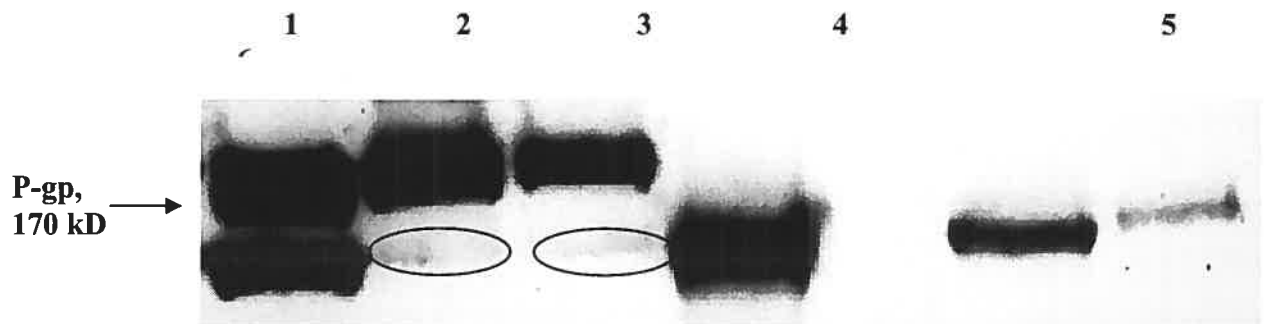


Le PCR a été utilisé afin de détecter la présence d'ARNm du gène *MDR1* dans le tissu cardiaque. Pour ce faire, des cellules ventriculaires ont été homogénéisées en utilisant une solution de Trizol® afin d'extraire l'ARN. Le RT-PCR a été exécuté à l'aide des amorces suivantes : 5'-GATCTGTGAACTCTTGTTTTCA-3' et 5'-GAAGAGAGACTTACATTAGGC-3'. Un fragment d'ADN de 244 pb situé dans l'exon 26 du gène *MDR1* a été détecté dans toutes les espèces.



Analyse par PCR de l'ARNm isolé du tissu ventriculaire des cobayes pré-traités avec 0, 11.6 et 15 mg/kg/jour (puits 2,3 et 4 respectivement). GAPDH a été amplifié dans les puits 5, 6 et 7 comme contrôle positif. La flèche à 244 paires de bases représente l'ARNm de *MDR1*.

L'immunobuvardage a été utilisé afin de détecter la P-glycoprotéine dans le tissu cardiaque. Les protéines (100 µg/puits) ont été fractionnées dans un gel dénaturant de polyacrylamide 7.5% et transférées sur une membrane de nitrocellulose par électrophorèse. La présence de la glycoprotéine a été clairement détectée dans le tissu cardiaque des 3 espèces étudiées en utilisant l'anticorps monoclonal C219 (Figure ci-dessous). Les niveaux de glycoprotéine-P semblent nettement inférieurs dans le cœur que dans le foie. De plus, la détection de la protéine chez le rat et le cobaye est très faible. Ces niveaux peuvent être expliqués par le fait que l'anticorps C219 est un anticorps anti-humain. Ainsi, il est nettement moins spécifiques chez les autres espèces.



Analyse par immunobuvardage de la P-glycoprotéine ventriculaire humaine, de cobaye et de rat. Les échantillons de protéines (100 µg/puits) ont été séparés sur un gel dénaturant de polyacrylamide 7.5% et transférés sur une membrane de nitrocellulose par électrophorèse. La présence de la glycoprotéine a été détectée en utilisant l'anticorps monoclonal C219. Des anticorps conjugués à la peroxidase ont été utilisés comme anticorps secondaires et la détection de la P-gp dans les ventricules humain (1), les ventricules de cobayes (2) et les ventricules de rats (3) fut réalisée avec les réactifs ECL. Le contrôles positif se retrouve dans le puits (4) et nous retrouvons le foie de rat et le foie de cobaye dans les puits (5) et (6) respectivement.

## **ANNEXE III**

### **Déclaration des coauteurs**

Pierre Morissette

Programme 3-700-1-0, Ph.D. Sciences Pharmaceutiques, option pharmacologie

Pierre Morissette, Jacques Turgeon. **Modulatory role of ABC transporters on the cardiac electrophysiological effects of an  $I_{Kr}$  blocker.**

Article à soumettre à Journal of pharmacology and experimental therapeutics

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Pierre Morissette inclut cet article dans son mémoire qui a pour titre «Modulation de la P-glycoprotéine et évaluation des répercussions électrophysiologiques cardiaques».

Jacques Turgeon

Coauteur

Signature

Date

Pierre Morissette

Programme 3-700-1-0, Ph.D. Sciences Pharmaceutiques, option pharmacologie

Pierre Morissette, Raymond Hreiche, Jacques Turgeon. **ATP binding cassette membrane transporters as a key determinant of sex-related differences in drug-induced Long QT syndrome**

Article à soumettre à Journal of Cardiovascular Pharmacology

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Pierre Morissette inclut cet article dans son mémoire qui a pour titre «Modulation de la P-glycoprotéine et évaluation des répercussions électrophysiologiques cardiaques».

Jacques Turgeon

Coauteur

Signature

Date

Raymond Hreiche

Coauteur

Signature

Date

Pierre Morissette

Programme 3-700-1-0, Ph.D. Sciences Pharmaceutiques, option pharmacologie

Pierre Morissette, Raymond Hreiche, Dean Vo, Louise Mallet, Edward E Knaus, Jacques Turgeon. **Olanzapine (Zyprexa<sup>®</sup>) prolongs cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current.**

Article soumis à Journal of pharmacology and experimental therapeutics

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Pierre Morissette inclut cet article dans son mémoire qui a pour titre «Modulation de la P-glycoprotéine et évaluation des répercussions électrophysiologiques cardiaques».

Raymond Hreiche

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Dean Vo

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Louise Mallet

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Edward E Knaus

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Jacques Turgeon

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Pierre Morissette

Programme 3-700-1-0, Ph.D. Sciences Pharmaceutiques, option pharmacologie

Pierre Morissette, Raymond Hreiche, Jacques Turgeon. **Drug-induced long QT syndrome and torsade de pointes.**

Article soumis à Canadian Journal of Cardiology

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Pierre Morissette inclut cet article dans son mémoire qui a pour titre «Modulation de la P-glycoprotéine et évaluation des répercussions électrophysiologiques cardiaques».

Jacques Turgeon

Coauteur

Signature

Date

Raymond Hreiche

Coauteur

Signature

Date

