

BENOIT DROLET

**LA PRO-ARYTHMIE MÉDICAMENTEUSE :
EXPLICATIONS ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES**

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

**FACULTÉ DE PHARMACIE
UNIVERSITÉ LAVAL**

AOÛT 2001

© Benoît Drolet, 2001



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-65447-8

Canada

Résumé court

Plusieurs médicaments de diverses classes pharmacologiques ont été impliqués dans la genèse d'arythmies cardiaques sévères, telles les torsades de pointes. Afin de mieux comprendre les mécanismes électrophysiologiques et pharmacologiques en cause; les effets du dropéridol, du sildénafil, de la dompéridone et du pimozide sur la repolarisation cardiaque et sur le courant potassique rectifiant retardé ont été évalués à l'aide des techniques de patch-clamp et de rétroperfusion de Langendorff. Cette dernière a aussi permis d'évaluer l'effet de la vitamine K sur le potentiel d'action cardiaque. Les effets de ce médicament sur les courants sodique et potassiques cardiaques ont ensuite été confirmés à l'aide de la technique de patch-clamp. Cette étude démontre que le dropéridol, le sildénafil, la dompéridone et le pimozide prolongent la repolarisation cardiaque en bloquant la composante rapide du courant potassique rectifiant retardé. Elle démontre aussi que la vitamine K module le potentiel d'action en bloquant les courants sodique et potassiques cardiaques.

Résumé long

Plusieurs cas de prolongation de l'intervalle QT, de torsades de pointes et/ou de morts subites ont été rapportés suite à l'utilisation de plusieurs médicaments, dont le dropéridol, le sildénafil, la dompéridone, le pimozide et la vitamine K. Afin de mieux comprendre les mécanismes électrophysiologiques et pharmacologiques responsables de ces effets indésirables, les effets de ces médicaments sur le potentiel d'action cardiaque et sur les principaux courants de dépolarisation et de repolarisation impliqués ont été évalués à l'aide des techniques de rétroperfusion de Langendorff et de voltage imposé (patch-clamp). Sur des cœurs isolés de cobaye rétroperfusés par l'aorte, cette étude démontre que le dropéridol, le sildénafil, la dompéridone et le pimozide prolongent la durée du potentiel d'action monophasique mesurée à 90% de repolarisation (MAPD₉₀). L'effet de la vitamine K sur la MAPD₉₀ s'avère plutôt modeste. Ce médicament affecte davantage l'amplitude du potentiel d'action ainsi que les paramètres de conduction cardiaque. Sur des myocytes ventriculaires isolés de cobaye, cette étude démontre que le dropéridol, le pimozide et la vitamine K bloquent de façon significative et concentration-dépendante la composante rapide du courant potassique rectifiant retardé (I_{Kr}). L'effet de ces trois médicaments sur la composante lente du rectifiant retardé (I_{Ks}) s'avère beaucoup moins important. Elle démontre aussi que la vitamine K module le potentiel d'action en bloquant de façon significative le courant sodique de dépolarisation cardiaque (I_{Na}). Finalement, sur des cellules HEK293 ou CHO transfectées avec le gène HERG encodant la protéine-canal générant le courant I_{Kr} , cette étude démontre que le dropéridol, le sildénafil et la dompéridone bloquent le

courant I_{HERG} à des concentrations observables en clinique. Le dropéridol, le sildénafil, la dompéridone et le pimozide prolongent donc la repolarisation cardiaque en bloquant de façon relativement spécifique la composante rapide du rectifiant retardé (I_{Kr}). De ce fait, ces quatre médicaments se comportent comme des antiarythmiques de classe III. La vitamine K, quant à elle, module le potentiel d'action cardiaque en bloquant à la fois le courant sodique cardiaque (I_{Na}) et la composante rapide du rectifiant retardé (I_{Kr}). La vitamine K se comporte donc comme un antiarythmique de classe Ia (effet *quinidine-like*).

Avant-propos

Le corps de cette thèse est composé de cinq articles scientifiques soumis à différents journaux. Le chapitre deux est constitué de l'article intitulé «Droperidol lengthens cardiac repolarization due to block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current» (Benoît Drolet, Shetuan Zhang, Dominic Deschênes, Jimmy Rail, Sylvie Nadeau, Zhengfeng Zhou, Craig T. January et Jacques Turgeon) publié dans le *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. Le chapitre trois est formé de l'article intitulé «Sildenafil (Viagra) prolongs cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current» (Peter Geelen, Benoît Drolet, Jimmy Rail, Jocelyn Bérubé, Pascal Daleau, Guy Rousseau, René Cardinal, Gilles E. O'Hara et Jacques Turgeon) publié dans *Circulation*. Le chapitre quatre est constitué de l'article intitulé «Domperidone should not be considered a no-risk alternative to cisapride in the treatment of gastrointestinal motility disorders» (Benoît Drolet, Guy Rousseau, Pascal Daleau, René Cardinal et Jacques Turgeon) publié dans *Circulation*. Le chapitre cinq est formé de l'article intitulé «Vitamin K modulates cardiac action potential by blocking sodium and potassium ion channels» (Benoît Drolet, Annie Emond, Vincent Fortin, Pascal Daleau, Guy Rousseau, René Cardinal et Jacques Turgeon) publié dans le *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. Finalement, le chapitre six se compose de l'article «Pimozide (Orap®) prolongs cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current in native cardiac myocytes» (Benoît Drolet, Guy Rousseau, Pascal Daleau, René Cardinal,

Chantale Simard et Jacques Turgeon) sous presse dans le *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*.

Mes premiers remerciements s'adressent à mon directeur de recherche, le Dr Jacques Turgeon, pour tout ce qu'il a fait pour moi au cours des sept dernières années, à partir du moment où j'étais stagiaire d'été de premier cycle dans son laboratoire, jusqu'à l'obtention de mon diplôme de doctorat. Il a toujours fait le maximum pour me guider et me supporter dans mes activités de laboratoire, dans la rédaction d'articles, dans la présentation orale ou écrite de résultats lors de congrès provinciaux, nationaux ou internationaux, dans les demandes de bourses à divers organismes, bref, dans tout ce qu'il fallait pour me donner l'opportunité de devenir peu à peu autonome en recherche. Merci Jacques.

Je veux aussi exprimer ma reconnaissance envers mon co-directeur de recherche, le Dr Pascal Daleau, pour sa contribution à mes travaux de recherche. Ses suggestions et interventions ont fait la différence, notamment lors du projet sildénafil. J'ai particulièrement apprécié l'arrangement administratif et technique qui m'a permis de mener à terme à Montréal, des projets entrepris plus tôt à Québec. Merci Pascal.

Je tiens également à remercier sincèrement les Drs René Cardinal et Guy Rousseau, du Centre de Recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires, et pour leur contribution à mes travaux au cours des deux dernières années.

Évidemment, je m'en voudrais de passer sous silence les noms de toutes ces autres personnes ayant contribué à mes travaux de recherche, et co-auteur(e)s

de ces publications. Ce sont : Shetuan Zhang, Dominic Deschênes, Jimmy Rail, Sylvie Nadeau, Zhengfeng Zhou, Craig T. January, Peter Geelen, Jocelyn Bérubé, Gilles E. O'Hara, Annie Emond, Vincent Fortin et Chantale Simard. Un grand merci à vous.

Je veux aussi exprimer ma reconnaissance envers Michel Blouin, Lynn Atton, Serge Simard, Josée Morin, Chantal de Montigny, Michel Vermeulen et Pierre Fortier pour l'aide apportée lors de la réalisation de ces travaux.

Je tiens particulièrement à remercier la Fondation des maladies du cœur du Canada, le Fonds FRSQ-FCAR-Santé ainsi que l'Université Laval, par l'entremise du Fonds pour l'Engagement des étudiants au Doctorat (FED), pour leurs supports financiers au cours de mes études de doctorat.

À mes parents, au terme de ces dix années d'études universitaires, merci pour votre amour, votre support et votre intérêt.

Finalement, à Chantale, avec qui j'ai choisi de passer le reste de ma vie, merci d'être là, avec moi, chaque jour...

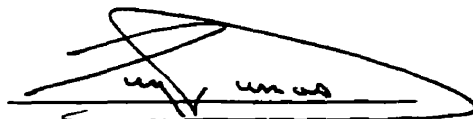
Abstract

In this thesis, a new numerical method to solve the incompressible, unsteady Navier-Stokes equations in unbounded cylindrical domains is presented. The method comes as a novel application of Leonard's divergence-free vector expansions approach, and therefore possesses the following characteristics: i) exact treatment of the continuity constraint; ii) complete elimination of the pressure variable; iii) implicit time integration of the diffusive term at no extra cost; and iv) reduction of the number of (velocity) unknowns from three to two. Another important feature of the method, that indeed represents the originality of the present formulation, is the introduction of mapped B-spline piecewise polynomials for the discretization of the semi-infinite radial direction.

More specifically, the spatial discretization is constructed from a combination of Fourier series, for both the longitudinal (physical periodicity of temporal evolving flows) and azimuthal (geometrical periodicity) directions, and of B-splines on a mapped unitary radial domain. The particular choice of mapping function allows for an exact representation of algebraically decaying functions, up to some finite order. Besides the imposition of proper decaying conditions in the far field, complete (finite order) regularity conditions are also imposed at the center point $r = 0$. These mixed spectral/B-spline expansions, used to form the divergence-free vector basis functions, yield an efficient compromise between the high uncoupling associated with the orthogonality of Fourier series and the resolution positioning flexibility that is characteristic of local methods. The local character of the B-splines furthermore allows for a radial variation of the azimuthal truncation. The resulting vector basis functions are applied to in Galerkin type weighted residual formulation that transforms the complete 3-D problem into a set of small 1-D radial ODE's that are marched in time. For

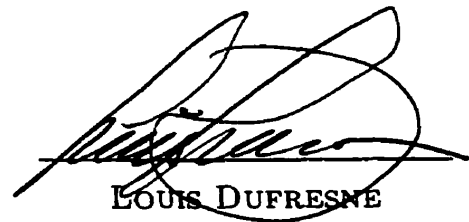
that latter task, the quasi-third order, mixed explicit/implicit scheme proposed by Spalart et al. (*J. Comp. Phys.*, **96**, 297, 1991) is used. The Galerkin formulation also serves for the development of an eigenvalue solver for linear stability problems. Finally, a wall-bounded version of this method, equivalent to the one presented by Loulou et al. (NASA TM-110436, 1997), is also produced in this work.

The validation of the different Navier-Stokes and eigenvalue solvers is achieved by comparing linear stability results, and nonlinear dynamics predictions with other benchmark data. The particular flow problems considered are related to the stability of a trailing line vortex, and the stability and nonlinear dynamical evolution of a special class of zero circulation vortex that leads to the formation of a triangular vortex. On one hand, comparisons made between the unbounded B-spline formulation and the wall-bounded version of the method have shown only a marginal advantage of the former method over the latter. On the other hand, comparisons made with the data obtained by purely global expansions approximation methods prove the present spectral/B-spline method to be an advantageous alternative to these global methods for the computation of unbounded flow problems having an intrinsic axial symmetry.



Prof. GUY DUMAS

Thesis Advisor



LOUIS DUFRESNE

Candidate

1.12 Implications dans le développement de nouveaux médicaments	46
1.13 Hypothèse et objectifs.....	49
1.14 Références.....	50
CHAPITRE 2	76
DROPERIDOL LENGTHENS CARDIAC REPOLARIZATION DUE TO BLOCK OF THE RAPID COMPONENT OF THE DELAYED RECTIFIER POTASSIUM CURRENT	76
Résumé	77
Abstract.....	80
Key words.....	81
Introduction	82
Methods	84
Statistical Analyses.....	88
Results	89
Discussion	92
Acknowledgments.....	95
References	96
Figure legends	104
CHAPITRE 3	110
SILDENAFIL (VIAGRA) PROLONGS CARDIAC REPOLARIZATION BY BLOCKING THE RAPID COMPONENT OF THE DELAYED RECTIFIER POTASSIUM CURRENT	110
Résumé	111
Abstract.....	114
Key words.....	115
Condensed abstract.....	116
Introduction	117
Methods	118
Statistical Analysis	120
Results	121
Discussion	123
Conclusions	125
Acknowledgments.....	126
References	127
Figure legends	129
CHAPITRE 4	132
DOMPERIDONE SHOULD NOT BE CONSIDERED A NO-RISK ALTERNATIVE TO CISAPRIDE IN THE TREATMENT OF GASTROINTESTINAL MOTILITY DISORDERS.....	132
Résumé	133

Abstract.....	136
Condensed abstract.....	137
Introduction	138
Methods	139
Statistical Analysis	141
Results	142
Discussion	144
Conclusions	146
Acknowledgments	147
References	148
Figure legends	151
CHAPITRE 5	154
VITAMIN K MODULATES CARDIAC ACTION POTENTIAL BY BLOCKING SODIUM AND POTASSIUM ION CHANNELS	154
Résumé	155
Abstract.....	157
Key words.....	158
Introduction	159
Methods	161
Statistical Analyses.....	164
Results	165
Discussion	168
Acknowledgments	170
References	171
Figure legends	176
CHAPITRE 6	182
PIMOZIDE (ORAP®) PROLONGS CARDIAC REPOLARIZATION BY BLOCKING THE RAPID COMPONENT OF THE DELAYED RECTIFIER POTASSIUM CURRENT IN NATIVE CARDIAC MYOCYTES	182
Résumé	183
Abstract.....	186
Key words.....	187
Introduction	188
Methods	190
Statistical Analyses.....	193
Results	194
Discussion	196
Acknowledgments	199
References	200

Figure legends	203
CHAPITRE 7	207
CONCLUSION GÉNÉRALE	207
Conclusion générale	208

Liste des figures

CHAPITRE 1	INTRODUCTION	PAGE
Figure 1a :	Représentation schématique de KvLQT1 et localisation de quelques mutations associées au LQTS.....	6
Figure 1b :	Représentation schématique de minK et localisation de quelques mutations associées au LQTS.....	6
Figure 2a :	Représentation schématique de HERG et localisation de quelques mutations associées au LQTS.....	10
Figure 2b :	Représentation schématique de MiRP1 et localisation de quelques mutations associées au LQTS.....	10

Figure 3 : Représentation schématique de SCN5A et localisation de quelques mutations associées au LQTS.....	12
Figure 4 : Complexes d’ondes ST-T selon le génotype de LQTS.....	22
Figure 5 : Bande de rythme classique d’un épisode de torsades de pointes.....	25
Figure 6 : Structures moléculaires de quelques médicaments pouvant causer des torsades de pointes, en relation avec le pharmacophore “de classe III” proposé par Morgan et Sullivan.....	41

Liste des abréviations

- ADN** : acide désoxyribonucléique
- ANOVA** : analyse de variance (statistique)
- APD** : durée du potentiel d'action
- ATP** : adénosine triphosphate
- BAS** : niveau de base
- BCL** : durée du cycle de stimulation de base
- Cellules M** : cellules musculaires cardiaques (myocytes)
- CHO** : Chinese hamster ovary (lignée cellulaire)
- C_{max}** : concentration plasmatique maximale
- CYP3A** : isoenzymes hépatiques du cytochrome P450 3A
- CYP3A4** : isoenzyme hépatique du cytochrome P450 3A4
- DMSO** : diméthylsulfoxyde
- DROP** : dropéridol
- EADs** : post-dépolarisations précoces
- ECG** : électrocardiogramme
- FDA** : Food and Drug Administration
- HEK293** : Human embryonic kidney 293 (lignée cellulaire)
- HERG** : gène codant I_{Kr} (human ether-à-go-go-related gene)
- H-RAS** : gène Harvey ras-1
- IC₅₀** : concentration à laquelle 50% d'inhibition est observée
- I_{KATP}** : courant potassique dépendant de l'adénosine triphosphate
- 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_K : courant potassique rectifiant retardé

I_{Kr} : composante rapide de I_K

I_{Ks} : composante lente de I_K

I_{Kur} : courant potassique ultra-rapide

I_{Na} : courant sodique cardiaque

JLN : syndrome Jervell-Lange-Nielsen

Kv1.5 : gène codant une protéine-canal potassique voltage-dépendante à activation ultra-rapide

KvLQT1 : gène codant une protéine-canal potassique voltage-dépendante, constituante de I_{Ks} et impliquée dans le LQT1

LQTS : syndrome du long QT

LQT1 : syndrome du long QT causé par des mutations de KvLQT1

LQT2 : syndrome du long QT causé par des mutations de HERG

LQT3 : syndrome du long QT causé par des mutations de SCN5A

LQT4 : syndrome du long QT causé par des mutations d'un gène à identifier

LQT5 : syndrome du long QT causé par des mutations de minK

LQT6 : syndrome du long QT causé par des mutations de MiRP1

MAP : potentiel d'action monophasique

MAPD : durée du potentiel d'action monophasique

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

MEM : minimal essential medium (milieu de culture cellulaire)

minK : gène codant une sous-unité protéique de structure compacte, constituante de I_{Ks} , et impliquée dans le LQT5

MiRP1 : gène codant une sous-unité protéique de structure compacte, constituante de I_{Kr} , et impliquée dans le LQT6

NS : non-significatif (statistique)

PIMO : pimozide

QID : quatre fois par jour

QTc : intervalle QT corrigé en fonction de la fréquence cardiaque

RW : syndrome Romano-Ward

SCN5A : gène codant I_{Na}

S.D. : écart-type

S.E.M. : erreur-type de la moyenne

SRS : Spontaneous Reporting System (de la FDA)

TID : trois fois par jour

TMP-SMX : triméthoprimé-sulfaméthoxazole

VF : fibrillation ventriculaire

VT : tachycardie ventriculaire

V/V : volume par volume

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Introduction

1. Le syndrome du long QT (LQTS)

1.1 Historique du LQTS congénital

Jervell et Lange-Nielsen¹ ont fourni la première description formelle de la maladie en 1957, chez une famille norvégienne de six enfants dont quatre souffraient de surdit e cong enitale, de syncope et d'une prolongation de l'intervalle QT sur l'électrocardiogramme (ECG). Trois de ces quatre enfants sont morts subitement. Les parents, qui n'étaient pas consanguins, ainsi que les deux autres enfants, avaient une fonction auditive et des intervalles QT normaux et ont mené une vie normale. Au début des années soixante, Romano et al.² et Ward³ ont décrit, de façon indépendante, un désordre cardiaque similaire, mais sans surdité associée. Aujourd'hui, le syndrome Romano-Ward (RW) est considéré comme un désordre autosomal dominant sans surdité cong enitale. En fait, le syndrome RW est vu actuellement comme un groupe hétérogène d'au moins six génotypes moléculaires résultant de canaux ioniques cardiaques défectueux. Le syndrome Jervell-Lange-Nielsen (JLN) est quant à lui considéré comme un désordre autosomal récessif avec surdité cong enitale. Au moins deux génotypes résultant aussi de canaux ioniques cardiaques défectueux ont jusqu'à maintenant été identifiés (Tableau 1).

Yanowitz et al.⁴ ont remarqué que l'intervalle QT pouvait être prolongé par une stellectomie droite ou une stimulation du ganglion stellaire (cervico-thoracique) gauche. Plus tard, Schwartz et al.⁵ sont parvenus à induire une alternance de l'onde T (souvent observée chez les patients LQTS) en stimulant le ganglion stellaire gauche. Ils ont par la suite réussi à traiter un jeune patient

particulièrement réfractaire par une stellectomie gauche. C'était l'époque où la théorie du "déséquilibre sympathique" prévalait. On croyait alors que les épisodes de syncope étaient attribuables à des décharges sympathiques soudaines à partir du ganglion stellaire gauche. Les effets bénéfiques des agents bêta-bloquants ont été décrits pour la première fois en 1975⁶, et clairement établis dix ans plus tard⁷. En fait, la mortalité sur 10 ans passe de 71% chez les patients non-traités à 6% chez les patients traités avec des bêta-bloquants ou ayant subi une dénervation sympathique cardiaque gauche. En 1979, Cramptom et al.⁸ ont créé le Registre International du LQTS, qui, durant les années suivantes, a permis de recruter plus de 2000 familles. Tel que décrit ici-bas, le Registre constitue une source importante d'informations cliniques et familiales, qui peuvent maintenant être interprétées dans un contexte de génétique moderne. En 1991, Keating et al.⁹ ont rapporté un lien très étroit entre le locus Harvey ras-1 sur le bras court du chromosome 11 (11p15.5) et le LQTS dans une grande famille. Le Harvey ras-1 a finalement été exclu en tant que gène responsable¹⁰. En fait, le véritable gène responsable à ce locus (LQT1) n'a été identifié que cinq ans plus tard. Pendant les neuf mois compris entre mars 1995 et janvier 1996, trois gènes du LQTS ont été identifiés¹¹⁻¹³. Deux autres l'ont été depuis^{14;15}. De plus, l'existence de familles reliées à aucun locus connu a été rapportée¹⁶, pendant que des mécanismes permettant d'expliquer le syndrome JLN étaient identifiés¹⁷⁻¹⁹. Fait très intéressant, des différences cliniques parmi les patients affectés (dépendant d'un gène spécifique, et peut-être de mutations spécifiques) ont aussi été notées²⁰⁻²³, et un traitement selon le génotype est maintenant proposé^{24;25}. Par ailleurs, il semble de plus en plus évident que les manifestations cliniques du LQTS varient parmi les individus porteurs des mêmes mutations²⁶, et que certains patients puissent même présenter des intervalles QT normaux²⁷.

	Localisation chromosomique	Gène	Courant
<i>Autosomal dominant (Romano-Ward)</i>			
LQT1	11p15.5	KvLQT1 (KCNQ1)	↓ I _{Ks}
LQT2	7q35-36	HERG (KCNH2)	↓ I _{Kr}
LQT3	3p21-24	SCN5A	↑ I _{Na}
LQT4	4q25-27	indéterminé	indéterminé
LQT5	21q22.1-22.2	MinK (KCNE1)	↓ I _{Ks}
LQT6	21q22.1-22.2	MiRP1 (KCNE2)	↓ I _{Kr}
LQT7	indéterminée	indéterminé	indéterminé
<i>Autosomal récessif (Jervell-Lange-Nielsen)</i>			
JLN1	11p15.5	KvLQT1 (KCNQ1)	↓↓ I _{Ks}
JLN2	21q22.1-22.2	MinK (KCNE1)	↓↓ I _{Ks}
JLN3	indéterminée	indéterminé	indéterminé

Tableau 1. État des connaissances sur la génétique du LQTS congénital
(adapté de Chiang et al. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36 :1-12.)

1.2 Prévalence

La prévalence exacte du syndrome RW est inconnue, mais on estime qu'aux États-Unis, une personne sur 10 000 serait porteuse d'un ou des gènes défectueux^{20;28}. Toutefois, puisqu'on identifie de plus en plus de porteurs asymptomatiques, la prévalence réelle pourrait bien être supérieure. Le syndrome JLN est beaucoup plus rare. Fraser et al. ont estimé que chez les jeunes Britanniques et Irlandais âgés de 4 à 15 ans, il s'observe chez environ 1,6 à 6 sujets sur 1 million²⁹.

1.3 Biologie moléculaire

Keating et al.⁹, utilisant des analyses de liaison, ont identifié un premier gène du LQTS sur le chromosome 11p15.5 dans une grande famille. Cependant, l'hétérogénéité de ce locus du LQTS a ensuite été démontrée^{30;31}.

1.3.1 KvLQT1 (KCNQ1)

En 1996, Wang et al.¹³, utilisant le clonage positionnel, ont démontré que le gène du LQTS relié au chromosome 11 était KvLQT1, à la position 11p15.5. KvLQT1 est fortement exprimé au niveau cardiaque, où il code la synthèse d'une protéine aux propriétés structurelles d'un canal potassique régulé par le voltage. De multiples mutations ont maintenant été décrites sur KvLQT1 chez des patients atteints de LQTS³²⁻⁴³. KvLQT1 possède la structure typique à 6 segments transmembranaires des canaux potassiques régulés par le voltage¹³ (Figure 1a) et s'assemble avec la sous-unité minK (Figure 1b) pour former le canal responsable de la composante lente du courant rectifiant retardé (I_{Ks}).

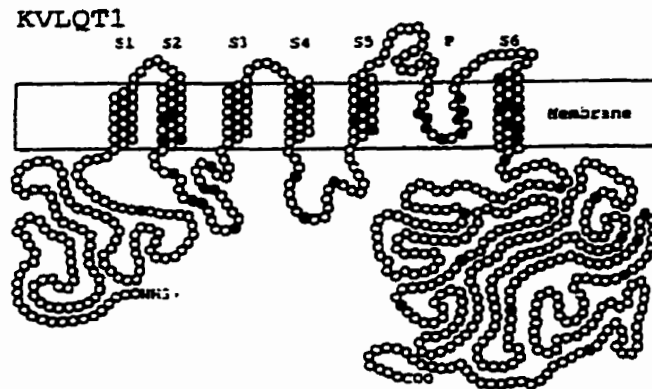


Figure 1a. Représentation schématique de KvLQT1 et localisation de quelques mutations associées au LQTS

KvLQT1 est fait 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. (adapté de Splawski et al. *Circulation* 2000;102 :1178-85.)

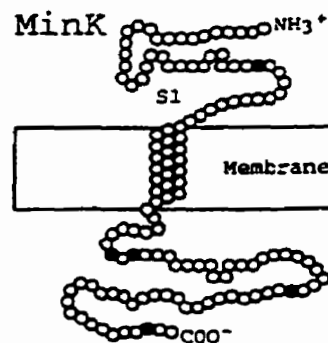


Figure 1b. Représentation schématique de minK et localisation de quelques mutations associées au LQTS

MinK est fait d'un seul segment transmembranaire (S1). Chaque cercle représente un acide aminé. Les cercles noirs situent quelques mutations identifiées à ce jour. (adapté de Splawski et al. *Circulation* 2000;102 :1178-85.)

KvLQT1 s'exprime non seulement au niveau cardiaque, mais aussi dans d'autres tissus humains tels le pancréas, les reins, le placenta et les poumons, mais pas au niveau du foie, des muscles squelettiques ni du cerveau¹³. Il a aussi été démontré par hybridation in situ que KvLQT1 s'exprime au niveau des cellules de la stria vascularis de l'oreille interne chez la souris¹⁷, un élément important dans la compréhension de l'étiologie de la surdité associée au syndrome JLN.

Chez les individus atteints de LQT1, les allèles normaux et mutants de KvLQT1 sont co-exprimés dans les myocytes. Dans certains cas, la forme mutante de KvLQT1 interfère avec la fonction de la forme normale de type sauvage, via un mécanisme négatif dominant ("poison pill"). Chez d'autres, la protéine mutante ne fonctionne tout simplement pas. Dans les deux cas, on observe une réduction de I_{Ks} , causant une prolongation de la repolarisation cardiaque et un risque accru d'arythmies³⁴. Récemment, des formes récessives de syndrome RW sans surdité ont été décrites chez des patients homozygotes sur des mutations de KvLQT1⁴⁴⁻⁴⁶. Puisque leurs parents, comme les parents de sujets atteints du syndrome JLN, sont hétérozygotes pour une mutation sur KvLQT1 et présentent un intervalle QT normal, on croit que certaines mutations de KvLQT1 puissent ne pas engendrer de manifestations cliniques, ou que la pénétrance soit variable. Il est donc possible que des mutations "phénotypiquement légères" sur les gènes du LQTS puissent être présentes dans la population générale, suggérant une éventuelle prédisposition à des arythmies suite à l'effet du stress ou d'un médicament chez les sujets silencieusement affectés^{33;45}.

En 1997, Neyroud et al.¹⁷ ont relié le syndrome JLN au chromosome 11p15.5 en analysant quatre familles consanguines. Ils y ont identifié une délétion-

insertion homozygote dans le domaine C-terminal de KvLQT1 chez trois enfants affectés de deux familles. Peu de temps après, Splawski et al.¹⁸, ont aussi décrit un patient homozygote pour une mutation de KvLQT1 d'une famille atteinte de LQTS autosomal dominant. Ce patient présentait un intervalle QT corrigé (QTc) fortement prolongé, ainsi qu'une surdité congénitale, alors que les deux parents montraient des phénotypes normaux.

On estime qu'une prolongation importante du QT associée à la surdité reflètent une diminution importante des canaux I_{Ks} . De plus, le fait d'avoir découvert que KvLQT1 s'exprime dans les cellules du stria vascularis de l'oreille interne de la souris, suggère fortement que ce gène joue un rôle clé dans la fonction auditive normale, probablement en maintenant l'homéostasie de l'endolymphe¹⁷.

On reconnaît maintenant que les mutations homozygotes de KvLQT1 causent le syndrome JLN^{19;47;48}, et que la consanguinité est fréquente dans ces familles. La surdité requiert la présence de deux allèles mutants. On sait aussi que les patients atteints du syndrome JLN sont fortement susceptibles aux arythmies. De plus, il semble qu'un seul allèle muté (tel qu'observé chez les parents), soit en mesure d'accroître le risque d'arythmie. Ce risque semble donc être fonction de la "dose de gène".

1.3.2 Human "éther-à-go-go"-related gene : HERG (KCNH2)

Le locus du LQT2 a été situé chez les familles affectées sur le chromosome 7q35-36⁴⁹, et le gène a ensuite été identifié par l'approche du gène-candidat; c'est-à-dire que la recherche et la sélection de gènes au niveau du locus a conduit à l'observation de mutations chez les individus affectés. Le gène maléfique du LQT2 est HERG, codant aussi pour un canal potassique⁵⁰

(Figure 2a). Curran et al.¹² ont identifié six mutations associées au LQTS sur le gène HERG et conclu que ce dernier était responsable du LQTS relié au chromosome 7 (LQT2). Comme dans le cas de KvLQT1, de multiples mutations de HERG ont été identifiées^{35;51-59}.

Le gène de HERG est hautement exprimé au niveau cardiaque¹², et, comme c'est le cas chez plusieurs autres canaux potassiques, la protéine pour laquelle il code possède six segments transmembranaires. HERG code la sous-unité majeure de la composante rapide du courant potassique rectifiant retardé (I_{Kr})⁵⁰. Ce courant sortant est le principal responsable de la repolarisation rapide en phase 3 du potentiel d'action enregistré sur des myocytes humains. Comme c'est le cas avec KvLQT1, les mutations de HERG causent différents degrés de diminution du courant repolarisant. Dans certains cas, on peut parler d'un effet négatif dominant, dans d'autres, d'une inhibition complète⁶⁰. Des anomalies dans les processus de biosynthèse de la protéine-canal HERG mutante ont aussi été rapportées^{56;61}. Des études in vitro ont par ailleurs démontré que minK est capable de s'assembler avec HERG pour moduler l'amplitude du courant repolarisant⁶². Plus récemment, le *minK-related peptide 1* (MiRP1) a été identifié comme un "partenaire protéique" pour HERG, et des mutations de MiRP1 ont été impliquées dans le LQTS médicamenteux¹⁵ (Figure 2b). I_{Kr} est aussi la cible de choix des méthanesulfonamides⁶³ et de presque tous les autres médicaments pouvant causer des torsades de pointes⁶⁴, reliant donc les formes congénitales et médicamenteuses du LQTS.

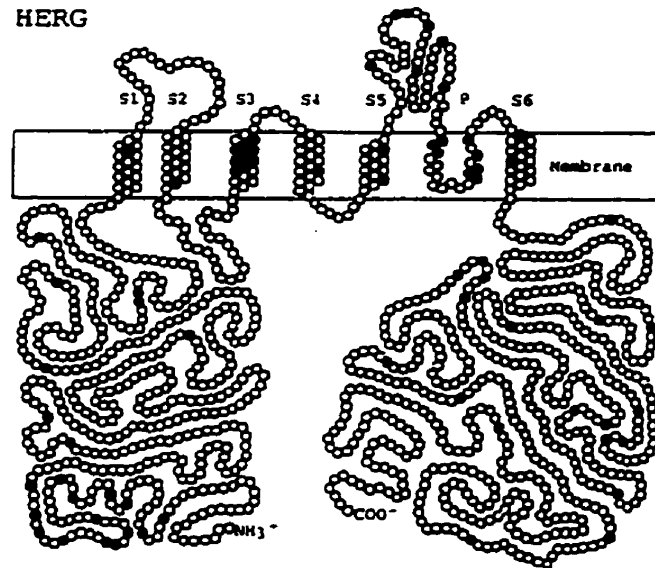


Figure 2a. Représentation schématique de HERG et localisation de quelques mutations associées au LQTS

HERG est fait 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. (adapté de Splawski et al. *Circulation* 2000;102 :1178-85.)

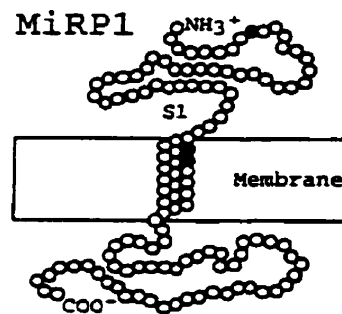


Figure 2b. Représentation schématique de MiRP1 et localisation de quelques mutations associées au LQTS

MiRP1 est fait d'un seul segment transmembranaire (S1). Chaque cercle représente un acide aminé. Les cercles noirs situent quelques mutations identifiées à ce jour. (adapté de Splawski et al. *Circulation* 2000;102 :1178-85.)

1.3.3 Le gène du canal sodique cardiaque dépendant du voltage : SCN5A

Utilisant l'approche du gène-candidat, Jiang et al.⁴⁹ ainsi que Wang et al.¹¹ ont découvert que le gène responsable de la forme de LQTS reliée au chromosome 3 (LQT3) est le gène du canal sodique cardiaque SCN5A (3p21-24) (Figure 3). La première mutation décrite est une délétion de neuf nucléotides (trois acides aminés) dans une région importante pour l'inactivation du canal. Peu à peu, quelques groupes⁶⁵⁻⁷⁰ ont identifié d'autres mutations, confirmant bel et bien SCN5A comme gène responsable du LQT3.

SCN5A code une protéine à quatre domaines homologues (D I - D IV), contenant chacun six segments transmembranaires (S1-S6)⁷¹. Donc, contrairement à ce qui se passe avec les canaux potassiques, l'expression d'une seule protéine du canal sodique suffit à générer le courant sodique. SCN5A s'exprime fortement dans le cœur humain, mais pas dans le cerveau, le foie ni le muscle squelettique (où d'autres gènes sont requis pour le courant sodique)⁷². Alors que les anomalies de KvLQT1 et de HERG causent un problème de type "diminution de fonction du canal", celles de SCN5A résultent en un défaut de type "gain de fonction". De fait, les mutations du LQT3, via plusieurs mécanismes, génèrent un courant sodique entrant persistant, à inactivation trop lente, pendant la phase plateau du potentiel d'action. Ce courant persistant est toutefois sensible à la mexilétine et à la tétródotoxine^{65;67;69;73}. Baroudi et al.⁶⁶ ont récemment décrit une telle mutation, produisant entre autres un courant sodique persistant, responsable d'un phénotype LQT3. L'efficacité de la repolarisation se trouvant ainsi réduite, le résultat final demeure donc une prolongation du potentiel d'action cardiaque et un risque accru de torsades de pointes.

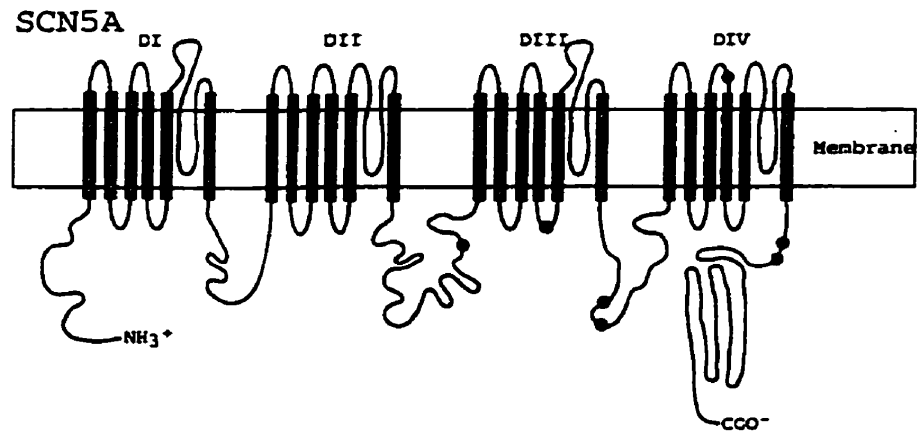


Figure 3. Représentation schématique de SCN5A et localisation de quelques mutations associées au LQTS

SCN5A consiste en 4 domaines (DI à DIV), chacun étant fait de 6 segments transmembranaires et d'une région pore. Les cercles noirs situent quelques mutations identifiées à ce jour.
(adapté de Splawski et al. *Circulation* 2000;102 :1178-85.)

Fait intéressant, par ailleurs, cette mutation de SCN5A, décrite par Baroudi et al.⁶⁶, cause aussi le syndrome de Brugada, par une réduction simultanée de l'expression des canaux sodiques cardiaques. Une autre mutation de ce genre a été identifiée récemment dans une grande famille⁷⁴.

1.3.4 MinK (KCNE1)

MinK a été cloné pour la première fois par Takumi et al.⁷⁵ à partir d'ADN de rat et localisé sur le chromosome 21q22.1-q22.2⁷⁶. L'ADN ainsi cloné code pour une protéine membranaire constituée de 130 acides aminés et d'un seul domaine transmembranaire (Figure 1b). Cette protéine induit un courant potassique à activation lente, dépendant du voltage, lorsque co-assemblée avec les copies de KvLQT1 endogènes que l'on retrouve dans les ovocytes de xénope⁷⁵. Il est généralement accepté aujourd'hui que minK s'assemble avec KvLQT1 pour former I_{Ks} ^{77;78}.

Splawski et al.¹⁴ ont identifié des mutations de minK chez des membres de deux familles affectées par le LQTS. Les deux mutations (S74L, D76N) réduisent I_{Ks} en déplaçant l'activation dépendante du voltage et en accélérant la désactivation du canal. Il a aussi été démontré que les canaux I_{Ks} mutants formés avec les sous-unités de minK D76N et S74L génèrent des courants unitaires plus faibles et ont des probabilités d'ouverture réduites⁷⁹. Donc, ces études fonctionnelles supportent l'idée que minK puisse représenter un cinquième locus du LQTS (LQT5)⁸⁰ (Tableau 1). Bien que l'interprétation des manifestations cliniques du LQT5 puisse être compliquée par les effets confondus des mutations de minK sur KvLQT1 et HERG⁸¹, les conséquences fonctionnelles de ces mutations demeurent une repolarisation cardiaque retardée et un risque accru d'arythmies. Comme c'est le cas avec KvLQT1,

des sujets homozygotes pour des mutations de minK ont été recensés parmi les patients atteints du syndrome JLN. Schulze-Bahr et al.¹⁹ ont étudié une famille libanaise atteinte du syndrome JLN dans laquelle trois des six enfants présentaient des intervalles QTc prolongés et une surdité congénitale bilatérale¹⁹. Deux de ces trois enfants ont souffert de syncopes récidivantes depuis la petite enfance. Les deux parents et les trois autres enfants présentent une fonction auditive et un intervalle QTc normaux. Dans cette famille, des mutations de minK (KCNE1), avec un site de mutation chez le père et un site de mutation différent chez la mère, ont été retrouvées chez tous les enfants affectés. Dans un tel cas, on peut qualifier ces enfants d'hétérozygotes composés. Les enfants non-affectés n'ont pour leur part qu'un allèle muté. Cette mutation; Asp76Asn, correspond à une mutation de minK déjà observée chez le rat (Asp77Asn), laquelle produit une importante réduction de l'activité du canal I_{Ks} exprimé dans des ovocytes de xénope⁸². Duggal et al.⁸⁰ ont identifié la même mutation (Asp76Asn) sur le gène minK d'un patient atteint du syndrome JLN. La mère de ce sujet ainsi que sa demi-sœur sont hétérozygotes pour cette mutation. Fait intéressant, ces deux membres de la famille ont présenté des intervalles QTc prolongés, démontrant que tous les "porteurs" du syndrome JLN n'ont pas un phénotype normal. Comme c'est le cas avec KvLQT1, le gène minK s'exprime dans l'oreille interne. Des souris génétiquement modifiées, dans lesquelles le locus de minK est désorganisé (minK^{-/-}) démontrent un désordre de mouvement (comportement shaker/waltzer)⁸³ typique d'une anomalie de l'oreille interne. De fait, dans l'oreille interne des animaux "knockouts", les cellules ciliées dégèrent, pendant que les cellules marginales et vestibulaires sont incapables de générer un courant court-circuit équivalent in vivo, indiquant l'absence de sécrétion potassique transépithéliale. Les souris perdent aussi la

capacité d'adapter l'intervalle QT aux variations de la fréquence cardiaque, ce qui peut refléter une susceptibilité accrue aux arythmies⁸³. Kupersmidt et al.⁸⁴ ont observé un désordre de mouvement similaire dans leur modèle de souris "knockouts" sur minK. Ces résultats démontrent de façon convaincante que minK est un des gènes impliqués dans le syndrome JLN (JLN2) (Tableau 1).

1.3.5 MinK-related-peptide 1 :MiRP1 (KCNE2)

Récemment, un nouveau gène de canal potassique codant MiRP1 a été cloné¹⁵ (Figure 2b). On croit que cette petite protéine membranaire s'assemble avec HERG pour modifier sa fonction. Contrairement aux canaux formés seulement avec HERG, les complexes ressemblent aux canaux cardiaques I_{Kr} physiologiques, au plan de leur activation-inactivation, de leur conductance unitaire, de leur régulation par le potassium et par l'inhibition biphasique distinctive exercée par l'antiarythmique de classe III E-4031. Trois mutations associées au LQTS et à la fibrillation ventriculaire ont été identifiées sur MiRP1. Les canaux mutés ainsi formés s'ouvrent lentement et se ferment rapidement, diminuant ainsi les courants potassiques. Ces observations supportent l'hypothèse selon laquelle MiRP1 est un des gènes du LQTS (LQT6) (Tableau 1). Bien que des mutations de MiRP1 aient été associées au LQTS médicamenteux⁸⁵ et que la co-expression de HERG et MiRP1 semble moduler la sensibilité de I_{Kr} à certains médicaments, le rôle exact de MiRP1 au niveau du myocarde reste à préciser, considérant qu'il demeure difficile à détecter dans le tissu cardiaque¹⁵.

1.3.6 Gènes non-identifiés

Le locus LQT4 a été relié au chromosome 4q25-27 dans une famille de 65 membres¹⁶. On ne connaît toujours pas l'identité du gène responsable. Les patients de cette famille souffrent de bradycardie sévère, de fibrillation auriculaire et présentent une onde T bizarre.

Actuellement, on considère qu'au mieux, on peut relier de 50 à 75% des familles atteintes du syndrome RW aux génotypes LQT1 à LQT6. Marks et al.⁸⁶ ont pour leur part identifié trois garçons atteints de LQTS avec bloc auriculo-ventriculaire et syndactylie (doigts palmés) simple. Leurs intervalles QT étaient excessivement prolongés ($QTc > 600$ msec). Deux de ces trois enfants sont morts subitement, malgré un traitement avec des agents bêta-bloquants et une stimulation cardiaque permanente (pace-maker). La syndactylie et le LQTS ont aussi été rapportés chez les femmes⁸⁷. Les gènes responsables chez ces patients et chez ceux pour qui le syndrome RW n'a pu être relié restent à être déterminés.

Il existe aussi quelques patients atteints du syndrome JLN chez qui aucun gène anormal n'a été identifié⁸⁸, indiquant une probable hétérogénéité génétique dans le syndrome JLN, comme c'est le cas dans le syndrome RW.

1.4 Symptomatologie

La plupart des observations sur les manifestations cliniques avaient été faites avant qu'on ne réalise que plusieurs mutations sur plusieurs gènes peuvent causer le LQTS, et que les patients peuvent présenter des phénotypes fort différents, voire aucun phénotype. La plupart des observations cliniques

concernent le LQT1 et le LQT2, les deux formes les plus fréquentes, et peuvent ne pas s'appliquer aux formes plus rares. De plus, il a été suggéré que pas plus de 60% des patients soient symptomatiques^{20;28}. En clinique, le LQTS se manifeste souvent par une syncope, des convulsions et un arrêt cardiaque. Quatre-vingt-cinq pour cent des événements surviennent suite à une activité physique ou un stress émotif. Parfois, un stimulus auditif tel qu'une sonnerie de téléphone ou de réveille-matin sert de déclencheur aux épisodes de syncope, particulièrement chez les sujets atteints du LQT2²³. Il semble que la prévalence des syncopes soit supérieure durant les menstruations⁸⁹ et en période post-partum⁹⁰. Par ailleurs, quinze pour cent des symptômes surviennent au repos ou pendant le sommeil, ce qui se produit plus fréquemment chez les sujets souffrant de LQT3^{20;21}. Fait intéressant, trente pour cent des patients n'ont aucune histoire familiale de LQTS; ces cas représentant des mutations de novo ou reflétant une pénétrance diminuée. Pour le LQT1, la forme la plus fréquente, le risque de manifestations cardiaques est plus grand chez les hommes jusqu'à la puberté, puis supérieur ensuite chez les femmes à l'âge adulte⁹¹. Ces caractéristiques cliniques spécifiques au génotype sont présentées dans le Tableau 2.

1.5 Manifestations électrocardiographiques

1.5.1 Prolongation de l'intervalle QT

Une des façons les plus courantes de corriger l'intervalle QT en fonction de la fréquence cardiaque est d'utiliser la formule de Bazett⁹² : $QTc = QT / (RR)^{1/2}$. La 2^e dérivation est généralement la meilleure pour mesurer le QT²⁸, puisque la fin de l'onde T y est habituellement bien délimitée et que l'intervalle QT

	LQT1	LQT2	LQT3
Déclencheur de l'arythmie	Activité physique	Stimulus auditif	Repos, sommeil
Anomalie de l'onde T	Base élargie	Faible amplitude ou encoche	Début retardé
Manifestations cardiaques à 40 ans			
<i>≥1 manifestation (%)</i>	62	46	18
<i>≥2 manifestations (%)</i>	37	36	5
Manifestations létales (%)	4	4	20
Âge médian à la 1^{ère} manifestation (ans)	9	12	16

Tableau 2. Caractéristiques cliniques spécifiques au génotype
(adapté de Chiang et al. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36 :1-12.)

ainsi obtenu offre une bonne corrélation avec le QT maximal mesuré sur l'ECG à 12 dérivations. Un intervalle QTc supérieur à 440 msec est considéré prolongé. Cependant, les observations du Registre International du LQTS montrent que 68 (5%) des 1345 membres de familles ayant un intervalle QTc < 440 msec ont subi un arrêt cardiaque⁸⁹, suggérant que les personnes affectées puissent (parfois ou toujours) avoir des intervalles QTc normaux. Garson et al.⁹³ ont aussi démontré que 6% des 287 patients atteints de LQTS ont un intervalle QTc normal. Une analyse effectuée chez 199 membres de familles avec le génotype LQT1, a permis de constater qu'en utilisant un seuil ("cutoff") établi à 440 msec pour le QTc, 11% des membres de ces familles n'étaient pas bien classifiés²⁰. Aucun des "porteurs" du gène affecté n'avait un QTc de 410 msec et moins, tandis qu'aucun sujet normal n'avait un QTc de 470 msec et plus (hommes) ou 480 msec et plus (femmes)²⁰. En utilisant un QTc de 460 msec comme seuil, la valeur prédictive positive s'élevait à 92% et la valeur prédictive négative, à 94%²⁸. Puisque 6% des porteurs du gène affecté présentent un premier QTc normal et que le QTc peut varier sur les tracés suivants, plusieurs ECG sont indiqués et requis pour identifier ces porteurs si un doute persiste. Éventuellement, de nouvelles techniques de génotypage rapides et peu coûteuses permettront le diagnostic moléculaire. Pendant un test d'activité physique, une relation anormale entre la durée du QT et le cycle de stimulation s'observe. En fait, chez certains sujets, particulièrement ceux atteints de LQT1, le QTc ne parvient pas à se raccourcir de façon satisfaisante à mesure que la fréquence cardiaque augmente, et une prolongation persistante du QTc s'observe durant la phase de recouvrement⁹⁴. Dans la population générale, les femmes présentent des intervalles QT plus longs que ceux des hommes, probablement davantage à cause du raccourcissement observé chez ces derniers après la puberté, qu'à cause d'une

prolongation chez les femmes pendant leur période féconde⁹⁵. Dans le LQTS, les hommes présentent des valeurs de QTc moyennes inférieures à celles des femmes et des enfants^{91;96}, que les membres des familles soient des génotypes positifs ou négatifs. Il a donc été suggéré que la différence observée entre les adultes des deux sexes, en ce qui concerne la susceptibilité aux torsades de pointes, reflète la présence relativement plus importante chez les hommes d'un facteur venant contrer les mécanismes favorisant la prolongation du QT²¹.

1.5.2 Dispersion de l'intervalle QT

En plus de l'hétérogénéité temporelle décrite plus haut (l'ECG peut sporadiquement être normal), la repolarisation dans le LQTS peut aussi faire preuve d'hétérogénéités spatiales⁹⁷ et transmurales⁹⁸ substantielles. Les dispersions spatiales du QT et du QTc peuvent être calculées en utilisant deux indices: la différence entre la plus longue et la plus courte valeur mesurée sur chacune des 12 dérivations de l'ECG (QTmax – QTmin, QTcmax.–QTcmin) et la dispersion relative du QT et du QTc (écart-type du QT/moyenne des QT x 100). Ces deux indices de dispersion de la repolarisation sont augmentés chez les patients LQTS par rapport aux sujets témoins⁹⁷.

1.5.3 Anomalies des ondes T-U et alternance de l'onde T

Il a été proposé que le degré d'hétérogénéité transmurale puisse être déterminé par la durée de la deuxième moitié (post-pic) de l'onde T⁹⁸. La repolarisation du potentiel d'action épicaudique, le premier à se repolariser, coïncide avec le pic de l'onde T in vitro; la repolarisation des cellules myocardiques (M cells),

les dernières à se repolariser, coïncide quant à elle avec la fin de l'onde T. Il a donc été proposé que la durée du potentiel d'action des cellules M détermine l'intervalle QT et que l'intervalle $\text{picT} - \text{finT}$ serve d'indice d'hétérogénéité transmurale de repolarisation.

Les patients atteints de LQTS peuvent présenter de multiples anomalies morphologiques de l'onde T, telles qu'une onde T à base élargie, biphasique, bifide ou avec une encoche. Ces anomalies de l'onde T peuvent s'observer chez des sujets normaux, mais beaucoup moins fréquemment que chez les patients atteints de LQTS (15% vs 62%)⁹⁹. Parmi les patients LQTS, ces anomalies de l'onde T sont plus fréquentes chez ceux ayant une histoire d'arrêt cardiaque ou de syncope (81% vs 19%)⁹⁹. Il a aussi été proposé qu'une encoche sur l'onde T, observée pendant la phase de recouvrement lors de tests d'activité physique, suggère fortement le LQTS⁹⁹.

Différents motifs dans le complexe d'ondes ST-T ont aussi été suggérés chez les patients atteints de LQTS (Figure 4). La durée de l'onde T est particulièrement prolongée chez les patients atteints de LQT1. Les patients LQT2 présentent habituellement des ondes T de petite taille et/ou encochées. Le début de l'onde T est anormalement retardé chez les patients LQT3¹⁰⁰. Dans un rapport préliminaire¹⁰¹, on parvenait à prédire correctement les génotypes dans 98% des familles démontrant des motifs d'ondes typiques. Globalement, la prédiction s'est avérée exacte dans 80% des familles, en se basant sur le motif de l'onde ST-T sur l'ECG¹⁰¹.

L'hétérogénéité temporelle de la repolarisation dans le LQTS peut aussi s'observer dans l'alternance, d'un battement à l'autre, de la polarité ou de l'amplitude de l'onde T (T wave alternans). Ce phénomène peut s'observer brièvement au repos, mais apparaît beaucoup plus souvent durant un stress

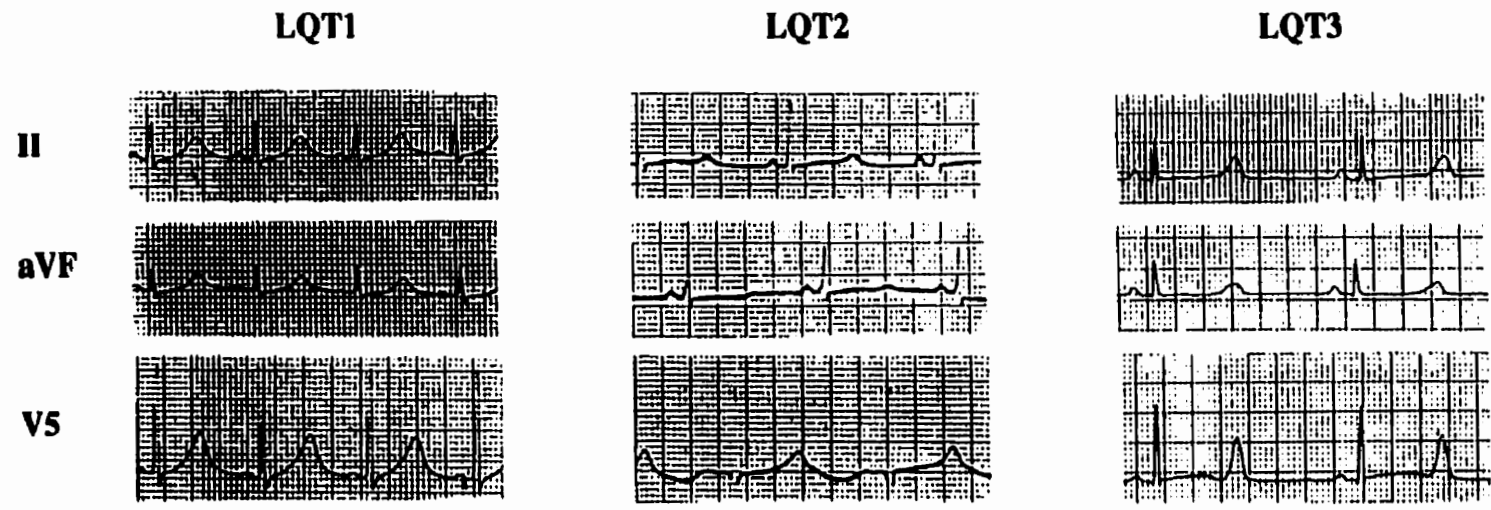


Figure 4. Complexes d'ondes ST-T selon le génotype de LQTS
 (adapté de Moss et al. *Circulation* 1995;92 :2929-34.)

physique ou émotif. Il est reconnu comme un précurseur de torsades de pointes et de ce fait, comme un marqueur pour les patients à haut risque⁵.

1.5.4 Bradycardie

Il a été observé que la fréquence cardiaque moyenne au repos est plus faible chez les patients atteints de LQTS, particulièrement chez les enfants, par rapport aux sujets normaux témoins⁶. De plus, les patients LQTS ont une fréquence cardiaque plus faible que celle de témoins normaux durant une activité physique de modérée à intense, mais on observe un chevauchement considérable entre leurs distributions normales respectives. Un dysfonctionnement du nœud sinusal a aussi été rapporté chez les patients LQTS⁹⁴. Quelques-uns ont un arrêt sinusal et une encoche sur l'onde T, lors du premier battement après une pause. Les battements ventriculaires répétitifs et les torsades de pointes se déclenchent habituellement à partir du deuxième pic après l'encoche¹⁰². Il a été démontré que, suite à une dénervation sympathique cardiaque gauche couronnée de succès, l'onde T avec encoche disparaît après une pause¹⁰². Une forme particulièrement maligne de LQTS se présente avec un bloc auriculo-ventriculaire 2:1 et /ou des désordres de conduction intraventriculaires, probablement attribuables à une très importante prolongation du potentiel d'action dans le système de conduction¹⁰³.

Le degré de bradycardie sinusale étant très variable, ceci suggère que certains désordres génétiques ont plus de chances d'être associés avec cette manifestation de la maladie que d'autres, ou que l'expression d'autres gènes détermine si un sujet donné développe une bradycardie sinusale²¹.

1.5.5 Arythmies cardiaques

Les enregistrements de potentiel d'action monophasique ont démontré une prolongation de la durée du potentiel d'action dans le muscle ventriculaire des sujets atteints de LQTS⁹⁸. On croit que les post-dépolarisations précoces (EAD's), survenant pendant les phases 2 et 3 prolongées du potentiel d'action, sont attribuables à la réactivation des courants calciques de type L, ou d'autres courants tels l'échangeur sodium-calcium ou le courant sodique cardiaque¹⁰⁴. Typiquement, les torsades de pointes commencent par une dépolarisation ventriculaire prématurée, suivie d'une pause compensatoire. Le battement sinusal suivant présente souvent une prolongation marquée de l'intervalle QT et une onde T d'allure très bizarre. S'ensuit une séquence de tachycardie ventriculaire polymorphe (torsades de pointes)¹⁰⁵ (Figure 5), dont le premier battement est déclenché à partir d'une post-dépolarisation précoce. Ce cycle "court-long-court" annonçant les torsades de pointes est une empreinte classique du LQTS. Les torsades de pointes peuvent se développer spontanément, causant les épisodes de syncope, puis dégénérer vers la fibrillation ventriculaire et ultimement, la mort subite.

El-Sherif et al.¹⁰⁶, par une analyse tridimensionnelle des motifs d'activation dans un modèle de LQTS, ont démontré que le premier battement de la tachycardie ventriculaire polymorphe survient régulièrement sous forme d'une activité focale dans un site sous-endocardique, alors que les battements suivants sont dus à une activité focale sous-endocardique, une excitation de ré-entrée ou une combinaison des deux mécanismes¹⁰⁶. Ils ont ensuite démontré que le déplacement apparent de l'axe du QRS observé pendant les torsades de pointes était causé par un circuit plutôt localisé, changeant de position et

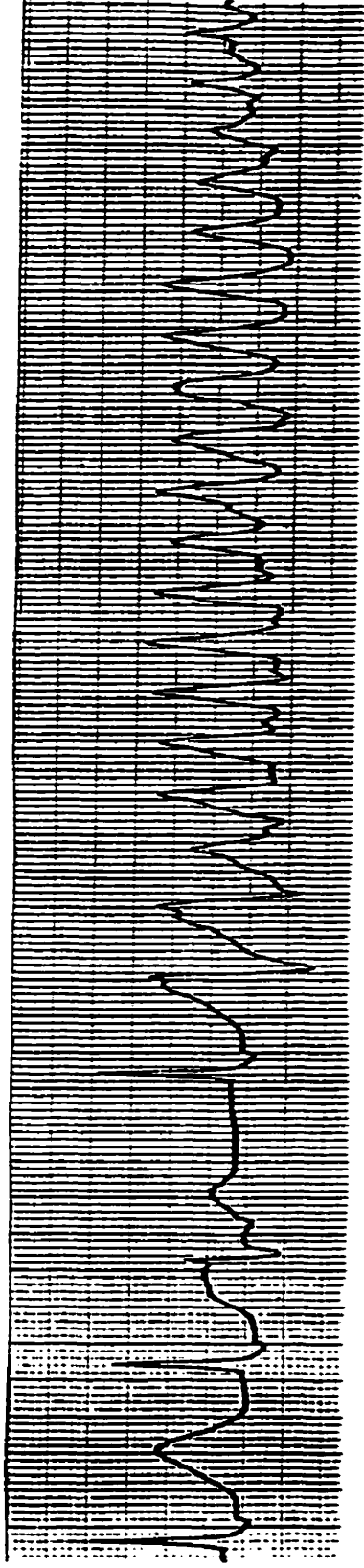


Figure 5. Bande de rythme classique d'un épisode de torsades de pointes

Le premier complexe présente un intervalle QT fortement prolongé de 720 msec. La première extrasystole débute le cycle court-long-court qui déclenche un épisode de torsades de pointes. (vitesse du papier :25mm/sec).

d'orientation d'un battement à l'autre; la majeure partie du myocarde ventriculaire étant activé de façon centrifuge¹⁰⁷. Ceci suggère un déclenchement par des post-dépolarisations précoces dans le réseau de Purkinje (sous-endocarde) et un maintien par la ré-entrée.

1.6 Diagnostic

Des antécédents de syncope ou de mort subite chez un enfant ou un jeune adulte, particulièrement durant une activité physique ou un stress émotif, ainsi qu'une histoire de noyade inexplicée (ou de quasi-noyade), devraient éveiller des soupçons quant à l'éventualité du LQTS^{28;43}. Certains avancent même que des convulsions ou syncopes vraisemblablement provoquées par une situation de "fight, flight or fright" indiquent le LQTS jusqu'à preuve du contraire²⁸. Aux États-Unis, plus de la moitié des 8000 morts subites inexplicées chez les enfants pourraient être attribuables au LQTS²⁸, et le taux de mortalité sur 10 ans chez les patients LQTS non-traités pourrait être aussi élevé que 50%, exigeant que le diagnostic de LQTS soit considéré dans certaines situations cliniques. Bien que des progrès immenses aient été faits dans la compréhension des mécanismes moléculaires à la base des désordres électrophysiologiques observés chez les patients LQTS, le diagnostic s'appuie encore fortement sur les manifestations cliniques notées chez les patients et leurs familles. Chez ceux présentant les manifestations caractéristiques du LQTS, les cas typiques ne causent aucune difficulté diagnostique, présumant que le médecin connaisse la maladie. Cependant, les cas "borderlines" sont plus complexes et requièrent l'intégration de plusieurs variables cliniques, incluant des observations électrocardiographiques au repos et pendant l'activité physique, ainsi que les antécédents cliniques et familiaux complets.

Schwartz et al.⁷ ont proposé les premiers critères diagnostiques du LQTS en 1985, procurant une approche quantitative attribuant un poids différent et relatif aux critères mineurs et majeurs. Les progrès qui ont suivi dans la compréhension du LQTS, incluant l'observation que le QTc chez les femmes est plus long que chez les hommes, qu'il existe un chevauchement important des valeurs de QTc entre les porteurs et les "non-porteurs" de certaines mutations, et que plusieurs paramètres cliniques sont significativement différents chez des patients atteints ou non de LQTS, ont mené à la formulation de nouveaux critères publiés en 1993¹⁰⁸. Ces nouveaux critères sont présentés dans le Tableau 3¹⁰⁸. Ils sont fondés sur des observations électrocardiographiques, et les antécédents cliniques et familiaux. Le résultat est une valeur située entre 0 et 9. Trois catégories de probabilité ont été définies: <1 point = faible probabilité; 2 à 3 points = probabilité intermédiaire; >4 points = forte probabilité. Chez les patients montrant un total de 2 à 3 points, plusieurs ECG devraient être obtenus, puisque la valeur du QTc chez les patients LQTS peut varier avec le temps. De plus, des ECG de dépistage devraient aussi être obtenus chez les autres membres de la famille.

Des tests d'activité physique et un monitoring avec Holter devraient être effectués chez tous les sujets "suspects" pour le LQTS, bien que leur valeur prédictive positive soit somme toute assez faible. Le raccourcissement ou l'allongement du QTc pendant ou après des tests d'activité physique ne s'est pas avéré très utile non plus, puisqu'il existe peu de standards normaux, et que des études prospectives sur la valeur prédictive de ces variations de QTc dans la stratification du risque n'ont toujours pas été faites. Les évaluations électrophysiologiques plus invasives, avec ou sans administration de catécholamines, ne sont pas utiles.

	Points
<i>Observations électrocardiographiques*</i>	
QTc†	
>480 msec	3
460-470 msec	2
450 (hommes) msec	1
Torsades de pointes‡	2
Alternance de l'onde T	1
Onde T encochée sur 3 dérivations	1
Rythme cardiaque lent pour l'âge§	0,5
<i>Antécédents cliniques</i>	
Syncope‡	
Avec stress	2
Sans stress	1
Surdité congénitale	0,5
<i>Antécédents familiaux**</i>	
Diagnostic de LQTS confirmé chez des membres de la famille¶	1
Mort subite inexplicée avant l'âge de 30 ans parmi les membres de la famille immédiate	0,5

Tableau 3. Critères diagnostiques du LQTS
(adapté de Schwartz et al. *Circulation* 1993;88 :782-4.)

Pointage : <1 point = faible probabilité; 2 à 3 points = probabilité intermédiaire;
>4 points = forte probabilité

* En absence de médicaments ou désordres connus pour affecter ces paramètres sur l'ECG;

† QTc calculé selon la formule de Bazett, $QTc = QT/RR^{1/2}$;

‡ Mutuellement exclusifs;

§ Rythme cardiaque au repos sous le deuxième percentile pour l'âge;

** Le même membre de la famille ne peut être compté deux fois;

¶ Un diagnostic confirmé de LQTS se définit par un pointage > 4.

Dans les cas plus “borderlines”, des tests génétiques visant à identifier de nouvelles mutations pourront éventuellement être utilisés. Actuellement, ces tests ne sont pas assez bien développés pour devenir un outil diagnostique disponible sur une base routinière. Dans une récente étude effectuée chez neuf familles avec des cas sporadiques de LQTS²⁶, c’est-à-dire des familles à l’intérieur desquelles, à part l’individu affecté, aucun des membres de la famille ne présente de signes cliniques de la maladie; 33% des 46 membres d’une famille ont été identifiés comme “porteurs” par diagnostic moléculaire, avec une pénétrance estimée à seulement 25%. Il semble donc approprié d’effectuer un dépistage moléculaire chez tous les membres de la famille des patients génotypés, lorsque disponible. Les approches moléculaires contemporaines peuvent être utilisées pour analyser l’ADN génomique (à partir de lymphocytes périphériques) et détecter des mutations associées au LQTS. Ceci est particulièrement utile pour les membres d’une famille dans laquelle le gène mutant responsable et des mutations spécifiques ont été identifiés à partir d’un individu affecté. Dans au moins un cas, des mutations sur à la fois HERG et KvLQT1 (caractère hétérozygote double) ont été identifiées chez deux sœurs sévèrement affectées, membres d’une grande famille LQTS; suggérant que les analyses génétiques effectuées sur les jeunes patients sévèrement affectés devraient considérer la recherche de plus d’une mutation sur les gènes du LQTS⁵⁸. Par ailleurs, le dépistage de mutations associées au LQTS ne peut se faire encore à grande échelle à cause des coûts et du temps requis, mais aussi parce que quelques gènes impliqués dans le LQTS restent à être identifiés. Par contre, la structure génomique de chacun des cinq gènes humains du LQTS étant maintenant connue, une étape

importante a été franchie afin de rendre le diagnostic pré-symptomatique de mutations sur ces gènes plus accessible^{15;71;109}.

1.7 Traitement

Pour les patients asymptomatiques, il existe diverses options thérapeutiques selon les besoins. Schwartz et al.¹¹⁰ ont proposé de traiter les patients asymptomatiques dans six cas :

- 1) chez ceux souffrant de surdité congénitale, puisque le risque de manifestation cardiaque est alors particulièrement élevé;
- 2) chez les nouveau-nés et les très jeunes enfants, le risque étant particulièrement élevé pendant les premiers mois de la vie;
- 3) chez les frères et sœurs affectés d'un enfant mort subitement suite à un stress émotif;
- 4) chez les patients présentant une alternance de l'onde T, un signe d'instabilité électrique accrue;
- 5) chez les patients présentant un intervalle QTc très long (>600 msec), probablement les individus les plus à risque;
- 6) lorsque l'anxiété est palpable et qu'une requête explicite de traitement est signifiée par la famille, après des explications minutieuses et complètes sur la situation.

Vincent et al.²⁰ et Garson et al.⁹³ ont pour leur part recommandé de traiter tous les patients asymptomatiques s'ils ont moins de quarante ans au moment du diagnostic, puisqu'il est parfois impossible de prévoir quel patient asymptomatique deviendra symptomatique, et que dans 30 à 40% des cas, la

première manifestation est la mort subite. D'ailleurs, dans une récente étude de Priori et al.¹¹¹, on a remarqué qu'il n'était pas rare de constater que la mort représente le tout premier symptôme, suggérant que tous les jeunes patients asymptomatiques doivent être traités.

Par ailleurs, il semble faire consensus que les patients symptomatiques doivent être traités. Il existe actuellement cinq possibilités de traitement pour les patients atteints de LQTS : 1) les agents bêta-bloquants, 2) les stimulateurs cardiaques (pace-makers), 3) la dénervation sympathique cardiaque gauche, 4) les défibrillateurs et 5) le traitement "adapté au gène". L'objectif thérapeutique est de prévenir les tachyarythmies ventriculaires malignes (tachycardie ventriculaire, torsades de pointes et fibrillation ventriculaire).

1.7.1 Les agents bêta-bloquants

Les bêta-bloquants demeurent toujours le traitement de première ligne. Décrit pour la première fois en 1975⁶ et clairement établi en 1985⁷, l'effet bénéfique des agents bêta-bloquants s'exprime par une réduction dramatique de la mortalité. Évaluée à 71% chez les sujets témoins, elle est passée à 6% seulement chez les sujets traités¹¹⁰. Les syncopes et autres manifestations récidivent chez les patients traités dans environ 25% des cas, et les probabilités de mort subite sur une période de cinq ans sont estimées à 10%, malgré le traitement¹¹².

La dose de bêta-bloquant devrait être maximisée, ce qui devrait se traduire par une réponse diminuée de la fréquence cardiaque face à un test à l'effort. L'objectif est de maintenir la fréquence cardiaque en-deçà de 130 battements/minutes en toutes circonstances. Tous les bêta-bloquants semblent efficaces, bien qu'aucune étude comparative n'ait été entreprise à ce sujet.

Évidemment, à cause de ses propriétés antiarythmiques de classe III, le sotalol est absolument contre-indiqué. Le propranolol est largement utilisé, à une posologie quotidienne de 2 à 3 mg/kg. Le nadolol est passablement utilisé aussi à cause de sa demi-vie plus longue (oublier une dose pourrait alors ne pas être catastrophique). La non-observance expose bien sûr le patient au même risque d'événement cardiaque qu'un sujet non-traité, et contribue probablement à un certain pourcentage d'échecs du traitement, particulièrement chez les adolescents. Chez les patients qui développent une bradycardie sévère ou un arrêt sinusal significatif (i.e. > 2 sec), l'installation concomitante d'un stimulateur cardiaque (pace-maker) est indiquée.

Le mécanisme précis expliquant l'efficacité des agents bêta-bloquants dans le LQTS reste inconnu. Le QTc demeure prolongé après un traitement efficace avec les bêta-bloquants, mais sa dispersion (QTcmax – QTcmin) est réduite chez les sujets sensibles ("responders") au traitement¹¹³. Une valeur seuil ("cutoff") de 100 msec pour QTcmax - QTcmin offre une sensibilité de 80% et une spécificité de 82% pour discriminer les sensibles ("responders") des non-sensibles ("nonresponders") au traitement. On a aussi observé qu'un groupe de patients LQTS n'ayant pas été sensibles aux bêta-bloquants et ayant subi une dénervation sympathique cardiaque gauche sont demeurés asymptomatiques (suivi moyen, 5 ± 4 ans). Dans ce groupe, la dispersion de la repolarisation a été significativement réduite par la dénervation chirurgicale, jusqu'à des valeurs semblables à celles des patients sensibles au traitement bêta-bloquant¹¹³. Donc, la persistance d'une dispersion excessive du QT après l'introduction d'une thérapie bêta-bloquante semble être un marqueur, permettant d'identifier rapidement les patients susceptibles de demeurer à haut risque, et de ce fait, suggère la nécessité de passer à d'autres formes de traitement.

Récemment, Shimizu et al.¹¹⁴ ont démontré dans un modèle canin que le chromanol 293B (un bloqueur d' I_{Ks}) ne suffisait pas à induire des torsades de pointes, mais que l'ajout d'un agoniste bêta était fortement arythmogène, probablement par une augmentation de la dispersion transmurale de la repolarisation. Ils ont proposé que cela était causé par une importante augmentation résiduelle de I_{Ks} au niveau des cellules épocardiques et endocardiques, mais pas dans les cellules M, où I_{Ks} , de façon intrinsèque, est moins présent. Cette étude permet donc une compréhension mécanistique des fondements cellulaires de l'efficacité thérapeutique des agents bêta-bloquants dans le LQT1. Dans une autre étude, réalisée chez l'humain, Shimizu et al.¹¹⁵ ont aussi démontré que l'ajout de propranolol renversait complètement la prolongation de l'intervalle QT et l'augmentation de la dispersion induites par l'adrénaline chez des patients LQT1. Un mécanisme possible expliquant l'efficacité des bêta-bloquants est l'inhibition de la réactivation du courant calcique entrant, un effet qui s'appliquerait à toutes les formes de LQTS. De 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 torsades de pointes chez des patients LQTS ayant subi des tests de provocation à l'adrénaline¹⁰⁴. Le vérapamil pourrait s'avérer une alternative efficace pour les patients ne pouvant tolérer les bêta-bloquants, tels les asthmatiques, bien que des données sur l'efficacité et la sécurité à long terme ne soient pas encore disponibles.

1.7.2 La stimulation cardiaque

Les effets bénéfiques de la stimulation cardiaque chez les patients LQTS à haut risque sont probablement attribuables à la prévention de la bradycardie et des pauses, reconnues comme étant arythmogènes¹¹². Cependant, les stimulateurs ne devraient pas être considérés en monothérapie dans le LQTS, mais plutôt comme des accessoires au traitement bêta-bloquant, dans le but de prévenir les épisodes de bradycardie sévère ou les pauses chez les patients souffrant de bloc auriculo-ventriculaire pré-existant, ou lorsque des arythmies pause-dépendantes ont été documentées.

1.7.3 La dénervation sympathique cardiaque gauche

La dénervation sympathique cardiaque gauche devrait être réservée aux patients souffrant de syncopes récidivantes qu'on ne peut contrôler à l'aide des bêta-bloquants ou de la stimulation cardiaque. La plus grande étude à ce sujet, publiée par Schwartz et al.¹¹⁰, a évalué 123 patients et est considérée comme très représentative, puisqu'elle a couvert 90% de toute la population ayant subi ce type d'intervention, et que le suivi a été très long, en moyenne 10 ans. Aucun de ces patients ne répondait ou ne tolérait les bêta-bloquants à forte dose. La dénervation sympathique cardiaque gauche a réduit de façon marquée le nombre de patients avec manifestations cardiaques (de 99% à 45%) et le nombre de manifestations cardiaques par patient (de 21 ± 31 à 1 ± 3). La plupart des patients ayant souffert de manifestations cardiaques après l'intervention n'en ont eu qu'une seule, habituellement durant les premiers six

mois. La prévalence de la mort subite sur 10 ans s'est élevée à 8%, et le taux de survie à cinq ans à 94%.

Pour obtenir une dénervation sympathique cardiaque gauche adéquate, il faut enlever les quatre ou cinq premiers ganglions cervico-thoraciques gauches, avec la moitié inférieure du ganglion stellaire gauche. En préservant la moitié supérieure de ce ganglion, on évite le syndrome de Horner iatrogène, caractérisé entre autres par un myosis, de l'énophtalmie (globe oculaire enfoncé) et presque toujours, une élévation de la température de la joue avec sudation d'un seul côté du visage.

1.7.4 Les défibrillateurs

Un défibrillateur est présentement utilisé lorsque la combinaison des bêta-bloquants, de la dénervation sympathique et/ou de la stimulation cardiaque ne parvient pas à éviter les épisodes de syncope. On suggère aussi l'installation d'un défibrillateur comme traitement de première ligne, lorsque le premier symptôme est un arrêt cardiaque ressuscité. Alors que l'installation d'un défibrillateur semble diminuer de façon importante la prévalence de la mort subite chez les patients LQTS¹¹⁶, elle peut aussi engendrer une importante détresse émotionnelle pouvant déclencher les arythmies, et par le fait même, les décharges électriques. Pour éviter ces chocs, lors de courts épisodes de torsades de pointes s'arrêtant d'eux-mêmes, des algorithmes de détection et de traitement révisés ont été introduits dans les appareils plus récents.

1.7.5 Le traitement “adapté au gène”

Chez les patients LQT3, des études expérimentales¹¹⁷ et cliniques²⁴ ont suggéré que les bloquants du canal sodique tels la mexilétine et la lidocaïne puissent prévenir l'ouverture répétitive du canal, raccourcir l'intervalle QT et normaliser la morphologie de l'onde T. Ils sont donc considérés comme des traitements “adaptés au gène LQT3”. Cependant, la mexilétine s'est aussi avérée efficace à réduire la dispersion et à prévenir les torsades de pointes dans des modèles de LQT2 et de LQT3¹¹⁸. De plus, dans un modèle canin de LQT1, la mexilétine a réduit davantage la durée du potentiel d'action des cellules M que celle des cellules épicrodiques et endocardiodes, diminuant donc la dispersion transmurale et l'effet inducteur de torsades de pointes de l'isoprotérénol¹¹⁴. Actuellement, ces traitements ne peuvent être considérés qu'en tant qu'adjuvants aux bêta-bloquants, et leur utilité en monothérapie dans le LQTS reste à être démontrée.

Pendant que les études moléculaires de génétique proposent la possibilité de traitements spécifiques aux génotypes ciblant les canaux ioniques, toute intervention réduisant le courant entrant net ou augmentant le courant sortant net diminuera l'intervalle QT et pourra protéger les patients LQTS des arythmies. Augmenter la kaliémie à environ 1,5 mEq/L au-dessus de la normale avec le spironolactone, ou grâce à l'administration intraveineuse ou orale de chlorure de potassium, a permis de réduire de 24% l'intervalle QTc chez sept patients LQT2, comparé à 4% chez cinq sujets témoins en santé, en plus d'éliminer l'encoche sur l'onde T²⁵. On croit que ces interventions causent une augmentation de I_{Kr} , et devraient être efficaces dans toutes les formes de LQTS. D'un autre côté, bien qu'augmenter la kaliémie puisse

renverser les anomalies de l'ECG dans le LQT2, une augmentation à long terme ne sera peut-être que partiellement réalisable, en raison de la fonction rénale normale¹¹⁹. Le nicorandil, un ouvreur de canaux potassiques sensibles à l'ATP, améliore les anomalies de repolarisation observées durant l'administration d'adrénaline chez les patients LQT1¹¹⁵. L'efficacité du nicorandil a aussi été démontrée dans un groupe de patients LQTS chez qui les épisodes de syncope étaient réfractaires aux bêta-bloquants¹²⁰. L'effet à long terme des ouvreurs de canaux potassiques chez les patients LQTS reste cependant à être déterminé, et leur éventuelle mise en marché est incertaine.

1.8 Historique du LQTS médicamenteux

Il existe plusieurs raisons de croire qu'une prolongation de l'intervalle QT puisse, dans certaines circonstances, être un mode d'action antiarythmique efficace. De fait, les médicaments possédant cet attribut démontrent des propriétés antiarythmiques¹²¹. Cependant, les problèmes reliés à la pro-arythmie ont limité le développement et l'utilisation à grande échelle des antiarythmiques de classe I et III¹²²⁻¹²⁹. De plus, les médicaments à indications "non-cardiaques" prolongeant le QT, même de façon modeste, sont dorénavant sous étroite surveillance de la part des agences de contrôle gouvernementales, à cause de leur potentiel pro-arythmique. En fait, depuis le milieu des années 80, on a remarqué que ces médicaments à indications "non-cardiaques" proviennent de classes thérapeutiques de plus en plus diverses. Durant les années 60 et 70, on avait déjà noté la toxicité cardiaque de certaines classes de médicaments, tels les neuroleptiques et les antihistaminiques de première génération¹³⁰⁻¹³⁴, mais ces observations restaient confinées à une littérature très spécialisée, et on considérait la capacité de certains de ces

médicaments de prolonger le QT comme une “curiosité” pharmacologique d’une signification clinique incertaine et pour laquelle bien sûr, les mécanismes moléculaires demeureraient obscurs.

On a depuis identifié plusieurs autres médicaments de classes thérapeutiques très diverses, possédant un tel potentiel pro-arythmique. Le Tableau 4 dresse une liste non-exhaustive des médicaments ayant le potentiel de causer des torsades de pointes. Une des faiblesses de ce genre de liste est de ne fournir aucune estimation du risque relatif. Par exemple, il semble clair que le risque associé à une faible dose de terfénadine chez un homme en santé, ne prenant aucun autre médicament, soit extrêmement faible. Au contraire, le risque associé à l’administration de quinidine, de sotalol ou de dofétilide à une femme en stade avancé d’insuffisance cardiaque, souffrant également de fibrillation auriculaire et d’hypokaliémie, est probablement de l’ordre de 5 à 10% ou plus¹³⁵.

1.9 Étiologie

Puisque l’intervalle QT est la somme des durées de dépolarisation et de repolarisation ventriculaires, il reflète la durée du potentiel d’action des myocytes cardiaques. Cette durée est donc contrôlée par un équilibre étroit entre les courants entrants et sortants, durant la phase de repolarisation. Les courants potassiques sortants, particulièrement le courant rectifiant retardé: I_K (qui est la somme de deux composantes aux propriétés cinétiques et pharmacologiques distinctes; la rapide I_{Kr} et la lente I_{Ks}) jouent un rôle important durant la phase de repolarisation, et déterminent la forme du potentiel d’action. Une diminution de la conductance peut augmenter la durée du potentiel d’action et de la période réfractaire efficace de façon significative.

Antiarythmiques	Non-antiarythmiques		
-Quinidine	<i>-Antihistaminiques</i>	<i>-Antibiotiques</i>	<i>-Antifongiques</i>
-Procaïnamide	-Terfénadine	-TMP-SMX*	-Kétoconazole
-N-acétylprocaïnamide	-Fexofénadine	-Érythromycine	-Itraconazole
-Disopyramide	-Astémizole	-Clarithromycine	-Fluconazole
-Sotalol	-Diphénhydramine	-Pentamidine	
-Dofétilide	-Clémastine	-Sparfloxacin	
-Ibutilide		-Grépafloracine	
-Azimilide	<i>-Neuroleptiques</i>	<i>-Antidépresseurs</i>	<i>-Antimalariens</i>
-Tédisamil	-Thioridazine	-Amitriptyline	-Chloroquine
-Bépridil	-Halopéridol	-Désipramine	-Halofantrine
-Amiodarone	-Dropéridol	-Imipramine	
-Brétylium	-Chlorpromazine	-Doxépine	
	-Pimozide	-Maprotiline	
	-Rispéridone		
	-Sertindole		
	<i>-Modulateurs de la motilité gastrointestinale</i>	<i>-Divers</i>	
	-Cisapride	-Probuco	
	-Dompéridone	-Glyburide	
		-Indapamide	
		-Térodiline	

Tableau 4. Médicaments ayant été associés aux torsades de pointes

* TMP-SMX = triméthoprime-sulfaméthoxazole

Plusieurs études suggèrent que le principal mécanisme par lequel des médicaments prolongent le QT et causent des torsades de pointes est le bloc de courants potassiques repolarisants¹³⁶⁻¹⁴⁶. Des médicaments tels l'amiodarone ou le *d*-sotalol exercent leur action antiarythmique de classe III par ce mécanisme. En fait, le *d*-sotalol bloque complètement la composante rapide I_{Kr} à des concentrations qui ont peu d'effet sur I_{Ks} ^{140;147}. Une caractéristique intéressante des médicaments "non-cardiaques" énumérés dans le Tableau 4 est qu'ils sont à peu près tous, comme le *d*-sotalol, des bloqueurs relativement spécifiques de I_{Kr} ¹³⁶⁻¹⁴⁶.

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 relativement spécifique. En fait, il est même 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.

Il y a quelques années, Morgan et Sullivan¹⁴⁸ 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 6): 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 jette un coup d'oeil aux 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

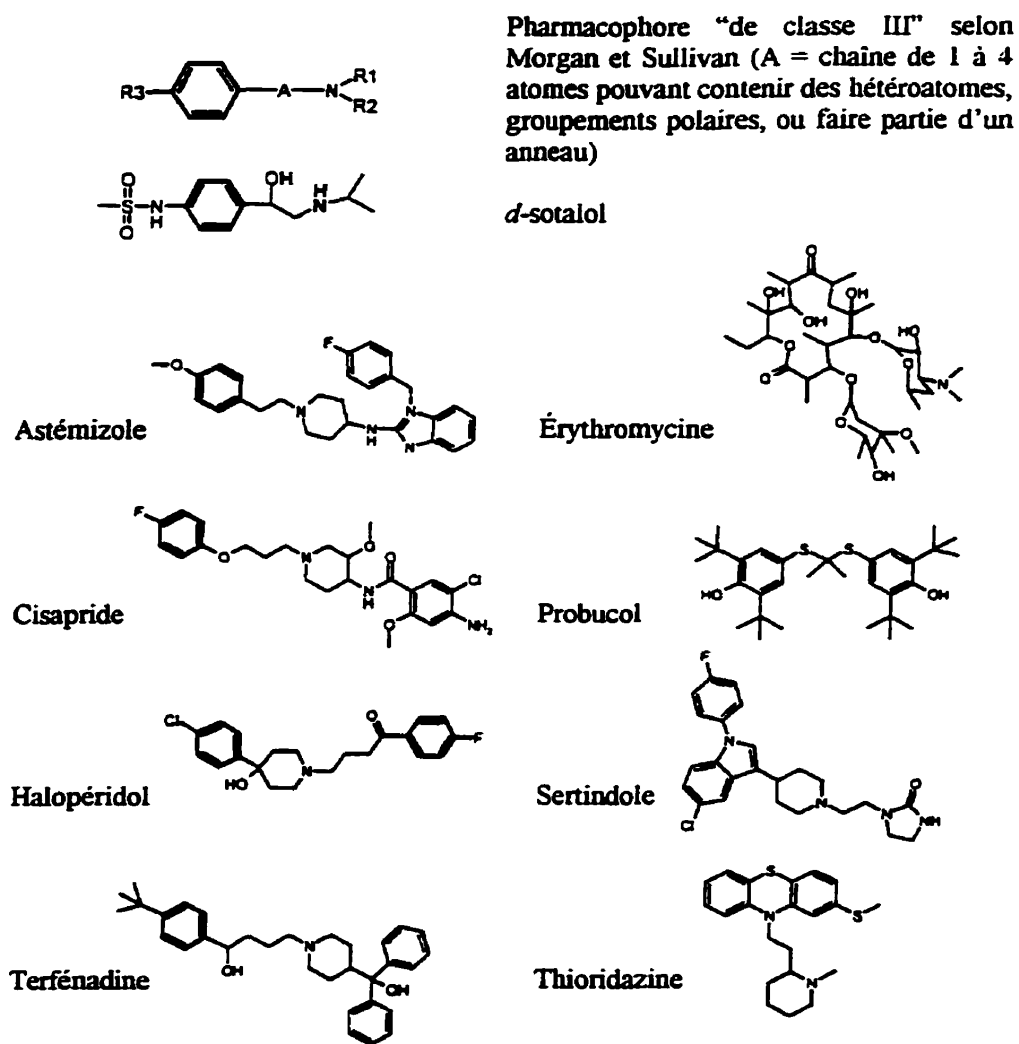


Figure 6. Structures moléculaires de quelques médicaments pouvant causer des torsades de pointes, en relation avec le pharmacophore "de classe III" proposé par Morgan et Sullivan.

À gauche : Exemples de médicaments sur lesquels ce pharmacophore (un cycle aromatique relié à un atome d'azote basique par une chaîne) peut être observé.

À droite : Exemples de médicaments prolongeant le QT et causant des torsades de pointes, sur lesquels ce pharmacophore est difficilement identifiable.

(adapté de dePonti et al. *Eur J Clin Pharmacol* 2000;56 :1-18.)

proposé par Morgan et Sullivan est difficilement identifiable sur d'autres médicaments, tels le probucol ou l'érythromycine. Bien sûr, 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 produits 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 de la terfénadine; la fexofénadine, principal métabolite de la terfénadine, est une molécule plus polaire, n'ayant pratiquement aucun effet sur le QTc, à part quelques cas anecdotiques¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

Récemment, en considérant la question sous un autre angle, c'est-à-dire en examinant la protéine-cible plutôt que le médicament, Mitcheson et al.¹⁵² ont proposé les premiers fondements structurels protéiques du LQTS médicamenteux. En utilisant la mutagenèse, ils ont démontré que la terfénadine et le cisapride interagissent avec deux acides aminés du domaine transmembranaire S6 de HERG (Y652: tyrosine et F656: phénylalanine). Fait intéressant, ces deux résidus aromatiques du domaine S6 ne se retrouvent que sur les canaux potassiques de type eag/erg, tels HERG. De fait, sur les autres canaux potassiques dépendants du voltage, on trouve l'isoleucine et la valine aux positions équivalentes. Ceci suggère donc une première explication "structurelle protéique" à savoir pourquoi autant de médicaments bloquent HERG mais peu ou pas les autres canaux potassiques dépendants du voltage.

1.10 Facteurs de risque

Des études cliniques ont permis d'identifier des facteurs de risque dans le développement des torsades de pointes¹⁵³. Pour quelques-uns d'entre eux, une explication électrophysiologique peut être fournie, et les observations cliniques ont parfois été le point de départ d'études cellulaires et biophysiques fort intéressantes. Par exemple, l'hypokaliémie et les rythmes cardiaques lents sont reconnus comme des facteurs de risque et ont servi à identifier les post-dépolarisations précoces comme de potentiels déclencheurs de torsades de pointes *in vitro*¹⁵⁴. De plus, le fait d'observer que l'hypokaliémie favorise les torsades de pointes a suscité l'intérêt à étudier les mécanismes par lesquels de faibles concentrations de potassium extracellulaire diminuent paradoxalement I_{Kr} , et potentialisent le bloc du canal par les médicaments¹⁵⁵.

D'autres facteurs de risque reconnus en clinique mais moins bien expliqués incluent le sexe féminin, l'hypomagnésémie, la conversion récente de la fibrillation auriculaire¹⁵⁶ et l'administration intraveineuse rapide de médicaments¹⁵⁷. Une intéressante étude a rapporté que le rythme sinusal semble s'accroître durant les minutes précédant un épisode de torsades de pointes¹⁵⁸, suggérant qu'une activation adrénergique sous-jacente, ou à tout le moins des rythmes cardiaques rapides contribuent aux torsades de pointes. Le même phénomène pourrait expliquer l'augmentation apparente du risque de torsades de pointes, peu après une cardioversion de fibrillation auriculaire en rythme sinusal, en présence de médicaments prolongeant l'intervalle QT. Plus récemment, des expériences réalisées sur des cœurs isolés ou des préparations cellulaires ont permis d'identifier la surcharge calcique intracellulaire comme un élément contribuant de façon importante au risque de torsades de

pointes^{159;160}. Ceci, entre autres, permettrait d'expliquer pourquoi les torsades de pointes induites par les médicaments semblent plus fréquentes parmi les patients atteints de cardiopathies telles l'insuffisance cardiaque congestive, chez qui les désordres de l'homéostasie calcique intracellulaire sont de plus en plus reconnus comme des substrats arythmogènes potentiels¹⁶¹.

Pour la plupart des médicaments, le risque de torsades de pointes s'élève à mesure que la dose et la concentration augmentent. L'accroissement marqué du risque de torsades de pointes lors de l'inhibition (par les macrolides ou les imidazoles) du métabolisme hépatique médié par le CYP3A4 de la terfénaire et du cisapride, deux puissants bloqueurs de I_{Kr} , en est un témoignage éloquent^{162;163}. Par ailleurs, on ne sait pas s'il y a dans la population générale, des patients chez qui l'activité métabolique du CYP3A4 est réduite (pour des raisons génétiques ou environnementales). De plus, puisque ce ne sont pas tous les patients soumis à de fortes concentrations des médicaments présentés dans le Tableau 4 qui développent des torsades de pointes, d'autres "modulateurs" du risque interviennent peut-être (hypokaliémie, pause après une stimulation adrénergique, etc.). Le cas de la quinidine constitue une exception à ce type de risque apparemment dépendant de la concentration. En fait, il est bien connu que la pro-arythmie associée à la quinidine survient à des concentrations plasmatiques sous-thérapeutiques¹³⁵. Il semble maintenant probable que ceci reflète les multiples effets électrophysiologiques de la quinidine. À faible concentration, elle est un puissant bloqueur de I_{Kr} , favorisant les torsades de pointes, alors qu'à des concentrations supérieures, le bloc des canaux sodiques cardiaques pourrait venir réduire le risque de torsades de pointes¹³⁵. De même, le risque de torsades de pointes durant un traitement avec l'amiodarone est très faible, même si ce médicament prolonge l'intervalle QT, en bloquant I_{Kr} et/ou I_{Ks} ¹⁶⁴. Encore une fois, la réduction du

potentiel pro-arythmique de l'amiodarone reflète probablement la capacité de ce médicament de bloquer une variété de courants entrants arythmogènes, responsables des post-dépolarisations précoces et de l'activité gâchette déclenchant les torsades de pointes¹⁶⁴.

1.11 Rôle de la génétique dans les torsades de pointes médicamenteuses

Chez certains patients, le diagnostic de LQTS congénital n'a pu se faire qu'après l'observation de torsades de pointes suite à l'administration de médicaments. Le fait de pouvoir identifier des gènes défectueux dans certains cas de LQTS congénital offre la possibilité de tester, de façon formelle, l'hypothèse selon laquelle des variantes alléliques dans ces gènes ou d'autres gènes, contribuent au risque de torsades de pointes. Deux scénarios peuvent être envisagés. Premièrement, les patients avec des mutations "cliniquement silencieuses" sur les gènes codant I_{Ks} peuvent présenter une repolarisation cardiaque quasi-normale grâce à un courant I_{Kr} vigoureux. Cependant, dans une telle situation, l'administration d'un bloqueur de I_{Kr} viendrait "démasquer" la déficience latente de I_{Ks} , un phénomène maintenant connu sous le terme "réduction de la réserve de repolarisation"¹⁵³. Deuxièmement, un patient pourrait être susceptible aux torsades de pointes durant un traitement avec un bloqueur de I_{Kr} , à cause d'une modification de la sensibilité au bloc du complexe HERG-MiRP1, tel que rapporté⁸⁵. Apparemment, ces deux phénomènes surviennent chez des patients présentant des mutations sur les gènes du LQTS, mais semblent relativement rares. Néanmoins, il demeure possible que d'éventuelles mutations actuellement non-identifiées puissent être une cause fréquente de torsades de pointes médicamenteuses.

Avec le décryptage récent du génome humain, on a réalisé que les polymorphismes de l'ADN sont extrêmement fréquents, survenant peut-être, en moyenne, à tous les milliers de paires de bases. Un polymorphisme sur le gène *minK* (substitution d'une asparagine (N) pour un aspartate (D) à la position 85 de la partie C-terminale de *minK*) a été identifié comme facteur de risque potentiel pour les torsades de pointes médicamenteuses¹⁶⁵. Lors de cette étude, le polymorphisme D85N a été retrouvé chez 1,5% des individus d'une grande population témoin mais chez 7,3% des individus d'une cohorte de patients ayant souffert de LQTS médicamenteux. Bien que le polymorphisme D85N de *minK* produise des modifications plutôt subtiles des cinétiques d'activation-désactivation de I_{K_S} lorsque co-exprimé avec *KvLQT1*, des études de modélisation ont indiqué que ces modifications sont suffisantes pour accroître de façon marquée la susceptibilité du potentiel d'action à générer des post-dépolarisations précoces, lorsque I_{K_r} est bloqué¹³⁵. Il est possible aussi que d'autres polymorphismes fréquents, chacun pouvant produire un désordre relativement subtil dans la fonction du canal concerné, puissent "conspirer" ensemble pour augmenter le risque de torsades de pointes.

1.12 Implications dans le développement de nouveaux médicaments

La conséquence évidente d'une meilleure compréhension des fondements moléculaires du LQTS est de se demander si une prolongation du QT, durant un traitement avec un médicament donné, doit être considérée comme un signe que ce médicament puisse conférer un risque de torsades de pointes. Par exemple, à la posologie recommandée, la terfénadine prolonge le QT de 6

msec en moyenne, et les premiers cas de torsades de pointes n'ont été rapportés que plusieurs années après que le produit eût été mis en marché et que plus de 100 millions d'ordonnances eurent été rédigées¹³⁵. Le cas de la terfénaire suggère qu'une prolongation du QT, même modeste, puisse être un marqueur de risque de torsades de pointes, particulièrement si diverses circonstances font en sorte d'augmenter les concentrations des médicaments (tel que ce fût le cas avec la terfénaire) ou d'exposer des patients à d'autres facteurs de risque (hypokaliémie, insuffisance cardiaque congestive, etc.). En fait, avec les progrès réalisés en génétique et en biologie moléculaire au cours des dernières années, la question à se poser s'est peu à peu raffinée. Est-ce qu'un médicament bloquant I_{Kr} , ou bloquant le courant reconstitué par l'expression de HERG dans des systèmes d'expression hétérologues (ou bloquant I_{Ks} , ou activant I_{Na}) confère un risque de torsades de pointes? Les questions de ce genre font actuellement l'objet d'intenses débats au sein de la communauté scientifique et des agences de contrôle gouvernementales, puisqu'elles peuvent avoir un impact important sur une gamme étendue de médicaments, tels les antibiotiques, neuroleptiques, antidépresseurs, antihistaminiques ou modulateurs de motilité gastro-intestinale.

On tente actuellement d'établir des lignes directrices à ce sujet pour le développement de nouveaux médicaments. Cependant, plusieurs d'entre elles restent à être discutées, et la façon "correcte" d'intégrer à grande échelle la nouvelle information fournie par la génétique moléculaire dans le développement de nouveaux médicaments demeure indéterminée. Plusieurs principes, cependant, peuvent être énoncés. Premièrement, si on nivelle les variables confondantes, il semble probable que le risque de torsades de pointes soit proportionnel au degré de prolongation de l'intervalle QT observé durant le programme de développement du médicament. La situation devient donc

particulièrement préoccupante lorsque des désordres d'élimination (dus à des polymorphismes des enzymes de biotransformation ou à des interactions médicamenteuses) créent des groupes de patients chez qui les concentrations de médicaments s'élèvent dangereusement. Aussi, il ne faut jamais oublier que même un important programme de développement, étudiant plusieurs milliers de patients et ne décelant aucun cas de torsades de pointes, ne constitue pas une garantie d'exclusion d'un événement dont la prévalence peut s'avérer tout de même "cliniquement" très importante (telle que 1 cas sur 1000). Deuxièmement, il semble que l'enthousiasme avec lequel une société pharmaceutique poursuive le développement (avec le support des agences gouvernementales) d'un médicament prolongeant le QT ou bloquant I_{Kr} , dépende de l'importance relative de l'indication (le nouveau médicament soulage-t-il un nez qui coule ou offre-t-il un traitement au SIDA?) et de la disponibilité des thérapies alternatives. Troisièmement, l'exemple de l'amiodarone, un médicament conférant peu de risque de torsades de pointes malgré la prolongation de l'intervalle QT, implique que d'autres effets pharmacologiques doivent être pris en considération dans l'évaluation globale du risque. Le bloc de courants entrants arythmogènes par l'amiodarone explique probablement cette étonnante très faible tendance à causer des torsades de pointes¹⁶⁴. Tenter d'incorporer cette propriété, autant que possible, à d'autres molécules pour réduire la prévalence des torsades de pointes semble donc un concept intéressant. Finalement, il semble bien qu'un dépistage systématique du bloc de I_{Kr} et/ou de I_{Ks} soit en voie d'être inclus dans le processus d'évaluation pré-clinique des nouveaux médicaments, avant qu'ils n'atteignent les études cliniques.

1.13 Hypothèse et objectifs

Plusieurs médicaments non-antiarythmiques sont impliqués dans la genèse d'événements pro-arythmiques, tels les torsades de pointes. Bien qu'une description clinique détaillée de ces événements ait été effectuée, leur étiologie, d'un point de vue électrophysiologique, est encore méconnue.

Des travaux effectués précédemment dans notre laboratoire et ailleurs ont démontré que plusieurs de ces médicaments bloquent des courants potassiques de repolarisation cardiaque. L'objectif de ce travail de recherche consistait à démontrer que le dropéridol, le sildénafil, la dompéridone, la vitamine K et le pimozide prolongent la repolarisation cardiaque, principalement en bloquant la composante rapide du courant rectifiant retardé (I_{Kr}).

1.14 Références

1. Jervell A, Lange-Nielssen F: Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the QT interval and sudden death. *Am Heart J* 1957;54:59-68
2. Romano C, Gemme G, Pongiglione R: Aritmie cardiache rare dell'eta' pediatrica. *Clin Pediatr* 1963;45:656-683
3. Ward OC: A new familial cardiac syndrome in children. *J Iri Med Assoc* 1964;54:103-106
4. Yanowitz F, Preston JB, Abildskov JA: Functional distribution of right and left stellate innervation to the ventricles: production of neurogenic electrocardiographic changes by unilateral alteration of sympathetic tone. *Circ Res* 1966;18:416-428
5. Schwartz PJ, Mailliani A: Electrical alteration of the T wave: clinical and experimental evidence of its relationship with the sympathetic nervous system and with the long QT syndrome. *Am Heart J* 1975;89:45-50
6. Schwartz PJ, Periti M, Mailliani A: The long QT syndrome. *Am Heart J* 1975;89:378-390
7. Schwartz PJ: Idiopathic long QT syndrome: progress and questions. *Am Heart J* 1985;109:399-411

8. Moss AJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Locati EH, Carleen E: The long QT syndrome: a prospective international study. *Circulation* 1985;71:17-21
9. Keating M, Atkinson D, Dunn C, Timothy K, Vincent GM, Leppert M: Linkage of a cardiac arrhythmia, the long QT syndrome and the Harvey ras-1 gene. *Science* 1991;252:704-706
10. Curran M, Atkinson D, Timothy K: Locus heterogeneity of autosomal dominant long QT syndrome. *J Clin Invest* 1993;92:799-803
11. Wang Q, Shen J, Splawski I: SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995;80:805-811
12. Curran M, Splawski I, Timothy K, Vincent GM, Green ED, Keating M: A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 1995;80:795-803
13. Wang Q, Curran M, Splawski I: Positional cloning of a novel potassium channel gene: KvLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 1996;12:17-23
14. Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating M: Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat Genet* 1997;17:338-340

15. Abbott GW, Sesti F, Splawski I: MiRP1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999;97:175-187
16. Schott JJ, Charpentier F, Peltier S: Mapping of a gene for long QT syndrome to chromosome 4q25-27. *Am J Hum Genet* 1995;57:1114-1122
17. Neyroud N, Tesson F, Denjoy I: A novel mutation in the potassium channel gene KvLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet* 1997;15:186-189
18. Splawski I, Timothy K, Vincent GM, Atkinson D, Keating M: Molecular basis of the long QT syndrome associated with deafness. *N Engl J Med* 1997;336:1562-1567
19. Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H, Haverkamp W, Chen Q, Sun Y: KCNE1 mutations cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat Genet* 1997;17:267-268
20. Vincent GM, Timothy K, Leppert M, Keating M: The spectrum of symptoms and QT intervals in carriers of the gene for the long QT syndrome. *N Engl J Med* 1992;327:846-852
21. 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

22. Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ: Influence of genotype on the clinical course of the long QT syndrome. International Long QT Syndrome Registry Research Group. *N Engl J Med* 1998;339:960-965
23. Wilde AA, Jongbloed RJ, Doevendans PA: Auditory stimuli as a trigger for arrhythmic events differentiate HERG-related (LQTS2) patients from KvLQT1-related patients (LQTS1). *J Am Coll Cardiol* 1999;33:327-332
24. Schwartz PJ, Priori SG, Locati EH: Long QT syndrome patients with mutations of the SCN5A and HERG genes have differential responses to Na⁺ channel blockade and to increases in heart rate: implications for gene-specific therapy. *Circulation* 1995;92:3381-3386
25. Compton SJ, Lux RL, Ramsey MR: Genetically defined therapy of inherited long QT syndrome. Correction of abnormal repolarization by potassium. *Circulation* 1996;94:1018-1022
26. Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ: Low penetrance in the long QT syndrome: clinical impact. *Circulation* 1999;99:529-533
27. Neyroud N, Denjoy I, Donger C: Heterozygous mutation in the pore of potassium channel gene KvLQT1 causes an apparently normal phenotype in long QT syndrome. *Eur J Hum Genet* 1998;6:129-133

28. Ackerman MJ: The long QT syndrome: ion channel diseases of the heart. *Mayo Clin Proc* 1998;73:250-269
29. Fraser GR, Froggatt P, Murphy T: Genetic aspects of the cardioauditory syndrome of Jervell and Lange-Nielsen (congenital deafness and electrocardiographic abnormalities). *Ann Hum Genet* 1964;28:133-157
30. Benhorin J, Kalman YM, Medina A: Evidence of genetic heterogeneity in the long QT syndrome. *Science* 1993;260:1960-1962
31. Ko YL, Chen SA, Tank TK: No evidence of linkage of long QT syndrome and chromosome 11p15.5 markers in a Chinese family: evidence for genetic heterogeneity. *Hum Genet* 1994;94:364-366
32. Russell MW, Dick M, Collins FS, Brody LC: KvLQT1 mutations in three families with familial or sporadic long QT syndrome. *Hum Mol Genet* 1996;5:1319-1324
33. Donger C, Denjoy I, Berthet M: KvLQT1 C-terminal missense mutation causes a forme fruste long QT syndrome. *Circulation* 1997;96:2778-2781
34. Shalaby FY, Levesque PC, Yang WP: Dominant-negative KvLQT1 mutations underlie the LQT1 form of long QT syndrome. *Circulation* 1997;96:1733-1736

35. Tanaka T, Nagai R, Tomoike H: Four novel KvLQT1 and four novel HERG mutations in familial long QT syndrome. *Circulation* 1997;95:565-567
36. van den Berg MH, Wilde AA, Robles de Medina EO: The long QT syndrome: a novel missense mutation in the S6 region of the KvLQT1 gene. *Hum Genet* 1997;100:356-361
37. Kanters JK, Larsen LA, Orholm M: Novel donor splice site mutation in the KvLQT1 gene is associated with long QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;9:620-624
38. Li H, Chen Q, Moss AJ: New mutations in the KvLQT1 potassium channel that cause long QT syndrome. *Circulation* 1998;97:1264-1269
39. Saarinen K, Swan H, Kainulainen K, Toivonen L, Viitasalo M, Kontula K: Molecular genetics of the long QT syndrome: two novel mutations of the KvLQT1 gene and phenotypic expression of the mutant gene in a large kindred. *Hum Mutat* 1998;11:158-165
40. Ackerman MJ, Schroeder JJ, Berry R: A novel mutation in KvLQT1 is the molecular basis of inherited long QT syndrome in a near-drowning patient's family. *Pediatr Res* 1998;44:148-153

41. Franqueza L, Lin M, Splawski I, Keating M, Sanguinetti MC: Long QT syndrome-associated mutations in the S4-S5 linker of KvLQT1 potassium channels modify gating and interaction with minK subunits. *J Biol Chem* 1999;274:21063-21070
42. Neyroud N, Richard P, Vignier N: Genomic organization of the KCNQ1 K⁺ channel gene and identification of C-terminal mutations in the long QT syndrome. *Circ Res* 1999;84:290-297
43. Ackerman MJ, Tester DJ, Porter CJ, Edwards WD: Molecular diagnosis of the inherited long QT syndrome in a woman who died after near-drowning. *N Engl J Med* 1999;341:1121-1125
44. Roden DM, Spooner PM: Inherited long QT syndrome: a paradigm for understanding arrhythmogenesis. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1999;10:1664-1684
45. Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C: A recessive variant of the Romano-Ward long QT syndrome? *Circulation* 1998;97:2420-2425
46. Larsen LA, Fosdal I, Andersen PS: Recessive Romano-Ward syndrome associated with compound heterozygosity for two mutations in the KvLQT1 gene. *Eur J Hum Genet* 1999;7:724-728

47. Tyson J, Tranebjarg L, Bellman S: IsK and KvLQT1: mutation in either of the two subunits of the slow component of the delayed rectifier potassium channel can cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Hum Mol Genet* 1997;6:2179-2185
48. Chen Q, Zhang D, Gingell RL: Homozygous deletion in KvLQT1 associated with Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Circulation* 1999;99:1344-1347
49. Jiang C, Atkinson D, Towbin JA: Two long QT syndrome loci map to chromosomes 3 and 7 with evidence for further heterogeneity. *Nat Genet* 1994;8:141-147
50. Warmke JE, Ganetzky B: A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3438-3442
51. Schulze-Bahr E, Haverkamp W, Funke H: The long QT syndrome. *N Engl J Med* 1995;333:1783-1784
52. Salter CA, Walsh EP, Vesely MR, Plummer MH, Ginsburg RS, Jacob HJ: Novel missense mutation in the cyclic nucleotide-binding domain of HERG causes long QT syndrome. *Am J Med Genet* 1996;65:27-35
53. Benson DW, MacRae CA, Vesely MR: Missense mutation in the pore region of HERG causes familial long QT syndrome. *Circulation* 1996;93:1791-1795

54. Li X, Xu J, Li M: The human delta1261 mutation of the HERG potassium channel results in a truncated protein that contains a subunit interaction domain and decreases the channel expression. *J Biol Chem* 1997;272:705-708
55. Nakajima T, Furukawa T, Tanaka T: Novel mechanism of HERG current suppression in LQT2: shift in voltage dependence of HERG inactivation. *Circ Res* 1998;83:415-422
56. Zhou Z, Gong Q, Epstein ML, January CT: HERG channel dysfunction in human long QT syndrome. Intracellular transport and functional defects. *J Biol Chem* 1998;273:21061-21066
57. Chen J, Zou A, Splawski I, Keating M, Sanguinetti MC: Long QT syndrome-associated mutations in the Per-Arnt-Sim (PAS) domain of HERG potassium channels accelerate channel deactivation. *J Biol Chem* 1999;274:10113-10118
58. Berthet M, Denjoy I, Donger C: C-terminal HERG mutations: the role of hypokalemia and a KCNQ1-associated mutation in cardiac event occurrence. *Circulation* 1999;99:1464-1470
59. Hoorntje T, Alders M, van Tintelen P: Homozygous premature truncation of the HERG protein: the human HERG knockout. *Circulation* 1999;100:1264-1267

60. Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating M: A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* 1995;81:299-307
61. Furutani M, Trudeau MC, Hagiwara N: Novel mechanism associated with an inherited cardiac arrhythmia: defective protein trafficking by the mutant HERG (G601S) potassium channel. *Circulation* 1999;99:2290-2294
62. McDonald TV, Yu Z, Ming Z: A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I_{Kr} . *Nature* 1997;388:289-292
63. Spector PS, Curran ME, Keating M, Sanguinetti MC: Class III antiarrhythmic drugs block HERG, a human cardiac delayed rectifier K^+ channel. Open-channel block by methanesulfonanilides. *Circ Res* 1996;78:499-503
64. Shieh MS, Chen SA, Chiang CE: Drug-induced torsade de pointes in one patient with congenital long QT syndrome. *Int J Cardiol* 1996;54:85-88
65. Kambouris NG, Nuss HB, Johns DC, Tomaselli GF, Marban E, Balser JR: Phenotypic characterization of a novel long QT syndrome mutation (R1623Q) in the cardiac sodium channel. *Circulation* 1998;97:640-644

66. Baroudi G, Chahine M: Biophysical phenotypes of SCN5A mutations causing long QT and Brugada syndromes. *FEBS Lett* 2000;487:224-228
67. Makita N, Shirai N, Nagashima M: A de novo missense mutation of human cardiac Na⁺ channel exhibiting novel molecular mechanisms of long QT syndrome. *FEBS Lett* 1998;423:5-9
68. Yamagishi H, Furutani M, Kamisago M: A de novo missense mutation (R1623Q) of the SCN5A gene in a Japanese girl with sporadic long QT syndrome. *Hum Mutat* 1998;11:481(Abstract)
69. Wei J, Wang DW, Alings M: Congenital long QT syndrome caused by a novel mutation in a conserved acidic domain of the cardiac Na⁺ channel. *Circulation* 1999;99:3165-3171
70. Wattanasirichaigoon D, Vesely MR, Duggal P: Sodium channel abnormalities are infrequent in patients with long QT syndrome: identification of two novel SCN5A mutations. *Am J Med Genet* 1999;86:470-476
71. Wang Q, Li Z, Shen J, Keating M: Genomic organization of the human SCN5A gene encoding the cardiac sodium channel. *Genomics* 1996;34:9-16

72. Gellens ME, George AJ, Chen LQ: Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:554-558
73. Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George AJ: Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* 1995;376:683-685
74. Bezzina C, Veldkamp MW, van Den Berg MP: A single Na⁺ channel mutation causing both long QT and Brugada syndromes. *Circ Res* 1999;85:1206-1213
75. Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S: Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* 1988;242:1042-1045
76. Chevillard C, Attali B, Lesage F: Localization of a potassium channel gene (KCNE1) to 21q22.1-q22.2 by in situ hybridization and somatic cell hybridization. *Genomics* 1993;15:243-245
77. Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G: KvLQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I_{Ks} cardiac potassium current. *Nature* 1996;384:78-80
78. Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A: Coassembly of KvLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I_{Ks} potassium channel. *Nature* 1996;384:80-83

79. Sesti F, Goldstein SA: Single-channel characteristics of wild-type I_{Ks} channels and channels formed with two minK mutants that cause long QT syndrome. *J Gen Physiol* 1998;112:651-663
80. Duggal P, Vesely MR, Wattanasirichaigoon D, Villafane J, Kaushik V, Beggs AH: Mutation of the gene for I_{Ks} associated with both Jervell and Lange-Nielsen and Romano-Ward forms of long QT syndrome. *Circulation* 1998;97:142-146
81. Bianchi L, Shen Z, Dennis AT: Cellular dysfunction of LQT5-minK mutants: abnormalities of I_{Ks} , I_{Kr} and trafficking in long QT syndrome. *Hum Mol Genet* 1999;8:1499-1507
82. Wang KW, Goldstein SA: Subunit composition of minK potassium channels. *Neuron* 1995;14:1303-1309
83. Drici MD, Arrighi I, Chouabe C: Involvement of I_{Ks} -associated K^+ channel in heart rate control of repolarization in a murine engineered model of Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Circ Res* 1998;83:95-102
84. Kupersmidt S, Yang T, Anderson ME: Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ Res* 1999;84:146-152

85. Sesti F, Abbott GW, Wei J, Murray KT, Saksena S, Schwartz PJ, Priori SG, Roden DM, George AL, Goldstein SA: A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10613-10618
86. Marks ML, Whisler SL, Clericuzio C, Keating M: A new form of long QT syndrome associated with syndactyly. *J Am Coll Cardiol* 1995;25:59-64
87. Marks ML, Trippel DL, Keating M: Long QT syndrome associated with syndactyly identified in females. *Am J Cardiol* 1995;76:744-745
88. Tesson F, Donger C, Denjoy I: Exclusion of KCNE1 (IsK) as a candidate gene for Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:2051-2055
89. Schwartz PJ, Zaza A, Locati E, Moss AJ: Stress and sudden death. The case of the long QT syndrome. *Circulation* 1991;83:71-80
90. Rashba EJ, Zareba W, Moss AJ: Influence of pregnancy on the risk for cardiac events in patients with hereditary long QT syndrome. LQTS Investigators. *Circulation* 1998;97:451-456
91. Locati EH, Zareba W, Moss AJ: Age- and sex-related differences in clinical manifestations in patients with congenital long QT syndrome. Findings from the International LQTS registry. *Circulation* 1998;97:2237-2244

92. Bazett HC: An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart* 1920;7:353-370
93. Garson AJ, Dick M, Fournier A: The long QT syndrome in children. An international study of 287 patients. *Circulation* 1993;87:1866-1872
94. 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
95. Rautaharju PM, Zhou SH, Wong S: Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Can J Cardiol* 1992;8:690-695
96. Lehmann MH, Timothy K, Frankovich D: Age-gender influence on the rate-corrected QT interval and the QT heart rate relation in families with genotypically characterized long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:93-99
97. Day CP, McComb JM, Campbell RW: QT dispersion: an indication of arrhythmia risk in patients with long QT intervals. *Br Heart J* 1990;63:342-344

98. Yan GX, Antzelevitch C: Cellular basis for the normal T wave and the electrocardiographic manifestations of the long QT syndrome. *Circulation* 1998;98:1928-1936
99. 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
100. Moss AJ, Zareba W, Benhorin J: ECG T wave patterns in genetically distinct forms of the hereditary long QT syndrome. *Circulation* 1995;92:2929-2934
101. Zhang L, Timothy K, Splawski I: Genotypes are highly predictable in long QT syndrome families with typical ECG ST-T wave patterns. *Circulation* 1998;98:776(Abstract)
102. Malfatto G, Rosen MR, Foresti A, Schwartz PJ: Idiopathic long QT syndrome exacerbated by beta-adrenergic blockade and responsive to left cardiac sympathetic denervation: implications regarding electrophysiologic substrate and adrenergic modulation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1992;3:295-305
103. Gorgels AP, Al FF, Zaman L, Kantoch MJ, Al HZ: The long QT syndrome with impaired atrioventricular conduction: a malignant variant in infants. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;9:1225-1232

104. Shimizu W, Ohe T, Kurita T: 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
105. Dessertenne F: La tachycardie ventriculaire à deux foyers opposés variables. *Arch Mal Coeur* 1966;59:263-272
106. El-Sherif N, Caref EB, Yin H, Restivo M: The electrophysiological mechanism of ventricular arrhythmias in the long QT syndrome. Tridimensional mapping of activation and recovery patterns. *Circ Res* 1996;79:474-492
107. El-Sherif N, Chinushi M, Caref EB, Restivo M: Electrophysiological mechanism of the characteristic electrocardiographic morphology of torsade de pointes tachyarrhythmias in the long QT syndrome. Detailed analysis of ventricular tridimensional activation patterns. *Circulation* 1997;96:4392-4399
108. Schwartz PJ, Moss AJ, Vincent GM, Crampton RS: Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation* 1993;88:782-784
109. Splawski I, Shen J, Timothy K, Vincent GM, Lehmann MH, Keating M: Genomic structure of three long QT syndrome genes: KvLQT1, HERG and KCNE1. *Genomics* 1998;51:86-97

110. Schwartz PJ: The long QT syndrome. *Curr Prob Cardiol* 1997;22:297-351
111. Priori SG, Maugeri FS, Schwartz PJ: The risk of sudden death as first cardiac event in asymptomatic patients with the long QT syndrome. *Circulation* 1998;98:777(Abstract)
112. Eldar M, Griffin JC, Van Hare F: 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
113. Priori SG, Napolitano C, Diehl L, Schwartz PJ: Dispersion of the QT interval, a marker of therapeutic efficacy in the idiopathic long QT syndrome. *Circulation* 1994;89:1681-1689
114. 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
115. Shimizu W, Kurita T, Matsuo K: Improvement of repolarization abnormalities by a K⁺ channel opener in the LQT1 form of congenital long QT syndrome. *Circulation* 1998;97:1581-1588
116. Kron J, Oliver RP, Norsted S, Silka MJ: The automatic implantable cardioverter-defibrillator in young patients. *J Am Coll Cardiol* 1990;16:896-902

117. 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
118. Shimizu W, Antzelevitch C: Sodium channel block with mexiletine is effective in reducing dispersion of repolarization and preventing torsade de pointes in LQT2 and LQT3 models of the long QT syndrome. *Circulation* 1997;96:2038-2047
119. Tan HL, Alings M, Van Olden RW, Wilde AA: Long-term (subacute) potassium treatment in congenital HERG-related long QT syndrome (LQTS2). *J Cardiovasc Electrophysiol* 1999;10:229-233
120. Sato T, Hata Y, Yamamoto M: Early afterdepolarization abolished by potassium channel opener in a patient with idiopathic long QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1995;6:279-282
121. Roden DM: The long QT syndrome and torsades de pointes: basic and clinical aspects., in El-Sherif N, Samet P (eds): *Cardiac pacing and electrophysiology*. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1991, pp 265-284
122. Bauman JL, Bauernfeind RA, Hoff JV, Strasberg B, Swiryn S, Rosen M: Torsades de pointes due to quinidine: Observations in 31 patients. *Am Heart J* 1984;107:425-430

123. 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
124. Wald RW, Waxman MB, Colman JM: Torsades de pointes ventricular tachycardia: a complication of disopyramide shared with quinidine. *J Electrocardiol* 1981;14:301-305
125. Strasberg B, Sclarovsky S, Erdberg A, Duffy CE, Lam W, Swiryn S, Agmon J, Rosen M: Procainamide-induced polymorphous ventricular tachycardia. *Am J Cardiol* 1981;47:1309-1314
126. Stratmann HG, Walter KE, Kennedy HL: Torsades de pointes associated with elevated N-acetylprocainamide levels. *Am Heart J* 1985;109:375-381
127. Leroy G, Haiat R, Barthelemy M: Torsades de pointes during loading with amiodarone. *Eur Heart J* 1987;8:541-547
128. Kontopoulos A, Filindris A, Mandoulis F, Metaxas P: Sotalol-induced torsades de pointes. *Postgrad Med J* 1981;57:321-323
129. Arstall MA, Hii JTY, Lehman RG: Sotalol-induced torsades de pointes: Management with magnesium infusion. *Postgrad Med J* 1992;68:289-293
130. Huston JR, Bell GE: The effect of thioridazine hydrochloride and chlorpromazine on the electrocardiogram. *JAMA* 1966;198:16-20

131. Kelly HQ, Fay JE, Lavery FG: Thioridazine hydrochloride (Mellaril): its effect on the electrocardiogram and a report on two fatalities. *Can Med Assoc J* 1963;89:546-554
132. Fowler NO, McCall D, Chou TC, Holmes JC, Hanenson IB: Electrocardiographic changes and cardiac arrhythmias in patients receiving psychotropic drugs. *Am J Cardiol* 1976;37:223-230
133. Hestand HE, Teske DW: Diphenhydramine hydrochloride intoxication. *J Pediatr* 1977;90:1017-1018
134. Abaza A, Delattre G, Germain G: Hydroxyzine et troubles du rythme cardiaque. *Coeur Med Interne* 1967;6:373-387
135. Roden DM: Acquired long QT syndromes and the risk of proarrhythmia. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000;11:938-940
136. Woosley RL, Chen Y, Freiman JP: Mechanism of the cardiotoxic actions of terfenadine. *JAMA* 1993;269:1532-1536
137. 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
138. 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

139. Roden DM, Bennett PB, Snyders DJ: Quinidine delays I_K activation in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* 1988;62:1055-1058
140. Komeichi K, Tohse N, Nakaya H: Effects of N-acetylprocainamide and sotalol on ion currents in isolated guinea pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 1990;187:313-322
141. Vorperian VR, Zhou Z, Mohammad S: Torsade de pointes with an antihistamine metabolite: Potassium channel blockade with desmethylastemizole. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:1556-1561
142. Khalifa M, Drolet B, Daleau P, Lefez C, Gilbert M, Plante S, O'Hara GE, Gleeton O, Hamelin BA, Turgeon J: Block of potassium currents in guinea pig ventricular myocytes and lengthening of cardiac repolarization in man by the histamine H1 receptor antagonist diphenhydramine. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288:858-865
143. 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 blocking the delayed rectifier potassium current. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288:1261-1268

144. 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
145. 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
146. Kang J, Wang L, Cai F, Rampe D: High affinity blockade of the HERG cardiac K⁺ channel by the neuroleptic pimozone. *Eur J Pharmacol* 2000;392:137-140
147. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK: Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current: Differential sensitivity to block by Class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 1990;96:195-215
148. Morgan TK, Sullivan ME: An overview of Class III electrophysiological agents: a new generation of antiarrhythmic therapy. *Prog Med Chem* 1992;29:65-108
149. Craig-McFeely PM, Freemantle SL, Pearce GL, Shakir SA: QT lengthening and life-threatening arrhythmias associated with fexofenadine. *Br J Gen Pract* 2000;50:148-148

150. Pinto YM, van Gelder IC, Heeringa M, Crijns HJ: QT lengthening and life-threatening arrhythmias associated with fexofenadine. *Lancet* 1999;353:980-980
151. Giraud T: QT lengthening and arrhythmias associated with fexofenadine. *Lancet* 1999;353:2072-2073
152. Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti MC: A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:12329-12333
153. Roden DM: Taking the idio out of idiosyncratic: Predicting torsades de pointes. *PACE* 1998;21:1029-1034
154. Roden DM: Mechanisms and management of proarrhythmia. *Am J Cardiol* 1998;82:49i-57i
155. Yang T, Roden DM: Extracellular potassium modulation of drug block of I_{Kr} . Implications for torsades de pointes and reverse use-dependence. *Circulation* 1996;93:407-411
156. Choy AMJ, Darbar D, Dell'Orto S, Roden DM: Increased sensitivity to QT prolonging drug therapy immediately after cardioversion to sinus rhythm. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:396-401
157. Carlsson L, Abrahamsson C, Andersson B, Duker G, Schiller-Linhardt G: Proarrhythmic effects of the Class III agent almokalant: Importance of infusion rate, QT dispersion, and early afterdepolarizations. *Cardiovasc Res* 1993;27:2186-2193

158. 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
159. Carlsson L, Drews L, Duker G: Rhythm anomalies related to delayed repolarization in vivo: Influence of sarcolemmal Ca²⁺ entry and intracellular Ca²⁺ overload. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;279:231-239
160. Wu Y, Roden DM, Anderson ME: Calmodulin kinase inhibition prevents development of the arrhythmogenic transient inward current. *Circ Res* 1999;84:906-912
161. Tomaselli GF, Rose J: Molecular aspects of arrhythmias associated with cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol* 2000;15:202-208
162. Honig PK, Wortham DC, Zamani K, Conner DP, Mullin JC, Cantilena LR: Terfenadine-ketoconazole interaction: pharmacokinetic and electrocardiographic consequences. *JAMA* 1993;269:1513-1518
163. Piquette RK: Torsade de pointes induced by cisapride/clarithromycin interaction. *Ann Pharmacother* 1999;33:22-26
164. Kodama I, Kamiya K, Toyama J: Cellular electropharmacology of amiodarone. *Cardiovasc Res* 1997;35:13-29

165. Wei J, Yang IC, Tapper AR, Murray KT, Viswanathan P, Rudy Y, Bennett PB, Norris K, Balsler JR, Roden DM, George AL: KCNE1 polymorphism confers risk of drug-induced long QT syndrome by altering kinetic properties of I_{Ks} potassium channels. *Circulation* 1999;100:2612-2612

CHAPITRE 2

DROPERIDOL LENGTHENS CARDIAC REPOLARIZATION DUE TO BLOCK OF THE RAPID COMPONENT OF THE DELAYED RECTIFIER POTASSIUM CURRENT

Résumé

Des cas de torsades de pointes ont été rapportés suite à l'utilisation du dropéridol, un neuroleptique de la famille des butyrophénones. Nos objectifs étaient (1) de caractériser les effets du dropéridol sur la repolarisation cardiaque et (2) d'évaluer les effets du dropéridol sur un important courant potassique sortant impliqué dans la repolarisation cardiaque (I_{Kr}).

Des cœurs isolés de cobaye ($n=32$) ont été stimulés à différents cycles de stimulation (150 à 250 msec) et soumis à des concentrations de dropéridol variant de 10 à 300 nmol/L. Le dropéridol a augmenté la durée du potentiel d'action monophasique mesurée à 90% de repolarisation ($MAPD_{90}$), de façon concentration-dépendante; de $9,8 \pm 2,3$ msec ($7,3 \pm 0,7\%$) à 10 nmol/L mais de $32,7 \pm 3,6$ msec ($25,7 \pm 2,2\%$) à 300 nmol/L (cycle de stimulation de 250 msec). L'augmentation de la $MAPD_{90}$ est aussi inversement proportionnelle à la fréquence de stimulation. Tel que mentionné plus haut, le dropéridol 300 nmol/L augmente la $MAPD_{90}$ de $32,7 \pm 3,6$ msec ($25,7 \pm 2,2\%$) à un cycle de stimulation de 250 msec, mais de seulement $14,1 \pm 1,3$ msec ($13,6 \pm 2,3\%$) à un cycle de stimulation de 150 msec. Des expériences de patch-clamp effectuées sur des myocytes ventriculaires isolés de cobaye ont démontré que le dropéridol diminue le courant potassique sortant induit par de courtes dépolarisations (250 msec; I_{K250}) de façon concentration-dépendante. La CI_{50} estimée pour I_{K250} , représentant principalement I_{Kr} , est 28 nmol/L. Finalement, le courant potassique sortant mesuré dans des cellules HEK293, exprimant de hauts niveaux de la protéine HERG, a été diminué de 50% par le dropéridol à 32,2 nmol/L.

Le blocage significatif de I_{Kr} par le dropéridol explique la prolongation de l'intervalle QT observée chez des patients soumis à des concentrations thérapeutiques (10 à 400 nmol/L) du médicament.

DROPERIDOL LENGTHENS CARDIAC REPOLARIZATION DUE TO BLOCK
OF THE RAPID COMPONENT OF THE DELAYED RECTIFIER POTASSIUM
CURRENT

Benoit Drolet, M.Sc.¹, Shetuan Zhang, M.D., Ph.D.², Dominic Deschênes,
M.D.¹, Jimmy Rail, M.Sc.¹, Sylvie Nadeau, M.D.¹, Zhengfeng Zhou, M.D.,
Ph.D.², Craig T. January, M.D., Ph.D.² and Jacques Turgeon, Ph.D.¹

1. Quebec Heart Institute, Laval Hospital and Faculties of Pharmacy and
Medicine, Laval University, Sainte-Foy, Québec, Canada, G1V 4G5
2. Departments of Medicine (Cardiology) and Physiology,
University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA, 53792

Short title: Drolet et al., *Droperidol blocks cardiac I_{Kr}*

Address for correspondence: Jacques Turgeon, Ph.D.,

Centre de recherche, Hôpital Laval,
2725 Chemin Ste-Foy, Ste-Foy,
Québec, Canada, G1V 4G5,
Tel: (418) 656-8711 # 5390
Fax: (418) 656-4509
E-mail: jacques.turgeon@pils.com

Supported by: Medical Research Council of Canada (MT-11876), Heart and
Stroke Foundation of Quebec, Oscar Rennebohm Foundation and American
Heart Association.

July 22, 1999

Abstract

Introduction: Torsades de pointes have been observed during treatment with droperidol, a butyrophenone neuroleptic agent. Our objectives were (1) to characterize the effects of droperidol on cardiac repolarization and (2) to evaluate effects of droperidol on a major time-dependent outward potassium current involved in cardiac repolarization, namely I_{Kr} .

Methods and results: Isolated, buffer-perfused guinea pig hearts ($n=32$) were stimulated at different pacing cycle lengths (150-250 msec) and exposed to droperidol at concentrations ranging from 10 to 300 nmol/L. Droperidol increased monophasic action potential duration measured at 90% repolarization ($MAPD_{90}$) in a concentration-dependent manner by 9.8 ± 2.3 msec ($7.3 \pm 0.7\%$) at 10 nmol/L but by 32.7 ± 3.6 msec ($25.7 \pm 2.2\%$) at 300 nmol/L (250 msec cycle length). Increase in $MAPD_{90}$ was also reverse frequency-dependent; as noted previously, droperidol 300 nmol/L increased $MAPD_{90}$ by 32.7 ± 3.6 msec ($25.7 \pm 2.2\%$) at a pacing cycle length of 250 msec but by only 14.1 ± 1.3 msec ($13.6 \pm 2.3\%$) at a pacing cycle length of 150 msec. Patch-clamp experiments performed in isolated guinea pig ventricular myocytes demonstrated that droperidol decreases the time-dependent outward K^+ current elicited by short depolarizations (250 msec; I_{K250}) in a concentration-dependent manner. Estimated IC_{50} for I_{K250} , which mostly underlies I_{Kr} , was 28 nmol/L. Finally, HERG K^+ current elicited in HEK293 cells expressing high levels of HERG protein was decreased 50% by droperidol 32.2 nmol/L.

Conclusions: Potent block of I_{Kr} by droperidol is likely to underlie QT prolongation observed in patients treated at therapeutic plasma concentrations (10-400 nmol/L) of the drug.

Key words

- delayed rectifier • cardiac repolarization • droperidol
- torsades de pointes • QT interval

Introduction

Droperidol is a highly potent butyrophenone neuroleptic agent commonly used to decrease nausea and to prevent emesis. Its application for the treatment of agitated delirium in critically ill patients is also increasing¹. However, in the recent years, lengthening of the QT interval and induction of major cardiac rhythm disturbances such as polymorphic ventricular tachycardia (torsades de pointes) have been noticed during treatment with droperidol at therapeutic dosages²⁻⁶.

A wide variety of non-cardiovascular drugs, such as histamine-H₁ receptor antagonists, macrolide antimicrobials and the gastrointestinal prokinetic agent cisapride have been associated with QT prolongation and induction of torsades de pointes⁷⁻¹⁵. Lately, it has been shown that drugs such as terfenadine, astemizole, erythromycin and cisapride can modulate potassium currents involved in cardiac repolarization, including the rapid component of the delayed rectifier (I_{Kr})¹⁶⁻²¹. Blockade of I_{Kr} is well known as the major pharmacological effect of Class III antiarrhythmic agents such as dofetilide, a drug associated with QT prolongation and proarrhythmic events such as torsades de pointes²²⁻²⁵.

Extrapolation of the currently known electrophysiological mechanisms associated with drug-induced torsades de pointes to the clinical observation of droperidol-induced cardiac toxicity suggests that this agent would modulate cardiac repolarization. Indeed, studies using rabbit Purkinje fibers have demonstrated that low concentrations of droperidol (0.01 to 0.3 μM) prolong action potential duration (APD) in a reverse-frequency and dose-dependent manner²⁶. Low-concentration droperidol exerts typical class III antiarrhythmic drug properties, giving an explanation to the lengthening of cardiac repolarization observed in humans during treatment with the drug. On the other

hand, the identification of specific ionic current(s) involved in these effects, has not been investigated yet. Therefore, the goal of the present studies was to evaluate (1) the action potential-lengthening effects of droperidol in isolated guinea pig hearts perfused in the Langendorff mode using a monophasic action potential signal measured at 90% repolarization (MAPD₉₀) as an index of cardiac repolarization; and (2) the effects of droperidol 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 institutional guidelines of Laval University 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.

Experiments With Buffer-Perfused Guinea Pig Isolated Hearts

Heart isolation, perfusion technique and electrophysiological measurements have been described previously²¹. In brief, hearts were perfused at 37°C during a control period of 5 minutes to assess stability of the monophasic action potential signal. Monophasic action potential signals were recorded at a basic cycle length of 250 msec. Then, basic cycle length was changed to 225 msec, and the hearts were paced for 75 seconds before the monophasic action potential signal was recorded. The same procedure was repeated for cycle lengths of stimulation of 200, 175 and 150 msec. Thereafter, perfusion was performed with Krebs-Henseleit buffer containing droperidol 10, 30, 100 or 300 nmol/L for a period of 15 minutes at a basic cycle length of 250 msec. Monophasic action potential signals were recorded again at basic cycle lengths of 250, 225, 200, 175 and 150 msec. Only one concentration of the drug was tested in each heart. Perfusion with Krebs-Henseleit buffer containing no drug was then restarted to assess reversibility of drug effects.

Patch-Clamp Experiments

Guinea pig ventricular myocyte preparation, solutions and electrophysiological measurements

Experiments were performed on single ventricular myocytes obtained from adult guinea pig hearts as described previously²¹. In brief, a small aliquot of dissociated cells was placed in a 0.5 mL chamber mounted on the stage of an inverted microscope (model CK2, Olympus). Cells were allowed to adhere to the coverslip on the bottom of the chamber and were then superfused continuously with the extracellular solution containing (in mM) NaCl 145, KCl 4, MgCl₂ 1, HEPES 10 and glucose 5. Nisoldipine (Bayer Leverkusen, Germany) 0.2 μmol/L was added to eliminate the slow calcium inward current and Ca²⁺ was omitted in the extracellular solution to shift I_{Ks} activation to positive potentials²¹. The pH was adjusted to 7.35 with NaOH. The cells were prewarmed at 30°C by a Peltier device (Medical System Corp., Greenvale, NY). Droperidol solutions of 10, 30, 100 and 300 nmol/L were prepared daily by dissolving required amounts of droperidol (Sigma, St-Louis, MO) in 100 mL of the extracellular solution. Complete replacement of extracellular solution contained in the chamber was achieved within 2 to 3 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 as described previously²¹. The pipette solution contained (in mM) MgCl₂ 2, CaCl₂ 1, EGTA 11, MgATP 5, K₂ATP 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. Effects of droperidol on the rapidly (I_{Kr}) and slowly (I_{Ks}) activating component of I_K were studied in cells

held at -40 mV (to inactivate I_{Na}) and depolarized by pulses lasting 250 msec (I_{K250}) or 5000 msec (I_{K5000}). Test potentials of depolarizing pulses varied between -20 and $+50$ mV. I_{Kr} and I_{Ks} were measured from the peak magnitude of tail current obtained on repolarization to -40 mV.

HERG-transfected HEK293 cell preparation, solutions and electrophysiological measurements

The HERG transfection protocol for HEK293 cells has been published²⁷. HERG cDNA was subcloned into BamH I and EcoR I sites of the pCDNA3 vector (Invitrogen, San Diego, CA), which was transfected into HEK293 cells using a lipofectamine method (Gibco). The stably transfected cells were cultured in minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 400 μ g/mL G-418. For electrophysiological study, 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 (Diaphot, Nikon) and were superfused with HEPES-buffered Tyrode solution containing (in mM) 137 NaCl, 4 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 glucose, and 10 HEPES (pH 7.4 with NaOH). Solution exchanges were completed within 1 min. Membrane currents were recorded in whole cell configuration using suction pipettes^{18; 28} and leak compensation was not used. The pipettes had inner diameters of 1-1.5 μ m and, when filled with the internal pipette solution, had resistances of 2-4 M Ω . The internal pipette solution contained (in mM) 130 KCl, 1 MgCl₂, 5 EGTA, 5 MgATP, and 10 HEPES (pH 7.2 with KOH). An Axopatch 1D patch-clamp amplifier was used to generate voltage-clamp

protocols, acquire data, and analyse voltage and current signals. Droperidol 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 droperidol on the HERG current was studied in cells clamped at a holding potential of -80 mV. Depolarizing steps were applied for 4 seconds to voltages between -60 and $+50$ mV in 10-mV increments. Cells were then repolarized at -50 mV for 5.7 seconds, before they get back to the holding potential (-80 mV).

Statistical Analyses

Buffer-perfused isolated hearts

Only hearts with reversal of droperidol effects on reperfusion with buffer containing no drug were included in the analysis. Data on the magnitude of droperidol effects were analysed with a Student's paired- t test. Frequency-dependent effects were compared by conditional Hotelling's T^2 test²⁹. All values are expressed as mean \pm S.E.M. Level of statistical significance was set at $P < .05$.

Guinea pig ventricular myocytes and HERG-transfected HEK293 cells

Data are presented as mean \pm S.E.M.. Concentration-dependent block of I_{K250} and of HERG tail currents was tested by Hotelling's T^2 test. Level of statistical significance was set at $P < .05$.

Results

Experiments With Buffer-Perfused Guinea Pig Isolated Hearts

Experiments performed in buffer-perfused isolated guinea pig hearts (n=32; n=8 for each concentration tested) demonstrated that droperidol caused a concentration and reverse frequency-dependent increase in MAPD₉₀. Table 1 shows that when hearts were exposed to droperidol 100 nmol/L at decremental pacing cycle lengths of 250, 225, 200, 175 and 150 msec; MAPD₉₀ was increased by 24.1±2.2, 22.4±2.0, 19.9±1.9, 18.5±2.8 and 15.7±3.5 msec, respectively. This reverse frequency-dependent effect of the drug was also concentration-dependent. In fact, when hearts were stimulated at a pacing cycle length of 250 msec, droperidol 10, 30, 100 and 300 nmol/L increased MAPD₉₀ by 9.8±2.3, 16.2±3.0, 24.1±2.2 and 32.7±3.6 msec, respectively. Typical examples of monophasic action potentials recorded at baseline and during perfusion of droperidol 300 nmol/L, at a pacing cycle length of 250 msec, are illustrated in Figure 1A. Data obtained in each heart tested for the increase in MAPD₉₀ at a pacing cycle length of 250 msec, using droperidol at 10, 30, 100 and 300 nmol/L are shown in Figure 1B.

Patch-Clamp Experiments

Isolated Guinea Pig Ventricular Myocytes

Figure 2A 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 (BAS) and in the presence of droperidol (DROP) 30 nmol/L. In this cell, activating and tail currents recorded in control conditions were inhibited by droperidol 30 nmol/L. Inhibition of I_{K250}

tail current was assessed by exposing myocytes ($n=5$ at each concentration) to droperidol 10, 30 or 100 nmol/L. Tail current amplitude was measured as the difference between the peak current recorded just after the step to 0 mV and steady-state current recorded at -40 mV. Block of I_{K250} by droperidol was concentration-dependent. Figure 2B reports tail current amplitude plotted as a function of droperidol concentration. Data were fitted with the Hill equation, giving a half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 27.6 nmol/L, with a Hill coefficient of 1.23. Figure 3 shows a typical 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 (BAS) and in the presence of droperidol (DROP) 100 nmol/L. Activating and tail currents recorded in control conditions were only slightly reduced by droperidol 100 nmol/L ($n=6$).

HERG-transfected HEK293 cells

Figure 4 (left panel) shows HERG currents elicited by a 4 sec step from a holding potential of -80 mV to $+20$ mV, followed by repolarization to -50 mV for 5.7 sec, in a HERG-transfected HEK293 cell perfused under control conditions and in the presence of droperidol 500 nmol/L. For control conditions, depolarizing steps activated a time-dependent outward current that increased in amplitude with more positive voltage steps to reach a maximum at voltages near 0 mV. Depolarizing steps to more positive voltages resulted in inward rectification typical of I_{Kr} , as previously reported for HERG current in these cells^{20; 27}. After the repolarizing step to -50 mV, an outward tail current was recorded. Tail current amplitude increased with depolarizing steps from -60 to $+10$ mV and was then superimposed on further depolarizing steps to

+50 mV. Droperidol 500 nmol/L suppressed both the outward and tail currents, as shown in left panel. The mean decrease in HERG tail-current peak amplitude in 5 cells exposed to the same concentration of droperidol was 98.6%. Figure 4 (right panel) shows that block of HERG current by droperidol was concentration-dependent. HERG tail-current peak amplitude, normalized to control, is plotted as a function of droperidol concentration (with concentrations of 5, 20, 100 and 500 nmol/L studied). Data were fitted with the Hill equation, giving a half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 32.2 nmol/L, with a Hill coefficient of 1.39.

Discussion

Results obtained in this study clearly indicate that droperidol possesses direct cardiac electrophysiological effects on a major ionic current involved in cardiac repolarization. Patch-clamp experiments revealed significant block of I_{Kr} in guinea pig ventricular myocytes and of HERG in HEK293 cells at low concentrations of droperidol. Moreover, exposure of isolated, buffer-perfused guinea pig hearts to droperidol was associated with a concentration and reverse frequency-dependent lengthening of action potential duration. Our results provide an explanation for QT interval prolongation observed during treatment with the drug. They also suggest that even at low plasma concentrations, droperidol blocks I_{Kr} . Conversely, we showed that droperidol only exerts a modest effect on I_{Ks} , probably not clinically relevant.

In isolated guinea pig ventricular myocytes, the estimated IC_{50} for I_{K250} following a test pulse to 0 mV was 27.6 nmol/L. It has previously been shown that time-dependent outward current activated by short (250 msec) pulses to low depolarizing potentials (0 mV), and more importantly, the tail current elicited under these conditions with repolarization, represents mainly I_{Kr} ; whereas current activated by long (5000 msec) pulses to high depolarizing potentials (+50 mV) represents mainly I_{Ks} ³⁰. In HEK293 cells, the estimated IC_{50} for HERG tail current was 32.2 nmol/L. These values are within the same range as the IC_{50} of dofetilide (31.5 nmol/L) for I_{Kr} ²², making droperidol a very potent blocker of this current.

Interestingly, in the majority of droperidol cardiac toxicity case reports, patients were treated with multi-drug regimens, including histamine receptor antagonists^{2, 4-6}. In the recent years, some groups have proposed that combined

block of I_{Kr} and I_{Ks} would prolong action potential duration much more than block of I_{Kr} alone³¹. It was also hypothesized that one would only have to block both components concomitantly at 55% or more, in order to elicit early afterdepolarizations³². We have shown, in a canine model, that the diuretic agent indapamide, a weak blocker of I_{Ks} ³³, can facilitate action potential prolonging effect of the class III antiarrhythmic agent *dl*-sotalol, in normokalemic animals³⁴. It was also shown that the general anesthetic thiopental, a selective blocker of I_{Ks} ^{35; 36}, significantly increases the effect of the I_{Kr} blocker erythromycin on $MAPD_{90}$ ^{19; 37}.

Recent studies have demonstrated that both components of I_K are present in human atrial and ventricular tissues³⁸⁻⁴⁰. Both of them could therefore be involved in drug action, leading to lengthening of the QT interval. Several studies performed recently have demonstrated that cardiac potassium currents may also be the target of non-antiarrhythmic agents^{17-21; 33; 41-44}. Since droperidol has been shown to be a potent blocker of I_{Kr} , this may give an explanation to the unheralded nature of proarrhythmic events observed in patients during combined drug therapy with droperidol and non-antiarrhythmic agents.

In conclusion, results obtained in this study demonstrated that droperidol has direct cardiac electrophysiological effects. The drug significantly blocks HERG current and the rapid component of the delayed rectifier potassium current to which it corresponds (I_{Kr}), providing an explanation to the observed concentration and reverse frequency-dependent prolongation of cardiac repolarization (Class III effect). Effects were observed at drug concentrations achieved during intravenous administration of therapeutic doses. (10-400 nmol/L)⁴⁵⁻⁴⁷. Clinical awareness is warranted in susceptible patients, particularly those with genetic (congenital long QT and potentially other inherited

arrhythmic syndromes) and those receiving multi-drug regimens including droperidol and other drugs modulating cardiac potassium currents.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada (MT-11876), an operating grant from the Heart and Stroke Foundation of Quebec and grants from the Oscar Rennebohm Foundation, the American Heart Association and the American Heart Association, Wisconsin Affiliate. Benoit Drolet is the recipient of studentships from the Heart and Stroke Foundation of Canada and the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR). Dominic Deschênes and Sylvie Nadeau were recipients of summer research studentships from the MRC/Pharmaceutical Manufacturers Association of Canada. Jimmy Rail is the recipient of a studentship from the Quebec Heart Institute. Dr Turgeon is the recipient of a scholarship from the Joseph C. Edwards Foundation. The authors also thank Michel Blouin and Lynn Atton for technical assistance and Serge Simard, M.Sc., for statistical analysis.

References

1. Lawrence KR, Nasraway SA: Conduction disturbances associated with administration of butyrophenone antipsychotics in the critically ill: a review of the literature. *Pharmacotherapy* 1997;17:531-537
2. Guy JM, André-Fouet X, Porte J, et al: Torsades de pointes et allongement de la durée de l'intervalle QT après injection de droperidol. *Ann Cardiol Angéiol* 1991;40:541-545
3. Michaellets EL, Smith LK, Van Tassel ED: Torsade de pointes resulting from the addition of droperidol to an existing cytochrome P450 drug interaction. *Ann Pharmacother* 1998;32:761-765
4. Frye MA, Coudreaut MF, Hakeman SM, et al: Continuous droperidol infusion for management of agitated delirium in an intensive care unit. *Psychosomatics* 1995;36:301-305
5. Faigel DO, Metz DC, Kochman ML: Torsade de pointes complicating the treatment of bleeding esophageal varices: association with neuroleptics, vasopressin and electrolyte imbalance. *Am J Gastroenterol* 1995;90:822-824
6. Lischke V, Behne M, Doelken P, et al: Droperidol causes a dose-dependent prolongation of the QT interval. *Anesth Analg* 1994;79:983-986
7. Zimmermann M, Duruz H, Guinand O, 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, et al: Torsade de pointes induced by terfenadine in a patient with long QT syndrome. *J Electrocardiol* 1994;27:343-346
9. Craft TM: Torsades de pointes after astemizole overdose. *Br Med J* 1986;292:660
10. 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
11. Guelon D, Bedock B, Chartier C, et al: QT prolongation and recurrent "torsades de pointes" during erythromycin lactobionate infusion. *Am J Cardiol* 1986;58:666
12. Nattel S, Ranger S, Talajic M, et al: Erythromycin-induced long QT syndrome: concordance with quinidine and underlying cellular electrophysiologic mechanism. *Am J Med* 1990;89:235-238
13. Bran S, Murray WA, Hirsch IB, et al: Long QT syndrome during high-dose cisapride. *Arch Intern Med* 1995;155:765-768
14. Lewin MB, Bryant RM, Fenrich AL, et al: Cisapride-induced long QT interval. *J Pediatr* 1996;128:279-281
15. Pettignano R, Chambliss CR, Darsey E, et al: Cisapride-induced dysrhythmia in a pediatric patient receiving extracorporeal life support. *Crit Care Med* 1996;24:1268-1271
16. Woosley RL, Chen Y, Freiman JP, et al: Mechanism of the cardiotoxic actions of terfenadine. *JAMA* 1993;269:1532-1536

17. Salata JJ, Jurkiewicz NK, Wallace AA, et al: Cardiac electrophysiological actions of the histamine H₁-receptor antagonists astemizole and terfenadine compared with chlorpheniramine and pyrilamine. *Circ Res* 1995;76:110-119
18. Vorperian VR, Zhou Z, Mohammad S, et al: Torsade de pointes with an antihistamine metabolite: potassium channel block with desmethylastemizole. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:1556-1561
19. Daleau P, Lessard E, Groleau MF, et al: 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. Mohammad S, Zhou Z, Gong Q, et al: Blockage of the HERG human cardiac K⁺ channel by the gastrointestinal prokinetic agent cisapride. *Am J Physiol* 1997;273:H2534-H2538
21. Drolet B, Khalifa M, Daleau P, et al: Block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current by the prokinetic agent cisapride underlies drug-related lengthening of the QT interval. *Circulation* 1998;97:204-210
22. Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC: Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide. *Circ Res* 1993;72:75-83

23. Sedgwick ML, Lip G, Rae AP, et al: Chemical cardioversion of atrial fibrillation with intravenous dofetilide. *Int J Cardiol* 1995;49:159-166
24. Echt DS, Lee JT, Murray KT, et al: A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study of dofetilide in patients with inducible sustained ventricular tachyarrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1995;6:687-699
25. Falk RH, Pollak A, Singh SN, et al: Intravenous dofetilide, a class III antiarrhythmic agent, for the termination of sustained atrial fibrillation or flutter. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:385-390
26. Adamantidis MM, Kerram P, Caron JF, et al: Droperidol exerts dual effects on repolarization and induces early afterdepolarizations and triggered activity in rabbit Purkinje fibers. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;266:884-893
27. Zhou Z, Gong Q, Ye B, et al: Properties of HERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature. *Biophys J* 1998;74:230-241
28. Hamil OP, Marty A, Neher E, et al: Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981;391:85-100
29. Srivastava MS, EM Carter: *An introduction to applied multivariate statistics*. New York, NY, Elsevier Science Publishing Co Inc, 1983

30. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK: Two components of cardiac delayed rectifier K^+ current: Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 1990;96:195-215
31. Courtney KR, Hill BC, Follmer CH: The importance of K^+ channel rectification to cardiac repolarization. *Proc West Pharmacol Soc* 1992;35:177-182
32. Zeng J, Laurita KR, Rosenbaum DS, et al: 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
33. Turgeon J, Daleau P, Bennett PB, et al: Block of I_{Ks} , the slow component of the delayed rectifier K^+ current, by the diuretic agent indapamide in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* 1994;75:879-886
34. Fiset C, Drolet B, Hamelin BA, et al: Block of I_{Ks} by the diuretic agent indapamide modulates cardiac electrophysiological effects of the class III antiarrhythmic drug *dl*-sotalol. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283:148-156
35. Takahashi H, Terrar DA: Selectivity of action of propofol and thiopentone on components of the delayed rectifier potassium current in guinea pig isolated ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 1995;115:20P(Abstract)
36. Heath BM, Terrar DA: Separation of the components of the delayed rectifier potassium current using selective blockers of I_{Kr} and I_{Ks} in

guinea-pig isolated ventricular myocytes. *Experimental Physiology* 1996;81:587-603

37. Morey TE, Martynyuk AE, Napolitano CA, et al: Ionic basis of the differential effects of intravenous anesthetics on erythromycin-induced prolongation of ventricular repolarization in the guinea pig heart. *Anesthesiology* 1997;87:1172-1181
38. Li GR, Feng J, Yue L, et al: Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. *Circ Res* 1996;78:689-696
39. Wang Z, Fermini B, Nattel S: Delayed rectifier outward current and repolarization in human atrial myocytes. *Circ Res* 1993;73:276-285
40. Wang Z, Fermini B, Nattel S: Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 1994;28:1540-1546
41. Daleau P, Turgeon J: Triamterene inhibits the delayed rectifier potassium current (I_K) in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* 1994;74(6):1114-1120
42. Khalifa M, Drolet B, Daleau P, et al: Block of potassium currents in guinea pig ventricular myocytes and lengthening of cardiac repolarization in man by the histamine H1 receptor antagonist diphenhydramine. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288: 858-865

43. Khalifa M, Drolet B, Hamelin BA, et al: Modulation of cardiac repolarization by venlafaxine. *Can J Cardiol* 1996;12:85E(Abstract)
44. Drolet B, Vincent F, Rail J, et al: Thioridazine lengthens repolarization of cardiac ventricular myocytes by block of the delayed rectifier potassium current. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288: 1261-1268
45. Lehmann KA, Van Peer A, Ikonomakis M, et al: Pharmacokinetics of droperidol in surgical patients under different conditions of anaesthesia. *Br J Anaesth* 1988;61:297-301
46. Grunwald Z, Torjman M, Schieren H, et al: The pharmacokinetics of droperidol in anesthetized children. *Anesth Analg* 1993;76:1238-1242
47. Fischler M, Bonnet F, Trang H, et al: The pharmacokinetics of droperidol in anesthetized patients. *Anesthesiology* 1986;64:486-489

Table 1. Mean MAPD₉₀ prolongation (\pm S.E.M.) after a 15-minute droperidol perfusion, at various pacing cycle lengths.

Pacing cycle length (msec)	10 nmol/L	30 nmol/L	100 nmol/L	300 nmol/L
150	3.5 \pm 1.2	6.5 \pm 3.2	15.7 \pm 3.5	14.1 \pm 1.3
175	5.4 \pm 1.6	10.0 \pm 3.1	18.5 \pm 2.8	22.2 \pm 2.7
200	7.2 \pm 1.9	12.2 \pm 3.1	19.9 \pm 1.9	25.1 \pm 2.4
225	8.2 \pm 2.2	13.7 \pm 2.9	22.4 \pm 2.1	29.0 \pm 2.9
250	9.8 \pm 2.4	16.2 \pm 3.0	24.1 \pm 2.2	32.7 \pm 3.6

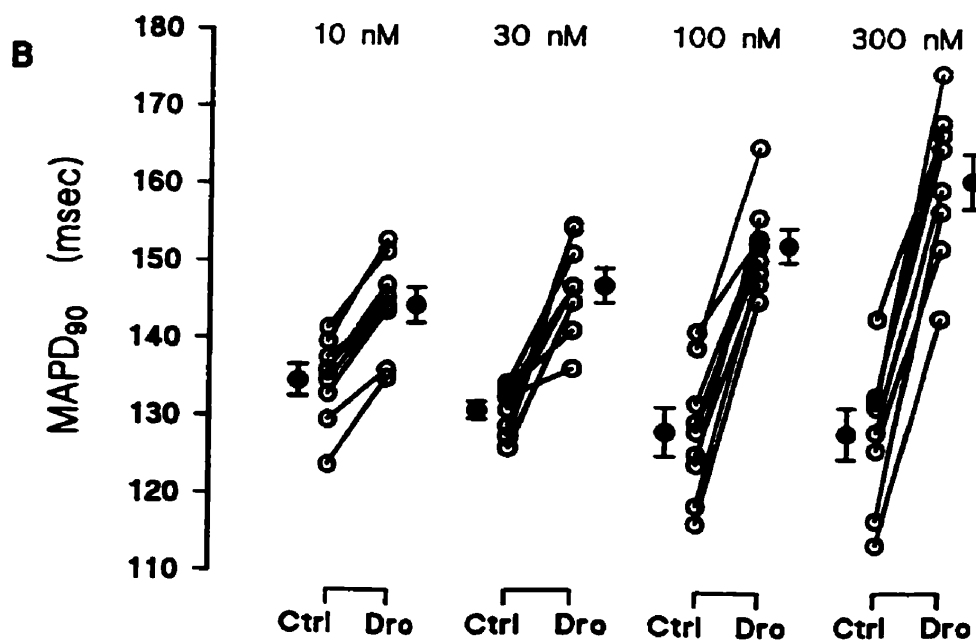
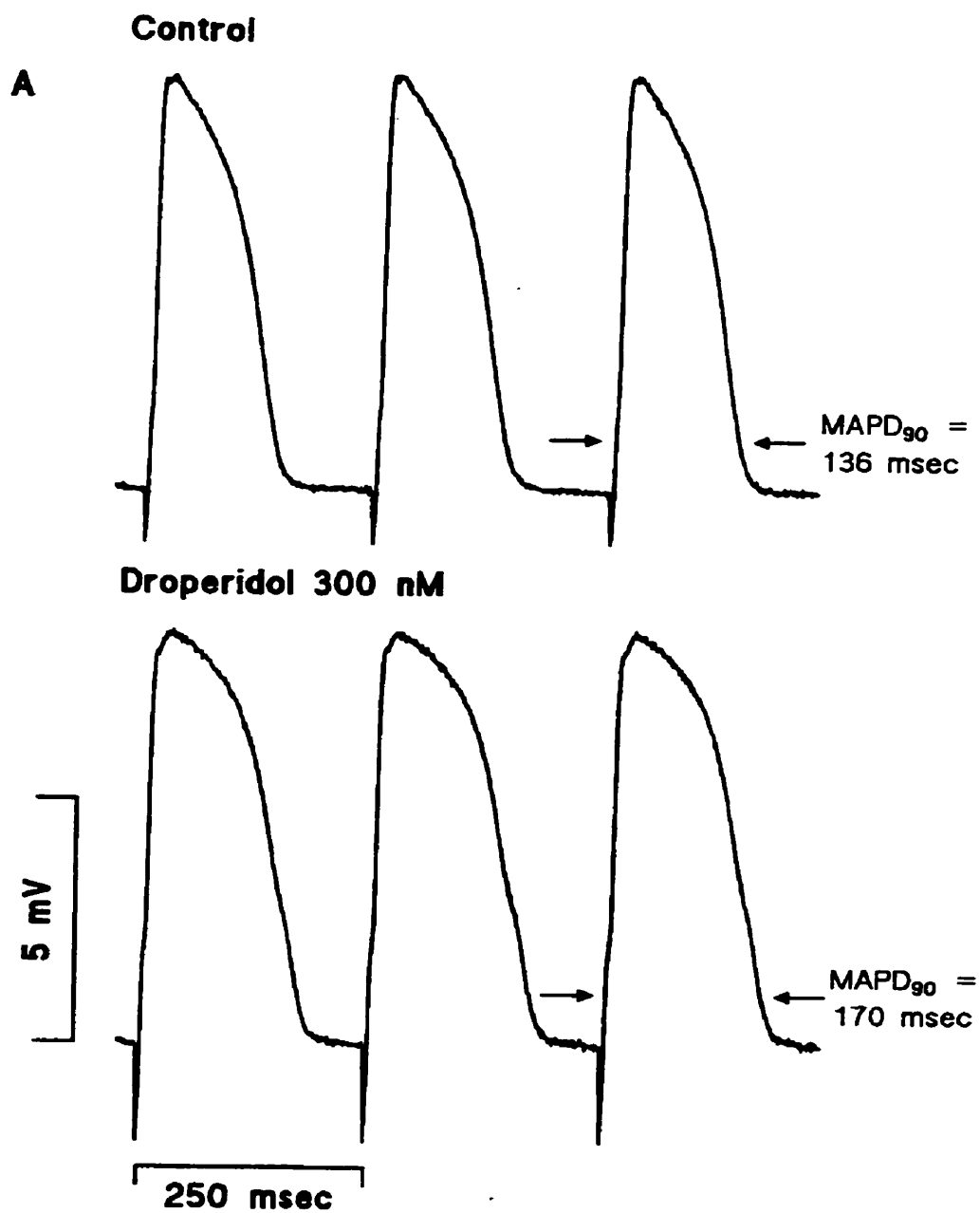
Figure legends

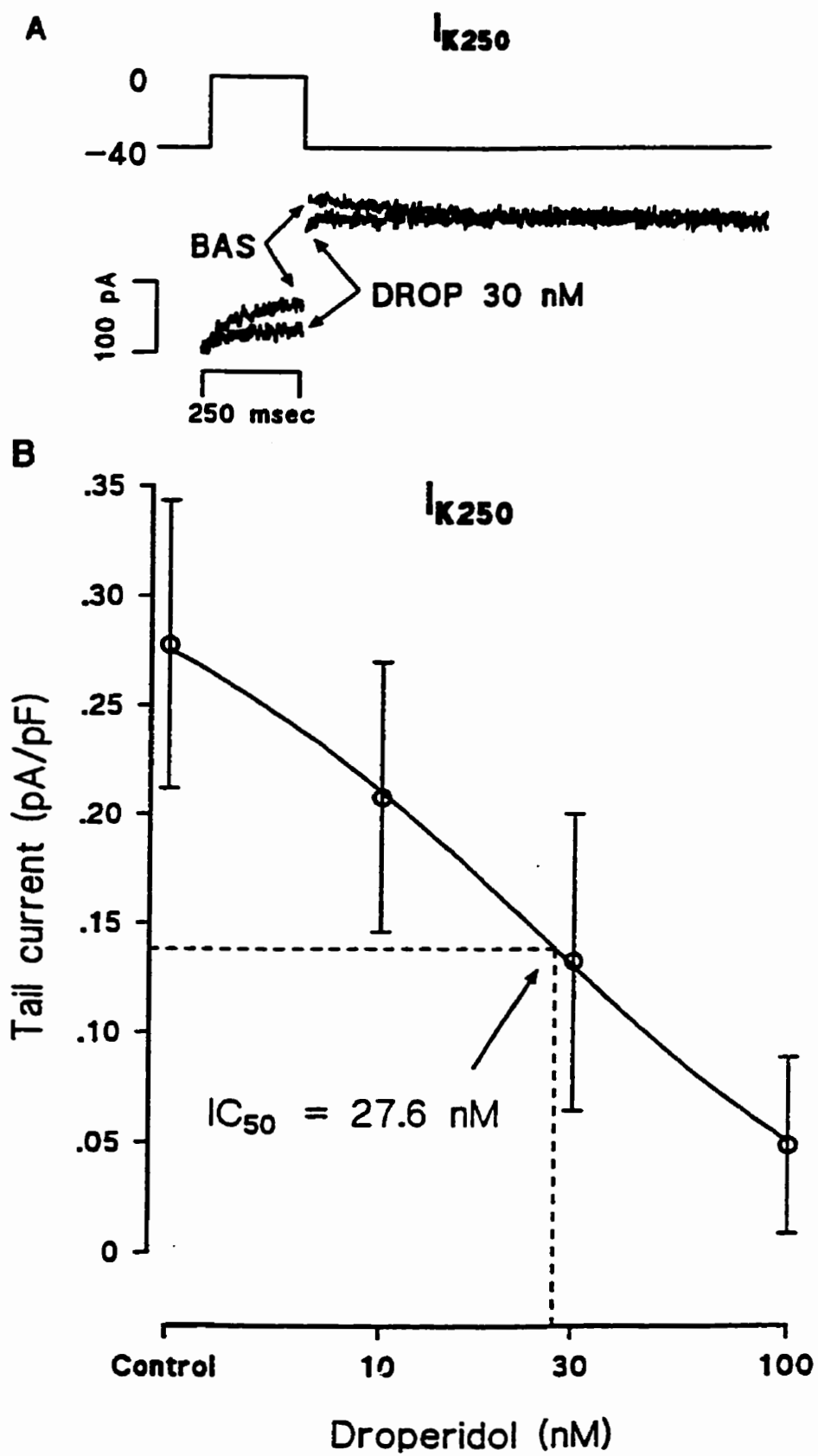
Figure 1. Panel A shows recordings of monophasic action potential signals during the baseline period (Control) and after 15 minutes of exposure to droperidol 300 nmol/L (pacing cycle length of 250 msec). Panel B shows the effects of droperidol on monophasic action potential duration (MAPD) determined in isolated, buffer-perfused guinea pig hearts, at a pacing cycle length of 250 msec. MAPD at 90% repolarization (MAPD₉₀) was measured at baseline (Ctrl) and during perfusion of droperidol (Dro) 10, 30, 100 or 300 nmol/L (n=8 at each concentration).

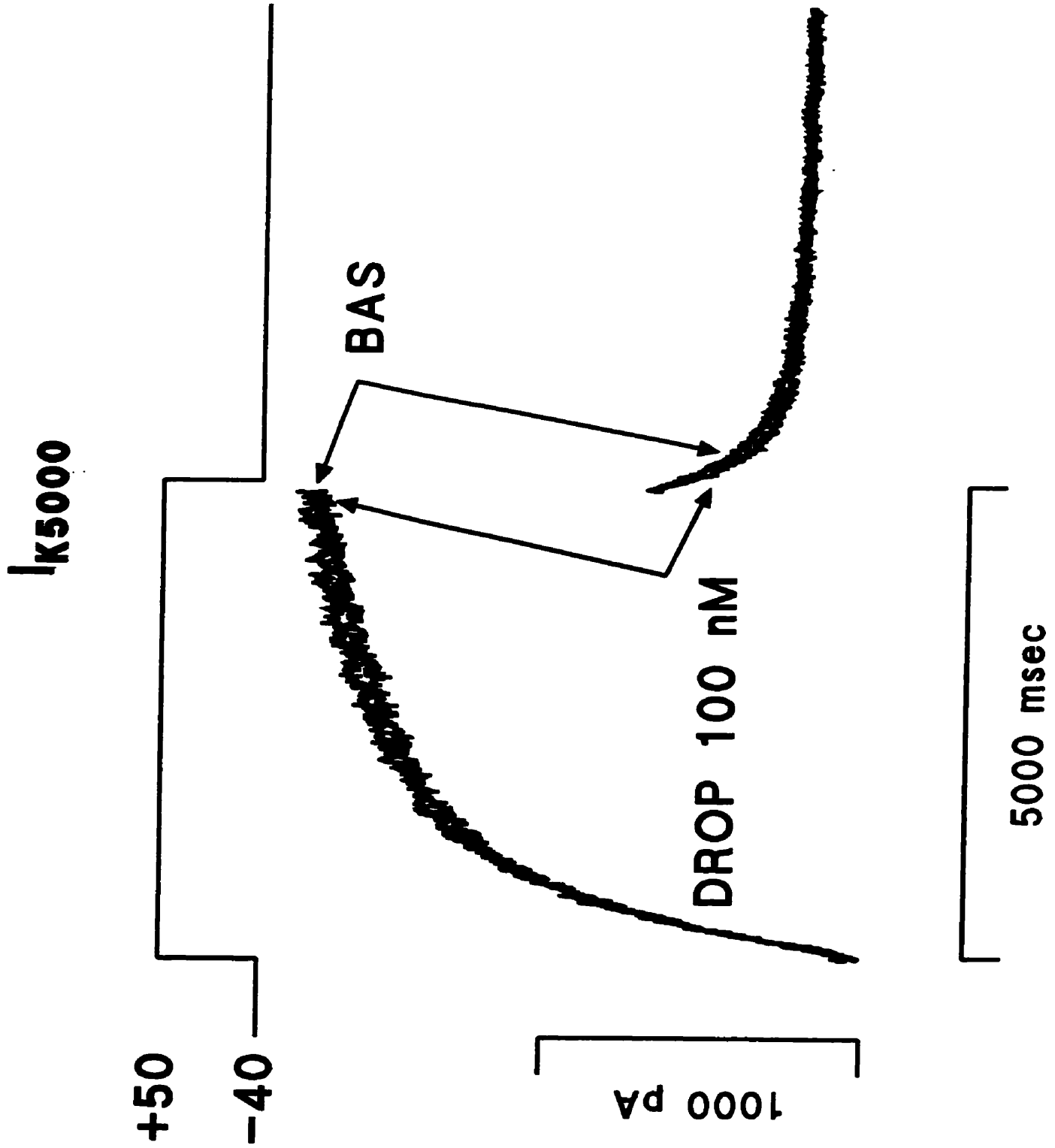
Figure 2 Panel A shows recordings of membrane currents elicited by short pulses (I_{K250}) to 0 mV at baseline (BAS) and during exposure to droperidol (DRO) 30 nmol/L. Panel B shows normalized tail current amplitude recorded at -40 mV following a test pulse to 0 mV. Control data and data obtained at three concentrations of droperidol (n=5 cells/concentration) are shown. The estimated IC₅₀ for the tail current is 27.6 nmol/L (Hill coefficient 1.23).

Figure 3 Figure 3 shows recordings of membrane currents elicited by long pulses (I_{K5000}) to +50 mV at baseline (BAS) and during exposure to droperidol (DRO) 100 nmol/L.

Figure 4 Left panel shows outward and tail currents by HERG channels, elicited by a 4 sec step to +20 mV, in a HERG-transfected HEK293 cell perfused under control conditions and in the presence of droperidol 500 nmol/L. Right panel illustrates HERG tail-current peak amplitude, normalized to control, plotted as a function of droperidol concentration. Estimated IC_{50} is 32.2 nmol/L (Hill coefficient 1.39).







I 5000

+50

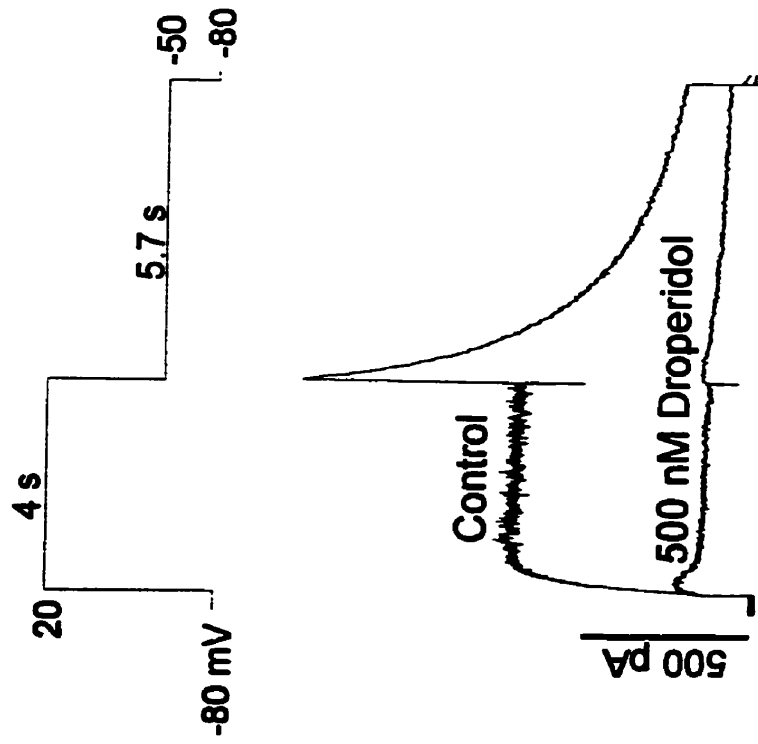
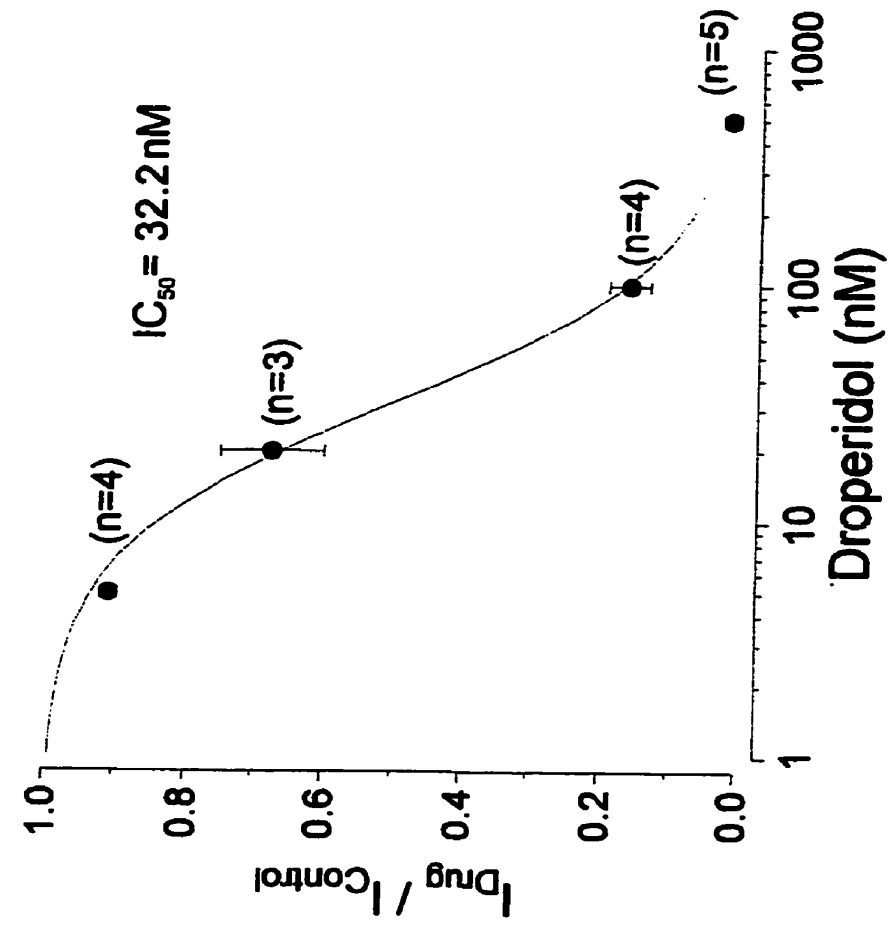
-40

BAS

DROP 100 nM

1000 pA

5000 msec



CHAPITRE 3

SILDENAFIL (VIAGRA) PROLONGS CARDIAC REPOLARIZATION BY BLOCKING THE RAPID COMPONENT OF THE DELAYED RECTIFIER POTASSIUM CURRENT

Résumé

Plusieurs cas de morts subites ont été rapportés avec l'utilisation du sildénafil chez des patients prédisposés aux événements cardiaques ischémiques. Bien que des épisodes d'ischémie aiguë puissent expliquer quelques-uns de ces décès, nous avons proposé que le sildénafil puisse posséder des effets électrophysiologiques cardiaques inattendus, pouvant prédisposer certains patients à la pro-arythmie.

Des expériences ont été effectuées sur 10 cœurs isolés de cobaye. Elles ont démontré une prolongation de la repolarisation cardiaque inversement proportionnelle à la fréquence de stimulation, par le sildénafil 30 $\mu\text{mol/L}$. La durée du potentiel d'action s'est accrue de 15% (117 ± 3 à 134 ± 2 msec) sous l'effet du sildénafil 30 $\mu\text{mol/L}$ à un cycle de stimulation de 250 msec, mais de seulement 6% (99 ± 2 à 105 ± 2 msec) à un cycle de stimulation de 150 msec. Les expériences effectuées sur des cellules HEK293 transfectées avec le gène HERG (n=30) ont démontré un blocage concentration-dépendant de la composante rapide du courant potassique rectifiant retardé (I_{Kr}): le courant d'activation est diminué de 50% à une concentration de sildénafil de 100 $\mu\text{mol/L}$. Cet effet a été confirmé en utilisant des cellules CHO (Chinese hamster ovary) transfectées avec le gène HERG, lesquelles n'expriment aucun courant endogène interférant avec I_K .

Le sildénafil possède des effets électrophysiologiques cardiaques directs similaires à ceux des antiarythmiques de classe III. Ces effets peuvent être observés à des concentrations pouvant être atteintes 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 à la mort subite suite à l'utilisation du sildénafil.

Sildenafil (Viagra®) Prolongs Cardiac Repolarization by Blocking the Rapid Component of the Delayed Rectifier Potassium Current

Peter Geelen, M.D., Ph.D.^{1,3}, Benoit Drolet, M.Sc.^{1,2,4}, Jimmy Rail, M.Sc.^{1,2}, Jocelyn Bérubé, M.Sc.^{1,3}, Pascal Daleau, Ph.D.^{1,3}, Guy Rousseau, Ph.D.^{4,5}, René Cardinal, Ph.D.^{4,5}, Gilles E. O'Hara, M.D.^{1,3}, Jacques Turgeon, Ph.D.^{1,2,3,4,5,6}

A. Institut de cardiologie de Québec, Hôpital Laval¹ et Facultés de Pharmacie² et de Médecine³, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Canada G1V 4G5

B. Centre de Recherche, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal⁴, Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine⁵ et Faculté de Pharmacie⁶, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H4J 1C5

Short title: Geelen et al., *Sildenafil (Viagra®) blocks cardiac I_{Kr}*

Word count: 2372

Journal subject head: BASIC SCIENCE RESEARCH, 132

Address for correspondence: Jacques Turgeon, Ph.D.

Dean, Faculty of Pharmacy

University of Montreal

C.P. 6128 succursale Centre-ville

Montreal QC Canada H3C 3J7

Tel : (514) 343-6440

Fax : (514) 343-7377

E-mail : jacques.turgeon@umontreal.ca

Supported by : Medical Research Council of Canada (MT-11876) and Heart and Stroke Foundation of Quebec

May 23, 2000

Abstract

Background: Several cases of unexpected death have been reported with sildenafil in patients predisposed to ischemic cardiac events. Although acute episodes of ischemia could account for some of these deaths, we hypothesized that sildenafil may have unsuspected electrophysiological effects predisposing some patients to proarrhythmia.

Methods and Results: Studies were undertaken in 10 isolated guinea pig hearts which demonstrated prolongation of cardiac repolarization in a reverse use-dependent manner by sildenafil 30 μM . Action potential duration increased 15% from baseline 117 ± 3 to 134 ± 2 msec with sildenafil during pacing at 250 msec cycle length, while a 6% increase from 99 ± 2 to 105 ± 2 msec was seen with pacing at 150 msec cycle length. Experiments in HERG-transfected HEK293 cells ($n=30$) demonstrated concentration-dependent block of the rapid component (I_{Kr}) of the delayed rectifier potassium current: activating current was 50% decreased at 100 μM . This effect was confirmed using HERG-transfected CHO cells, which exhibit no endogenous I_K -like current.

Conclusions: Sildenafil possesses direct cardiac electrophysiological effects similar to Class III antiarrhythmic drugs. These effects are observed at concentrations that may be found in conditions of impaired drug elimination such as renal or hepatic insufficiency, during co-administration of another CYP3A substrate/inhibitor or after drug overdose, and offer a new potential explanation for sudden death during sildenafil treatment.

Key words : Proarrhythmia, I_{Kr} blockers, sildenafil

Condensed abstract

Several cases of unexpected death have been reported with sildenafil use. Although some of these deaths were assumed to be due to acute ischemia, we tested whether sildenafil possesses electrophysiological effects predisposing to proarrhythmia. Sildenafil prolonged cardiac repolarization in isolated hearts, and voltage-clamp experiments in HERG-transfected HEK293 or CHO cells demonstrated concentration-dependent block of I_{Kr} . These effects were observed at concentrations that may be found in conditions of impaired drug elimination or in case of drug overdose.

Introduction

The drug sildenafil citrate is a successful tool in the treatment of impotence through a selective inhibition of the phosphodiesterase V that inactivates cGMP, the mediator of smooth muscle relaxation in the corpus cavernosum^{1,2}.

As impotence is a common problem among patients with cardiac disease, sildenafil is increasingly prescribed by cardiologists³. Several deaths have been reported in patients taking sildenafil, but it was generally assumed that they were related to an underlying disease, e.g. ischemia, and not to a specific drug effect^{3,4}.

We investigated whether unexpected electrophysiological effects of sildenafil on cardiac repolarization might provide an alternate explanation for an increased risk of sudden death. We therefore determined action potential-prolonging effects of sildenafil in isolated hearts and characterized the effects of the drug on I_{Kr} , using 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.

Experiments with isolated hearts

Experiments with isolated guinea pig hearts were performed as described previously⁵. The hearts were perfused with Krebs-Henseleit buffer during a control period of 10 minutes, followed by 15 minutes with buffer containing 30 μM of sildenafil dissolved in 100 μL of dimethylsulfoxide (DMSO). Perfusion with buffer containing no drug was then restarted during a 10-minute washout period. Monophasic action potentials from the left ventricle were recorded every 60 seconds during 3 seconds, at basic pacing cycle lengths (BCL) of 250, 200 and 150 msec.

Patch-clamp experiments

Experiments were performed on HERG-transfected HEK293 cells. Preparation and harvesting of the HEK293 cells were done as described by Zhou et al.⁶. Membrane currents were recorded in whole cell configuration using suction pipettes. The composition of superfusion and internal pipette solutions were described by Zhou et al.⁶. Sildenafil solutions of 1-100 μM were prepared daily by dissolving required amounts of the drug in 100 μL of DMSO. The same volume of DMSO was added in baseline and washout buffer solutions. HERG gene was also transiently transfected in CHO cells as described by Bérubé et al.⁷. Recordings of currents and composition of

superfusion and internal pipette solutions were described by Bérubé et al.⁷. All voltage-clamp experiments were performed at 22-23 °C.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm SEM. Isolated heart data on the magnitude of sildenafil effects were analyzed with a student's paired *t*-test. In the patch-clamp experiments, concentration-dependent block of HERG activating current was tested by Hotelling's T^2 -test. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Experiments with isolated hearts

Examples of monophasic action potentials recorded at baseline and during perfusion with sildenafil 30 μM at a BCL of 250 msec are illustrated in Figure 1A. Experiments in isolated hearts ($n=10$) showed an increase in monophasic action potential duration measured at 90% repolarization (MAPD_{90}) during perfusion with sildenafil 30 μM (Figure 1B): At a BCL of 250 msec, MAPD_{90} increased from 117 ± 3 msec at baseline to 134 ± 2 msec after 15 minutes of drug perfusion ($P<0.05$), decreasing back to 126 ± 4 msec after 10 minutes of washout ($P<0.05$ versus sildenafil). At the shortest BCL of 150 msec, MAPD_{90} increased from 99 ± 2 at baseline to 105 ± 2 msec after sildenafil perfusion ($P<0.05$), returning to baseline after washout (99 ± 2 msec). Thus, sildenafil was associated with a 15% increase in MAPD_{90} at the longest BCL and with a 6% increase at the shortest BCL. Such reverse use-dependent characteristics are typically seen with I_{K_r} blockers.

Patch-clamp experiments

The mechanism of the action potential-prolonging effect of sildenafil was elucidated by the patch-clamp experiments in HEK293 and in CHO cells. Figure 2A shows currents elicited in a HERG-transfected HEK293 cell perfused under control conditions, after 15 minutes of sildenafil 30 μM and after 20 minutes of washout. In this cell, sildenafil 30 μM caused a $\approx 40\%$ reduction of the activating current, whereas the reduction of the tail current was $\approx 25\%$.

To ascertain that the effects of sildenafil were not due to a modulation of a HEK293 cell endogenous current, we confirmed the inhibitory effects of sildenafil in HERG-transfected CHO cells, which exhibit no I_{K} -like endogenous currents⁸. Figure 2B shows currents elicited in a HERG-transfected CHO cell perfused under control conditions, after 15 minutes of sildenafil 30 μM and after 20 minutes of washout. In this cell, sildenafil 30 μM caused a $\approx 50\%$ reduction of the activating current, and a $\approx 44\%$ reduction of the tail current. Sildenafil 30 μM had no effect on HERG channel activation, deactivation nor inactivation kinetics.

In HERG-transfected HEK293 cells, block of activating currents was assessed with sildenafil concentrations ranging from 1 to 100 μM and the data were fitted to the Hill equation, giving an estimated IC_{50} of 100 μM (Figure 2C).

Discussion

Our results indicate that sildenafil can prolong cardiac repolarization by blocking I_{Kr} . In fact, we have shown that sildenafil 30 μM caused a clinically relevant 15% prolongation of cardiac repolarization, which is comparable to the effect of cisapride 100 nM under the same conditions⁵. It has been shown that I_{Kr} block may lead to triggered ventricular arrhythmias and sudden death⁹. These results provide a new potential explanation for sudden death during sildenafil treatment.

Inhibition of HERG current was demonstrated in both HEK293 and CHO cell lines. In HEK293 cells, the estimated IC_{50} for I_{Kr} was 100 μM . Plasma concentrations of sildenafil after treatment with single doses of 25-100 mg are around 1 μM ¹⁰. As sildenafil is a strong lipophilic drug, relevant tissue concentrations are probably higher. However, based on our results, several fold higher plasma concentrations than these encountered in clinical practice would be required before significant I_{Kr} block occurred. Drug metabolism studies have demonstrated that CYP3A's are the principal enzymes involved in the biotransformation of sildenafil¹⁰. Thus, one could expect an important rise in sildenafil plasma levels when it is co-administered with CYP3A inhibitors (macrolides, imidazoles) or other CYP3A substrates (many cardiac drugs such as calcium antagonists and statins). Indeed, a 20-fold increase in cisapride plasma concentrations (another inadvertent I_{Kr} blocker that is a CYP3A4 substrate) was reported during co-administration with fluconazole and erythromycin¹¹.

The cardiovascular effects of sildenafil in randomized, controlled clinical trials were minor, although patients with underlying heart disease

were generally excluded from these studies^{1,10,12}. From April 1998 through mid-November 1998, the FDA has been able to document 130 cases of death in US patients using sildenafil. 62% of them died of cardiovascular events (mostly MI or cardiac arrest), while the cause of death was unmentioned or unknown for 37% of patients¹⁰. Therefore, care should be taken when prescribing sildenafil to patients with cardiac disease⁴. Care should also be taken with patients at risk for impaired drug elimination and is further emphasized by these new findings. Since sildenafil can block I_{Kr} , caution is also needed during co-administration with other I_{Kr} blockers like Class III drugs and other compounds such as erythromycin, antihistamines and cisapride^{5,13,14}. Moreover, the present findings with sildenafil should also remind the whole concern of acquired long QT syndrome as a “drug-revealed” form of silent congenital long QT syndrome, observable under the effect of a growing list of drugs.

Conclusions

Sildenafil blocks I_{Kr} and prolongs cardiac repolarization at concentrations that may be seen after drug overdose or in the presence of impaired drug elimination. Clinical attention to QT prolongation and triggered ventricular tachyarrhythmias is warranted in patients with hepatic or renal insufficiency or suffering from the long QT syndrome and in patients on multi-drug regimens.

Acknowledgments

Dr Geelen was the recipient of a postdoctoral fellowship from the Heart and Stroke Foundation of Canada. Benoit Drolet is the recipient of studentships from the Heart and Stroke Foundation of Canada and from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR). Jimmy Rail was the recipient of a studentship from the Quebec Heart Institute. Dr Daleau is the recipient of a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Dr Rousseau is the recipient of a scholarship from the MRC/Canadian Hypertension Society. Dr Turgeon was the recipient of a scholarship from the Joseph C. Edwards Foundation. The authors also thank Michel Blouin and Lynn Atton for technical assistance. This work was presented in part at the 72nd Scientific Sessions of the American Heart Association, Atlanta, November 1999.

References

1. Goldstein I, Lue TF, Padma-Nathan H, Rosen RC, Steers WD, Wicker PA. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. *N Engl J Med* 1998;338:1397-1404.
2. Chuang AT, Strauss JD, Murphy RA, Steers Wd. Sildenafil, a type-5 cGMP phosphodiesterase inhibitor, specifically amplifies endogenous cGMP-dependent relaxation in rabbit corpus cavernosum smooth muscle in vitro. *J Urol* 1998;160:257-261.
3. Conti CR. Viagra[®], the latest cardio-vascular drug. *Clin Cardiol* 1998;21:616.
4. Cheitlin MD, Hutter AM, Brindis RG, Ganz P, Kaul S, Russel RO, Zusman RM, Forrester JS, Douglas PS, Faxon DP, Fisher JD, Gibbons RJ, Halperin JL, Hochman JS, Weintraub WS, Winters WL, Wolk, MJ. Use of sildenafil (Viagra) in patients with cardiovascular disease. *Circulation* 1999;99:168-177.
5. 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.
6. Zhou Z, Gong Q, Ye B, Fan Z, Makielski JC, Robertson GA, January CT. Properties of HERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature. *Biophys J* 1998;74:230-241.
7. Bérubé J, Chahine M, Daleau P. Modulation of HERG potassium channel properties by external pH. *Pflügers Arch* 1999;438:419-422.

8. Yu SP, Kerchner GA. Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *J Neurosci Res* 1998;52:612-617.
9. Priori SG. Exploring the hidden danger of noncardiac drugs. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;9:1114-1116.
10. Zusman RM, Morales A, Glasser DB, Osterloh IH. Overall cardiovascular profile of sildenafil citrate. *Am J Cardiol* 1999;83:35C-44C.
11. Pettignano R, Chambliss R, Darsey E, Heard M, Clark R. Cisapride-induced dysrhythmia in a pediatric patient receiving extracorporeal life support. *Crit Care Med* 1996;24:1268-1271.
12. Morales A, Gingell C, Collins M, Wicker PA, Osterloh IH. Clinical safety of oral sildenafil citrate (Viagra) in the treatment of erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 1998;10:69-73.
13. 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.
14. Salata JJ, Jurkiewicz NK, Wallace AA, Stupienski RF, Guinosso jr. PJ, Lynch jr. JJ. Cardiac electrophysiological actions of the histamine H1-receptor antagonists astemizole and terfenadine compared with chlorpheniramine and pyrilamine. *Circ Res* 1995;76:110-119.

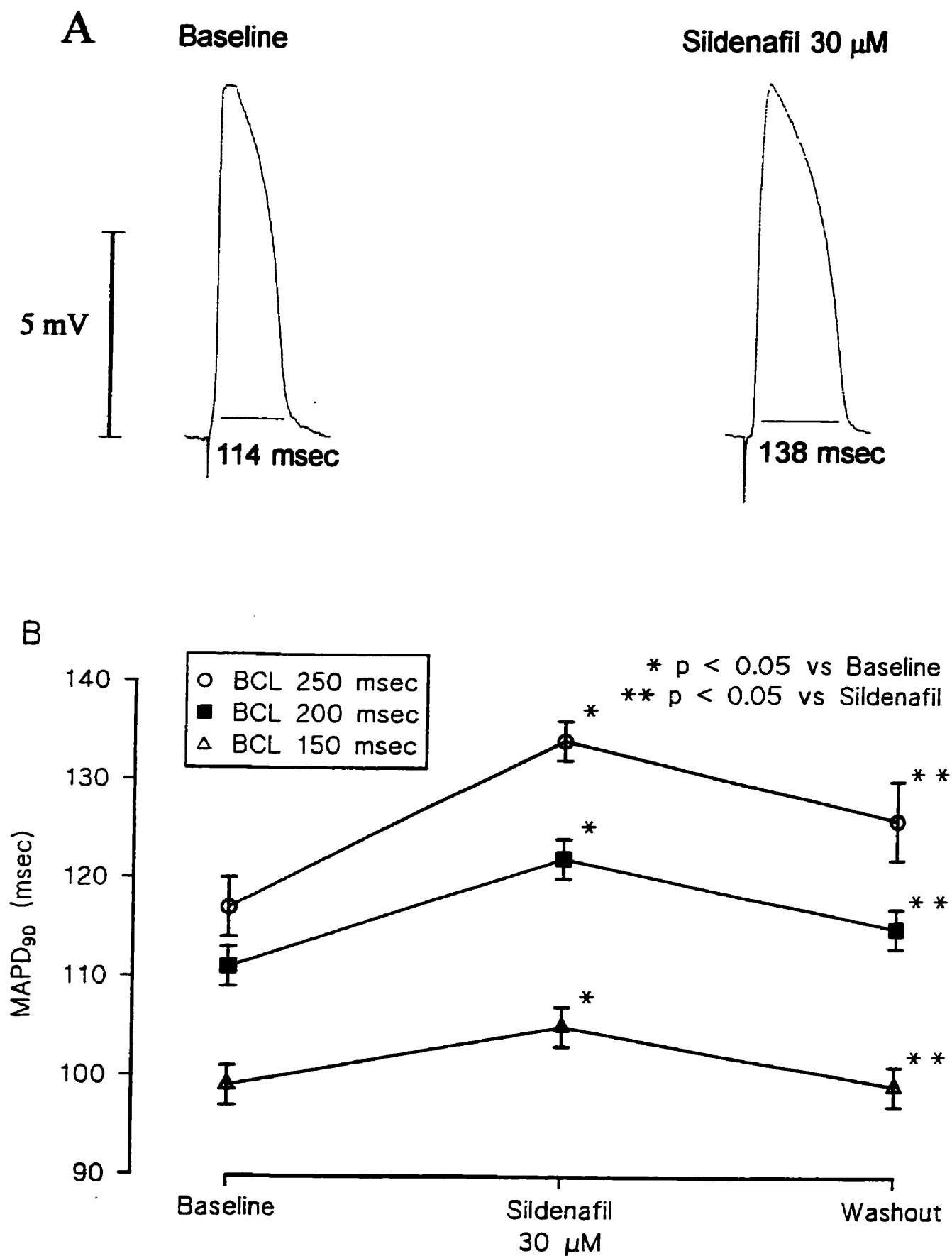
Figure legends

Figure 1

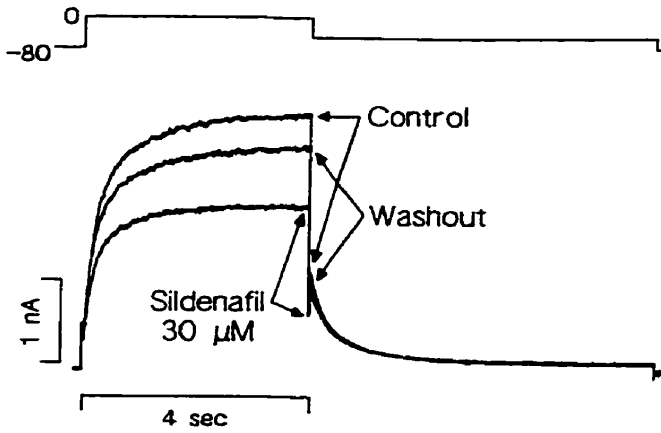
Panel A shows monophasic action potential signals recorded at baseline and after 15 minutes of sildenafil 30 μM at a BCL of 250 msec. Panel B shows serial changes in MAPD_{90} at BCL of 250, 200 and 150 msec in hearts ($n=10$) sequentially perfused with baseline, sildenafil 30 μM and washout buffer. BCL= basic cycle length.

Figure 2

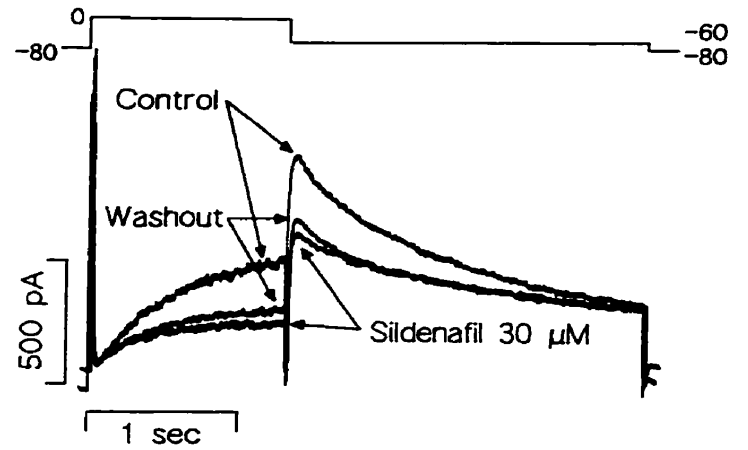
Panel A shows activating and tail currents elicited by a 4-second step to +20 mV in a HERG-transfected HEK293 cell under control conditions, after 15 minutes of sildenafil 30 μM , and after a 20-minute washout period. Panel B shows activating and tail currents elicited by a 1.25-second step to 0 mV in a HERG-transfected CHO cell under control conditions, after 15 minutes of sildenafil 30 μM , and after a 20-minute washout period. Panel C shows HERG activating current amplitude, measured at +20 mV in HEK293 cells ($n=30$), normalized to control, plotted as a function of sildenafil concentration.



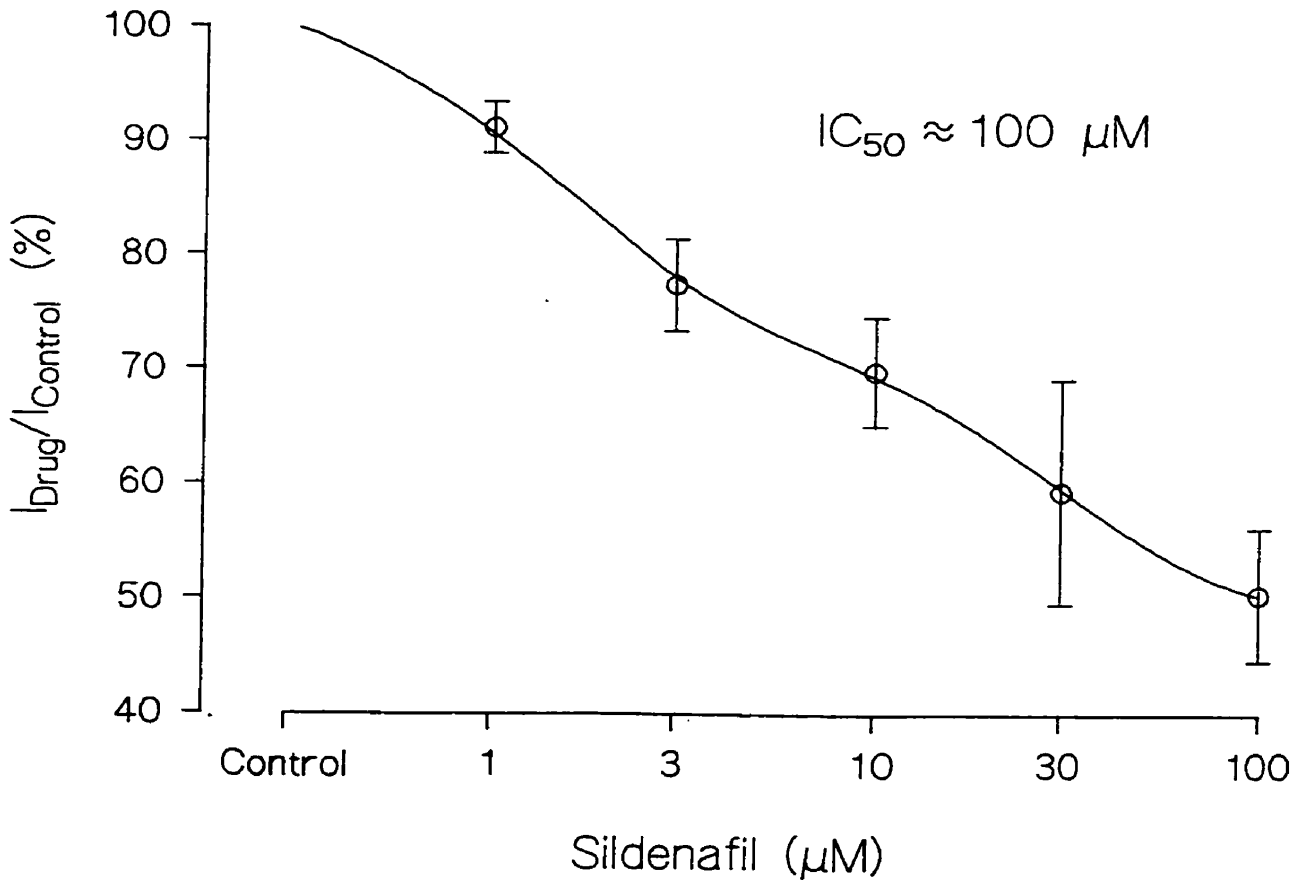
A HERG-transfected HEK293 cell



B HERG-transfected CHO cell



C



CHAPITRE 4

**DOMPERIDONE SHOULD NOT BE CONSIDERED A NO-RISK
ALTERNATIVE TO CISAPRIDE IN THE TREATMENT OF
GASTROINTESTINAL MOTILITY DISORDERS**

Résumé

Plusieurs cas de prolongation de l'intervalle QT et de tachyarythmies ventriculaires ont été rapportés suite à l'utilisation de la dompéridone, un agent antiémétique favorisant la motilité gastro-intestinale, disponible dans plusieurs pays dont le Canada, mais encore sous évaluation aux États-Unis. Bien que des désordres électrolytiques tels l'hypokaliémie puissent être responsables de certains de ces cas d'arythmies, nous avons proposé que la dompéridone puisse posséder certaines propriétés électrophysiologiques inattendues, prédisposant certains patients à la pro-arythmie.

Des expériences effectuées sur 9 cœurs isolés de cobaye ont démontré que la dompéridone 100 nmol/L produit une prolongation de la repolarisation cardiaque inversement proportionnelle à la fréquence de stimulation. La durée du potentiel d'action s'est accrue de 27% par rapport au niveau de base sous l'effet de la dompéridone 100 nmol/L (de 114 ± 3 à 145 ± 2 msec) à un cycle de stimulation de 250 msec, et de 9% (de 97 ± 2 à 106 ± 3 msec) à un cycle de stimulation de 150 msec. Des expériences effectuées sur des cellules CHO (Chinese hamster ovary) transfectées avec le gène HERG (Human ether-à-go-go-related gene) ($n=32$) ont démontré un blocage concentration-dépendant de la composante rapide du courant potassique rectifiant retardé (I_{Kr}). Le courant de queue a été réduit de 50% par la dompéridone à 162 nmol/L.

La dompéridone possède des effets électrophysiologiques cardiaques similaires à ceux du cisapride et des antiarythmiques de classe III. Ces effets sont observés à des concentrations thérapeutiques du médicament. La dompéridone ne devrait donc pas être considérée comme une alternative sans

risque au cisapride, un médicament récemment retiré des marchés canadien et américain.

**Domperidone Should Not Be Considered a No Risk Alternative to
Cisapride in the Treatment of Gastrointestinal Motility Disorders**

**Benoit Drolet, M.Sc.^{1,2,4}, Guy Rousseau, Ph.D.^{4,5}, Pascal Daleau, Ph.D.^{1,3},
René Cardinal, Ph.D.^{4,5} and Jacques Turgeon, Ph.D.^{1,2,3,4,5,6}**

- A. Institut de cardiologie de Québec, Hôpital Laval¹ et Facultés de Pharmacie²
et de Médecine³, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Canada G1V 4G5
- B. Centre de Recherche, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal⁴, Département
de Pharmacologie, Faculté de Médecine⁵ et Faculté de Pharmacie⁶,
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H4J 1C5

Short title: Drolet et al., *Domperidone blocks cardiac I_{Kr}*

Word count: 2396

Journal subject head: BASIC SCIENCE RESEARCH, 132

Address for correspondence: Jacques Turgeon, Ph.D.

Dean, Faculty of Pharmacy

University of Montreal

C.P. 6128 succursale Centre-ville

Montreal QC Canada H3C 3J7

Tel : (514) 343-6440

Fax : (514) 343-7377

E-mail : jacques.turgeon@umontreal.ca

Supported by : Medical Research Council of Canada (MT-11876) and Heart
and Stroke Foundation of Quebec

August 21, 2000

Abstract

Background: Several cases of QT prolongation and ventricular tachyarrhythmia have been reported with domperidone, a gastrokinetic and antiemetic agent available worldwide but still under investigation in the U.S.. Although electrolyte disturbances such as hypokalemia could account for some of these events, we hypothesized that domperidone may have unsuspected electrophysiological effects predisposing some patients to proarrhythmia.

Methods and Results: Studies were undertaken in 9 isolated guinea pig hearts which demonstrated reverse use-dependent prolongation of cardiac repolarization by domperidone 100 nM. Action potential duration increased 27% from baseline 114 ± 3 to 145 ± 2 msec with domperidone 100 nM during pacing at 250 msec cycle length, while a 9% increase from 97 ± 2 to 106 ± 3 msec was seen with pacing at a cycle length of 150 msec. Experiments in HERG-transfected CHO cells ($n=32$) demonstrated concentration-dependent block of the rapid component (I_{Kr}) of the delayed rectifier potassium current: tail current was decreased by 50% at 162 nM.

Conclusions: Domperidone possesses cardiac electrophysiological effects similar to those of cisapride and Class III antiarrhythmic drugs. These effects are observed at clinically relevant concentrations of the drug. Therefore, domperidone should not be considered as a no risk alternative to cisapride, a drug that was recently withdrawn from the U.S. market. —

Key words : Proarrhythmia, gastrokinetics, domperidone

Condensed abstract

Several cases of QT prolongation, ventricular tachyarrhythmia and cardiac arrest have been reported with domperidone use. Although some of these events were associated with hypokalemia, we hypothesized that domperidone could possess electrophysiological effects predisposing to proarrhythmia. Using an isolated heart model, we demonstrated that domperidone prolongs cardiac repolarization. Furthermore, voltage-clamp experiments in HERG-transfected CHO cells demonstrated concentration-dependent block of a major cardiac potassium channel (I_{Kr}). These effects were observed at clinically relevant concentrations of the drug.

Introduction

Domperidone (Motilium®) has been marketed worldwide since 1978, but is still under investigation in the United States. It is a unique compound with both gastrokinetic and antiemetic activities. Chemically distinct from cisapride, domperidone is a peripheral dopamine₂-receptor antagonist that might appear as an attractive safer alternative to cisapride, a drug that was recently withdrawn from the U.S. market, due to drug-related proarrhythmic events.¹⁻³

However, QT prolongation, life-threatening ventricular tachyarrhythmias and even cardiac arrests have also been reported following use of domperidone.⁴⁻¹¹ It was generally assumed that these adverse effects were related to an underlying electrolytic disturbance, e.g. hypokalemia, and not to a specific drug effect.^{5;7-9}

We investigated whether unexpected electrophysiological effects of domperidone on cardiac repolarization might also provide an explanation for some of the observed proarrhythmic events. We therefore determined action potential-prolonging effects of domperidone in isolated hearts and characterized the effects of the drug on a major cardiac potassium current, namely I_{Kr} , using the whole cell 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.

Experiments with isolated hearts

Experiments with isolated guinea pig hearts were performed as described previously.¹² The hearts were perfused with Krebs-Henseleit buffer during a control period of 10 minutes, followed by 15 minutes with buffer containing 100 nM of domperidone dissolved in 1 mL of dimethylsulfoxide (DMSO). Perfusion with buffer containing no drug was then restarted during a 10-minute washout period. The same concentration of DMSO (0.1% v/v) was also present in baseline and washout buffer solutions. Monophasic action potentials from the left ventricle were recorded by a pressure-maintained catheter every 60 seconds during 3 seconds, at basic pacing cycle lengths (BCL) of 250, 200 and 150 msec.

Patch-clamp experiments

Experiments were performed on HERG-transfected Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. Preparation and harvesting of the CHO cells were done as described previously.¹³ Membrane currents were recorded in whole cell configuration using suction pipettes. The composition of superfusion and internal pipette solutions were also described previously.¹⁴ Domperidone solutions of 30 nM to 1 μ M were prepared daily by dissolving required amounts of the drug in 100 μ L of DMSO. The same concentration of DMSO

(0.1% v/v) was also present in baseline and washout buffer solutions. All voltage-clamp experiments were performed at 22-23°C.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm SEM. Magnitude of domperidone effects for isolated heart data were analyzed with a student's paired *t*-test. In the patch-clamp experiments, concentration-dependent block of HERG tail current was tested by Hotelling's T^2 -test. A *P* value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Experiments with isolated hearts

Examples of monophasic action potentials recorded at baseline and during perfusion with domperidone 100 nM at a BCL of 250 msec are illustrated in Figure 1A. Experiments in isolated hearts ($n=9$) showed an increase in monophasic action potential duration measured at 90% repolarization (MAPD_{90}) during perfusion with domperidone 100 nM (Figure 1B): At a BCL of 250 msec, MAPD_{90} increased from 114 ± 3 msec at baseline to 145 ± 2 msec after 15 minutes of drug perfusion ($P<0.05$), decreasing back to 136 ± 2 msec after 10 minutes of washout ($P<0.05$ versus domperidone). At a BCL of 200 msec, MAPD_{90} increased from 110 ± 2 msec at baseline to 130 ± 3 msec after 15 minutes of drug perfusion ($P<0.05$), decreasing back to 118 ± 3 msec after 10 minutes of washout ($P<0.05$ versus domperidone). Finally, at the shortest BCL of 150 msec, MAPD_{90} increased from 97 ± 2 at baseline to 106 ± 3 msec after domperidone perfusion ($P<0.05$), returning to baseline after washout (99 ± 4 msec). Thus, domperidone was associated with a 27% increase in MAPD_{90} at the longest BCL and with a 9% increase at the shortest BCL. Such reverse use-dependent characteristics are typically seen with I_{K_r} blockers.

Patch-clamp experiments

The mechanism underlying action potential-prolonging effects of domperidone was investigated by conducting patch-clamp experiments in CHO cells. Figure 2A shows currents elicited in a HERG-transfected CHO cell perfused under control conditions (baseline), after 15 minutes of domperidone 300 nM and after a 20-minute washout period. In this cell, domperidone 300 nM caused a 59% reduction of the tail current. Similar experiments were conducted in a total of 32 cells (n=8/concentration). Block of tail currents was assessed with domperidone concentrations ranging from 30 nM to 1 μ M and the data were fitted to the Hill equation, giving an estimated IC_{50} of 162 nM (Figure 2B). Decrease of tail current was $12\pm 6\%$ at 30 nM, $35\pm 4\%$ at 100 nM, $65\pm 4\%$ at 300 nM and $95\pm 1\%$ at 1 μ M.

Discussion

Our results indicate that domperidone can prolong cardiac repolarization in a reverse rate-dependent manner by blocking I_{Kr} . In fact, we have shown that domperidone 100 nM caused a significant prolongation of cardiac repolarization ($\approx 25\text{-}30\%$). It has been shown that excessive I_{Kr} block may lead to triggered tachyarrhythmias and sudden death.¹⁵ These results provide a new explanation for QT prolongation and ventricular tachyarrhythmia during domperidone treatment.

Inhibition of HERG current was demonstrated in CHO cells. The estimated IC_{50} for I_{Kr} was 162 nM. Pharmacokinetic studies have shown that mean plasma concentration of domperidone in healthy subjects was 21 ng/mL (49 nM) following 14 days of domperidone 30 mg/d, which was similar to the mean plasma concentration of 18 ng/mL (42 nM) observed following the first dose.¹⁶ However, mean C_{max} values achieved 30 minutes after 10 and 60 mg oral doses of domperidone were 23 and 80 ng/mL (54 and 188 nM), respectively.¹⁷ Therefore, reduction of the I_{Kr} current and delayed cardiac repolarization are expected to be seen in patients treated with recommended doses of domperidone (10-20 mg TID-QID).

Similar electrophysiological properties have been extensively described recently with cisapride, another gastrokinetic drug. This drug had to be withdrawn from the U.S. market due to unacceptable cardiac toxicity.^{2,3,12} As cisapride was one of the overall most prescribed drugs in the U.S. and definitely the most prescribed in its therapeutic class, its withdrawal will cause a rapid shift towards alternative therapies.

With both gastrokinetic and antiemetic activities, domperidone provides short-term relief of dyspepsia, diabetic gastroparesis or gastroesophageal reflux, and prevents nausea and vomiting associated with chemotherapy and antiparkinsonian drugs.¹

Unlike metoclopramide, another prokinetic dopamine-receptor antagonist, domperidone does not readily cross the blood-brain barrier, and reports of CNS adverse effects, such as dystonic reactions, are rare.¹ Moreover, in the management of diabetic gastropathy, domperidone's antiemetic activity distinguishes it from cisapride.

Because of its "apparent" favorable safety profile, domperidone might appear as an appealing safer alternative to cisapride. In view of the present findings and considering previous reports on domperidone cardiac toxicity,⁴⁻¹¹ it should not be the case. Clinical attention should be directed towards QT prolongation and proarrhythmic events when domperidone is administered, as it was with cisapride. Since domperidone can block I_{Kr} , caution is also needed during co-administration with other I_{Kr} blockers like Class III drugs and other compounds such as antimicrobials, antihistamines and neuroleptics.¹⁸⁻²¹ Domperidone should be one of the next compound to add to the growing list of drugs associated with acquired long QT syndrome.

Conclusions

Domperidone is a potent I_{Kr} blocker. It prolongs cardiac repolarization at clinically relevant drug concentrations, and should not be considered as a no risk alternative to cisapride. Therefore, clinical attention to QT prolongation and triggered ventricular tachyarrhythmias should be warranted when prescribing domperidone, particularly in patients with hepatic or renal insufficiency or suffering from the long QT syndrome and in patients on multi-drug regimens.

Acknowledgments

Benoit Drolet is the recipient of studentships from the Heart and Stroke Foundation of Canada and from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR). Dr Rousseau is the recipient of a scholarship from the MRC/Canadian Hypertension Society. Dr Daleau is the recipient of a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Dr Turgeon was the recipient of a scholarship from the Joseph C. Edwards Foundation. The authors also thank Michel Blouin, Lynn Atton and Chantal de Montigny for technical assistance.

References

1. Barone JA. Domperidone: A peripherally acting dopamine₂-receptor antagonist. *Ann Pharmacother* 1999;33:429-440.
2. Bran S, Murray WA, Hirsch IB, et al: Long QT syndrome during high-dose cisapride. *Arch Intern Med* 1995;155:765-768.
3. Lewin MB, Bryant RM, Fenrich AL, et al: Cisapride-induced long QT interval. *J Pediatr* 1996;128:279-281.
4. Bruera E, Villamayor R, Roca E, et al: QT interval prolongation and ventricular fibrillation with i.v. domperidone. *Cancer Treat Rep* 1986;70(4):545-546.
5. Osborne RJ, Slevin ML, Hunter RW, et al: Cardiac arrhythmias during cytotoxic chemotherapy: role of domperidone. *Hum Toxicol* 1985;4(6):617-626.
6. Cameron HA, Reyntjens AJ, Lake-Bakaar G, et al: Cardiac arrest after treatment with intravenous domperidone. *Br Med J* 1985;290:160.
7. Quinn N, Parkes D, Jackson G, et al: Cardiotoxicity of domperidone. *Lancet* 1985;2:724.
8. Osborne RJ, Slevin ML, Hunter RW, et al: Cardiotoxicity of intravenous domperidone. *Lancet* 1985;2:385.
9. Roussak JB, Carey P, Parry H. Cardiac arrest after treatment with intravenous domperidone. *Br Med J* 1984;289:1579.
10. Giaccone G, Berletto O, Calciati A. Two sudden deaths during prophylactic antiemetic treatment with high doses of domperidone and methylprednisolone. *Lancet* 1984;2:1336-1337.
11. Joss RA, Goldhirsch A, Brunner KW, et al: Sudden death in a cancer patient on high dose domperidone. *Lancet* 1982;1:1019.

12. Drolet B, Khalifa M, Daleau P, et al: Block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current by the prokinetic agent cisapride underlies drug-related lengthening of the QT interval. *Circulation* 1998;97:204-210.
13. Bérubé J, Chahine M, Daleau P. Modulation of HERG potassium channel properties by external pH. *Pflügers Arch* 1999;438:419-422.
14. Zhou Z, Gong Q, Ye B, et al: Properties of HERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature. *Biophys J* 1998;74:230-241.
15. Priori SG. Exploring the hidden danger of noncardiac drugs. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;9:1114-1116.
16. Huizing G, Brouwers JRBJ, Westhuis P. Plasma drug concentration and prolactin release after acute and subchronic oral administration of domperidone and metoclopramide. In: Merkus F, ed. The serum concentration of drugs. Amsterdam: Excerpta Medica, 1980:271-277.
17. Heykants J, Hendriks R, Meuldermans W, et al: On the pharmacokinetics of domperidone in animals and man. IV. The pharmacokinetics of intravenous domperidone and its bioavailability in man following intramuscular, oral and rectal administration. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1981;6:61-70.
18. Daleau P, Lessard E, Groleau MF, et al: Erythromycin blocks the rapid component of the delayed rectifier potassium current and lengthens repolarization of guinea pig ventricular myocytes. *Circulation* 1995;91:3010-3016.

19. Khalifa M, Drolet B, Daleau P, et al: Block of potassium currents in guinea pig ventricular myocytes and lengthening of cardiac repolarization in man by the histamine H1-receptor antagonist diphenhydramine. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288:858-865.
20. Drolet B, Vincent F, Rail J, et al: Thioridazine lengthens repolarization of cardiac ventricular myocytes by blocking the delayed rectifier potassium current. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288:1261-1268.
21. Drolet B, Zhang S, Deschênes D, 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.

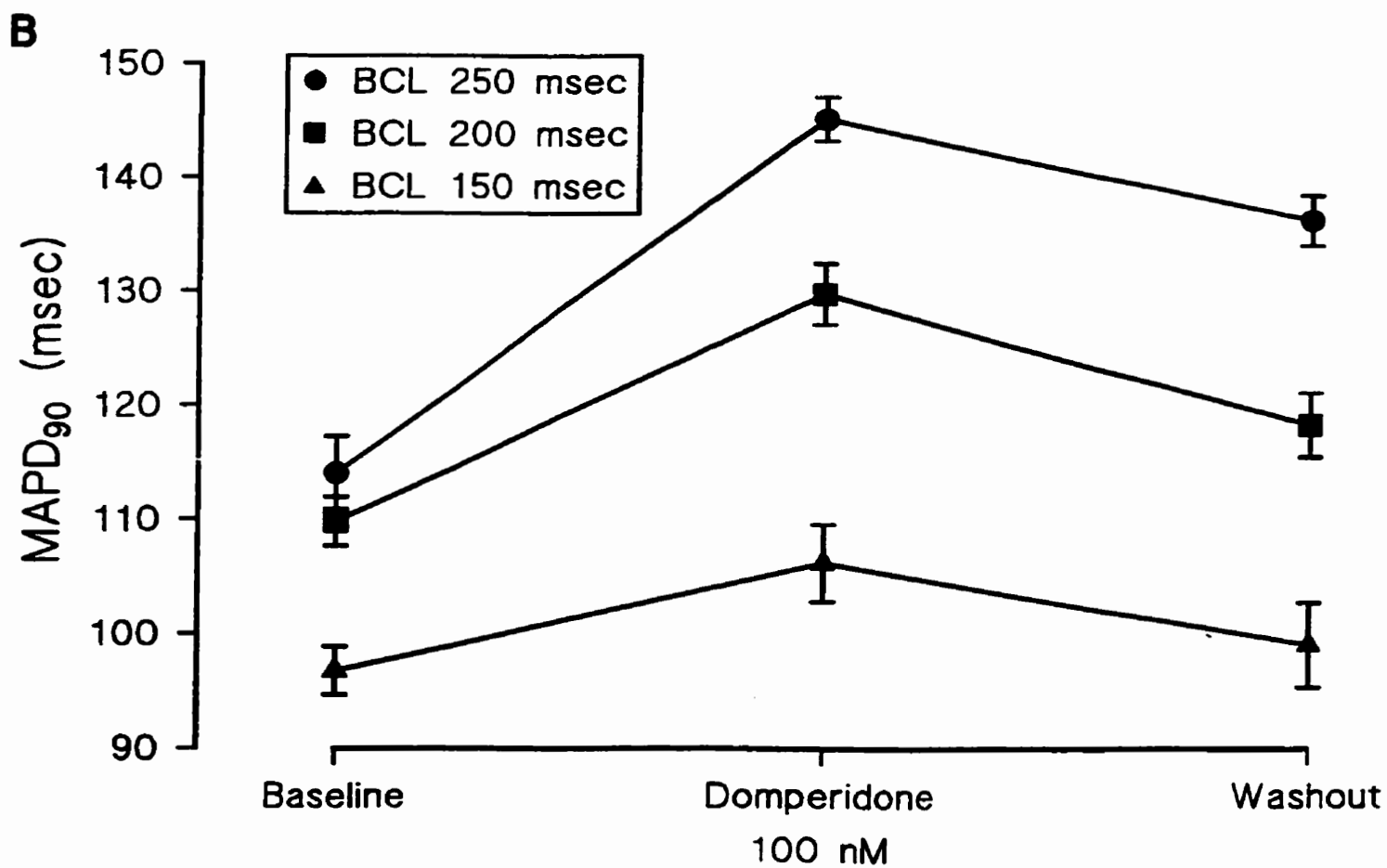
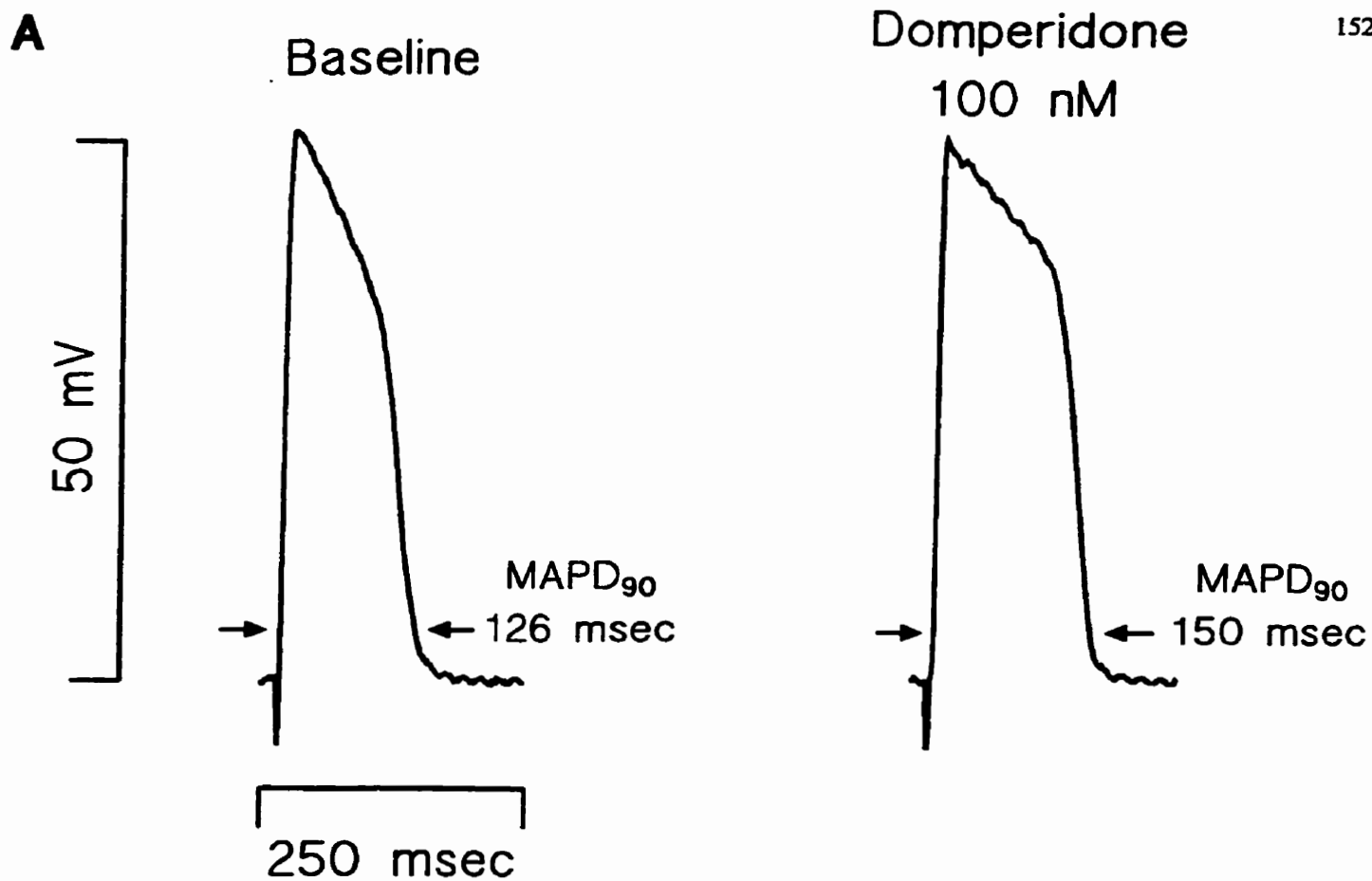
Figure legends

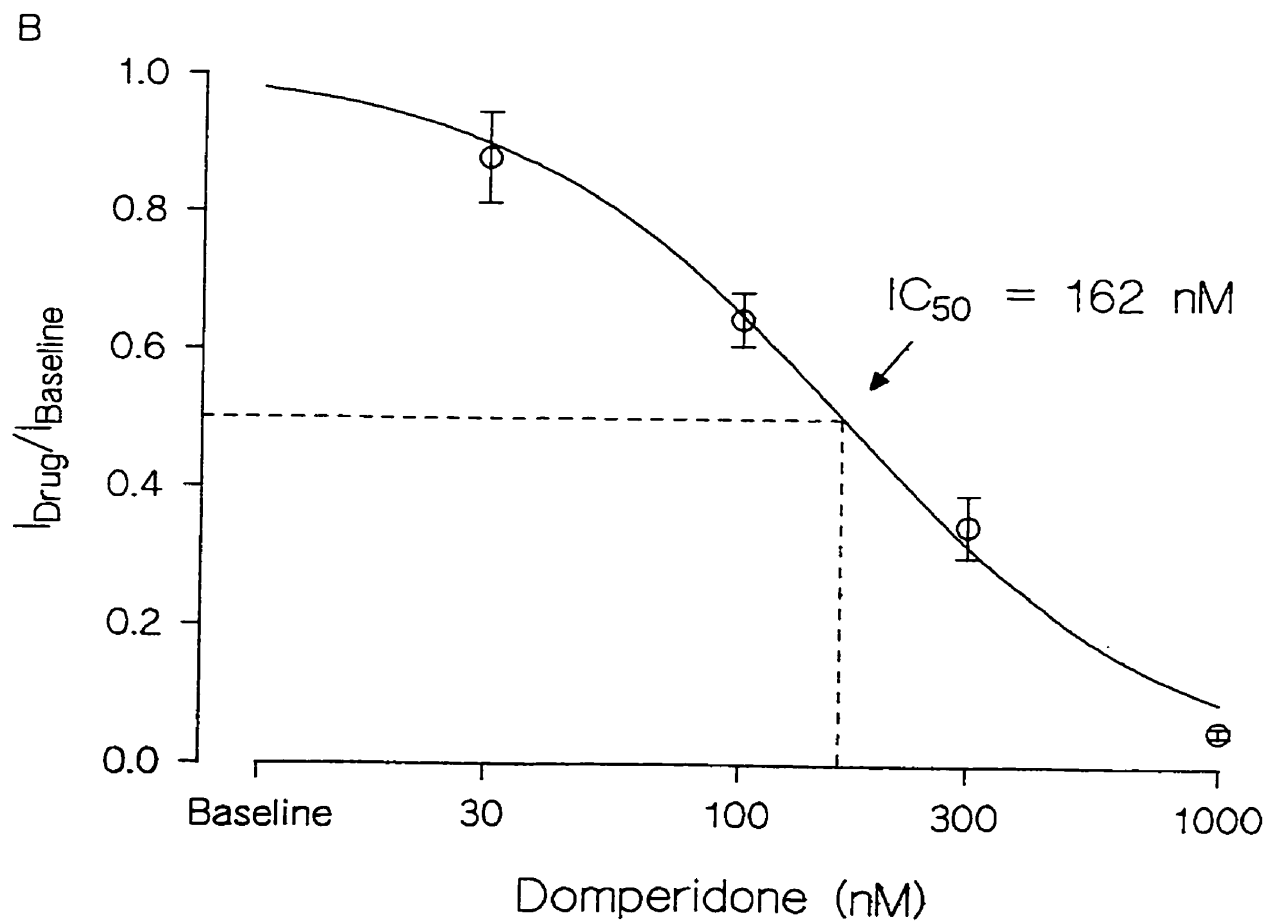
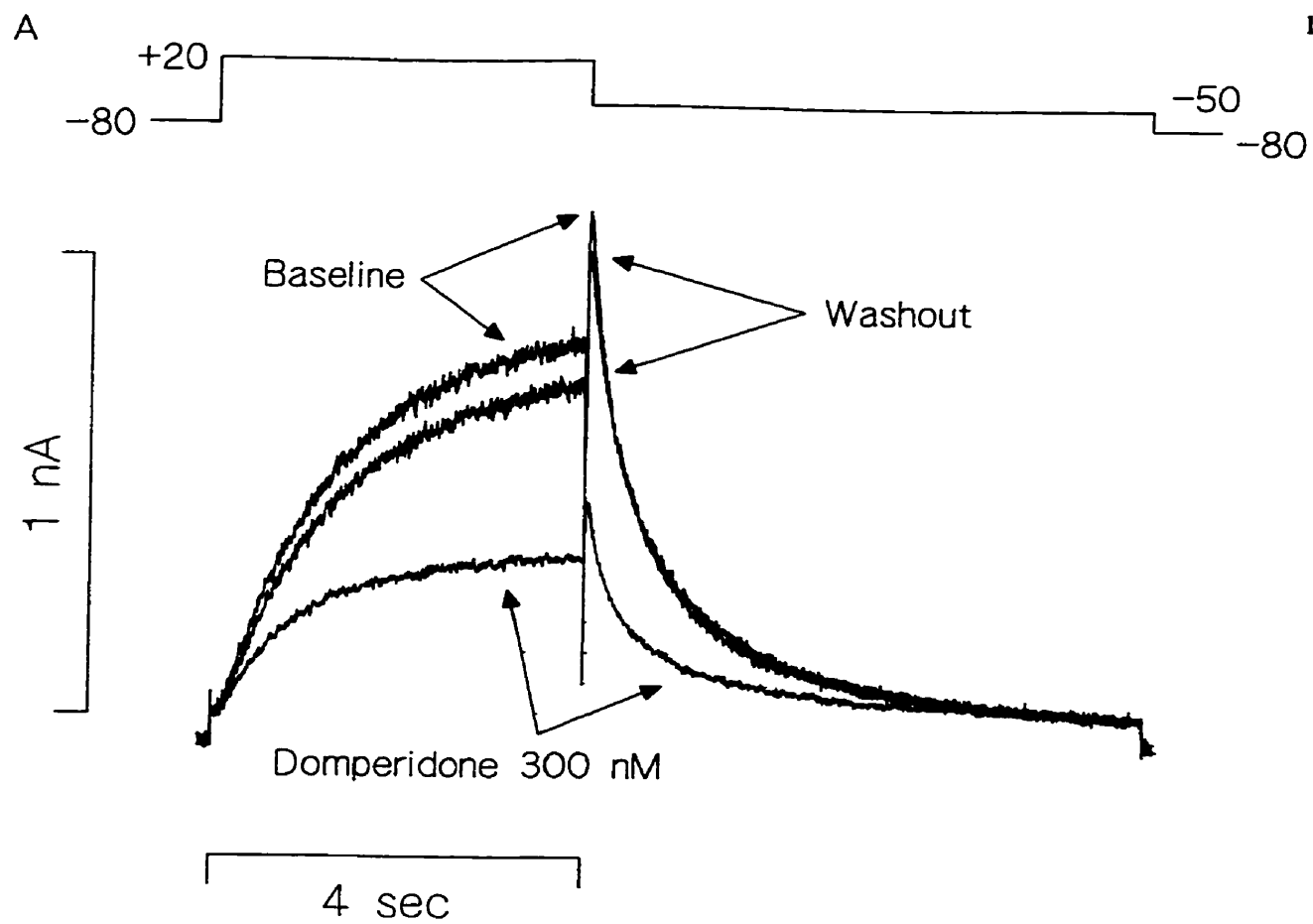
Figure 1

Panel A shows monophasic action potential signals recorded at baseline and after 15 minutes of domperidone 100 nM at a BCL of 250 msec. Panel B shows serial changes in $MAPD_{90}$ at BCL of 250, 200 and 150 msec in hearts (n=9) sequentially perfused with baseline, domperidone 100 nM and washout buffer. BCL= basic cycle length.

Figure 2

Panel A shows activating and tail currents elicited by a 4-second step to +20 mV in a HERG-transfected CHO cell under control conditions (baseline), after 15 minutes of domperidone 300 nM, and after a 20-minute washout period. Panel B shows HERG tail current amplitude, measured at +20 mV in CHO cells (n=32), normalized to control, plotted as a function of domperidone concentration.





CHAPITRE 5

VITAMIN K MODULATES CARDIAC ACTION POTENTIAL BY BLOCKING SODIUM AND POTASSIUM ION CHANNELS

Résumé

Des cas de défaillances cardiovasculaires, syncopes et morts subites ont été observés suite à l'administration rapide intraveineuse de vitamine K. Nos objectifs étaient de caractériser les effets de la vitamine K sur les potentiels d'action cardiaques et d'évaluer les effets de la vitamine K sur les courants sodique et potassiques; I_{Na} , I_{Kr} et I_{Ks} .

Des cœurs isolés de cobaye ($n=21$) ont été stimulés à un cycle de 250 msec et soumis à des concentrations de vitamine K variant de 1,15 à 4,6 $\mu\text{mol/L}$ (2,5 à 10 mg/L). La durée du potentiel d'action monophasique mesurée à 90% de repolarisation (MAPD_{90}) n'a pas été significativement réduite ($-1,6 \pm 0,3$ msec; $P > 0,05$; N.S.) à 1,15 $\mu\text{mol/L}$, mais augmentée de $6,5 \pm 0,4$ msec ($P < 0,05$) à 2,3 $\mu\text{mol/L}$. La MAPD_{90} n'était pas mesurable à 4,6 $\mu\text{mol/L}$, à cause de l'inexcitabilité observée. Des expériences de patch-clamp sur des myocytes ventriculaires de cobaye ont démontré une réduction de $\sim 50\%$ de I_{Na} par la vitamine K à 10 $\mu\text{mol/L}$ et une diminution concentration-dépendante du courant potassique induit par de courtes dépolarisations (250 msec; I_{K250}). La CI_{50} estimée pour I_{K250} , représentant principalement I_{Kr} est 2,3 $\mu\text{mol/L}$. La vitamine K bloque de façon beaucoup moins puissante le courant potassique induit par de longues dépolarisations (5000 msec; I_{K5000}), représentant principalement I_{Ks} , avec une CI_{50} estimée supérieure à 100 $\mu\text{mol/L}$.

Des concentrations thérapeutiques ($\sim 1,5$ $\mu\text{mol/L}$) de vitamine K intraveineuse modulent le potentiel d'action cardiaque en bloquant les courants ioniques impliqués dans la dépolarisation et la repolarisation cardiaques.

VITAMIN K MODULATES CARDIAC ACTION POTENTIAL BY BLOCKING SODIUM AND POTASSIUM ION CHANNELS

**Benoit Drolet, M.Sc.^{1,2,4}, Annie Emond, B.Pharm.^{1,2}, Vincent Fortin, M.D.^{1,3},
Pascal Daleau, Ph.D.^{1,3}, Guy Rousseau, Ph.D.^{4,5}, René Cardinal, Ph.D.^{4,5}
and Jacques Turgeon, Ph.D.^{1,2,3,4,5,6}**

**A. Institut de cardiologie de Québec, Hôpital Laval¹ et Facultés de Pharmacie²
et de Médecine³, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Canada G1V 4G5**

**B. Centre de Recherche, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal⁴, Département
de Pharmacologie, Faculté de Médecine⁵ et Faculté de Pharmacie⁶, Université
de Montréal, Montréal, Québec, Canada H4J 1C5**

Short title : Drolet et al., *Vitamin K blocks ion channels*

Address for correspondence : Jacques Turgeon, Ph.D.

Dean, Faculty of Pharmacy

University of Montreal,

C.P. 6128 succursale Centre-ville

Montreal QC Canada H3C 3J7

Tel : (514) 343-6440

Fax : (514) 343-7377

E-mail : jacques.turgeon@umontreal.ca

**Supported by : Medical Research Council of Canada (MT-11876) and Heart
and Stroke Foundation of Quebec**

March 27, 2000

Abstract

Background Cardiovascular collapses, syncope and sudden deaths have been observed following the rapid administration of i.v. vitamin K. Our objectives were to characterize the effects of vitamin K on cardiac action potentials and to evaluate effects of vitamin K on sodium and potassium currents, namely I_{Na} , I_{Kr} and I_{Ks} .

Methods and Results Guinea pig hearts (n=21) were paced at a cycle length of 250 msec and exposed to vitamin K at 1.15-4.6 $\mu\text{mol/L}$ (2.5-10 mg/L). Monophasic action potential duration measured at 90% repolarization (MAPD_{90}) was not significantly reduced (-1.6 ± 0.3 msec, $P > 0.05$ N.S.) at 1.15 $\mu\text{mol/L}$ but increased by 6.5 ± 0.4 msec ($P < 0.05$) at 2.3 $\mu\text{mol/L}$. MAPD_{90} was not measurable at 4.6 $\mu\text{mol/L}$, due to inexcitability. Patch-clamp experiments in ventricular myocytes demonstrated a $\approx 50\%$ reduction in I_{Na} by vitamin K 10 $\mu\text{mol/L}$ and a concentration-dependent reduction of the K^+ current elicited by short depolarizations (250 msec; I_{K250}). Estimated IC_{50} for I_{K250} , mostly representing I_{Kr} , was 2.3 $\mu\text{mol/L}$. Vitamin K was less potent to block the K^+ current elicited by long depolarizations (5000 msec; I_{K5000}), mostly representing I_{Ks} , with an estimated IC_{50} over 100 $\mu\text{mol/L}$.

Conclusions Therapeutic concentrations (≈ 1.5 $\mu\text{mol/L}$) of i.v. vitamin K modulate cardiac action potential by blocking ionic currents involved in cardiac depolarization and repolarization.

Key words • potassium currents • sodium current • vitamin K • cardiac arrhythmia

Introduction

Vitamin K serves as a necessary cofactor in the gamma-carboxylation for coagulation factors II, VII, IX and X, and for proteins C and S (1-2). In the absence of vitamin K, coagulation factors lack carboxylated glutamic acid residues, which leads to prolongation of the prothrombin time due to deficiency of the clotting system.

Adverse reactions following i.v. administration of vitamin K were observed early after its introduction to the U.S. market in 1960. Nevertheless, it was not until 1963 that the degree of risk associated with i.v. use of the drug was fully recognized when five cases of serious side effects, including one death, were reported. These reactions have included facial flushing, altered sensations of taste, diaphoresis, chest pain, dyspnea, cyanosis, respiratory and cardiac arrest (3-7). To avoid adverse reactions with i.v. administration, some clinicians have recommended diluting the drug and infusing it slowly at a rate no greater than 5 mg/min (3;7). However, even with these precautions, severe reactions, including another death, have been reported between 1976 and 1997 (4;5;8;9).

Since the initial report of death associated with i.v. administration of vitamin K, severe reactions and cardiovascular collapse were assumed to be secondary to an anaphylactoid response. In two cases, however, cardiovascular collapse followed vitamin K administration in which an anaphylactic effect was unlikely (4;8).

Interestingly, a wide variety of drugs, such as Class I and III antiarrhythmics, histamine-H₁ receptor antagonists, antimicrobials, neuroleptics and the gastrointestinal prokinetic agent cisapride have been associated with proarrhythmia (10-18). Lately, it has been shown that these drugs can modulate the cardiac depolarizing sodium current and/or potassium currents involved in

cardiac repolarization, including the rapid component of the delayed rectifier (I_{Kr}) (19-29). Blockade of I_{Na} and I_{Kr} is well known as the major pharmacological effect of Class Ia antiarrhythmic agents such as quinidine, a drug associated with proarrhythmic events (23;24;30;31).

Therefore, the goal of the present studies was to evaluate (1) the action potential-modulating effects of vitamin K in isolated guinea pig hearts perfused in the Langendorff mode using a monophasic action potential signal measured at 90% repolarization ($MAPD_{90}$) as an index of cardiac repolarization; and (2) the effects of vitamin K on sodium and potassium currents involved respectively in depolarization and repolarization of guinea pig ventricular myocytes, using the whole cell configuration of the patch-clamp technique.

Methods

Experiments were performed in accordance with institutional guidelines of Laval University 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.

Experiments With Buffer-Perfused Guinea Pig Isolated Hearts

Heart isolation and perfusion technique have been described previously (21). In brief, hearts were perfused at 37°C during a control period of 5 minutes to assess stability of the monophasic action potential signal. Monophasic action potential duration measured at 90% repolarization (MAPD₉₀) was determined by using a multi-steps process in which time-dependent windows were searched for the relevant data. The four factors required for each beat to determine MAPD₉₀ were: 1) Baseline (0%): average of the last 20 msec segment of data preceding the next pace pulse. 2) Peak depolarization (100%): 5 msec average of peak located between dV/dt max and dV/dt max + 60 msec. This eliminates false peaks as a result of a preceding spike in less filtered data or an EAD's peak occurring in the same data. 3) MAPD₉₀ start time: search backwards in time from dV/dt max to locate 10% above baseline value. 4) MAPD₉₀ end time: search forward from peak depolarization to locate 10% above baseline value. All beats in a 3-second data segment were analysed using the above procedure and a statistical analysis provided averages and S.D. values. Monophasic action potential signals from the left ventricle were recorded at a basic cycle length of 250 msec. Thereafter, perfusion was performed with Krebs-Henseleit buffer containing vitamin K 1.15, 2.3, or 4.6 µmol/L (2.5, 5 or 10 mg/L) for a period of 15 minutes at a basic cycle length of 250 msec. Only one concentration of the

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

Patch-Clamp Experiments

Guinea pig ventricular myocyte preparation, solutions and electrophysiological measurements for potassium repolarizing currents

Experiments were performed on single ventricular myocytes obtained from adult guinea pig hearts as described previously (21). Cells were superfused continuously with the extracellular solution containing (in mM) NaCl 145, KCl 4, MgCl₂ 1, HEPES 10 and glucose 5. Nisoldipine (Bayer Leverkusen, Germany) 0.2 μmol/L was added to eliminate the slow calcium inward current and Ca²⁺ was omitted in the extracellular solution to shift I_{Ks} activation to positive potentials (32). The pH was adjusted to 7.35 with NaOH. The cells were prewarmed at 30°C by a Peltier device (Medical System Corp., Greenvale, NY). Vitamin K solutions of 1, 3, 10, 30 or 100 μmol/L were prepared daily by dissolving required amounts of phytonadione injectable solution (10 mg/mL, Sabex Inc., Boucherville, QC, Canada) in 100 mL of the extracellular solution. Complete replacement of extracellular solution contained in the chamber was achieved within 2 to 3 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 at 30°C as described previously (21). The pipette solution contained (in mM) MgCl₂ 2, CaCl₂ 1, EGTA 11, MgATP 5, K₂ATP 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. Effects of vitamin K on the rapidly (I_{Kr}) and slowly (I_{Ks}) activating component of I_K were studied in cells held at -40 mV (to inactivate I_{Na}) and depolarized by

pulses lasting 250 msec (I_{K250}) or 5000 msec (I_{K5000}). Test potentials of depolarizing pulses varied between -20 and +50 mV. I_{Kr} and I_{Ks} were measured from the peak magnitude of tail current obtained on repolarization to -40 mV.

Guinea pig ventricular myocyte preparation, solutions and electrophysiological measurements for the sodium depolarizing current

Experiments were performed on single ventricular myocytes obtained from adult guinea pig hearts as described previously (21). Cells were superfused continuously with the extracellular solution containing (in mM) CsCl 132.5, NaCl 20, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, HEPES 20 and glucose 11. (pH adjusted to 7.35 with CsOH).

All currents were recorded in the whole cell, voltage-clamp configuration of the patch-clamp technique at 17°C as described previously (22). The pipette solution contained (in mM) CsF 135, NaCl 5, HEPES 5, EGTA 10, MgATP 5. The pH was adjusted to 7.2 with CsOH. Effects of vitamin K on the magnitude of peak I_{Na} current was studied in cells held at -120 mV and depolarized by pulses lasting 30 msec. Test potentials of depolarizing pulses varied between -70 and 0 mV. I_{Na} was measured from the peak magnitude of the inward current.

Statistical Analyses

Buffer-perfused isolated hearts Only hearts with reversal of vitamin K effects on reperfusion with buffer containing no drug were included in the analysis. Data on the magnitude of vitamin K effects were analysed with a Student's paired-*t* test. All values are expressed as mean \pm S.E.M. Level of statistical significance was set at $P < 0.05$.

Guinea pig ventricular myocytes Data are presented as mean \pm S.E.M.. Concentration-dependent block of I_{K250} and I_{K5000} tail currents was tested by Hotelling's T^2 test (33). Data on the magnitude of vitamin K effects on peak I_{Na} current was evaluated with an analysis of variance (ANOVA). Level of statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Experiments With Buffer-Perfused Guinea Pig Isolated Hearts

Experiments performed in buffer-perfused isolated guinea pig hearts ($n=7$ for each of the three concentrations tested) demonstrated that vitamin K caused a concentration-dependent effect on MAPD_{90} . At a pacing cycle length of 250 msec, MAPD_{90} was not significantly reduced from 127.2 ± 2.9 to 125.6 ± 3.2 ($P > 0.05$, N.S.) with vitamin K $1.15 \mu\text{mol/L}$ (2.5 mg/L), but increased from 122.5 ± 2.5 to 129.0 ± 2.5 ($P < 0.05$) with vitamin K $2.3 \mu\text{mol/L}$ (5 mg/L). MAPD_{90} was not measurable when vitamin K $4.6 \mu\text{mol/L}$ (10 mg/L) was used due to conduction block in all of the hearts tested. Clear reductions in action potential amplitudes observed at low concentration vitamin K (1.15 - $2.3 \mu\text{mol/L}$) are also consistent with these conduction blocks observed at higher concentration ($4.6 \mu\text{mol/L}$). Examples of monophasic action potentials recorded at baseline and during perfusion of vitamin K 1.15 and $2.3 \mu\text{mol/L}$, at a pacing cycle length of 250 msec, are illustrated in Figure 1.

Patch-Clamp Experiments

Repolarizing potassium currents

Figure 2A 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 (Baseline) and in the presence of vitamin K $10 \mu\text{mol/L}$. Under these conditions, I_{Kr} represents the major component of I_{K250} activating and tail currents (34). In this cell, activating and tail currents recorded under control conditions were significantly reduced by

vitamin K 10 $\mu\text{mol/L}$. Inhibition of I_{K250} tail current was assessed by exposing myocytes ($n=10$ at each concentration) to vitamin K 1, 3, 10, 30 or 100 $\mu\text{mol/L}$. Tail current amplitude was measured as the difference between the peak current recorded just after the step to 0 mV and steady-state current recorded at -40 mV. Block of I_{K250} tail current by vitamin K was concentration-dependent. Figure 2B reports tail current amplitude plotted as a function of vitamin K concentration. Data were fitted with the Hill equation, giving a half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 2.6 ± 0.3 $\mu\text{mol/L}$, with a Hill coefficient of 0.93. Figure 3A shows a typical 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 (Baseline) and in the presence of vitamin K 10 $\mu\text{mol/L}$. Under these conditions, I_{Ks} represents the major component of I_{K5000} activating and tail currents (34). Activating and tail currents recorded under control conditions were only modestly reduced by vitamin K 10 $\mu\text{mol/L}$. Inhibition of I_{K5000} tail current was assessed by exposing myocytes ($n=10$ at each concentration) to vitamin K 1, 3, 10, 30 or 100 $\mu\text{mol/L}$. Tail current amplitude was measured as the difference between the peak current recorded just after the step to +50 mV and steady-state current recorded at -40 mV. Block of I_{K5000} tail current by vitamin K was concentration-dependent. Figure 3B reports tail current amplitude plotted as a function of vitamin K concentration. Data were fitted with the Hill equation, giving an estimated half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) over 100 $\mu\text{mol/L}$, with a Hill coefficient of 0.83. The exact IC_{50} was not determined due to lack of clinical relevance for such high concentrations of the drug.

Depolarizing sodium current

Figure 4A illustrates a typical example of sodium current recordings elicited by a 30 msec pulse to -40 mV from a holding potential of -120 mV under control conditions, after 10 minutes of exposure to vitamin K 10 $\mu\text{mol/L}$, and after a 15-minute washout period in a guinea pig ventricular myocyte. Vitamin K caused a significant decrease in peak I_{Na} in all cells ($n=5$) exposed to the drug. Figure 4B shows the current-voltage relation for I_{Na} (mean \pm S.E.M. for 5 cells) under control conditions and in the presence of vitamin K 10 $\mu\text{mol/L}$. The drug produced statistically significant reductions in peak I_{Na} at voltages -40 and -30 mV ($P<0.05$).

Discussion

Results obtained in this study clearly indicate that vitamin K possesses direct cardiac electrophysiological effects on major ionic currents involved in cardiac depolarization and repolarization. Patch-clamp experiments revealed block of I_{Na} and I_{Kr} in guinea pig ventricular myocytes at clinically relevant concentrations of vitamin K. Moreover, exposure of isolated, buffer-perfused guinea pig hearts to vitamin K was associated with concentration-dependent Class Ia effects on action potential. Our results provide an explanation for cardiovascular collapses and syncopes observed during treatment with the drug.

In isolated guinea pig ventricular myocytes, the estimated IC_{50} for I_{K250} following a test pulse to 0 mV was 2.6 ± 0.3 $\mu\text{mol/L}$. It has previously been shown that time-dependent outward current activated by short (250 msec) pulses to low depolarizing potentials (0 mV), and the tail current elicited under these conditions with repolarization, represents mainly I_{Kr} ; whereas current activated by long (5000 msec) pulses to high depolarizing potentials (+50 mV) represents mainly I_{Ks} (34). Vitamin K 10 $\mu\text{mol/L}$ also reduced by $\approx 50\%$ the inward peak sodium current following a test pulse to -40 mV. Sodium current block by vitamin K was voltage-dependent, the effect of the drug being more important and statistically significant at voltage -30 and -40 mV ($P < 0.05$).

In guinea pig isolated hearts, vitamin K 1.15 $\mu\text{mol/L}$ causes a small reduction of MAPD_{90} , likely to be due to sodium current block, whereas vitamin K 2.3 $\mu\text{mol/L}$ slightly prolongs MAPD_{90} , suggesting a progressive concentration-dependent blocking effect on potassium currents, in addition to sodium current block. In every experiments with vitamin K 4.6 $\mu\text{mol/L}$ ($n=7$),

conduction block occurred, preventing us from measuring MAPD_{90} and appreciating the effect of a stronger block of potassium currents on cardiac repolarization. Obviously, these conduction blocks are consistent with the reductions of action potential amplitudes observed at lower (1.15-2.3 $\mu\text{mol/L}$) concentration of the drug and are strongly suggestive of an important blocking effect on the sodium current at higher concentrations of vitamin K, such as demonstrated in isolated myocytes with the patch-clamp technique.

In conclusion, results obtained in this study demonstrated that vitamin K has direct cardiac electrophysiological effects. The drug significantly blocks the cardiac sodium current (I_{Na}) and the rapid component of the delayed rectifier potassium current (I_{Kr}), providing an explanation to the observed electrophysiological effects on the action potential (Class Ia effect). Effects were observed at drug concentrations achieved during intravenous administration of therapeutic doses ($\approx 1.5 \mu\text{mol/L}$) (35). Clinical awareness is warranted in susceptible patients such as those suffering from congenital long QT syndrome, for whom a small effect on cardiac repolarization may be clinically relevant. Moreover, these results remind the growing concern about patients who are especially sensitive to sodium channel blockade, such as those with a Brugada-like ECG pattern and idiopathic VT/VF, and who would be at exceptionally high risk from a potent sodium channel blocker.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Medical Research Council (MRC) of Canada (MT-11876) and an operating grant from the Heart and Stroke Foundation of Quebec. Benoit Drolet is the recipient of studentships from the Heart and Stroke Foundation of Canada and the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR). Annie Emond and Vincent Fortin were recipients of summer research studentships from the MRC/Pharmaceutical Manufacturers Association of Canada. Dr Daleau is the recipient of a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Dr Rousseau is the recipient of a scholarship from the MRC/Canadian Hypertension Society. Dr Turgeon was the recipient of a scholarship from the Joseph C. Edwards Foundation. The authors also thank Michel Blouin, Lynn Atton and Chantal de Montigny for technical assistance. This work was presented in part at the 20th Annual Scientific Sessions of the North American Society of Pacing and Electrophysiology, Toronto, Canada, May 1999.

References

1. Johnson BC. Post-translational carboxylation of prethrombin. *Molec Cell Biochem* 38:77, 1981
2. Udall JA. Don't use the wrong vitamin K. *Cal Med* 112:65, 1970
3. Songy KA, Layon AJ. Vitamin K-induced cardiovascular collapse. *J Clin Anesth* 9:514, 1997
4. Barash P, Kitahata LM, Mandel S. Acute cardiovascular collapse after intravenous phytonadione. *Anesth Analg* 55:304, 1976
5. Rich EC, Drage CW. Severe complications of intravenous phytonadione therapy. Two cases, with one fatality. *Postgrad Med* 72:303, 1982
6. Pelletier G, Attali P, Ink O. Arrêt cardiorespiratoire après injection intraveineuse de vitamine K1. *Gastroenterol Clin Biol* 10:615, 1986
7. Lefrere JJ, Girot R. Acute cardiovascular collapse during intravenous vitamin K1 injection. *Thromb Haemost* 58:790, 1987
8. Havel M, Muller M, Graninger W, Kurz R, Lindemayr H. Tolerability of a new vitamin K1 preparation for parenteral administration to adults: one case of anaphylactoid reaction. *Clin Ther* 9:373, 1987
9. de la Rubia J, Grau E, Montserrat I, Zuazu I, Paya A. Anaphylactic shock and vitamin K1. *Ann Intern Med* 110:943, 1989

10. Koh KK, Rim MS, Yoon J, Kim SS. Torsade de pointes induced by terfenadine in a patient with long QT syndrome. *J Electrocardiol* 27:343, 1994
11. Craft TM. Torsades de pointes after astemizole overdose. *Br Med J* 292:660, 1986
12. Guelon D, Bedock B, Chartier C, Haberer JP. QT prolongation and recurrent "torsades de pointes" during erythromycin lactobionate infusion. *Am J Cardiol* 58:666, 1986
13. Pettignano R, Chambliss CR, Darsey E, Heard M, Clark R. Cisapride-induced dysrhythmia in a pediatric patient receiving extracorporeal life support. *Crit Care Med* 24:1268, 1996
14. Lin JC, Quasny HA. QT prolongation and development of torsades de pointes with the concomitant administration of oral erythromycin base and quinidine. *Pharmacotherapy* 17:626, 1997
15. Arstall MA, Hii JTY, Lehman RG, Horowitz JD. Sotalol-induced torsade de pointes: management with magnesium infusion. *Postgrad Med J* 68:289, 1992
16. Kemper AJ, Dunlap R, Pietro DA. Thioridazine-induced torsades de pointes: successful therapy with isoproterenol. *JAMA* 249:2931, 1983
17. 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 dropéridol. *Ann Cardiol Angéiol* 40:541, 1991

18. Zareba W, Moss AJ, Rosero SZ, Hajj-Ali R, Konecki J, Andrews M. Electrocardiographic findings in patients with diphenhydramine overdose. *Am J Cardiol* 80:1168, 1997
19. Woosley RL, Chen Y, Freiman JP, Gillis RA. Mechanism of the cardiotoxic actions of terfenadine. *JAMA* 269:1532, 1993
20. 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* 91:3010, 1995
21. 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* 97:204, 1998
22. Khalifa M, Daleau P, Turgeon J. Mechanism of sodium channel block by venlafaxine in guinea pig ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 291:280, 1999
23. Snyders DJ, Hondeghem LM. Effects of quinidine on the sodium current of guinea pig ventricular myocytes. Evidence for a drug-associated rested state with altered kinetics. *Circ Res* 66:565, 1990
24. Roden DM, Bennett PB, Snyders DJ, Balser JR, Hondeghem LM. Quinidine delays I_K activation in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* 62:1055, 1988

25. Komeichi K, Tohse N, Nakaya H, Shimizu M, Zhu MY, Kanno M. Effects of N-acetylprocainamide and sotalol on ion currents in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 187:313, 1990
26. Vorperian VR, Zhou Z, Mohammad S, Hoon TJ, Studenik C, January CT. Torsade de pointes with an antihistamine metabolite: potassium channel blockade with desmethylastemizole. *J Am Coll Cardiol* 28:1556, 1996
27. Khalifa M, Drolet B, Daleau P, Lefez C, Gilbert M, Plante S, O'Hara GE, Gleeton O, Hamelin BA, Turgeon J. Block of potassium currents in guinea pig ventricular myocytes and lengthening of cardiac repolarization in man by the histamine H1 receptor antagonist diphenhydramine. *J Pharmacol Exp Ther* 288:858, 1999
28. 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 blocking the delayed rectifier potassium current. *J Pharmacol Exp Ther* 288:1261, 1999
29. 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* 10:1597, 1999

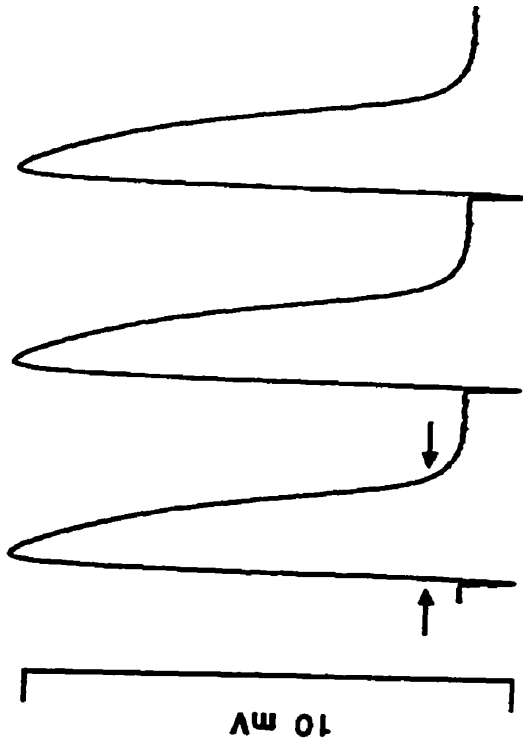
30. Colatsky TJ. Mechanisms of action of lidocaine and quinidine on action potential duration in rabbit cardiac Purkinje fibers. *Circ Res* 50:17, 1982
31. Roden DM. The long QT syndrome and torsades de pointes: basic and clinical aspects. In El-Sherif N, Samet P (eds). *Cardiac Pacing and Electrophysiology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 265-284, 1991
32. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Role of Ca^{2+} and K^{+} in gating the cardiac delayed rectifier K^{+} currents. *Pflügers Arch* 420:180, 1992
33. Srivastava MS, Carter EM. *An introduction to applied multivariate statistics*. Elsevier Science Publishing Co Inc, New York, 1983
34. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Two components of cardiac delayed rectifier K^{+} current: Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 96:195, 1990
35. Soedirman JR, De Bruijn EA, Maes RAA, Hanck A, Grüter J. Pharmacokinetics and tolerance of intravenous and intramuscular phylloquinone (vitamin K1) mixed micelles formulation. *Br J Clin Pharmacol* 41:517, 1996

Figure legends

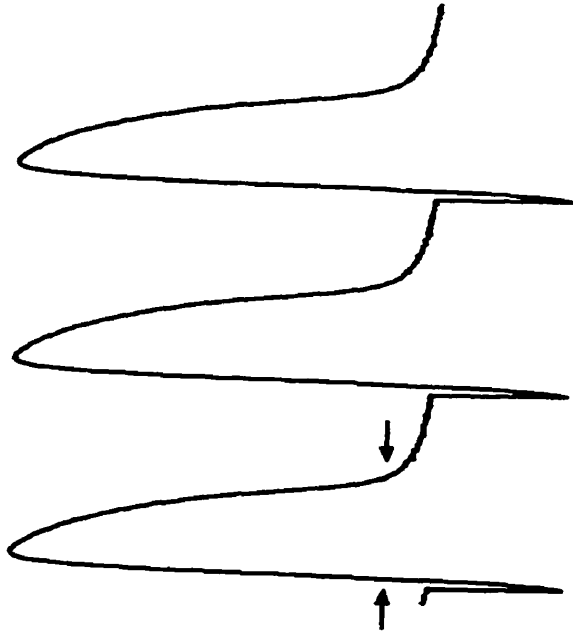
- Figure 1** Figure 1 shows recordings of monophasic action potential signals during a baseline period (Control; upper panels) and after 15 minutes of exposure to vitamin K 1.15 $\mu\text{mol/L}$ (lower left panel) or 2.3 $\mu\text{mol/L}$ (lower right panel) at a pacing cycle length of 250 msec.
- Figure 2** Panel A shows recordings of membrane currents elicited by short pulses (I_{K250}) to 0 mV at baseline (BAS) and during exposure to vitamin K 10 $\mu\text{mol/L}$. Panel B shows normalized tail current amplitude recorded at -40 mV following a test pulse to 0 mV. Control data and data obtained at five concentrations of vitamin K ($n=10$ cells/concentration) are shown. The estimated IC_{50} for the tail current is 2.6 ± 0.3 $\mu\text{mol/L}$ (Hill coefficient 0.93).
- Figure 3** Panel A shows recordings of membrane currents elicited by long pulses (I_{K5000}) to +50 mV at baseline (BAS) and during exposure to vitamin K 10 $\mu\text{mol/L}$. Panel B shows normalized tail current amplitude recorded at -40 mV following a test pulse to +50 mV. Control data and data obtained at five concentrations of vitamin K ($n=10$ cells/concentration) are shown. The estimated IC_{50} for the tail current is over 100 $\mu\text{mol/L}$ (Hill coefficient 0.83).

Figure 4 Panel A shows a typical example of sodium current recordings elicited by a 30 msec pulse to -40 mV from a holding potential of -120 mV under control conditions, after 10 minutes of exposure to vitamin K 10 $\mu\text{mol/L}$ and after a 15-minute washout period in a guinea pig ventricular myocyte. Panel B shows the current-voltage relation for I_{Na} (mean \pm S.E.M. for 5 cells) under control conditions and in the presence of vitamin K 10 $\mu\text{mol/L}$.

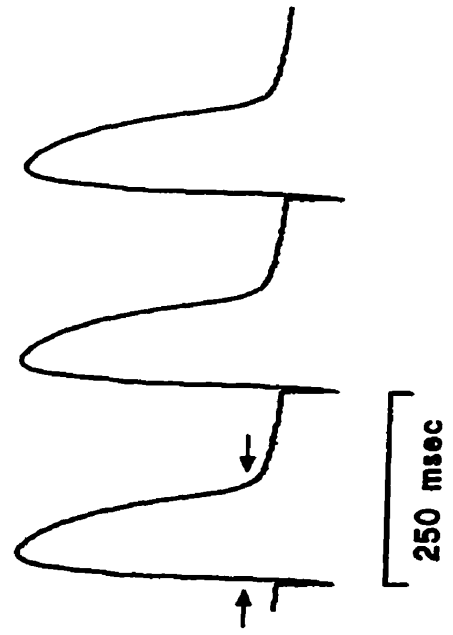
Control



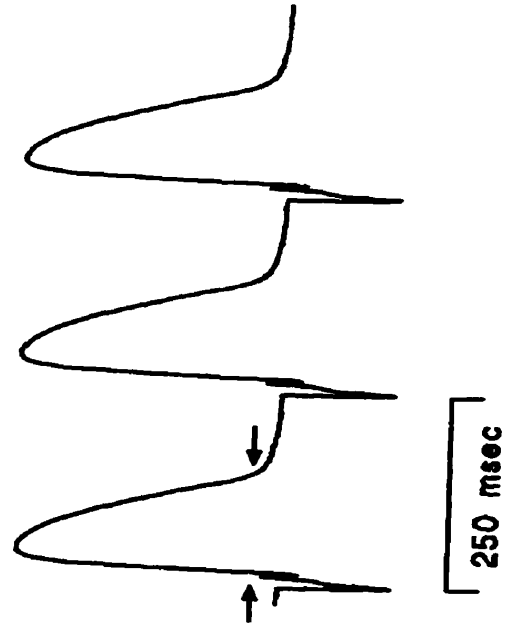
Control

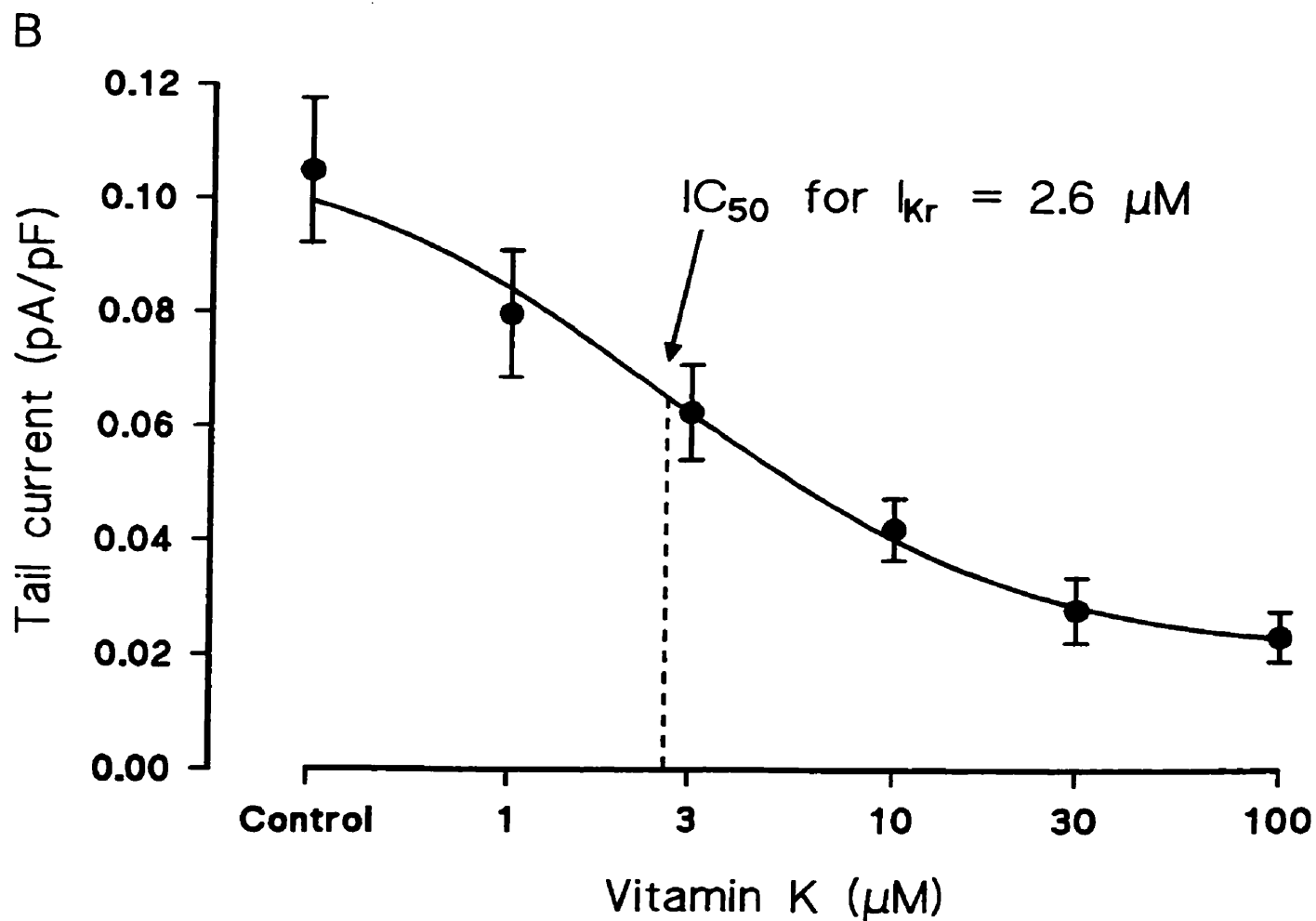
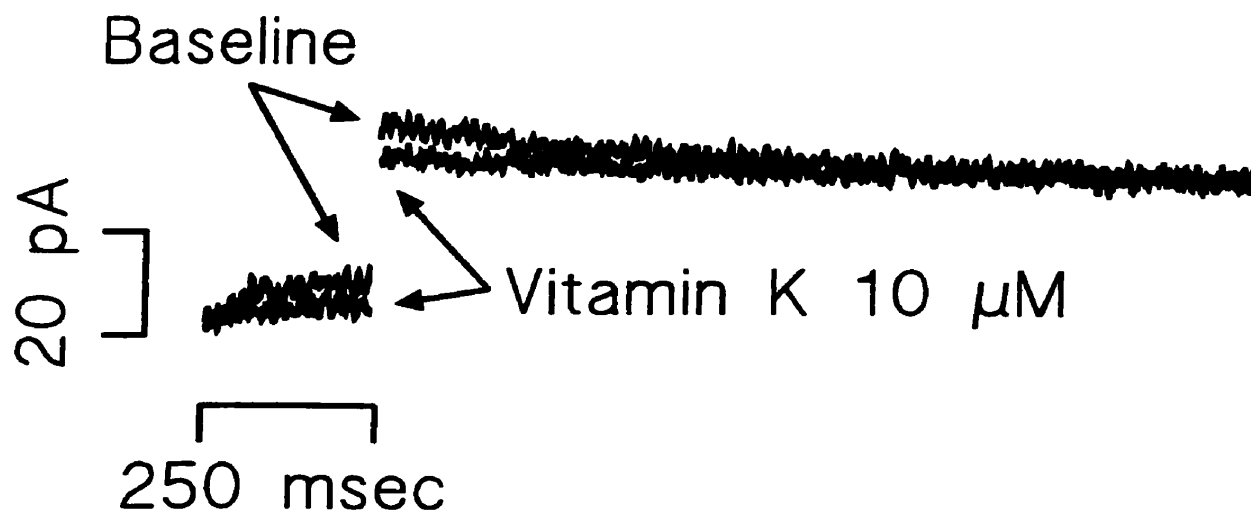


Vitamin K 1.15 μ M

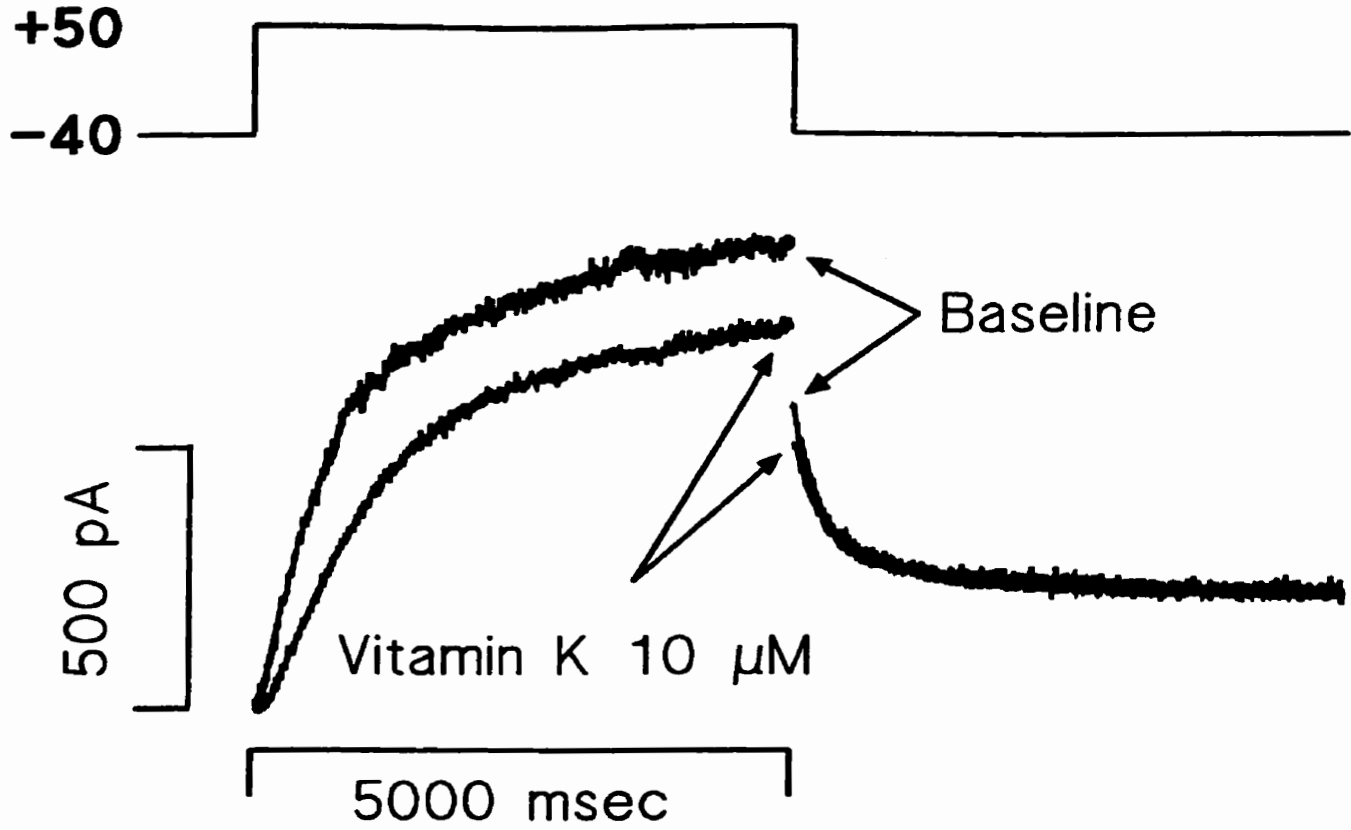


Vitamin K 2.3 μ M

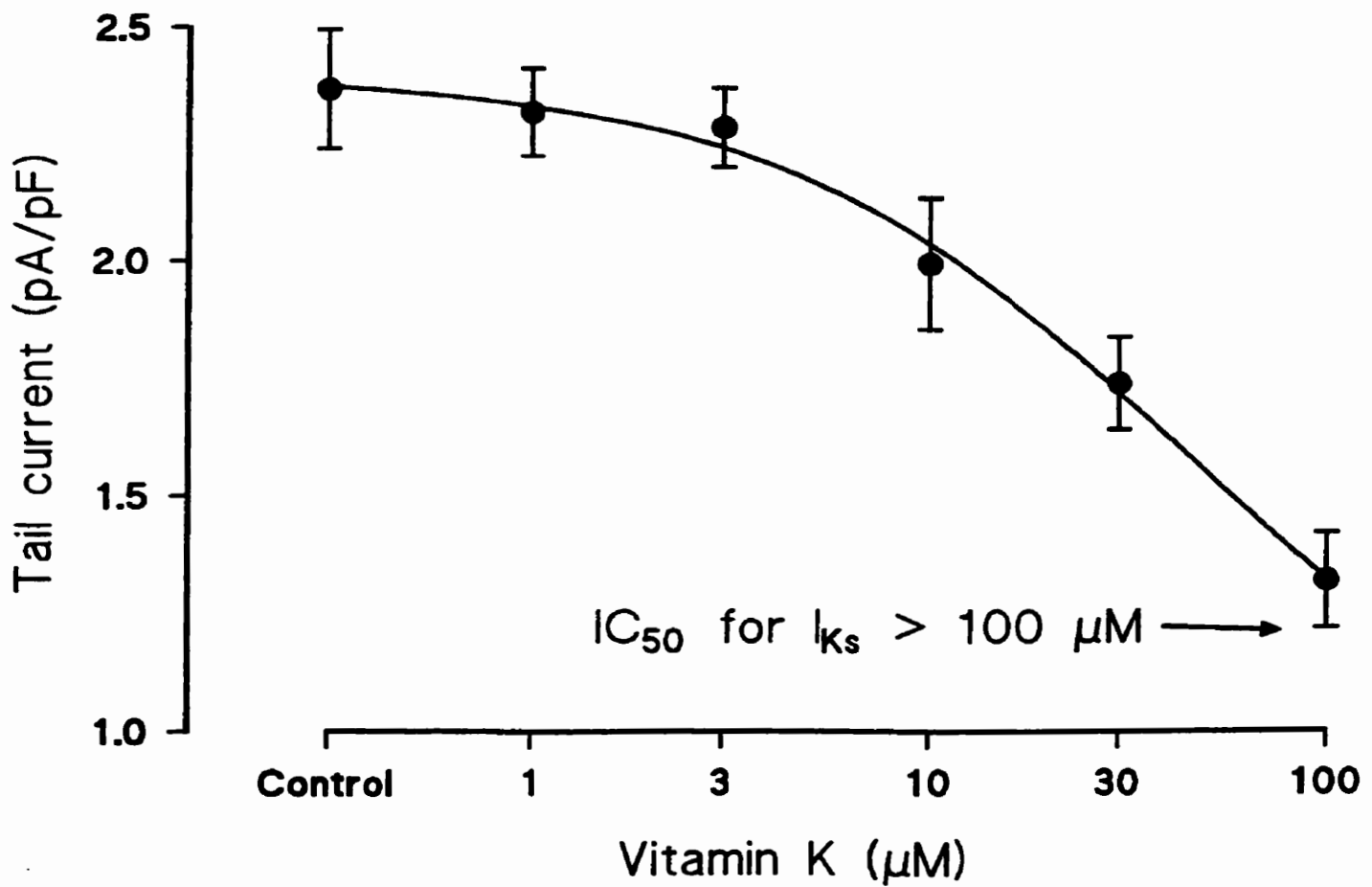


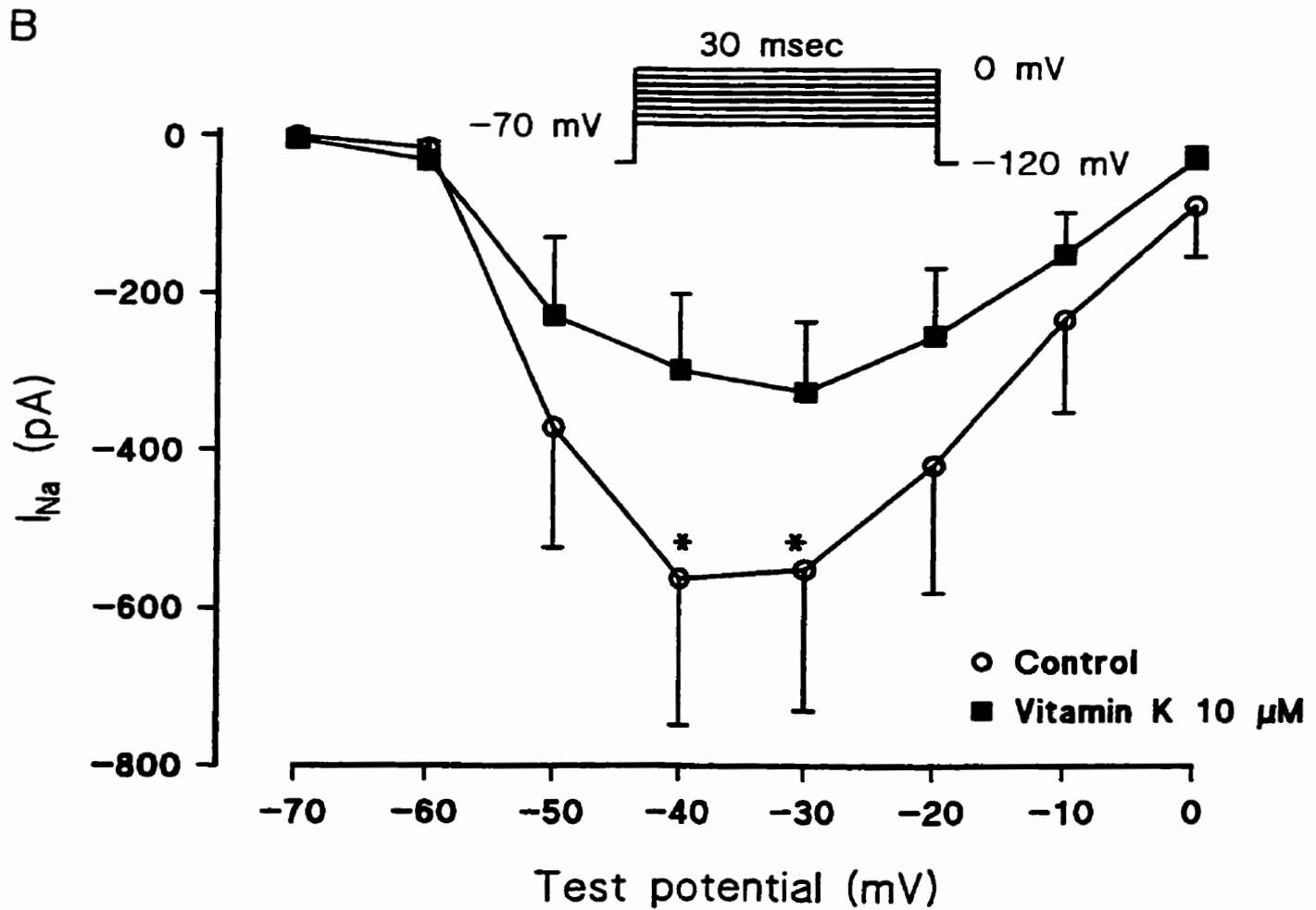
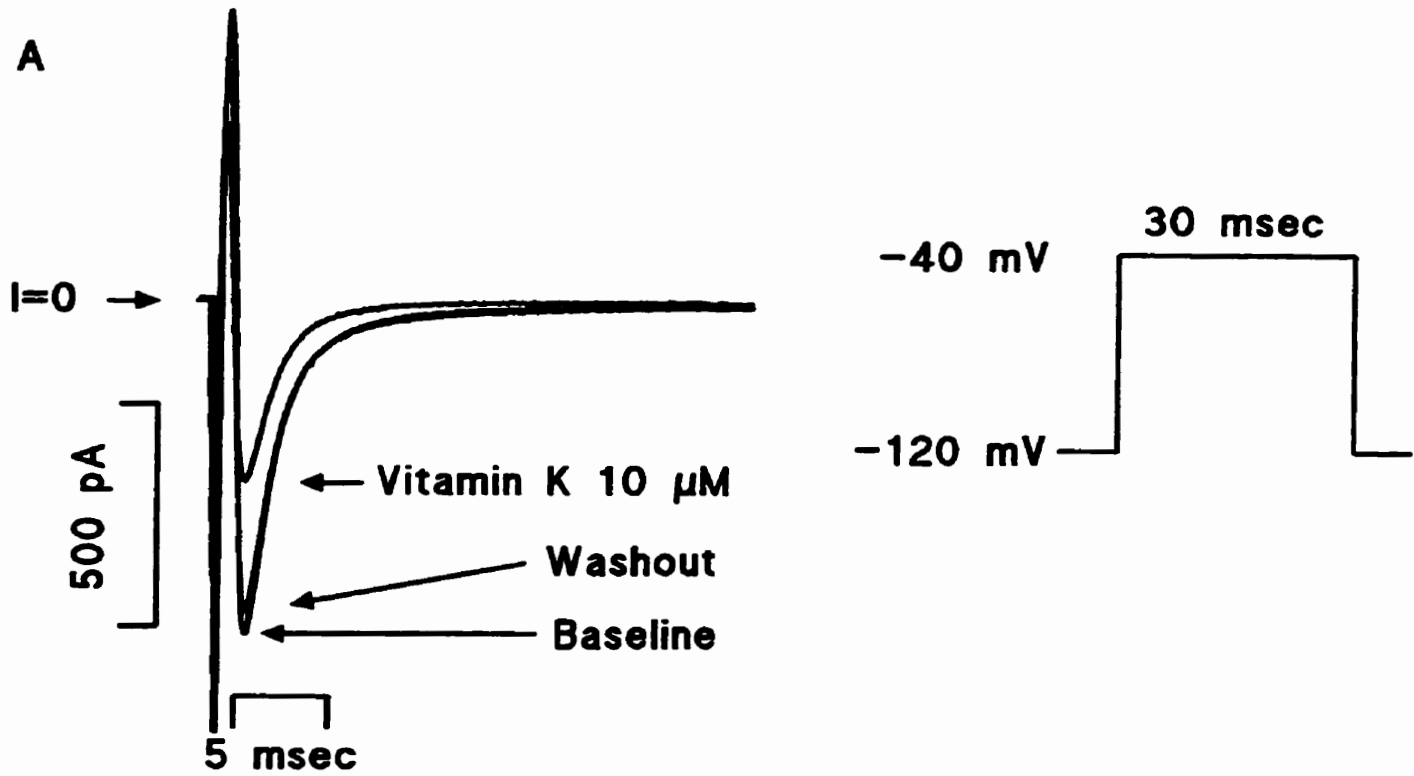


A



B





CHAPITRE 6

PIMOZIDE (ORAP®) PROLONGS CARDIAC REPOLARIZATION BY BLOCKING THE RAPID COMPONENT OF THE DELAYED RECTIFIER POTASSIUM CURRENT IN NATIVE CARDIAC MYOCYTES

Résumé

Plusieurs cas de prolongation de l'intervalle QT et de tachyarythmies ventriculaires ont été rapportés suite à l'administration du pimozide, un puissant neuroleptique utilisé dans le traitement des tics moteurs et verbaux associés au syndrome Gilles de la Tourette. Afin d'élucider les mécanismes électrophysiologiques cardiaques à la base de ces observations cliniques, nous avons examiné les effets du pimozide sur la durée du potentiel d'action monophasique mesurée à 90% de repolarisation (MAPD₉₀) et sur les courants potassiques impliqués dans la repolarisation de myocytes ventriculaires isolés de cobaye.

Des expériences effectuées sur 8 cœurs isolés de cobaye ont démontré une prolongation de la repolarisation cardiaque inversement proportionnelle à la fréquence de stimulation sous l'effet du pimozide 100 nmol/L. En fait, la durée du potentiel d'action s'est accrue de 24% (115±2 à 142±4 msec) sous l'effet du pimozide 100 nmol/L à un cycle de stimulation de 250 msec, mais de seulement 10% (97±2 à 107±3 msec) à un cycle de stimulation de 150 msec. Des expériences effectuées sur des myocytes ventriculaires isolés de cobaye (n=20) ont démontré un blocage concentration-dépendant de la composante rapide du courant potassique rectifiant retardé (I_{Kr}) par le pimozide: le courant de queue est diminué de 50% à 15 nmol/L.

Le pimozide possède des effets électrophysiologiques cardiaques similaires à ceux des antiarythmiques de classe III. Ces effets sont concentration-dépendants et observés à des concentrations thérapeutiques du médicament. Puisque le pimozide est fortement métabolisé par le CYP3A4, une attention

particulière devrait être portée afin d'éviter de potentielles interactions pharmacocinétiques menant à de fortes concentrations de pimozide et à la pro-arythmie.

**PIMOZIDE (ORAP[®]) PROLONGS CARDIAC REPOLARIZATION BY
BLOCKING THE RAPID COMPONENT OF THE DELAYED
RECTIFIER POTASSIUM CURRENT IN NATIVE CARDIAC
MYOCYTES**

Benoit Drolet, M.Sc.^{1,2,4}, Guy Rousseau, Ph.D.^{4,5}, Pascal Daleau, Ph.D.^{1,3},
René Cardinal, Ph.D.^{4,5}, Chantale Simard, M.Sc.⁶, Jacques Turgeon, Ph.D.^{1,4,6}

A. Institut de cardiologie de Québec, Hôpital Laval¹ et Facultés de Pharmacie²
et de Médecine³, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Canada G1V 4G5

B. Centre de Recherche, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal⁴, Département
de Pharmacologie, Faculté de Médecine⁵ et Faculté de Pharmacie⁶, Université
de Montréal, Montréal, Québec, Canada H4J 1C5

Short title : Drolet et al., *Pimozide blocks cardiac I_{Kr}*

Address for correspondence : Jacques Turgeon, Ph.D.

Dean, Faculty of Pharmacy

University of Montreal,

C.P. 6128 succursale Centre-ville

Montreal QC Canada H3C 3J7

Tel : (514) 343-6440

Fax : (514) 343-7377

E-mail : jacques.turgeon@umontreal.ca

Supported by : Medical Research Council of Canada (MT-11876) and Heart
and Stroke Foundation of Quebec

April 6, 2001

Abstract

Background: Several cases of QT prolongation and ventricular tachyarrhythmia have been reported with pimozide, a potent neuroleptic useful in the management of motor and phonic tics associated with Tourette's syndrome. To further elucidate the mechanism underlying these clinical observations, we examined the effects of pimozide on monophasic action potential duration (MAPD₉₀) and on potassium currents involved in the repolarization of native isolated ventricular myocytes.

Methods and Results: Studies were undertaken in 8 isolated guinea pig hearts which demonstrated reverse rate-dependent prolongation of cardiac repolarization by pimozide 100 nmol/L. Action potential duration increased 24% from baseline 115±2 to 142±4 msec with pimozide 100 nmol/L during pacing at 250 msec cycle length, while a 10% increase from 97±2 to 107±3 msec was seen with pacing at a cycle length of 150 msec. Experiments in native isolated ventricular myocytes (n=20) demonstrated concentration-dependent block of the rapid component (I_{Kr}) of the delayed rectifier potassium current: tail current was decreased by 50% at 15 nmol/L.

Conclusions: Pimozide possesses cardiac electrophysiological effects similar to those of Class III antiarrhythmic drugs. These effects are concentration-dependent and observed at recommended dosages of the drug. Since pimozide is strongly metabolized by CYP3A4, special care should be taken to avoid potential pharmacokinetic interactions leading to high plasma levels of pimozide and proarrhythmia.

Key words pimozide • potassium currents • repolarization • cardiac arrhythmia

Introduction

Pimozide (Orap®) is a neuroleptic agent that is the only alternative to haloperidol approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of Tourette disorder and it is widely prescribed in other countries for the treatment of schizophrenia and various psychiatric disorders (1). However, a number of reports have been published linking the use of pimozide with significant prolongation of the QT interval and ventricular arrhythmias (2-6).

Some cardiotoxic events have been associated with high doses of the drug, or with the concomitant use of drugs which slow the metabolism of pimozide, such as macrolide antibiotics (4,5). However, the very low doses of pimozide required to produce QT interval prolongation (7.5 mg/day) (2), were suggesting a high affinity interaction with one or more types of cardiac K⁺ channels. As a matter of fact, Kang et al. recently showed that pimozide was a potent inhibitor of the HERG channel (rapid component of the delayed rectifier), displaying an IC₅₀ value of 18 nmol/L. In contrast, pimozide (10 μmol/L) was found to have low affinity for both the KvLQT1/minK (slow component of the delayed rectifier) and the Kv 1.5 (ultra-rapid delayed rectifier) channels (7).

Interestingly, the K⁺ channel-modulating effects of pimozide on native isolated cardiac myocytes as well as the effects of the drug on monophasic action potential evaluated from isolated hearts have not been shown yet.

Therefore, the goal of the present studies was to evaluate 1) the action potential-modulating effects of pimozide in isolated guinea pig hearts perfused in the Langendorff mode using a monophasic action potential signal measured at 90% repolarization (MAPD_{90}) as an index of cardiac repolarization; and 2) the effects of pimozide on potassium currents involved in repolarization of guinea pig ventricular myocytes, using the whole cell configuration of the patch-clamp technique.

Methods

Experiments were performed in accordance with institutional guidelines of Laval University 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.

Experiments With Buffer-Perfused Guinea Pig Isolated Hearts

Experiments with isolated guinea pig hearts were performed as described previously (8). The hearts were perfused with Krebs-Henseleit buffer during a control period of 10 minutes, followed by 15 minutes with buffer containing 100 nmol/L of pimozide dissolved in 1 mL of dimethylsulfoxide (DMSO). Perfusion with buffer containing no drug was then restarted during a 10-minute washout period. The same concentration of DMSO (0.1% v/v) was also present in baseline and washout buffer solutions. Monophasic action potentials from the left ventricle were recorded by a pressure-maintained catheter every 60 seconds during 3 seconds, at basic pacing cycle lengths (BCL) of 250, 200 and 150 msec. Monophasic action potential duration measured at 90% repolarization (MAPD₉₀) was determined by using a multi-steps process in which time-dependent windows were searched for the relevant data. The four factors required for each beat to determine MAPD₉₀ were: 1) Baseline (0%): average of the last 20 msec segment of data preceding the next pace pulse. 2) Peak depolarization (100%): 5 msec average of peak located between dV/dt max and dV/dt max + 60 msec. This eliminates false peaks as a result of a preceding spike in less filtered data or an EAD's peak occurring in the same data. 3) MAPD₉₀ start time: search backwards in time from dV/dt max to locate 10% above baseline value. 4) MAPD₉₀ end time: search forward from peak

depolarization to locate 10% above baseline value. All beats in a 3-second data segment were analysed using the above procedure and a statistical analysis provided averages and S.D. values.

Patch-Clamp Experiments

Guinea pig ventricular myocyte preparation, solutions and electrophysiological measurements

Experiments were performed on single ventricular myocytes obtained from adult guinea pig hearts as described previously (8). Cells were superfused continuously with the extracellular solution containing (in mM) NaCl 145, KCl 4, MgCl₂ 1, HEPES 10 and glucose 5. Nisoldipine (Bayer Leverkusen, Germany) 0.2 μmol/L was added to eliminate the slow calcium inward current and Ca²⁺ was omitted in the extracellular solution to shift I_{Ks} activation to positive potentials (9). The pH was adjusted to 7.35 with NaOH. The cells were prewarmed at 30°C by a Peltier device (Medical System Corp., Greenvale, NY). Pimozide solution of 3-100 nmol/L was prepared daily by dissolving required amount of pimozide pure substance (Sigma, St.Louis, MO) in 100 μL of DMSO. The same concentration of DMSO (0.1% v/v) was also present in baseline and washout extracellular solutions. Complete replacement of extracellular solution contained in the chamber was achieved within 2 to 3 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 at 30°C as described previously (8). The pipette solution contained (in mM) MgCl₂ 2, CaCl₂ 1, EGTA 11, MgATP 5, K₂ATP 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. Effects of pimozide on the rapidly (I_{Kr}) and slowly (I_{Ks}) activating component of I_K

were studied in cells held at -40 mV (to inactivate I_{Na}) and depolarized by pulses lasting 250 msec (I_{K250}) or 5000 msec (I_{K5000}). Test potentials of depolarizing pulses varied between -20 and +50 mV. I_{Kr} and I_{Ks} were measured from the peak magnitude of tail current obtained on repolarization to -40 mV.

Statistical Analyses

Buffer-perfused isolated hearts Only hearts with reversal of pimozide effects on reperfusion with buffer containing no drug were included in the analysis. Data on the magnitude of pimozide effects were analysed with a Student's paired-*t* test. All values are expressed as mean \pm S.E.M. Level of statistical significance was set at $P < 0.05$.

Guinea pig ventricular myocytes Data are presented as mean \pm S.E.M.. Concentration-dependent block of I_{K250} and I_{K5000} tail currents was tested by Hotelling's T^2 test (10). Level of statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Experiments With Buffer-Perfused Guinea Pig Isolated Hearts

Examples of monophasic action potentials recorded at baseline and during perfusion with pimoziide 100 nmol/L at a BCL of 250 msec are illustrated in Figure 1A. Experiments in isolated hearts (n=8) showed an increase in monophasic action potential duration measured at 90% repolarization (MAPD₉₀) during perfusion with pimoziide 100 nmol/L. (Figure 1B): At a BCL of 250 msec, MAPD₉₀ increased from 115±2 msec at baseline to 142±4 msec after 15 minutes of drug perfusion ($P<0.05$), decreasing back to 135±4 msec after 10 minutes of washout. At a BCL of 200 msec, MAPD₉₀ increased from 111±2 msec at baseline to 129±4 msec after 15 minutes of drug perfusion ($P<0.05$), decreasing back to 123±4 msec after 10 minutes of washout. Finally, at the shortest BCL of 150 msec, MAPD₉₀ increased from 97±2 at baseline to 107±3 msec after pimoziide perfusion ($P<0.05$), returning towards baseline after washout (102±2 msec). Thus, pimoziide was associated with a 24% increase in MAPD₉₀ at the longest BCL and with a 10% increase at the shortest BCL. Such reverse use-dependent characteristics are typically seen with I_{Kr} blockers.

Patch-Clamp Experiments

Figure 2A 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 (Baseline) and in the presence of pimoziide 100 nmol/L. Under these conditions, I_{Kr} represents the major component of I_{K250} activating and tail currents (11). In this cell, activating and tail currents recorded

under control conditions were significantly reduced by pimozide 100 nmol/L. Inhibition of I_{K250} tail current was assessed by exposing myocytes ($n=4$ at each concentration) to pimozide 3, 10, 30 or 100 nmol/L. Tail current amplitude was measured from the peak current recorded just after the step from 0 mV, back to -40 mV. Block of I_{K250} tail current by pimozide was concentration-dependent. Figure 2C reports tail current amplitude plotted as a function of pimozide concentration. Data were fitted with the Hill equation, giving a half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 15 nmol/L, with a Hill coefficient of 0.95. Figure 2B shows a typical 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 (Baseline) and in the presence of pimozide 100 nmol/L. Under these conditions, I_{Ks} represents the major component of I_{K5000} activating and tail currents (11). Activating and tail currents recorded under control conditions were only slightly reduced by pimozide 100 nmol/L. Tail current amplitude was measured from the peak current recorded just after the step from $+50$ mV, back to -40 mV. Figure 3A illustrates the I/V relationship of I_{K250} tail current measured at baseline and in myocytes exposed to 10 or 100 nmol/L pimozide ($n = 4$ cells/concentration). Inhibition of I_{K250} tail current was concentration-dependent but voltage-independent. Figure 3B illustrates the I/V relationship of I_{K5000} tail current measured at baseline and in myocytes exposed to 10 or 100 nmol/L pimozide ($n = 4$ cells/concentration). Inhibition of I_{K5000} tail current was concentration-dependent but voltage-independent.

Discussion

Our results indicate that pimozone prolongs cardiac repolarization in a reverse rate-dependent manner by a selective block of I_{Kr} . In fact, we showed, in isolated buffer-perfused hearts, that pimozone 100 nmol/L causes a significant prolongation of cardiac repolarization ($\approx 25\%$). We also showed in ventricular native myocytes that pimozone is a potent and selective blocker (IC_{50} of 15 nmol/L) of the rapid component of the delayed rectifier (I_{Kr}).

Kang et al. recently showed high affinity blockade (IC_{50} of 18 nmol/L) of the HERG cardiac K^+ channel by pimozone. In contrast, they also showed that pimozone (10 μ mol/L) is a weak inhibitor of the KvLQT1/minK channel (7). Our results are in complete agreement with these findings and provide further explanations for QT lengthening and proarrhythmia observed during treatment with therapeutic concentrations (4-20 ng/mL or 9-43 nmol/L) of the drug (12).

Moreover, concentration-dependent block of I_{Kr} by pimozone explains cardiac toxicity observed in patients after overdosing. In other patients, the unheralded nature of pimozone-induced cardiac toxicity may be explained by increased plasma concentrations of the drug (due to either physiologically reduced clearance of pimozone or inhibition of its metabolism by other drugs).

Indeed, Flockhart et al. conducted a computer-assisted search of the FDA's Spontaneous Reporting System (SRS) between October 1991 and May 1995 to identify reports of adverse drug interactions during concomitant administration of pimozone and clarithromycin. For pimozone, the SRS search for cardiac arrhythmias revealed 39 unduplicated cases. The events included QTc prolongation, cardiac arrest, ECG abnormalities and syncope. Of the

cardiovascular arrhythmic events documented, pimozide was the singular drug suspect in 11 cases. For serious events reported, death was the outcome in 10 cases. Not all doses were in the high range (>10 mg/day), and positive dechallenge was noted in 18 cases (5).

Drug metabolism studies have demonstrated that CYP3A4 is the principal enzyme involved in the biotransformation of pimozide, catalysing its *N*-dealkylation (13). Interestingly, clarithromycin, a known inhibitor of CYP3A's in the liver and the gut (4) was shown to be a strong inhibitor of this *N*-dealkylation (14). Other macrolide antibiotics as well as imidazole derivatives are well-known inhibitors of the cytochrome P450 system and more specifically, of CYP3A4 (15,16). Therefore, under conditions of decreased CYP3A4 activity, plasma concentrations of pimozide are expected to rise significantly. Indeed, a pimozide plasma concentration as high as 50 ng/mL (108 nmol/L) was measured in a case of fatal clarithromycin-pimozide interaction (5).

Cardiac toxicity observed during overdosing or limited clearance of the drug supports the concept that arrhythmogenic effects of pimozide are concentration-dependent. Results obtained in this study are in agreement with this statement. In fact, we demonstrated a concentration-dependent decrease in a major current involved in cardiac repolarization, namely, I_{Kr} . Estimated IC_{50} for I_{Kr} (15 nmol/L) is in the same range as the mean peak plasma concentration (C_{max}) of 10 nmol/L measured in patients during the administration of usual doses (6 mg) of pimozide alone (4). Consequently, as demonstrated by Desta et al., lengthening of cardiac repolarization and prolongation of the QT interval is to be expected in most patients treated with the drug (4).

In conclusion, results obtained in our study provide further explanations for QT prolongation and ventricular tachyarrhythmia during pimozide

treatment. Block of the rapid component of the delayed rectifier current (I_{Kr}) and lengthening of $MAPD_{90}$ were observed at clinically relevant concentrations of the drug. The degree of QT prolongation associated with pimozide therapy appears to depend on plasma concentrations of the drug, on the individual biotransformation capacity (CYP3A4 activity), and on the coadministration with other drugs causing pharmacokinetic (inhibition of CYP3A4) interactions.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Medical Research Council (MRC) of Canada (MT-11876) and an operating grant from the Heart and Stroke Foundation of Quebec. Benoit Drolet is the recipient of studentships from the Heart and Stroke Foundation of Canada and the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR). Dr Rousseau is the recipient of a scholarship from the MRC/Canadian Hypertension Society. Dr Daleau is the recipient of a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Chantale Simard is the recipient of a studentship from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) and MDS Pharma Services. The authors also thank Michel Blouin and Lynn Atton for technical assistance.

References

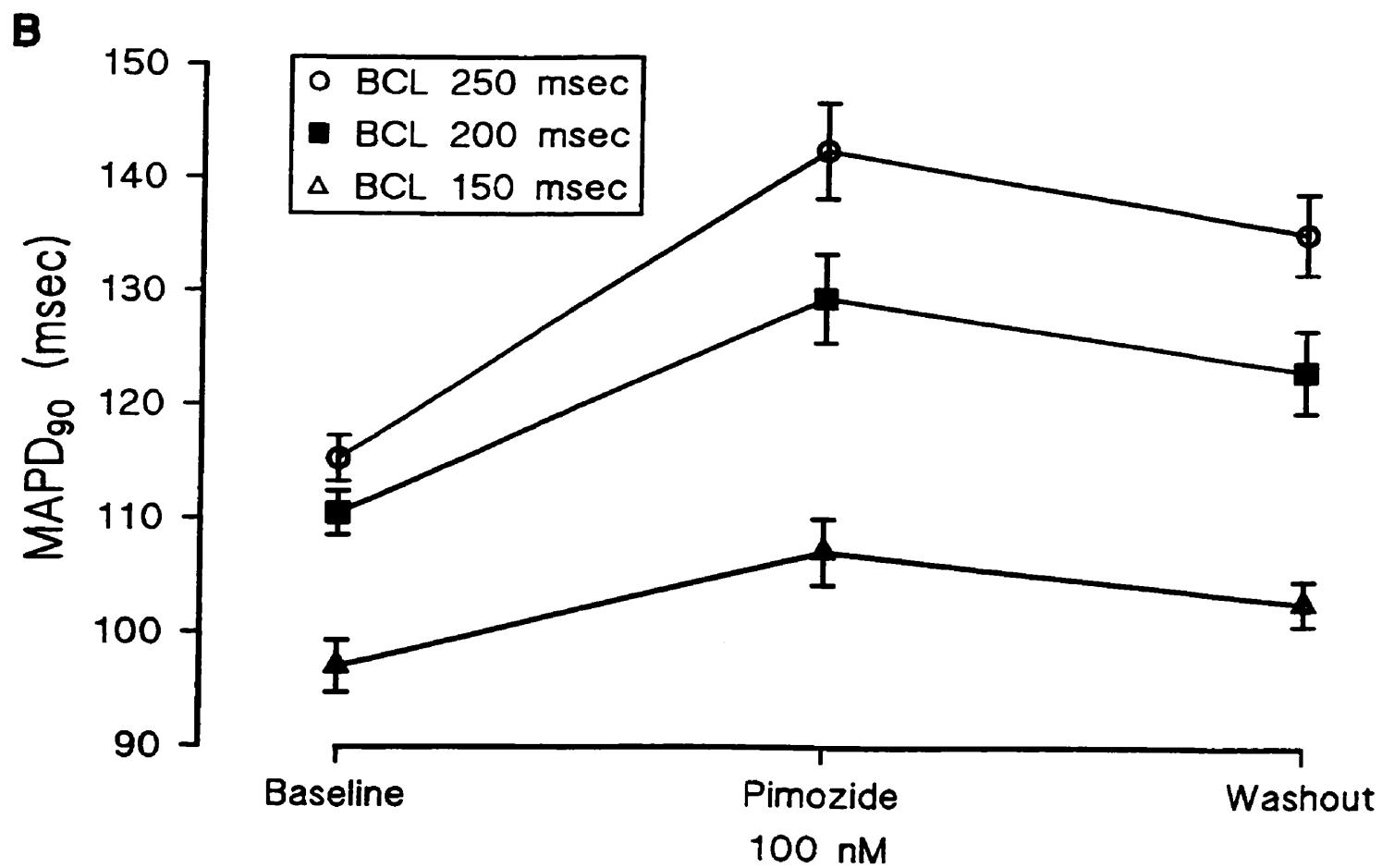
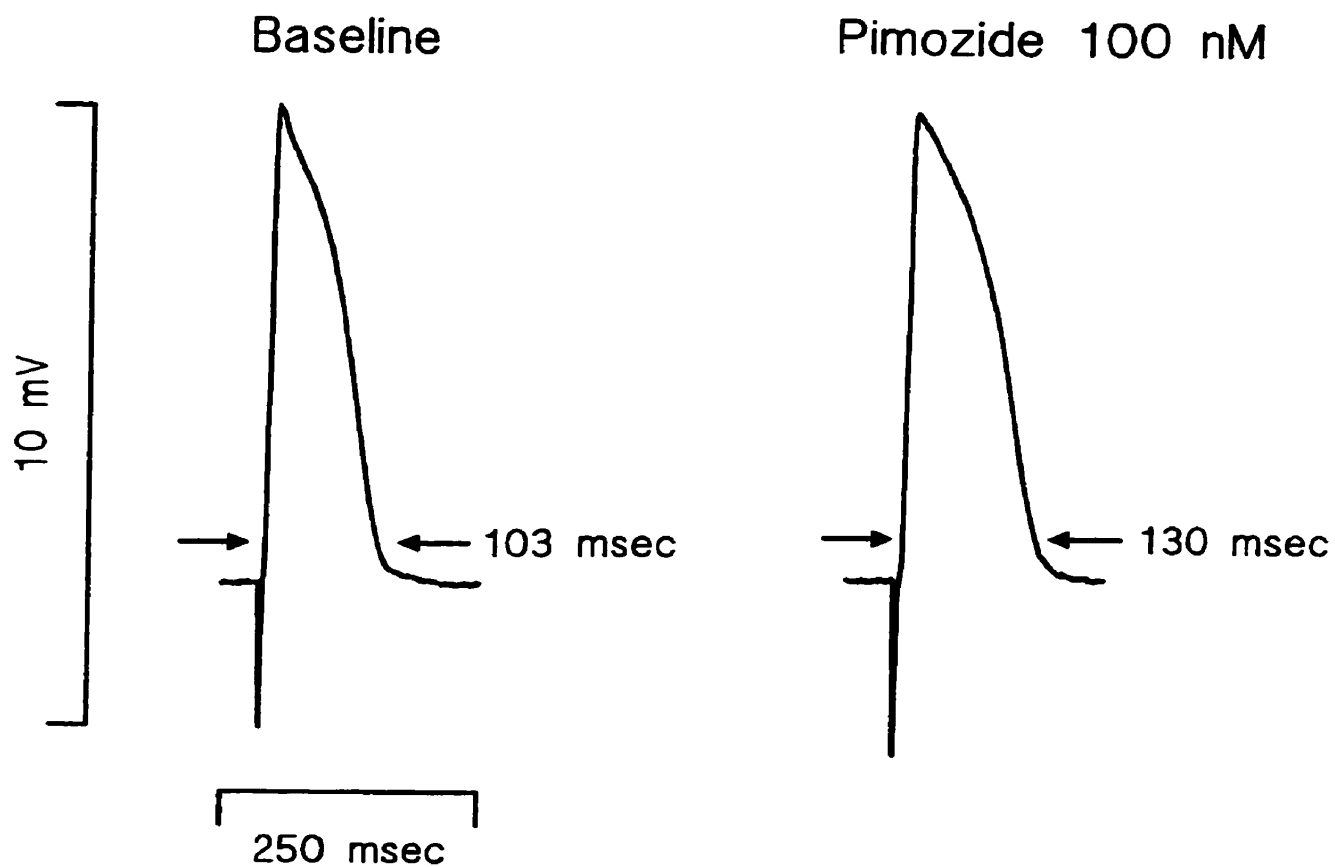
1. Opler LA, Feinberg SS. The role of pimozide in clinical psychiatry : a review. *J Clin Psychiatry* 52 :221, 1991
2. Fulop G, Phillips RA, Shapiro AK, et al. ECG changes during haloperidol and pimozide treatment of Tourette's disorder. *Am J Psychiatry* 144 :673, 1987
3. Krahenbuhl S, Sauter B, Kupferschmidt H, et al. Case report : reversible QT prolongation with torsades de pointes in a patient with pimozide intoxication. *Am J Med Sci* 309 :315, 1995
4. Desta Z, Kerbusch T, Flockhart DA. Effect of clarithromycin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of pimozide in healthy poor and extensive metabolizers of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6). *Clin Pharmacol Ther* 65 :10, 1999
5. Flockhart DA Drici MD, Kerbusch T, et al. Studies on the mechanism of a fatal clarithromycin-pimozide interaction in a patient with Tourette syndrome. *J Clin Psychopharmacol* 20 :317, 2000
6. Shapiro E, Shapiro AK, Fulop G, et al. Controlled study of haloperidol, pimozide and placebo for the treatment of Gilles de la Tourette's syndrome. *Arch Gen Psychiatry* 79 :1032, 1989

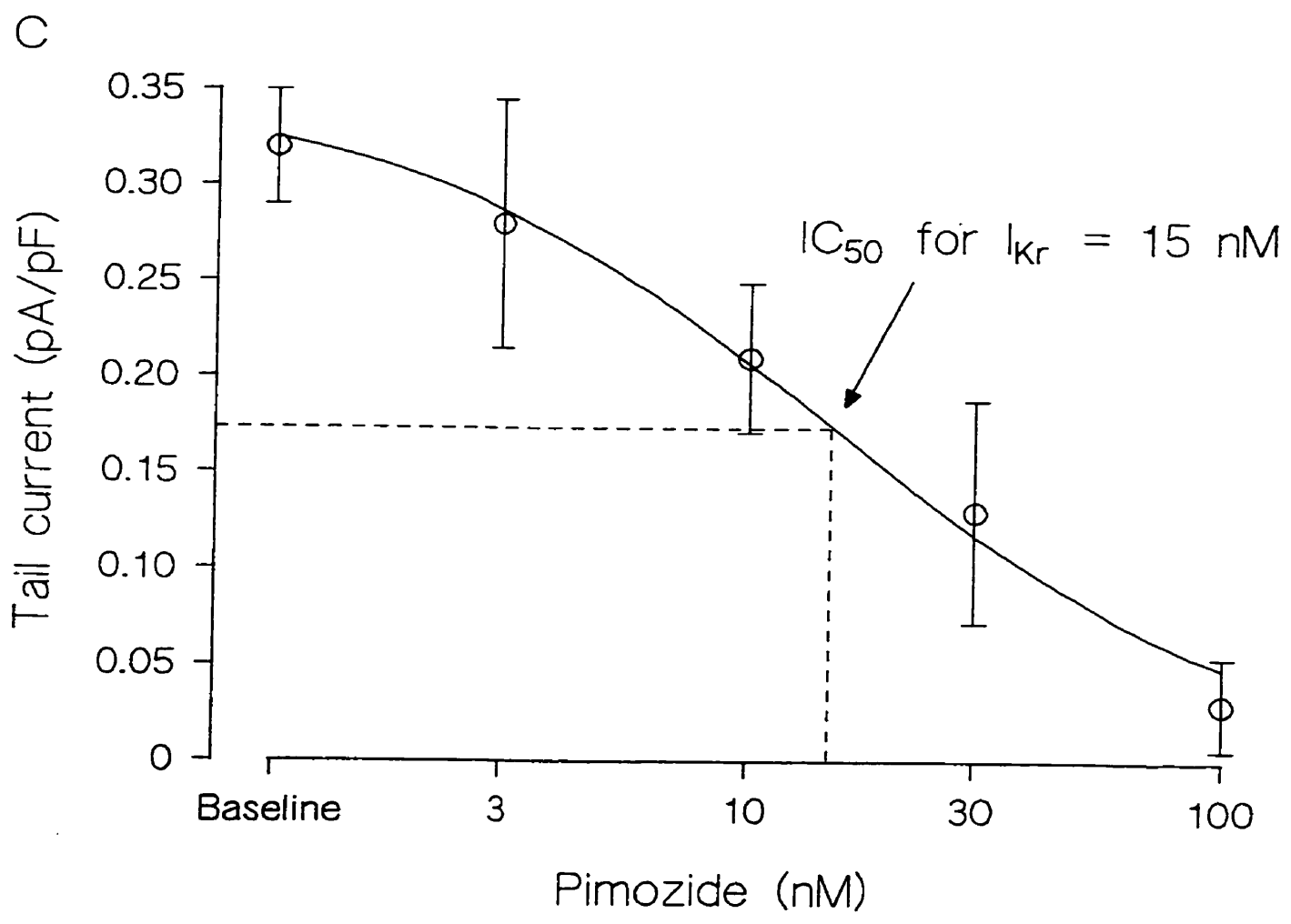
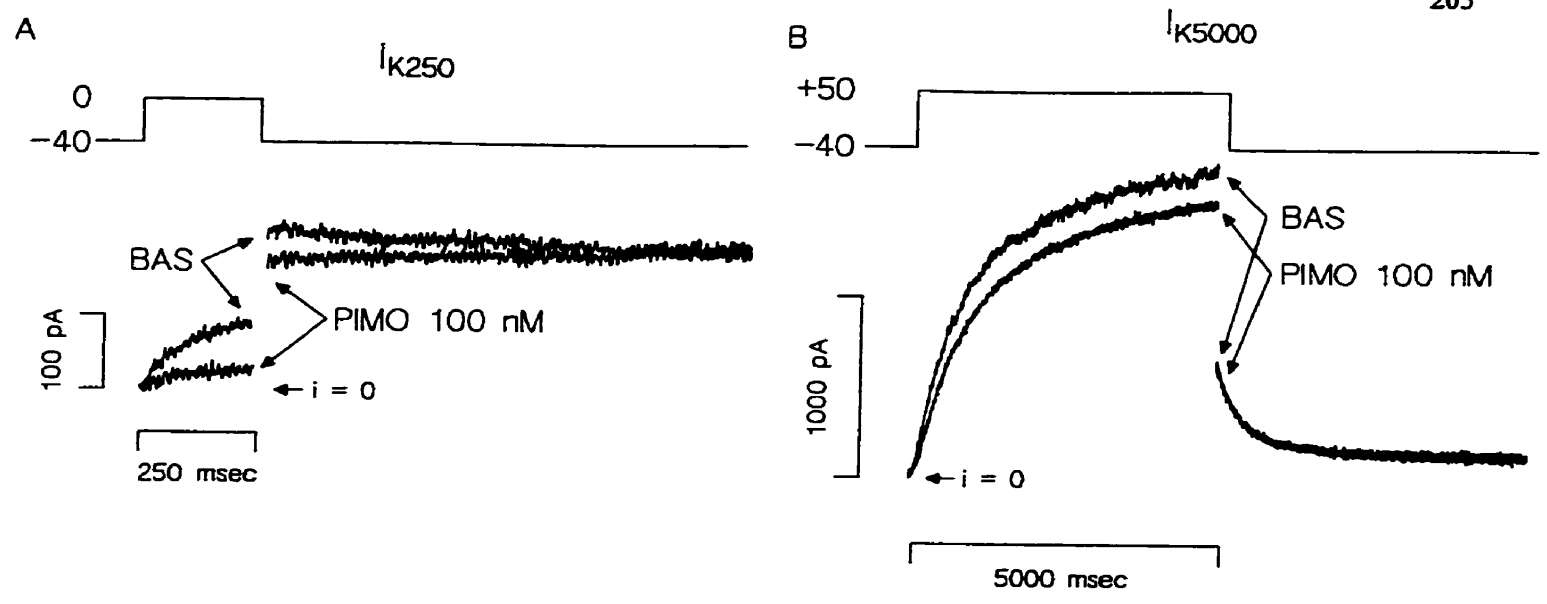
7. Kang J, Wang L, Cai F, et al. High affinity blockade of the HERG cardiac K⁺ channel by the neuroleptic pimozide. *Eur J Pharmacol* 392 : 137, 2000
8. Drolet B, Khalifa M, Daleau P, et al. Block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current by the prokinetic agent cisapride underlies drug-related lengthening of the QT interval. *Circulation* 97:204, 1998
9. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Role of Ca²⁺ and K⁺ in gating the cardiac delayed rectifier K⁺ currents. *Pflügers Arch* 420:180, 1992
10. Srivastava MS, Carter EM. An introduction to applied multivariate statistics. Elsevier Science Publishing Co Inc, New York, 1983
11. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current: Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 96:195, 1990
12. McCreadie RG, Heyants JJP, Chalmers A, et al. Plasma pimozide profiles in chronic schizophrenics. *Br J Clin Pharmacol* 7 :533, 1979
13. Desta Z, Kerbusch T, Soukhova N, et al. Identification and characterization of human cytochrome P450 isoforms interacting with pimozide. *J Pharmacol Exp Ther* 285 :428, 1998

14. Flockhart DA, Richard E, Woosley RL, et al. A metabolic interaction between clarithromycin and pimozide may result in cardiac toxicity. (Abstract) Clin Pharmacol Ther 59 :189, 1996
15. Wrighton SA, Ring BJ. Inhibition of human CYP3A catalysed 1'-hydroxymidazolam formation by ketoconazole, nifedipine, erythromycin, cimetidine and nizatidine. Pharm Res 11 :921, 1994
16. Ervine CM, Matthew DE, Brennan B, et al. Comparison of ketoconazole and fluconazole as cytochrome P450 inhibitors : use of steady-state infusion approach to achieve plasma concentration-response relationships. Drug Metab Disp 24 :211, 1996

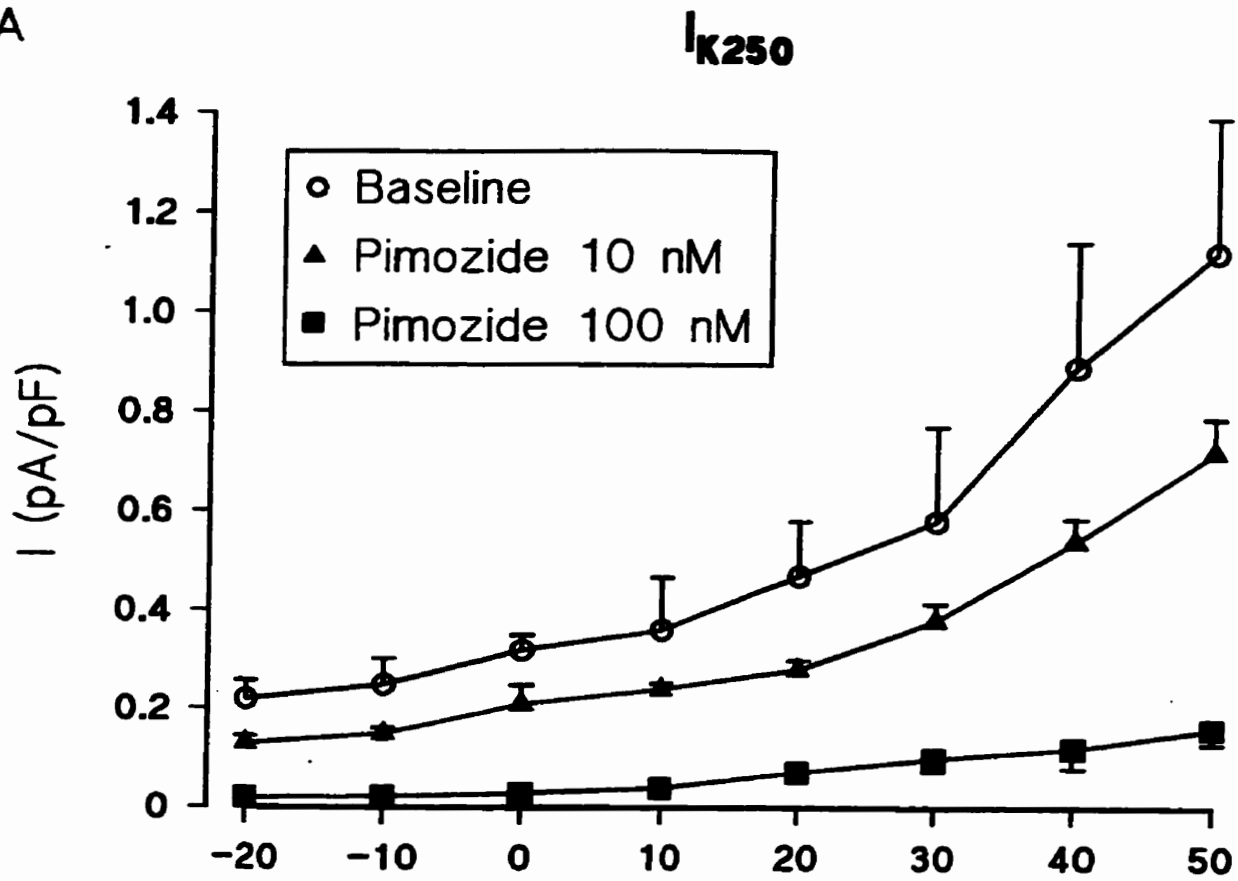
Figure legends

- Figure 1** Panel A shows monophasic action potential signals recorded at baseline and after 15 minutes of pimozide 100 nmol/L at a BCL of 250 msec. Panel B shows serial changes in MAPD₉₀ at BCL of 250, 200 and 150 msec in hearts (n=8) sequentially perfused with baseline, pimozide 100 nmol/L and washout buffer. BCL= basic cycle length.
- Figure 2** Panel A shows recordings of membrane currents elicited by short pulses (I_{K250}) to 0 mV at baseline (BAS) and during exposure to pimozide 100 nmol/L. Panel B shows recordings of membrane currents elicited by long pulses (I_{K5000}) to +50 mV at baseline (BAS) and during exposure to pimozide 100 nmol/L. Panel C shows normalized tail current amplitude recorded at -40 mV following a test pulse to 0 mV. Control data and data obtained at four concentrations of pimozide (n=4 cells/concentration) are shown. The estimated IC₅₀ for the tail current is 15 nmol/L (Hill coefficient 0.95).
- Figure 3** Panel A shows the current-voltage (I-V) relationship of I_{K250} measured at baseline and during exposure to pimozide 10 or 100 nmol/L. Panel B shows the current-voltage (I-V) relationship of I_{K5000} measured at baseline and during exposure to pimozide 10 or 100 nmol/L. Data are expressed as mean \pm S.E.M.

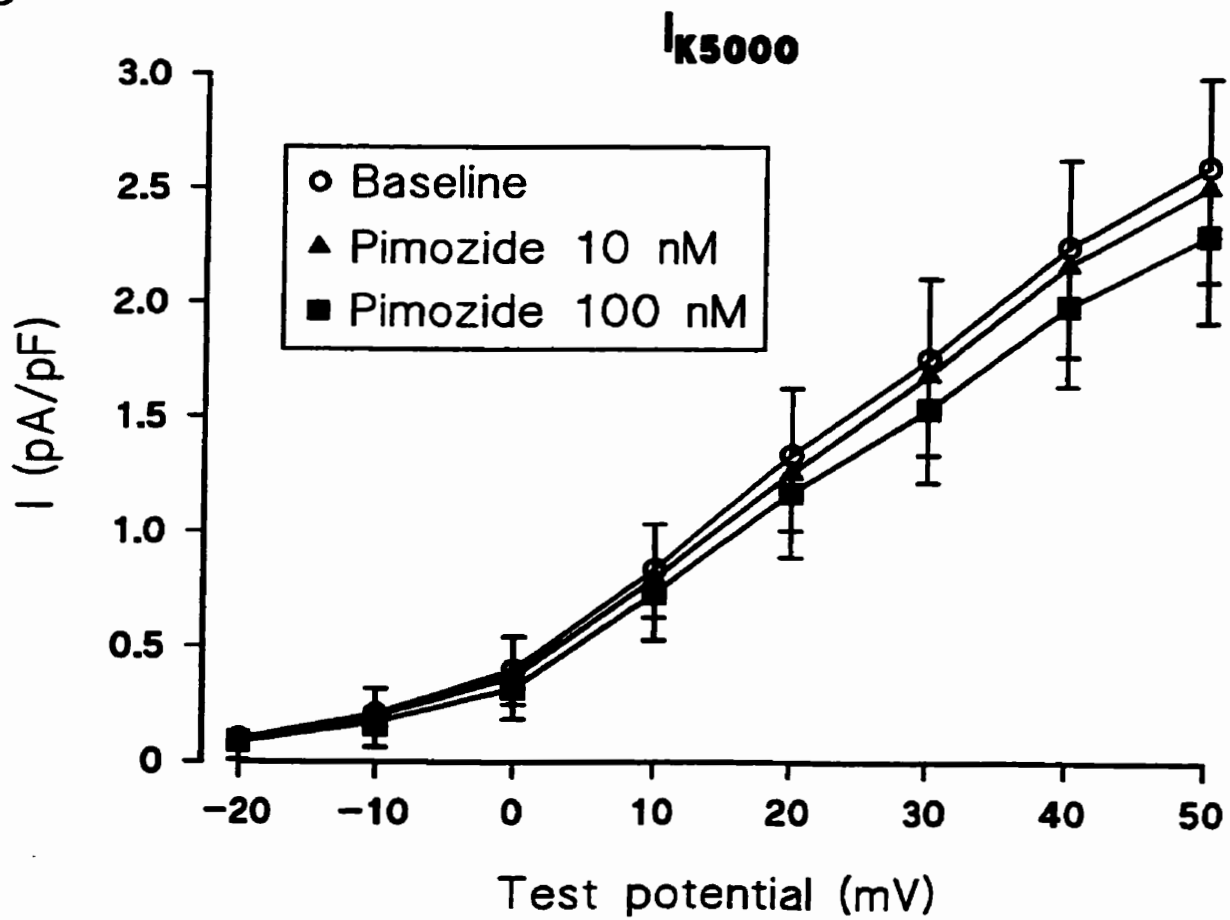
A



A



B



CHAPITRE 7

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale

L'objectif de ces travaux de recherche consistait à démontrer et à évaluer le potentiel pro-arythmique de certains médicaments de diverses classes pharmacologiques. Leurs effets sur la dépolarisation et/ou sur la repolarisation cardiaque, ainsi que sur les courants ioniques qui en sont responsables, ont été mesurés. Pour ce faire, deux techniques électrophysiologiques complémentaires ont été utilisées. D'abord, au niveau cellulaire, la technique de voltage imposé (*patch-clamp*) en configuration de cellule entière (*whole cell*) a permis d'évaluer les effets de quelques-uns de ces médicaments sur le courant sodique cardiaque et/ou sur le courant potassique rectifiant retardé de myocytes ventriculaires isolés de cobaye. Cette même technique de voltage imposé a aussi été utilisée afin d'évaluer l'effet de certains de ces médicaments sur le courant potassique sortant induit par l'expression du gène HERG, lorsque transfecté de façon transitoire ou stable dans des lignées cellulaires HEK293 ou CHO. Dans un deuxième temps, un modèle *ex vivo* de cœur isolé de cobaye, rétroperfusé par l'aorte selon la technique de Langendorff, a servi à déterminer l'effet de ces médicaments sur la dépolarisation et/ou sur la repolarisation cardiaque, par l'enregistrement et la mesure de potentiels d'action monophasiques.

Dans le chapitre deux, nous avons évalué les effets du dropéridol, un puissant neuroleptique, sur la durée du potentiel d'action monophasique ($MAPD_{90}$), à des cycles de stimulation décroissants. Nos résultats démontrent que le dropéridol augmente la $MAPD_{90}$ davantage aux cycles de stimulation longs

par rapport aux cycles de stimulation courts (*reverse-rate dependence*); une caractéristique des antiarythmiques de classe III. Au niveau cellulaire, nous avons caractérisé les effets du dropéridol sur les deux composantes du courant potassique rectifiant retardé (I_{Kr} et I_{Ks}), à l'aide de myocytes ventriculaires isolés de cobaye. Nos résultats démontrent que le dropéridol inhibe sélectivement I_{Kr} de façon concentration-dépendante. Le bloc de I_{Ks} par ce médicament est beaucoup moins important. De plus, grâce à la collaboration d'un groupe américain, nous avons été en mesure de démontrer que le dropéridol inhibe de façon concentration-dépendante le courant potassique sortant généré par l'expression du gène HERG dans des cellules HEK293. Ces résultats sont venus confirmer la puissante inhibition de I_{Kr} par le dropéridol, observée à l'aide de myocytes ventriculaires isolés de cobaye.

Dans le chapitre trois, nous avons évalué les effets du sildénafil (Viagra®), sur la durée du potentiel d'action monophasique ($MAPD_{90}$), à des cycles de stimulation décroissants. Nos résultats démontrent que le sildénafil, comme le dropéridol, augmente la $MAPD_{90}$ davantage aux cycles de stimulation longs par rapport aux cycles de stimulation courts (*reverse-rate dependence*); une caractéristique des antiarythmiques de classe III. À l'aide de la technique de patch-clamp et d'une lignée cellulaire HEK293 transfectée avec le gène HERG, nous avons ensuite déterminé les effets du sildénafil sur le courant potassique sortant généré par l'expression de ce gène (I_{Kr}). Nos résultats ont démontré que le sildénafil inhibe de façon concentration-dépendante le courant HERG exprimé dans des cellules HEK293. Afin d'exclure un possible effet confondant du sildénafil sur un courant potassique endogène présent chez les cellules HEK293, nous avons confirmé l'effet inhibiteur du sildénafil sur le courant HERG, à l'aide d'une autre série d'expériences effectuées sur des

cellules CHO transfectées avec HERG; ces dernières ne générant pas un tel courant endogène confondant.

Nous avons ensuite, dans le chapitre quatre, décrit les effets sur la repolarisation cardiaque de la dompéridone, un antiémétique et modulateur de la motilité gastro-intestinale en voie de connaître un regain de popularité, suite au retrait du cisapride des marchés canadien et américain. En fait, nos résultats démontrent que la dompéridone, comme le cisapride, augmente la $MAPD_{90}$ davantage aux cycles de stimulation longs par rapport aux cycles de stimulation courts (*reverse-rate dependence*); une caractéristique des antiarythmiques de classe III. De plus, à l'aide d'expériences de patch-clamp effectuées sur des cellules CHO transfectées avec le gène HERG, nous avons été en mesure de démontrer que la dompéridone inhibe de façon puissante et concentration-dépendante le courant potassique sortant généré par l'expression de ce gène dans des cellules CHO.

Dans le chapitre cinq, nous avons décrit les effets de la vitamine K, un agent antihémorragique, sur le potentiel d'action cardiaque et sur quelques-uns des courants ioniques qui en sont responsables. Nos résultats ont démontré qu'à faible concentration, la vitamine K n'a produit qu'une faible réduction non-significative de la $MAPD_{90}$. Une plus grande concentration du médicament a permis d'augmenter la $MAPD_{90}$, quoique très modestement. Toutefois, de fortes concentrations de vitamine K ont conduit à l'inexcitabilité cellulaire. Des expériences de patch-clamp effectuées sur des myocytes ventriculaires isolés de cobaye ont démontré une réduction significative du courant sodique de dépolarisation cardiaque, et une diminution concentration-dépendante et relativement sélective de la composante rapide du courant potassique rectifiant

retardé (I_{Kr}). De fait, l'effet inhibiteur de la vitamine K sur I_{Ks} s'est avéré beaucoup moins important. Nos résultats ont donc démontré les propriétés antiarythmiques de classe Ia de la vitamine K.

Enfin, dans le chapitre six, nous avons évalué les effets du pimozide, un neuroleptique utilisé notamment dans le traitement du syndrome Gilles de la Tourette, sur la durée du potentiel d'action monophasique ($MAPD_{90}$), à des cycles de stimulation décroissants. Nos résultats démontrent que le pimozide, comme le dropéridol, augmente la $MAPD_{90}$ davantage aux cycles de stimulation longs par rapport aux cycles de stimulation courts (*reverse-rate dependence*); une caractéristique des antiarythmiques de classe III. Au niveau cellulaire, nous avons caractérisé les effets du pimozide sur les deux composantes du courant potassique rectifiant retardé (I_{Kr} et I_{Ks}), à l'aide de myocytes ventriculaires isolés de cobaye. Nos résultats démontrent que le pimozide inhibe sélectivement I_{Kr} de façon concentration-dépendante. Le bloc de I_{Ks} par ce médicament est beaucoup moins important.

Ces études ont démontré qu'une variété de médicaments, de classes pharmacologiques très diverses, exercent des effets importants au niveau de la repolarisation cardiaque. On sait maintenant que le dropéridol, le sildénafil, la dompéridone et le pimozide possèdent des propriétés antiarythmiques de classe III, essentiellement par leur capacité à bloquer, à divers degrés, la composante rapide du courant potassique rectifiant retardé (I_{Kr}) et à prolonger la durée du potentiel d'action monophasique ($MAPD_{90}$).

Nous avons donc démontré, au point de vue pharmacodynamique, comment le dropéridol, le sildénafil, la dompéridone et le pimozide peuvent être à

l'origine, en clinique, de prolongations de l'intervalle QT et d'événements pro-arythmiques tels les torsades de pointes. Ces quatre médicaments étant fortement métabolisés par le CYP3A4 et susceptibles d'être administrés en concomitance avec d'autres substrats et/ou inhibiteurs de cet isoenzyme, une multitude d'interactions pharmacocinétiques et/ou pharmacodynamiques potentiellement dangereuses, voire fatales, semblent possibles. En attendant les progrès de la biologie moléculaire et de la pharmacogénétique dans l'identification de facteurs de risque permettant de prévenir la pro-arythmie médicamenteuse, la vigilance clinique et le jugement des médecins et pharmaciens semblent particulièrement de mise lors de l'administration de ces médicaments.

En ce qui concerne le cas particulier de la vitamine K, étant souvent administrée d'urgence pour renverser une anticoagulation excessive à la warfarine, on ne peut certes en déconseiller l'utilisation dans un tel contexte. De plus, force est d'admettre que les alternatives sont limitées, voire inexistantes. On peut cependant suggérer d'administrer la vitamine K le plus lentement possible, et d'éviter la voie intraveineuse autant que faire se peut, puisque les effets électrophysiologiques cardiaques de ce médicament semblent concentration-dépendants.

Le futur : prévision, prévention de la pro-arythmie médicamenteuse

Malgré les récents progrès, il y a encore beaucoup de chemin à faire en ce qui concerne la génétique, la physiologie et le traitement des arythmies cardiaques. Parmi les lacunes actuelles les plus évidentes, on retrouve: l'impossibilité d'identifier tous les gènes et toutes les variantes génétiques de

susceptibilité aux arythmies dans la population générale, ainsi que d'utiliser des tests fiables, peu coûteux et rapides pour les identifier. La génomique et le projet génome humain ont déjà un impact majeur, et leur influence continuera de s'accroître dans l'avenir. Les premières études de génétique se faisaient souvent à l'aide de méthodes telles que le clonage positionnel, parce que de petites portions seulement du génome avaient été cartographiées, génétiquement ou physiquement, et que peu de gènes humains étaient définis. Les limites de la technologie disponible au cours de la dernière décennie ajoutaient à la difficulté de ces expériences. Ces premières études de génétique, par exemple, exigeaient l'utilisation de RFLP (restriction fragment length polymorphisms) et de Southern blots. La situation est totalement différente aujourd'hui, et dans un futur rapproché, la génomique et le projet génome humain vont permettre d'atteindre de nouveaux sommets. Les cartes génétiques seront à la limite de la résolution, tous les gènes humains seront définis et disponibles dans des banques de données sur internet, et les technologies génétiques, particulièrement le séquençage de l'ADN, seront routinières, fiables et peu coûteuses. Les analyses de séquençage faciliteront grandement l'utilisation de tests génétiques efficaces sur de larges populations, en utilisant l'information existante concernant les gènes de sensibilité aux arythmies. La génomique fonctionnelle, actuellement limitée à des études d'expressions et d'interactions protéine-protéine, aura aussi un impact. On sait déjà, par exemple, que minK interagit avec KvLQT1, lorsque co-exprimé dans des systèmes hétérologues. MiRP1 en fait de même avec HERG. En fait, l'interaction de MiRP1 avec HERG est particulièrement intéressante, notamment au point de vue pharmacologique. Elle augmente la sensibilité à l'effet de divers médicaments, d'un canal aux propriétés déjà singulières. Il semble que la relation structure-activité recherchée depuis si

longtemps sur les médicaments bloquant sélectivement I_{Kr} se trouve davantage sur la structure de la protéine encodée par l'expression de HERG et de MiRP1, que sur les médicaments eux-mêmes. Ce qui expliquerait, au moins en partie, pourquoi tant de médicaments aux structures apparemment si diverses, bloquent le courant I_{Kr} de façon relativement sélective, dont le dropéridol, le sildénafil, la dompéridone, la vitamine K et le pimozide. Du côté pharmaceutique, l'avenir est donc dans la recherche de molécules dépourvues de cette caractéristique, qu'on peut désormais facilement identifier et quantifier.