UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE (LILLE I)

U.F.R. DE BIOLOGIE

Année 1999

N° attribué par la bibliothèque

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE (LILLE I)

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ.

présentée et soutenue publiquement par

Bérengère DUMOTIER

le 14 juin 1999

REPERCUSSIONS DE LA REDUCTION PHARMACOLOGIQUE DES COURANTS IONIQUES SUR LE PROFIL DU POTENTIEL D'ACTION DE FIBRES DE PURKINJE DE LAPIN.

Intérêt pour l'évaluation de la potentialité arythmogène des médicaments. Application à quelques médicaments non cardiotropes.

JURY :

Madame	le Professeur Yvonne MOUNIER	Président
Monsieur	le Professeur Denis ESCANDE	Rapporteur
Monsieur	le Docteur Icilio CAVERO	Rapporteur
Monsieur	le Professeur Bernard DUPUIS	Examinateur
Monsieur	le Professeur Christian FUNCK-BRENTANO	Examinateur
Madame	le Docteur Monique ADAMANTIDIS	Directeur de thèse



A Madame Le Professeur Yvonne Mounier,

Vous me faites l'honneur et la joie de présider cette thèse. J'ai eu le privilège de bénéficier de votre savoir tout au long de ma vie universitaire à la Faculté des Sciences de Lille. J'ai apprécié la qualité de vos enseignements. Ils ont attisé l'intérêt que je porte à l'électrophysiologie cellulaire. La gentillesse et la spontanéité que vous avez manifestées lors de notre dernière rencontre témoignent de vos grandes qualités. Vos compétences en Recherche Fondamentale feront de vos remarques une source d'enrichissement.

Veillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur Le Professeur Denis Escande,

Vous me faites l'immense honneur d'être membre de mon jury de thèse. La position éminente que vous occupez dans le domaine de l'électrophysiologie cardiaque ainsi que vos compétences en Cardiologie clinique vous donnent une place privilégiée dans l'appréciation de ce travail. En acceptant de juger ce mémoire, vous m'offrez une caution scientifique d'importance.

Soyez assuré de mon estime et de mon profond respect.

A Monsieur Le Docteur Icilio Cavero,

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail. Vos compétences en électrophysiologie cardiaque et votre connaissance en Pharmacologie clinique et expérimentale rendent votre présence justifiée. Chacune de vos remarques conduira à améliorer mes connaissances dans le domaine de la Recherche Scientifique et de ses applications cliniques.

•

Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur Le Professeur Bernard Dupuis,

Vous m'avez acceptée dans votre Laboratoire et permis de réaliser ce travail de thèse. Je mesure aujourd'hui la chance que j'ai eue de pouvoir travailler en collaboration avec des cliniciens, des pharmaciens et des fondamentalistes. Ces années m'ont appris la rigueur nécessaire à la Recherche Scientifique. Je ne manquerai pas de mettre à profit l'enseignement que j'ai reçu au Laboratoire de Pharmacologie.

Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude et mon plus grand respect.

A Monsieur Le Professeur Christian Funck-Brentano,

Vous me faites l'immense joie d'être parmi les membres de mon jury de thèse. Votre expérience en Cardiologie clinique et vos connaissances en Pharmacologie clinique et expérimentale justifient votre présence. Je vous remercie d'avoir accepté de partager votre temps si précieux. Vos critiques et commentaires seront pour moi de grands conseils que je ne tarderai pas à mettre en application.

Je vous prie de croire à ma profonde reconnaissance.

A Madame le Docteur Monique Adamantidis,

Vous m'avez soutenue sans relâche dans mes efforts et prodigué le sens de la rigueur et de la précision, indispensables à un travail de Recherche Scientifique. Vous m'avez offert votre expérience en qualité de chercheur ainsi que vos connaissances en Pharmacologie clinique et expérimentale. J'ai pu apprécier la disponibilité et la patience dont vous avez fait preuve à mon égard. Je n'oublierai pas ces années d'enseignement à vos côtés. Elles m'ont permis d'acquérir de solides connaissances en électrophysiologie cellulaire cardiaque.

Soyez assurée de ma profonde gratitude et de mon plus grand respect.

A Madame Le Docteur Michèle Bastide, A Messieurs Le Docteur Jacques Caron, Le Docteur Régis Bordet, Le Docteur Dominique Lacroix,

Je ne pouvais espèrer meilleur soutien que le vôtre. En outre vos compétences dans le domaine scientifique et clinique, j'ai particulièrement apprécié votre disponibilité et vos grandes qualités humaines. Je tiens également à vous remercier de la confiance que vous m'avez accordée. Tout ceci m'a aidé à avancer un peu plus chaque jour.

Soyez assurés de mon estime et de mon amitié.

Je tiens à remercier également,

Madame Marie-Claude Guillaume, pour son aide technique et les petits moments de bonheur qui ont marqué notre vie au Laboratoire. Je n'oublierai pas le temps où, entre deux concentrations, on partageait nos peines et nos joies.

Mesdames Nadine Pruvost et Sabine Duriez dont je n'ai épargné ni la patience, ni le temps.

Monsieur Ghislain Haudecoeur et Madame Isabelle Rischebourg pour leur bonne humeur quotidienne.

Mesdames Monique Sueur et Nicole Nattier ainsi que Monsieur Christian Sueur pour leur gentillesse, leur joie de vivre communicative et leur sens de la fraternité.

Je remercie particulièrement

Mes parents, Flavie, Hélène, Eric, la petite Chloé et le petit Adrien qui ont, à leur manière, participé à la réalisation de cette thèse et sans qui ce travail aurait perdu de son sens.

Mes amies, chères à mon coeur, Isabelle, Delphine et Emmanuelle, pour leur chaleureuse présence et les moments partagés. Elles ont été un soutien inestimable.

Mes amis de longue date et tous ceux qui sont heureux de voir aboutir ce travail.

TABLE DES MATIERES

PAGES

Introduction	
POTENTIALITE ARYTHMOGENE ET MEDICAMENTS NON CARDIOTROPES	13
Etude bibliographique	
I- L'ELECTROCARDIOGRAMME DE SURFACE ET LE POTENTIEL D'ACTION CARDIAQUE	17
II- LE POTENTIEL D'ACTION CARDIAQUE ET LES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES A L'ETAGE VENTRICULAIRE	21
- Le myocarde contractile - Les fibres de Purkinje	21 23
III- CARACTERISTIQUES DES PRINCIPAUX COURANTS IONIQUES TRANSMEMBRANAIRES CARDIAQUES	25
A - Les courants entrants dépolarisants dont l'activation dépend du potentiel de membrane	25
- Le courant sodique rapide INa-fast	25
- Le courant sodique de fenêtre INa-window	29
- Le courant socique à mactivation iente inva-siow	50
2) Les courants calciques	0.1
- Le courant calcique de type ICa(L)	31
- Le courant calcique transitoire ICa(T)	33
B - Les courants sortants repolarisants dont l'activation est dépendante du potentiel de membrane	34
1) Le courant transitoire sortant Ito	35
2) Le courant rectifiant retardé IK	40
3) Le courant rectifiant dans le sens entrant IK1	44
C - Le courant électrogénique de l'échangeur Na/Ca	47
IV- INFLUENCE DE LA FREQUENCE DE STIMULATION SUR LES EFFETS DE BLOCAGE DES COURANTS SODIQUES ET POTASSIQUES	52
- Bloc tonique et bloc phasique	52
 Fréquence-dépendance des effets de type antiarythmique de classe I et de classe IV Fréquence-dépendance inverse des effets de type antiarythmique de classe III 	54 56
V- MECANISMES CELLULAIRES ET SUBCELLULAIRES DES TROUBLES DU RYTHME VENTRICULAIRE	58
1) Les anomalies de la conduction de l'influx	59
2) Les anomalies de la génèse de l'influx	61
- L automatisme anormai - Les postdépolarisations retardées	63
- Les postdépolarisations précoces	65

 3) Cas particulier des Syndromes du QT long - Les phénotypes - Les mécanismes moléculaires 	68 69 69
VI- MODELES EXPERIMENTAUX D' EVALUATION DE LA POTENTIALITE ARYTHMOGENE	75
 Les modèles pharmacologiques in vitro Le coeur isolé Les préparations multicellulaires et les myocytes Les canaux ioniques 	76 76 77 79
2) Les modèles pharmacologiques in vivo	81
Résultats	90
I- LES REPERCUSSIONS DE LA DIMINUTION DE COURANTS IONIQUES SUR LE PROFIL DES POTENTIELS D'ACTION DE FIBRES DE PURKINJE DE LAPIN SONT-ELLES PREDICTIVES D'UNE POTENTIALITE ARYTHMOGENE? (Article n°1)	91
II- EVALUATION DE LA POTENTIALITE ARYTHMOGENE DE MEDICAMENTS NON CARDIOTROPES	106
1) Evaluation de la potentialité arythmogène du cisapride	106
(Article n°2) 2) Evaluation de la potentialité arythmogène du diphémanil méthylsulfate (Article n°3)	111
 3) Evaluation de la potentialité arythmogène de la sparfloxacine (Article n°4) 	121
III- CINETIQUES D'INSTALLATION ET DE RETRAIT DES EFFETS DU CISAPRIDE SUR LA DUREE DES POTENTIELS D'ACTION DE MYOCARDE VENTRICULAIRE DE LAPIN	130
Introduction	131
Matériels et méthodes	132
Résultats	135
Discussion	139
Références	142
Tableaux et Figures	144
Discussion générale	153
Références bibliographiques	160

Introduction

Le terme de « potentialité arythmogène » désigne la capacité d'un médicament cardiotrope ou non cardiotrope à aggraver, à des concentrations thérapeutiques (aux doses réalisées en clinique) et quelques fois suprathérapeutiques (en cas d'interaction médicamenteuse), un trouble du rythme cardiaque préexistant et/ou à favoriser voire induire une nouvelle arythmie.

En 1964, Selzer et Wray rapportaient un cas de mort subite chez un patient traité par la quinidine, médicament antiarythmique de classe Ia (selon la classification de Vaughan-Williams, 1975). Des études cliniques telles que l'étude CAST (Cardiac Arrhythmia Suppression Trial, 1989) ont rapporté une augmentation de la mortalité chez des patients qui présentaient des extrasystoles ventriculaires après un infarctus du myocarde et traités par le flécaïnide, l'encaïnide ou la moricizine, trois médicaments antiarythmiques de classe I (selon la classification de Vaughan-Williams, 1975). Cette étude a relancé l'intérêt des médicaments antiarythmiques agissant par un mécanisme autre que le blocage des courants sodiques rapides, les médicaments antiarythmiques de classe III, bloqueurs des courants potassiques, qui retardent la repolarisation ventriculaire et allongent la période réfractaire. Cependant, l'étude SWORD (Survival with oral D-sotalol, Waldo et coll., 1996), en montrant une augmentation de la mortalité des patients traités par le d-sotalol après un infarctus du myocarde, a tempéré cet enthousiasme et orienté le développement des médicaments antiarythmiques vers des composés « hybrides », c'est-à-dire ayant pour cibles différents types de canaux ioniques (Members of Sicilian Gambit, 1991, 1998).

La mise en évidence de la potentialité arythmogène des médicaments antiarythmiques a porté l'attention sur le risque proarythmique lié à l'utilisation de médicaments non cardiotropes. Cette prise de conscience a permis de souligner la potentialité arythmogène de certains médicaments appartenant à des familles thérapeutiques très diverses comme les antidépresseurs (Moir et coll., 1972), les antihistaminiques (Monahan et coll., 1990) ou les neuroleptiques (Mehtonen et coll., 1991). La liste des médicaments non cardiotropes déjà commercialisés et

dont l'utilisation a été associée à des troubles du rythme ventriculaire comme les Torsades de Pointes, s'est allongée d'année en année (Liste 1).

Ceci représente un réel problème de Santé Publique qui a incité un certain nombre de pays à exiger une évaluation, par des études électrophysiologiques, de la potentialité arythmogène des médicaments en développement. En effet, de façon surprenante, pour la majorité des médicaments incriminés, seuls les effets sur l'électrocardiogramme étaient documentés alors que peu de recherches avaient été entreprises concernant leurs effets sur l'électrogénèse cardiaque.

La potentialité arythmogène d'un médicament peut être évaluée en étudiant ses effets sur le potentiel d'action cardiaque. Cette étape demande une connaissance fondamentale des courants ioniques contribuant à l'activité électrique cellulaire. L'avancée des techniques d'étude des canaux ioniques en potentiel imposé et de biologie moléculaire a permis d'identifier différents types de courants ioniques dans les cellules cardiaques humaines et provenant de diverses espèces animales.

La mise en oeuvre de modèles expérimentaux *in vivo* et *in vitro* (Eckardt et coll., 1998a) a permis de mieux connaître les structures cellulaires impliquées et les mécanismes ioniques sousjacents des troubles du rythme cardiaque. Les modèles expérimentaux mis en oeuvre pour l'évaluation de la potentialité arythmogène des médicaments ne sont toujours pas satisfaisants. Chaque modèle animal est limité par les spécificités de l'espèce animale considérée et bien souvent ne représente qu'une situation clinique particulière, ce qui rend l'extrapolation des résultats expérimentaux à la clinique humaine particulièrement délicate. Cependant, ces modèles sont indispensables et peuvent fournir, à des degrés divers de pertinence, des éléments de réponse quant aux effets iatrogènes cardiaques d'un médicament.

Liste 1 : Médicaments susceptibles d'augmenter l'intervalle QT chez l'homme, et éventuellement associés à des cas publiés de torsades de pointes (+ : présent ; ? : publication présente, succincte et/ou mal étayée).

CLASSES	DCI	Prolongation de QT/QTc	Torsades de Pointes décrites
ANTIARYTHMIQUES Classe Ia	- quinidine - hydroquinidine - disopyramide - procaïnamide	+ + + +	+ + + +
Classe Ic	- propafénone - flécaïnide - encaïnide - lorcaïnide - indécaïnide - cibenzoline	+/- +/- +/- +/- +/- +/-	+ + (?) + (?)
Autres antiarythmiques de classe I (non rattachés à une sous-classe)	- ajmaline - aprindine - moxaprindine	+ + +	+ + . +
	- amiodarone - sotalol, D-sotalol - NAPA (acécaïnide) - sématilide - dofétilide - almokalant - ibutilide	+ + + + + +	+ + + + +
VASODILATATEURS ET/OU ANTIANGINEUX	- lidoflazine - bépridil - prénylamine - fénoxidil - kétansérine - papavérine (intracoronaire)	+ + + + +	+ + + + + +
PSYCHOTROPES <u>Neuroleptiques</u> - phénothiazines	- thioridazine - mésoridazine - chlorpromazine	+ + +	+ + +
- butyrophénones	 halopéridol dropéridol timipérone 	+ + +	+ + +
- benzamides substituées	- sultopride	+	+ (?)
- autre neuroleptique	- pimozid e	+	
<u>Antidépresseurs</u> - imipraminiques	- imipramine - désipramine - amitryptiline - maprotiline	+ (?) + (?) + +	+ (?) + + +
- IRS	- zimeldine - citalopram	+ + (?)	+
Autre psychotrope	- lithium	+	

ي محد

ANTI-INFECTIEUX Antibiotiques			
- Margangara	- érythromycine		1
		+	+
	- spiramycine	+	
	- spariloxacine	+	+ (?)
	- cotrimoxazole	+	+
	- clofazimine	+(?)	+(?)
Antiparasitaires		. (.)	. (.)
- antipaludéens			
- antiparudeens	quining		
	- quinne	} +	
	- chloroquine	+	+
]	- halofantrine	+	+
- autre antiparasitaires			
	- pentamidine (IV ou IM)	+	+
			Ŧ
Antiforniques	amphatáriaina D (IV)		
Anutongiques	- amphotericine B (IV)	+	+
	- ketoconazole	+	
Divers	- amantadine	+	+
······································			
ANTIHISTA MINIOURS 11	- astémizole		
ANTIMISTAMINIQUES III		+	Ŧ
	- terrenadine	+	+
	- hydroxyzine	+ (?) (surdosage)	
	- diphenhydramine	+	
	1 5		
ANTIMITOTIOUES	- doxorubicine	+	
Althuntongold	amagazina		
	- amsacrine	+	
	- zorubicine	+	
MEDICAMENTS POUVANT	- diurétiques hypokaliémiants	+	+
ENTRAINER UNE	- carbénicilline	+	+ .
HYPOKALIEMIE	- laxatifs		
MEDICAMENTS DIVERS	- cisapride	+	+
	dinhémanil		
1 · · · ·	- upicinalii	–	T
	- autopine	+	+
	- probucol	+	+
1	- térodiline	+	+
1	-hydrate de chloral	i +	+
1	- vasopressine	+	+
1	- suxaméthonium	· ·	+
ł	adánosina	Г I	۲ ۲ (۹)
	- auchosine	+	+ (1)
1	- acide pamidronique	+	
	- produits de contraste iodés	+	
1	(intracoronaire)		
1	- époprosténol	+(?)	
	- clofilium		
	vincoming (DA IV)	T I	1
	- vincamme (INI, IV)	+	+
DIVERS	- cocaïne	L +	+
DIVERO			
	- ecsiasy	+(:)	
	- herbes chinoises	+	+
	(glycyrrhizine)	ł	[
		1	
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·

Etude bibliographique

I- RELATIONS ENTRE L'ELECTROCARDIOGRAMME DE SURFACE ET LE POTENTIEL D'ACTION:

L'enregistrement conventionnel de l'électrocardiogramme (ECG) de surface (Figure 1) est le reflet de l'activité électrique cardiaque. Sur l'ECG de surface, l'onde P correspond à la dépolarisation des potentiels d'action auriculaires. Le complexe QRS correspond à l'ensemble de la dépolarisation ventriculaire et l'onde T à la phase de repolarisation finale du myocarde ventriculaire. L'intervalle QT donne une appréciation globale de la durée de la repolarisation ventriculaire.

Généralement, les modifications de l'ECG induites par les médicaments peuvent être résumées en (i) une augmentation de l'intervalle PR, c'est-à-dire un ralentissement de la conduction auriculoventriculaire, (ii) un élargissement du complexe QRS, indicatif du ralentissement de la vitesse de conduction intraventriculaire, (iii) un prolongement de l'intervalle QT, indiquant un retard de la repolarisation ventriculaire, (iv) l'apparition d'évènements particuliers tels que des extrasystoles ventriculaires isolées ou en salve, ou des tachycardies ventriculaires (Symansky et Gettes, 1993). Ces modifications de l'ECG peuvent fournir des signes précoces de toxicité médicamenteuse survenant lors de surdosage ou encore chez des patients dont les voies d'élimination rénale ou hépatique sont altérées. Pour un électrophysiologiste, elles constituent des éléments d'orientation dans la recherche des mécanismes cellulaires et/ou subcellulaires impliqués dans les troubles du rythme cardiaque.

L'appréciation des mécanismes par lesquels une substance peut altérer la forme de l'ECG demande une connaissance fondamentale des courants ioniques impliqués dans l'électrogénèse cardiaque (Zipes et Jalife, 1991). Les altérations de l'ECG seront différentes selon le type de blocage et selon le canal bloqué. Le blocage fréquence-dépendant des canaux sodiques rapides par des composés exerçant des effets antiarythmiques de classe I (à plus forte raison s'il est associé à une diminution du courant entrant calcique) conduit à une diminution de la Vmax et à un ralentissement de la conduction intraventriculaire.



Figure 1: Relations entre l'électrocardiogramme de surface et le potentiel d'action ventriculaire.

Il peut entraîner un élargissement du complexe QRS qui va s'intensifier avec l'augmentation de la fréquence cardiaque, tous les degrés de bloc dans le tissu conducteur de Purkinje, des arythmies ventriculaires et à l'extrême une asystole (Hoffman et coll, 1975; Morady et coll, 1985; Levine et coll, 1989; Rangers et coll, 1991).

Les effets de blocage des canaux potassiques conduisent à une prolongation de la repolarisation (phase 2 et/ou phase 3 du potentiel d'action) se traduisant par un allongement de l'intervalle QT (généralement exprimé en données corrigées, il tient compte de la fréquence cardiaque). L'allongement de l'intervalle QT peut être consécutif à une prise médicamenteuse. Il est alors d'origine acquise. Celui-ci est renforcé par la bradycardie et peut, dans ce contexte favoriser l'apparition de tachycardies ventriculaires polymorphes potentiellement létales que sont les Torsades de Pointes (TdP) (Dessertenne, 1966; Hondeghem et Snyders, 1990; Benedict, 1993; Funck-Brentano, 1993; Lipicky, 1993). Les TdP sont classiquement définies comme une tachycardie ventriculaire de type polymorphe avec une rotation périodique des complexes QRS autour de l'axe isoélectrique. Elles peuvent s'arrêter spontanément ou dégénérer en fibrillation ventriculaire. La séquence qui précède l'apparition de TdP d'origine acquise (Figure 2A) est caractérisée par (i) une bradycardie sinusale, c'est-à-dire une longue pause entre deux complexes QRS, mesurée par l'intervalle RR, (ii) une alternance caractéristique de cycles courts et de cycles longs, (iii) une onde T alternante (de polarité qui s'inverse) et qui peut être masquée par l'apparition d'une onde U proéminente et (iv) un premier battement ventriculaire ectopique avant le déclenchement de la tachycardie ventriculaire. Les changements de conformation de l'onde U sont souvent associés à certaines pathologies cardiaques (Kishida et coll., 1982). Elle peut s'inverser et/ou devenir très ample. On a d'abord pensé qu'elle était représentative de la repolarisation tardive d'une zone du myocarde ventriculaire (Einthoven, 1912), de la repolarisation terminale des potentiels d'action des fibres de Purkinje (Watanabe et Toda, 1978) ou bien encore du développement d'anomalies de la repolarisation (Patterson et coll., 1993). Très récemment, il a été proposé que les variations de la morphologie de l'onde U sont plutôt le reflet d'une altération du couplage électromécanique, c'est-à-dire une désynchronisation entre l'activité électrique des fibres de Purkinje et la contraction du myocarde ventriculaire (Surawicz, 1998).



Adapté d'après Symansky et Gettes, 1993 et Roden et coll., 1996

Figure 2: Tracés électrocardiographiques de Torsades de Pointes d'origine acquise (A) et congénitale (B).

Certains patients sont atteints d'un syndrome du QT long congénital, c'est-à-dire rattaché à une ou des anomalie(s) de gène(s) codant pour des protéines constituant les canaux ioniques cardiaques. Ces syndromes peuvent causer la mort subite. Les Torsades de Pointes d'origine congénitale sont favorisées par le stress émotionnel ou l'exercice physique. Certaines apparaissent pendant le sommeil. Il n'apparaît alors pas d'alternance de cycles courts et de cycles longs et les arythmies apparaissent soudainement (Figure 2B).

II- LE POTENTIEL D'ACTION CARDIAQUE ET LES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES A L'ETAGE VENTRICULAIRE:

Il est désormais bien établi que les propriétés électriques des cellules cardiaques diffèrent selon les régions considérées. Le myocarde contractile est constitué de cellules ventriculaires non douées d'automatisme. Leur potentiel d'action (PA) est caractérisé par une phase d'inversion de potentiel (ou overshoot) pendant laquelle la cellule est transitoirement chargée positivement par rapport au milieu extracellulaire, par un plateau se situant à des potentiels de membrane plutôt positifs, et par un potentiel de repos membranaire (PRM) voisin de -80 mV. Trois types de cellules ventriculaires, qui diffèrent par leurs propriétés électrophysiologiques, ont été mis en évidence chez le chien dans le myocarde ventriculaire (Sicouri et Antzelevitch, 1991). La Figure 3A représente les PA issus des différentes couches cellulaires ventriculaires: les cellules épicardiques, les cellules de la région du sous-épicarde profond à la région moyenne du myocarde appelées les cellules « M » et les cellules endocardiques. Les PA épicardiques présentent une morphologie particulière appelée « spike-and-dome ». Elle est formée d'une phase précoce de repolarisation relativement importante (le « spike ») suivie d'un rebond avant le plateau (le « dome »). Cette configuration est plus marquée à l'épicarde qu'à l'endocarde où elle est minimale voire absente selon les espèces animales. Ces différences de morphologie entre les PA ventriculaires ont été décrites dans de nombreux travaux réalisés chez le chien in vivo (Tande et coll., 1991) et in vitro (Litovsky et Antzelevitch, 1988; Antzelevitch et coll., 1991) mais également chez le chat (Furukawa et coll., 1990), le lapin (Fedida et Giles, 1991) et



D'après Sicouri et Antzelevitch, 1991

Figure 3: Tracés représentatifs des potentiels d'action de différentes populations de cellules ventriculaires (A) de l'épicarde (EPI) vers l'endocarde (ENDO) et de fibres de Purkinje (B) enregistrés à la fréquence de stimulation de 0.8 Hz.

l'homme (Drouin et coll., 1995). Les cellules « M » représentent 30 à 40 % de la masse totale du myocarde et se distinguent des cellules épicardiques et endocardiques par leurs propriétés électrophysiologiques.

Les fibres de Purkinje (Figure 3B) appartiennent au tissu conducteur à l'étage ventriculaire. Elles sont constituées de cellules douées d'un automatisme latent et sont responsables de la propagation de l'influx au sein du myocarde. L'origine de l'automatisme normal de ces cellules réside dans l'instabilité du potentiel de membrane qui en atteignant un potentiel critique, dépolarise la cellule. Il est caractérisé par une vitesse de dépolarisation lente pendant la diastole, appelée dépolarisation diastolique. L'automatisme normal de ces cellules est supprimé en stimulant la cellule plus rapidement que l'automatisme spontané (« overdrive suppression ») (Vassalle, 1977), ce qui augmente l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase, génère un courant net sortant et hyperpolarise la cellule. La morphologie des PA de fibres de Purkinje (Figure 3B) partage avec celle des PA ventriculaires une phase d'inversion de potentiel ainsi que le « spike-and-dome » des PA épicardiques et des cellules M. Cependant, le potentiel de repos membranaire des fibres de Purkinje se situe à des potentiels de membrane plus négatifs aux environs de -90 mV. Les cellules M présentent des caractéristiques communes aux fibres de Purkinje, c'est-à-dire un potentiel de repos membranaire plus négatif et une Vmax plus importante que les cellules épicardiques et endocardiques. Cependant, elles diffèrent des fibres de Purkinje par l'absence de dépolarisation diastolique et donc par l'absence d'activité spontanée.

Le potentiel d'action cardiaque présente 5 phases (Figure 3B): une phase rapide de dépolarisation (phase 0) de l'ordre de 600 V/s dans le tissu de Purkinje et de 300 V/s dans le myocarde ventriculaire, une phase initiale rapide de repolarisation (phase 1), le plateau (phase 2), la repolarisation terminale (phase 3) et le potentiel diastolique ou potentiel de repos membranaire (phase 4).



D'après Sicouri et Antzelevitch, 1991

Figure 3: Tracés représentatifs des potentiels d'action de différentes populations de cellules ventriculaires (A) de l'épicarde (EPI) vers l'endocarde (ENDO) et de fibres de Purkinje (B) enregistrés à la fréquence de stimulation de 0.8 Hz.

III- CARACTERISTIQUES DES PRINCIPAUX COURANTS IONIQUES TRANSMEMBRANAIRES CARDIAQUES:

Le potentiel d'action cardiaque est la résultante de la somme des courants ioniques entrants dépolarisants et des courants ioniques sortants repolarisants dont les caractéristiques sont détaillées dans le Tableau 1.

A - Les courants entrants dépolarisants dont l'activation dépend du potentiel de membrane:

1) LES COURANTS SODIQUES:

Les canaux sodiques rapides $I_{Na-fast}$ présentent des cinétiques d'activation et d'inactivation dépendantes du potentiel de membrane. Ils génèrent un courant entrant sodique très rapide responsable de la dépolarisation initiale du potentiel d'action (phase 0) (Figure 4). Coraboeuf et Weidmann (1949) furent les premiers à démontrer l'importance du courant sodique rapide dans l'excitation et la conduction de l'influx dans les fibres de Purkinje où leur forte densité est responsable d'une vitesse de conduction de l'influx très rapide, supérieure à celle existant dans le myocarde ventriculaire. Leur densité varie également entre les différentes couches de cellules ventriculaires. Elle est plus importante dans les cellules M que dans les cellules épicardiques et endocardiques (Sicouri et Antzelevitch, 1991). Les modifications du courant sodique global peuvent être estimées, à l'échelon cellulaire, par les variations de la vitesse maximale de dépolarisation de la phase 0 (Vmax).

Les cinétiques d'activation et d'inactivation du canal $I_{Na-fast}$ sont très rapides, de l'ordre de la milliseconde (Colatsky, 1980; Fozzard et coll., 1984). Les canaux sodiques rapides existent au moins dans trois états conformationnels différents (Figure 5A) : l'état fermé ou état de repos (R), dans lequel la perméabilité aux ions est faible mais augmente avec la dépolarisation membranaire; l'état activé (A) dans lequel la perméabilité aux ions est faible et n'augmente pas

<u>`</u>		T		····
Phase du potentiel d'action	Nature ionique	Nom	Direction	Fonction
Phase 0: courant dépolarisants> courants repolarisants	Na	courant voltage- dépendant sodique rapide: INa _{fast}	entrant	dépolarisation rapide
	Ca	courant voltage- dépendant calcique transitoire: I _{CaT}	entrant	rôle essentiel dans le relargage du calcium par le réticulum sarcoplasmique
	Са	courant voltage- dépendant calcique à inactivation lente: I_{CaL}	entrant	rôle dans la phase de dépolarisation rapide?
Phase 1: courants dépolarisants <courants repolarisants</courants 	К	courant voltage- dépendant transitoire sortant 4-AP sensible: I_{tot}	sortant	repolarisation rapide du potentiel d'action
	Cl	courant transitoire Ca^{2+} -dépendant: I_{to2}	sortant	repolarisation du potentiel d'action
Phase 2: plateau:équilibre entre courants entrants et courants sortants	Ca	courant voltage- dépendant calcique à inactivation lente: $I_{Cal.}$	entrant	maintien du plateau du potentiel d'action
	Na	courant sodique de fenêtre: INa _{window}	entrant	maintien du plateau des potentiels d'action
	Na	courant voltage- dépendant sodique à inactivation lente: INa _{slow}	entrant	maintien du plateau des potentiels d'action
	Na et Ca	courant électrogénique de l'échangeur Na/Ca	entrant (ou sortant) selon le potentiel de membrane	participe au maintien du plateau des potentiels d'action
	K	courant voltage- dépendant transitoire sortant 4-AP sensible: I_{101}	sortant	inactivation lente pendant le plateau
	K	courant voltage- dépendant rectifiant retardé: I _k	sortant	repolarisation
Phase 3: repolarisation rapide: courants repolarisants>courants dépolarisants	К	courant voltage- dépendant rectifiant retardé: I _k	sortant	repolarisation
	К	courant voltage- dépendant rectifiant dans le sens entrant: I _{K1}	sortant	repolarisation
Phase 4: diastole	К	courant voltage- dépendant rectifiant dans le sens entrant: I _{K1}	sortant	maintien du potentiel de repos membranaire

Tableau 1: Principaux courants ioniques et leur participation au potentiel d'action cardiaque à l'étage ventriculaire.



Figure 4: Contribution relative des différents courants ioniques cardiaques pendant la repolarisation d'un potentiel d'action de fibres de Purkinje.



Courant sodique de fenêtre

Figure 5: (A) Représentation schématique des trois états conformationnels des canaux ioniques: Etat activé (A), inactivé (I) et fermé (R). (B) Courbe d'activation et d'inactivation du courant sodique rapide en fonction du potentiel de membrane.

avec la dépolarisation membranaire. La transition la plus dépendante du potentiel de membrane est celle de l'état fermé vers l'état ouvert (Vandenberg et Horn, 1984). La transition à l'état inactivé peut survenir après l'état ouvert ou après l'état fermé. La proportion de canaux sodiques à l'état ouvert est déterminée par les cinétiques des portes d'activation et d'inactivation des canaux (Colatsky et coll., 1980). La période de recouvrement (délimitant une courte fenêtre de potentiels de membrane) des courbes d'activation et d'inactivation des courants sodiques rapides permet le passage d'un certain nombre d'ions sodium par le canal. Le courant généré est appelé I_{Na-window} (Figure 5B). Il joue un rôle important dans le maintien du plateau des potentiels d'action, particulièrement dans les fibres de Purkinje (Attwell et coll., 1979; Coraboeuf et coll., 1979). Ce courant est également impliqué dans l'apparition de postdépolarisations précoces pendant la repolarisation terminale des potentiel d'action des fibres de Purkinje, à des potentiels de membrane relativement négatifs (environ -50 mV) (Coulombe et coll., 1985).

Au potentiel diastolique, le passage de l'état inactivé à l'état fermé des canaux déterminera la période réfractaire absolue des cellules (temps pendant laquelle la cellule est inexcitable), délimitée par le nombre de canaux disponibles pour une seconde dépolarisation.

Le courant $I_{Na-fast}$ cardiaque est bloqué par la tétrodotoxine (TTX) (Coraboeuf et coll., 1979). Par contre, l'aconitine et des neurotoxines comme l'anthopleurine A (AP-A) et l'ATX-II ralentissent l'inactivation du courant sodique rapide et de ce fait augmentent le courant $I_{Nawindow}$. Par ailleurs, l'amplitude d' $I_{Na-fast}$ est augmentée par la stimulation β -adrénergique via un processus de phosphorylation dépendant de l'activation d'une proteine-kinase de type A (Ono et coll., 1993).

La diminution du courant $I_{Na-fast}$ et/ou l'effet de bloc des canaux sodiques rapides par une substance est appelé « effet antiarythmique de classe I » selon la classification de Vaughan-Williams (1970). Il peut être associé à un allongement (classe Ia), un raccourcissement (classe Ib) ou une absence de modification (classe Ic) de la durée du potentiel d'action. Expérimentalement, cet effet se traduit au niveau du potentiel d'action par une diminution de la vitesse maximale de dépolarisation de la phase 0 (Vmax), de l'amplitude (APA) et d'une réduction modeste du potentiel de repos membranaire (PRM). Ils déplacent la courbe

« potentiel seuil d'activité/Vmax » vers des potentiels plus négatifs, ce qui augmente la proportion de canaux à l'état inactivé, allonge le délai nécessaire pour qu'un certain nombre de canaux sodiques soient de nouveau à l'état de repos et par conséquent, prolonge la période réfractaire. Les effets de type antiarythmique de classe I sont voltage-dépendants. Ils sont d'autant plus marqués que la membrane sera faiblement polarisée. De ce fait, ils sont renforcés par l'augmentation de la concentration en potassium extracellulaire $[K^+]e$ et à l'inverse, diminués par l'abaissement de $[K^+]e$.

Les canaux sodiques à inactivation lente, $I_{Na-slow}$ forment une autre catégorie de courants sodiques, caractérisés par des cinétiques d'activation et d'inactivation relativement lentes (de l'ordre de la centaine de millisecondes) (Carmeliet, 1987). Les canaux sodiques $I_{Na-slow}$ ont été mis en évidence par Gintant et coll en 1984 dans les fibres de Purkinje de chien. Ils sont caractéristiques des fibres de Purkinje et peu abondants dans les myocytes ventriculaires (Grant et Starmer, 1987; Kiyosue et Arita, 1989). Dans les fibres de Purkinje de lapin, le courant $I_{Na-slow}$ s'active aux potentiels de membrane voisins de -80 mV (Carmeliet, 1987) et atteint un maximum aux environs de -20 mV, potentiel voisin de celui du plateau des potentiels d'action des fibres de Purkinje. De ce fait, il participe significativement au maintien du plateau des potentiels d'action dans ce tissu.

Le courant $I_{Na-slow}$ est particulièrement sensible aux effets bloquants de la TTX et des antiarythmiques de classe I, ces effets se traduisant par le raccourcissement de la durée du plateau des potentiels d'action (Carmeliet et Saikawa, 1982; Kiyosue et Arita, 1989). L'inactivation du courant $I_{Na-slow}$ est ralentie par l'aconitine et les neurotoxines AP-A et ATX-II (Gintant et coll., 1984). En raison de ses cinétiques relativement lentes, ce courant est diminué par l'élévation de la fréquence de stimulation.

2) LES COURANTS CALCIQUES:

On distingue 2 types de canaux calciques qui diffèrent par leurs propriétés cinétiques et pharmacologiques, les canaux de type L et les canaux de type T.

Les canaux de type L (« long lasting ») sont présents dans tous les tissus cardiaques. Ils génèrent un courant $I_{Ca(L)}$ qui est responsable de la dépolarisation membranaire des cellules nodales où il joue un rôle important dans la propagation des potentiels d'action. Ce courant contribue au maintien du plateau du potentiel d'action des cellules du faisceau de His-Purkinje et dans les myocytes ventriculaires où il est à l'origine du couplage excitation-contraction. Les canaux calciques de type L sont activés à des potentiels de membrane relativement peu négatifs (« high-voltage activated channels »), voisins de -30 mV (Tsien et coll, 1987) (Figure 6A). La probabilité et la durée d'ouverture de ces canaux augmentent avec la dépolarisation membranaire (Reuter et coll, 1982; Cavalie et coll, 1983). Leur inactivation dépend à la fois du potentiel de membrane et de la concentration intracellulaire en calcium (Kass et Sanguinetti, 1984; Lee et coll, 1985). En effet, la fixation même des ions calcium sur leur site (Tsien, 1987) modifie les propriétés perméantes de ces canaux.

La période de recouvrement des courbes d'activation et d'inactivation des courants calciques de type L délimite une courte fenêtre de potentiels de membrane qui permet le passage d'un certain nombre d'ions calcium par le canal (Figure 6B) (Hirano et coll., 1992). Le courant généré est appelé I_{Ca-window}. Il est en réalité induit par la réactivation d'un certain nombre de canaux calciques lors de la transition de l'état inactivé à l'état fermé pendant cette fenêtre de potentiels (Shorofsky et January, 1992). Il joue un rôle important dans l'apparition de postdépolarisations précoces (EADs), à des potentiels de membrane peu négatifs dans les fibres de Purkinje.



D'après Hirano, 1989

D'après Tseng et Boyden, 1989

Figure 6: Les courants calciques cardiaques de type T (symboles pleins) et de type L (symboles ouverts). (A) Amplitude des courants calciques en fonction du potentiel. (B) Courbes d'activation (triangles) et d'inactivation (carrés) des courants calciques en fonction du potentiel.

L'activité des canaux calciques de type L est fortement modulée par les neurotransmetteurs (McDonald et coll, 1994; Chen et coll, 1996). La probabilité d'ouverture des canaux est augmentée par la stimulation de l'adenylate cyclase et la phosphorylation AMPcdépendante des sous-unités α et/ou la stimulation de la guanylate cyclase et la phosphorylation GMPc-dépendante des sous-unités β du canal (Kameyama et coll, 1986; Puri et coll., 1997). Bien plus, la phosphorylation du canal est un processus indispensable à son activation.

Les canaux calciques de type L sont la cible des antagonistes calciques utilisés en clinique et qui constituent la classe IV des antiarythmiques selon la classification de Vaughan-Williams (Vaughan-Williams, 1975). Ils sont définis comme des canaux spécifiquement bloqués par les molécules de la famille des dihydropyridines (nisoldipine, nifédipine) (Sanguinetti et Kass, 1984). Ils sont également bloqués par des ions inorganiques comme le cobalt, le cadmium et à un moindre degré le magnésium (Lansman et coll, 1986). Au niveau cellulaire, la diminution du courant calcique de type L entraîne un raccourcissement de la durée et/ou la hauteur du plateau et induit de façon caractéristique une triangulation du potentiel d'action.

Inversement, l'amplitude du courant calcique de type L est partiellement renforcée par le Bay K8644, substance de la famille des dihydropyridines (Hess et coll, 1984) qui augmente la probabilité d'ouverture et le temps d'ouverture des canaux et qui a permis à travers de nombreuses études, une meilleure compréhension du rôle des canaux calciques de type L dans l'émergence des postdépolarisations précoces dans des fibres de Purkinje (January et coll., 1989).

Les canaux calciques de type T ont été clairement mis en évidence dans le tissu cardiaque par Bean (1985) et Nilius et coll (1985). La densité des canaux de type T est importante dans les cellules nodales (Hagiwara et coll, 1988), dans les fibres de Purkinje (Tseng et Boyden, 1989; Hirano et coll, 1989; Shorofsky et January, 1992) et dans les myocytes auriculaires (Bean, 1985). Par contre, ils sont faiblement représentés voire absents dans le myocarde ventriculaire contractile (Mitra et Morad, 1986; Droogmans et Nilius, 1989).

Ils présentent une activation et une inactivation dépendantes du potentiel de membrane, de cinétiques très rapides, responsables de leur nature transitoire. Les canaux de type T sont activés à des potentiels de membrane voisins de -60 mV (« low-voltage activated channels »), c'est-à-dire à un niveau de potentiel compris entre le seuil d'activation des canaux sodiques rapides et celui des canaux de type L (Figure 6B) et présentent une conductance unitaire faible, inférieure à 10 pS (Vassort et Alvarez, 1994). Ils pourraient donc jouer un rôle pendant la phase de dépolarisation des potentiels d'action. La période de recouvrement des courbes d'activation et d'inactivation du courant calcique de type T délimite une courte fenêtre de potentiels de membrane qui permet de générer un courant dit « de fenêtre » auquel il n'est pas attribué de rôle dans la génèse des postdépolarisations en raison de l'amplitude du courant de type T et de son niveau de potentiel.

Ils sont bloqués par les ions nickel et les ions magnésium mais sont insensibles aux effets des dihydropyridines, qu'elles soient antagonistes (nifédipine) ou agonistes (Bay K8644). Cependant certains antagonistes calciques des canaux de type L sont capables de bloquer les canaux calciques de type T à des concentrations relativement élevées (Vassort et Alvarez, 1994; Ertel et Ertel, 1997). Actuellement, on ne connait pas de molécule capable de bloquer sélectivement les canaux calciques de type T cardiaques, même si certains antagonistes calciques comme le mibéfradil présentent une affinité pour les canaux de type T des cellules vasculaires du muscle lisse très supérieure à celle des canaux de type L (Vassort et Alvarez, 1994; Ertel et Ertel, 1997).

B - Les courants sortants repolarisants dont l'activation dépend du potentiel de membrane:

Les canaux potassiques cardiaques font partie d'une famille de canaux d'une grande diversité. Ils sont responsables de la repolarisation cellulaire et/ou du maintien du potentiel de repos membranaire à des potentiels relativement négatifs dans les cellules cardiaques. Les principaux courants sortants repolarisants dont l'activation est dépendante du potentiel de membrane sont: le courant transitoire sortant I_{to} , le courant rectifiant retardé I_K et le courant rectifiant dans le sens entrant I_{K1} .

Le processus de repolarisation est un phénomène complexe qui est le résultat d'une fine balance entre courants entrants et courants sortants. L'allongement de la repolarisation cellulaire, dénommé effet antiarythmique de classe III (selon la classification de Vaughan-Williams) peut être le résultat de l'augmentation des courants entrants sodiques ou calciques et/ou de la diminution d'un ou plusieurs courants sortants potassiques.

1) LE COURANT TRANSITOIRE SORTANT Ito

Le courant transitoire sortant I_{to} joue un rôle très important dans la phase précoce de repolarisation, aux potentiels de membrane supérieurs à -20 mV et dans la détermination de la durée du potentiel d'action. Il est présent dans de nombreuses préparations cardiaques: il est très important dans les fibres de Purkinje (Kenyon et Gibbons, 1977, 1979) et à l'étage atrial (Giles et Imaizumi, 1988; Shibata et coll, 1989). Il est également présent dans les myocytes ventriculaires (Josephson et coll, 1984; Hiraoka et Kawano, 1987). Il est responsable des modifications fréquence-dépendantes de la durée des potentiels d'action (Hiraoka et Hiraoka, 1975; Boyett, 1981; Kukushkin et coll, 1983) et contribue indirectement à la modulation du couplage excitation-contraction dans les myocytes cardiaques.

Ce courant est formé de deux composantes, distinctes par leurs propriétés pharmacologiques et cinétiques (Coraboeuf et Carmeliet, 1982; Escande et coll, 1987) appelées I_{to1} et I_{to2} par Tseng et Hoffman en 1989: I_{to1} est définie comme la composante voltagedépendante et I_{to2} est la composante indépendante du potentiel de membrane et dont l'activation est dépendante du calcium intracellulaire.

La composante I_{to1} est un courant potassique particulièrement ample dans les myocytes auriculaires humains (Escande et coll, 1987; Shibata et coll, 1989) et de lapin (Giles et Imaizumi, 1988). Il est également présent dans les myocytes ventriculaires de rat (Josephson et coll., 1984), de lapin (Hiraoka et Kawano, 1989) et de chien (Tseng et Hoffman, 1989) mais sa densité est plus importante dans les fibres de Purkinje de mouton (Coraboeuf et Carmeliet, 1982) et de veau (Kenyon et Sutko, 1987).

Les canaux I_{to1} présentent des cinétiques d'activation et d'inactivation dépendantes du potentiel de membrane. Leur activation est très rapide et se produit à des potentiels de membrane supérieurs à -20 mV (Figure 7A). De ce fait, ils jouent un rôle primordial dans la phase précoce de repolarisation (phase 1) (Figure 4) et dans la détermination de la durée des potentiels d'action. Les cellules ventriculaires épicardiques présentent une plus forte densité de ce courant, responsable d'une phase précoce de repolarisation des potentiels d'action de plus grande amplitude que ceux des cellules endocardiques (Litovsky et Antzelevitch, 1988). Le processus d'inactivation de ce courant dépendant à la fois du temps et du potentiel de membrane est relativement lent (Fozzard et Hiraoka, 1973; Hiraoka et Kawano, 1989). Bien plus, la réactivation de ce courant est très lente. Pour ces raisons, la contribution d'Ito1 dans la phase 1 de la repolarisation du potentiel d'action est plus importante aux fréquences de stimulation basses qu'aux fréquences rapides (Kenyon et Sutko, 1987). Ces cinétiques d'activation et d'inactivation sont responsables de la nature transitoire de ce courant. Le courant I_{to1} est sélectivement bloqué par une amine tertiaire, la 4-aminopyridine (4-AP) (Castle et Slawsky, 1992; Campbell et coll, 1993) qui, en prolongeant la durée des potentiels d'action cardiaques, exerçe un effet dit « de type antiarythmique de classe III » (selon la classification de Vaughan-Williams).

La densité des canaux I_{to1} est très hétérogène entre les espèces animales et au sein d'une même espèce, entre les différents tissus cardiaques. Les canaux I_{to1} sont absents des myocytes ventriculaires de cobaye. Ils sont présents dans les autres espèces animales.


D'après Xu et Rozanski, 1997

D'après Kawano et coll., 1995

Figure 7: Courbe courant/potentiel des deux composantes du courant transitoire sortant I_{to} . (A) courant potassique dépendant du potentiel de membrane I_{to1} . (B) courant chlore I_{to2} dépendant de la concentration intracellulaire en calcium ([Ca²⁺]i).

Leur densité diminue de l'épicarde vers l'endocarde chez le chien (Litovsky et Antzelevitch, 1988; Liu et coll., 1993), le chat (Furukawa et coll, 1990) et l'homme (Li et coll. 1998), ce qui explique la morphologie différente de la repolarisation rapide des potentiels d'action épicardiques et endocardiques, plus prononcée à l'épicarde qu'à l'endocarde (Litovsky et Antzelevitch, 1989; Näubauer et coll, 1996). Le courant I_{to1} est bien représenté dans les cellules du myocarde profond, les « cellules M » (Sicouri et Antzelevitch, 1991; Drouin et coll, 1995) dont les potentiels d'action partagent avec ceux des fibres de Purkinje, où il est abondant, une phase précoce de repolarisation très marquée et un aspect caractéristique en « spike-anddome ». L'hétérogénéité de répartition de ce courant au sein de la paroi ventriculaire (Li et coll., 1998) contribuerait largement à l'hétérogénéité de la repolarisation ventriculaire transmurale (Liu et coll., 1993). Elle est responsable des comportement différents des cellules épicardiques et endocardiques vis-à-vis des changements brusques de la fréquence cardiaque, par exemple, lors d'extrasystoles ventriculaires. La réactivation du courant Itol étant très lente, sa participation à la repolarisation du potentiel d'action extrasystolique devient minimale. Ceci se traduit par un allongement de la durée des potentiels d'action plus important à l'épicarde qu'à l'endocarde (Litovsky et Antzelevitch, 1989).

L'amplitude du courant I_{to1} est réduite par la stimulation α 1-adrénergique (Wang et coll., 1991), cet effet étant supprimé par les antagonistes des récepteurs α 1-adrénergiques comme la prazosine (Tohse et coll., 1990b). Par ailleurs, dans les fibres de Purkinje, Nakayama et Fozzard (1988) ont montré que la stimulation β -adrénergique est capable de diminuer l'amplitude d'I_{to1} en altérant les cinétiques d'activation de ce canal.

La composante voltage-indépendante, calcium-sensible I_{to2} est également appelée $I_{Cl(Ca)}$ car c'est un courant porté par les ions chlorure, insensible aux effets de la 4-AP. L'activation de ce courant dépend de la concentration intracellulaire en calcium (Zygmunt et Gibbons, 1991, Sipido et coll, 1993) et non du potentiel de membrane.

Dans les fibres de Purkinje, I_{to2} est un bref courant d'amplitude plus faible que celle de I_{to1} (Siegelbaum et Tsien, 1980; Coraboeuf et Carmeliet, 1982; Kenyon et Sutko, 1987). Il est présent dans les myocytes auriculaires (Escande et coll, 1987) et ventriculaires (Hiraoka et Kawano, 1989).

 I_{to2} est activé par l'augmentation du calcium intracellulaire (Zygmunt et Gibbons, 1991; Sipido et coll, 1993) (Figure 7B) consécutive pour une part à la libération du calcium par le réticulum sarcoplasmique (RS) et à un moindre degré par l'entrée des ions calcium via les canaux transmembranaires (Kawano et coll. 1995; Papp et coll, 1995). Ce courant est donc diminué par toute substance diminuant l'influx de calcium (antagonistes calciques) ou réduisant le taux de calcium intracellulaire (EGTA) et/ou par les agents pharmacologiques qui altèrent la libération et/ou le recaptage du calcium par le RS comme la caféine et la ryanodine (Coraboeuf et Carmeliet, 1982; Escande et coll., 1987; Hiraoka et Kawano, 1989). En outre, étant porté par les ions chlorure, il est également inhibé par les bloqueurs de transporteurs d'anions tels que l'acide 4,4'-diisothiocyanatostilbène-2,2'-disulfonique (DIDS) et l'acide 4-acétamido-4'isothiocyanatostilbène-2,2'-disulfonique (SITS) (Zygmunt et Gibbons, 1991).

Au cours d'un potentiel d'action, les mouvements de charges sont comparés aux déplacement d'ions positifs. Ainsi, l'entrée de charges négatives dans la cellule est comparable à la sortie de charges positives, c'est-à-dire à un courant sortant. A l'inverse, la sortie de charges négatives est comparable à l'entrée de charges positives et assimilée à un courant dépolarisant. Le courant I_{to2} est donc un courant repolarisant aux potentiels de membrane supérieurs à son potentiel d'inversion (aux environs de - 60 mV) pendant la phase 1 des potentiels d'action ventriculaires (Zygmunt et coll; 1997) et de fibres de Purkinje (Sipido et coll, 1993) (Figure 7B). Cependant, il n'influence la repolarisation rapide des potentiels d'action cardiaques, que dans des conditions qui minimisent la participation d' I_{to1} , c'est à dire aux fréquences de stimulation élevées, supérieures à 2 Hz (Di Diego et coll, 1995; Hiraoka et Kawano, 1989; Kenyon et Sutko, 1987). Par contre, il est dépolarisant au potentiel diastolique (ou inférieur au potentiel d'équilibre des ions chlorure) et contribuerait au courant transitoire entrant non sélectif

 I_{TI} ("transient inward current") (Han et Ferrier, 1992, 1996; Laflamme et Becker, 1996) impliqué dans l'apparition de postdépolarisations retardées.

2) LE COURANT RECTIFIANT RETARDE IK

Le courant potassique rectifiant retardé I_K a été mis en évidence la première fois dans les fibres de Purkinje de mouton par Noble et Tsien (1969). Il est présent dans les fibres de Purkinje (Bennett, 1985; Gintant et coll, 1985; Scamps et Carmeliet, 1989), les myocytes auriculaires (Wang et coll, 1993a) et ventriculaires (McDonald et Trautwein, 1978; Matsuura, 1987; Giles et Imaizumi, 1988).

Si pendant de nombreuses années on a pensé qu'un seul canal était à l'origine de ce courant I_K , des études récentes réalisées sur des myocytes ventriculaires de cobaye ont bien montré qu'en réalité, il est formé de deux composantes distinctes: une composante I_{Kr} , présentant une constante d'activation rapide de l'ordre de la centaine de millisecondes, et une autre composante I_{Ks} , activée plus lentement, présentant une constante d'activation de l'ordre de la seconde (Sanguinetti et Jurkiewicz, 1990; Chinn, 1993). Ces observations ont été confirmées par des études de biologie moléculaire rapportant que les canaux portant les deux courants I_{Kr} et I_{Ks} sont constitués par des protéines codées par des gènes distincts: HERG pour I_{Kr} (Sanguinetti et coll, 1995; Spectror et coll, 1996a) et KCNQ1 (canal KvLQT1) plus KCNE1 (= minK ou I_{sK} , protéine régulatrice de KvLQT1) pour I_{Ks} (Sanguinetti et coll, 1996b). Les densités relatives des deux courants I_{Kr} et I_{Ks} et leur contribution dans la repolarisation cellulaire cardiaque sont fortement dépendantes de l'espèce animale. La composante rapidement activée I_{Kr} , (« rapidly-activating delayed rectifier current ») présente des constantes d'activation et de déactivation dépendantes du potentiel de membrane. L'appellation "retardé" (« delayed ») provient de la relative lenteur des cinétiques d'activation de ce courant (environ 300 ms chez le lapin; Salata et coll., 1996) comparée à celle du courant potassique transitoire sortant.

Dans les myocytes ventriculaires de lapin, I_{Kr} s'exprime à des potentiels de membrane compris entre -40 et +10 mV (Figure 8A). Cependant, aux potentiels de membrane supérieurs à 0 mV, il est caractérisé par une rectification dans le sens entrant, c'est-à-dire que son amplitude diminue avec la dépolarisation membranaire (Jurkiewicz et Sanguinetti, 1993). Cette rectification est attribuée à une très rapide inactivation voltage-dépendante d' I_{Kr} (Spectror et coll, 1996b; Yang et coll, 1997). Pour ces raisons, son rôle dans la repolarisation est le plus important à la fin du plateau des potentiels d'action.

 I_{Kr} est décrit comme la composante d' I_K sélectivement bloquée par les composés de la famille des méthanesulfonanilides comme le E-4031 (Follmer et Colatsky, 1990; Clay et coll, 1995) et le dofétilide (Carmeliet, 1992; Jurkiewicz et Sanguinetti, 1993). Il est la cible privilégiée des agents antiarythmiques de classe III de seconde génération (Colatsky et coll, 1990; Claremon et coll, 1993) parmi lesquels le sotalol (Sanguinetti et Jurkiewicz, 1991, Wettwer et coll, 1992), l'almokalant (Wettwer et coll, 1992; Carmeliet, 1993b), le térikalant (Jurkiewicz et coll, 1996) ou l'ambasilide (Zhang et coll, 1992). Il est bloqué de façon non sélective par d'autres médicaments antiarythmiques de classe III tel que l'amiodarone (Balser et coll, 1991) ou de classe Ia comme la quinidine et par un certain nombre de médicaments non cardiotropes de familles thérapeutiques très diverses, impliqués dans des effets d'allongement de la repolarisation ventriculaire (Salata et coll, 1995; Drolet et coll, 1998).

Il a été démontré que les ions K^+ interagissent avec un domaine particulier du canal I_{Kr} responsable de l'inactivation de type C (dûe à un changement de conformation d'un domaine de la protéine participant au pore du canal).

41





D'après Salata et coll., 1996

Figure 8: Courbe courant/potentiel de la composante rapide I_{Kr} (A) et lente I_{Ks} (B) du courant rectifiant retardé I_K . Influence de l'isoprotérénol (ISO) sur la composante I_{Ks} .

Ainsi, l'augmentation de la concentration des ions potassium extracellulaires ($[K^+]e$) ralentit l'inactivation du canal et augmente l'amplitude globale du courant I_{Kr} . A l'inverse, l'hypokaliémie diminue le courant I_{Kr} en renforçant son inactivation (Sanguinetti et Jurkiewicz, 1992; Yang et coll, 1997).

La composante à activation lente I_{Ks} (« slowly-activating delayed rectifier current ») présente des cinétiques d'activation et de déactivation plus lentes que celles d' I_{Kr} . Elle a été décrite la première fois dans les myocytes ventriculaires de cobaye (Sanguinetti et Jurkiewicz, 1990) puis chez le chien (Liu et Antzelevitch, 1995; Gintant, 1995) mais son existence n'a été mise en évidence qu'en 1996 chez le lapin (Salata et coll., 1996). Il est également présent dans les myocytes ventriculaires humains (Li et coll, 1996b). Il est absent chez le chat (Follmer et Colatsky, 1990; Furukawa et coll., 1992).

Dans les myocytes ventriculaires de lapin, le courant I_{Ks} s'active selon une constante d'environ 2500 ms (Salata et coll., 1996). Il s'exprime à des potentiels de membrane plus positifs qu'I_{Kr}, compris entre 0 et +60 mV et pourrait donc influencer les phases 1 et 2 de repolarisation des potentiels d'action ventriculaires (Figure 8B). Dans les fibres de Purkinje, sa participation à la repolarisation semble limitée car le niveau de potentiel de membrane après la dépolarisation cellulaire, est rapidement ramené à des potentiels négatifs pendant la phase précoce de repolarisation (phase 1). Le courant I_{Ks} est caractérisé par une absence de rectification (Figure 8B) et une insensibilité aux composés méthanesulfonanilides. La contribution d'I_{Ks} à la repolarisation cellulaire reste difficile à évaluer car il n'existe pas, à ce jour, de bloqueur sélectif de ce courant. En revanche, l'azimilide bloque les deux composantes I_{Kr} et I_{Ks} à des concentrations micromolaires (Bush et coll, 1993; Fermini et coll, 1995; Gintant, 1998). L'indapamide, médicament diurétique, est également capable de bloquer I_{Ks} sans influencer I_{Kr} (Turgeon et coll., 1994) mais cet effet n'est pas sélectif (Lu et coll., 1998). Les cinétiques d'activation et de déactivation lentes d' I_{Ks} (Jurkiewicz et Sanguinetti, 1990) sont responsables de la faible contribution de ce courant à la repolarisation aux fréquences dites normales ou basses. Par contre, aux fréquences de stimulation rapides, I_{Ks} s'accumule progressivement et de ce fait, joue un rôle important dans le raccourcissement de la durée des potentiels d'action.

Contrairement à I_{Kr} , l'amplitude d' I_{Ks} augmente lorsque la concentration extracellulaire en potassium diminue (Sanguinetti et Jurkiewicz, 1990; Liu et Antzelevitch, 1995; Gintant, 1996). Elle augmente aussi avec le taux de calcium intracellulaire (Nitta et coll, 1994). Elle est renforcée par la stimulation β -adrénergique (Sanguinetti et coll, 1991b).

Dans les myocytes ventriculaires de chien, le courant I_{Ks} contribue de façon plus importante à la repolarisation des cellules épicardiques où sa densité est supérieure par rapport aux cellules endocardiques (Gintant, 1995; Liu et Antzelevitch, 1995). Inversement, la plus faible amplitude du courant I_{Ks} dans les cellules M se traduit par un allongement de la repolarisation particulièrement important aux basses fréquences de stimulation comparé à celui des cellules endocardiques et épicardiques et explique en partie leur grande sensibilité vis-à-vis des effets retardant la repolarisation cellulaire (Liu et Antzelevitch, 1995). Celle-ci contribue à la dispersion de la repolarisation ventriculaire transmurale et pourrait jouer un rôle déterminant dans la formation de circuits de réentrée (voir paragraphe V) qui sont impliqués dans la génèse des Torsades de Pointes.

3) LE COURANT RECTIFIANT DANS LE SENS ENTRANT IK1

Le courant rectifiant dans le sens entrant I_{K1} est un courant important dans les fibres de Purkinje et les myocytes ventriculaires (Hume et Uehara, 1985) et d'amplitude moindre dans les myocytes auriculaires (Heidbüchel et coll, 1990; Wu et coll, 1991). Pendant longtemps on a considéré que ce courant était un courant de fond (courant de « background »).

En réalité, le courant I_{K1} s'ouvre avec l'hyperpolarisation de la membrane et se ferme avec la dépolarisation membranaire. Son activation est très rapide et présente une composante dépendante du potentiel de membrane et une composante dépendante du temps (Kurachi, 1985). I_{K1} est un courant rectifiant dans le sens entrant, c'est-à-dire que le canal laisse passer les ions K^+ plus facilement dans le sens entrant que dans le sens sortant.

En effet, des études réalisées en potentiel imposé montrent que lors de fortes hyperpolarisations, à des potentiels transmembranaires inférieurs au potentiel d'équilibre des ions K⁺ (égal à -94 mV, pour des concentrations extra- et intracellulaires en ions K⁺ de 4 et 140 mM, respectivement), le courant porté par le canal I_{K1} est un large courant entrant (Figure 9) qui présente une composante s'inactivant en fonction du potentiel de membrane. Cette inactivation voltage-dépendante s'explique par le blocage du canal par les ions sodium, calcium et magnésium extracellulaires (Biermans et coll, 1987). Par contre, aux potentiels de membrane supérieurs au potentiel d'équilibre des ions K⁺, le courant I_{K1} est un petit courant sortant qui rectifie (diminue) avec la dépolarisation membranaire (Figure 9). La rectification dans le sens entrant du courant I_{K1} est dûe au blocage voltage-dépendant du canal par des ions bivalents intracellulaires tels que le magnésium et le calcium (Matsuda et coll, 1987, 1993) mais également par des polyamines telles que la spermine et la spermidine (Ishihara et coll 1989; Ficker et coll, 1994; Lopatin et coll, 1994).

La résultante de ces propriétés implique qu'un courant sortant repolarisant ne traverse le canal I_{K1} qu'aux potentiels de membrane plus négatifs que -20 mV, que le courant sortant I_{K1} augmente progressivement avec la repolarisation cellulaire pour être très important aux potentiels de membrane proches du potentiel d'équilibre des ions K⁺. De ce fait, le courant I_{K1} joue un rôle très important dans la repolarisation terminale des potentiels d'action et dans le maintien du potentiel de repos membranaire (Figure 4) (Shimoni et coll, 1992; Kass et Freeman, 1993).

45



D'après Koumi et coll., 1995

Figure 9: Courbe courant/potentiel du courant rectifiant dans le sens entrant I_{K1} . (Notez le potentiel d'inversion peu négatif du courant I_{K1} , relatif aux concentrations en ions potassiques: [K+]e= 140 mM; [K+]i= 5.4 mM).

Le potentiel de repos membranaire des cellules cardiaques étant toujours supérieur au potentiel d'équilibre des ions K^+ , le canal I_{K1} ne génère pas de courant entrant pendant un potentiel d'action.

La conductance du canal I_{K1} est fortement dépendante de la concentration extracellulaire en potassium $[K^+]_0$: losque $[K^+]_0$ augmente, l'amplitude du courant I_{K1} augmente et elle est réduite lorsque $[K^+]_0$ diminue (Carmeliet, 1989). Le courant I_{K1} est très sensible aux effets de blocage des ions baryum et césium mais il n'existe pas de bloqueur sélectif de ce courant.

C - Le courant électrogénique de l'échangeur Na⁺/Ca²⁺

La première étude démontrant dans un tissu cardiaque l'existence d'un courant généré par un échangeur d'ions Na⁺/Ca²⁺ a été réalisée par Reuter et Seitz (1968) sur des myocytes ventriculaires. La nature électrogènique de l'activité de l'échangeur et son influence sur l'activité électrique cardiaque ont été démontrées bien plus tard (Kimura et coll.,1987; Egan et coll., 1989). L'échangeur Na⁺/Ca²⁺ peut fonctionner dans un sens ou s'inverser selon que le potentiel de membrane est inférieur (mode normal) ou supérieur (mode inverse) au potentiel d'inversion de l'échangeur E_{Na/Ca}. Celui-ci est déterminé par les potentiels d'équilibre des ions sodium et calcium, E_{Na} et E_{Ca}, respectivement. Lorsque l'échangeur fonctionne en mode normal (Figure 10A), il fait entrer 3 ions Na⁺ dans la cellule et exclut en échange un ion Ca²⁺. Le courant électrogénique I_{Na/Ca} généré par l'échangeur est alors un courant entrant. Lorque l'échangeur fonctionne en mode inverse, il fait sortir 3 ions Na⁺ et permet l'entrée d'un ion Ca²⁺ dans la cellule. Le courant I_{Na/Ca} est dans ce cas, un courant sortant.

- 80 mV MODE NORMAL COURANT ENTRANT

+ 40 mV MODE INVERSE COURANT SORTANT

3Na+

1Ca²⁺

[A] Conditions physiologiques

[Na]e = 140 mM [Na]i = 14 mM



[B] Augmentation de [Na]i



Figure 10: Représentation shématique de l'activité de l'échangeur Na/Ca en fonction du potentiel et de la concentration intracellulaire en ion sodium ([Na]i). ([Na]e) concentration extracellulaire en ion sodium .

L'activité de l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ dépend également des gradients de concentrations des ions Na⁺ et Ca²⁺. En mode normal, l'amplitude du courant est gouvernée par le taux de calcium intracellulaire [Ca]i. En mode inverse, elle est plus dépendante du taux de sodium intracellulaire [Na]i (Figure 10A). Sa participation à l'activité électrique cardiaque est toujours l'objet de controverses parce qu'il n'existe pas de bloqueur sélectif de l'échangeur Na⁺/Ca²⁺. L'analyse du courant électrogénique I_{Na/Ca} au cours d'un potentiel d'action cardiaque a été détaillée dans plusieurs modèles informatiques (Egan et coll., 1989; Noble et coll., 1991; Luo et Rudy, 1994). La Figure 11 donne une description de l'activité de l'échangeur au cours d'un potentiel d'action de myocyte ventriculaire selon Noble et coll. (A) et Luo et Rudy (B): dans des conditions physiologiques au potentiel de repos membranaire, l'échangeur utilise l'énergie du gradient de concentration des ions Na^+ pour exclure le calcium de la cellule et le courant $I_{Na/Ca}$ est un petit courant entrant '1'. Pendant la phase 0 du potentiel d'action, l'ouverture des canaux sodiques permet l'entrée massive d'ions sodium et le potentiel de membrane est pendant un temps très court supérieur à E_{Na/Ca}. De ce fait, l'échangeur génère un courant sortant (mode inverse) '2'. Selon le modèle de Luo et Rudy (1994) (Figure 11B), l'augmentation de [Na]i maintient l'échangeur en mode inverse aux potentiels de membrane positifs. Au début de la phase de repolarisation cellulaire, celui-ci génère alors un courant sortant en excluant 3 ions Na⁺ contre un ion Ca²⁺ '3' et renforce l'augmentation de [Ca]i provoquée par l'ouverture des canaux calciques de type L '4'. L'augmentation de [Ca]i modifie l'activité de l'échangeur en mode normal qui génère un courant entrant '5' au niveau du plateau selon le modèle de Noble et coll. (1991) et à des potentiels de membrane plus négatifs selon le modèle de Luo et Rudy (1994). L'activité en mode normal constitue le principal rôle de l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ au cours d'un potentiel d'action, c'est-à-dire celui de diminuer la concentration intracellulaire en Ca2+ et permettre ainsi le processus de relaxation après la contraction dans une cellule myocardique.



D'après Noble et coll., 1991

D'après Luo et Rudy, 1994

Figure 11: Evolution de la concentration intracellulaire en calcium [Ca2+]i et de l'activité de l'échangeur Na/Ca (INaCa) au cours d'un potentiel d'action ventriculaire selon deux modèles informatiques. Bien que l'amplitude du courant entrant $I_{Na/Ca}$ soit plus faible aux potentiels de membrane plus positifs, il pourrait jouer un rôle significatif dans le maintien du plateau des potentiels d'action des myocytes ventriculaires (Luo et Rudy, 1994a). Dans les fibres de Purkinje, le plateau des potentiels d'action se situant à des potentiels de membrane plus négatifs que ceux des cellules myocardiques, l'échangeur contribuerait de façon plus importante au plateau des potentiels d'action.

Aux potentiels de membrane relativement négatifs, une composante phasique du courant entrant I_{Na/Ca} induite par le relargage du calcium par le RS '6' pourrait favoriser la dépolarisation membranaire et participer au développement des postdépolarisations précoces pendant la phase finale du potentiel d'action (Szabo et coll., 1994; Luo et Rudy, 1994b). Le courant électrogénique de l'échangeur est également impliqué dans l'émergence des postdépolarisations tardives dans des conditions de surcharge calcique intracellulaire (Levi et coll., 1997): lors du blocage de la Na⁺/K⁺ ATPase par les glucosides cardiaques, la concentration intracellulaire en sodium augmente fortement, l'échangeur $I_{Na/Ca}$ s'active en mode inverse (Figure 10B) et génère un courant sortant plus important aux potentiels de membrane positifs dont la résultante est une diminution de la durée du plateau des potentiels d'action caractéristique des effets des digitaliques. L'activité de l'échangeur en mode inverse provoque une surcharge calcique intracellulaire. Aux potentiels de membrane plus négatifs, l'échangeur est plus sensible à l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Ainsi dans des conditions de surcharge calcique intracellulaire, aux potentiels de membrane voisins de -80 mV, le courant I_{Na/Ca} est un courant entrant renforcé par les mouvements oscillatoires du calcium libéré par le RS et qui pourrait participer au courant transitoire entrant I_{ti} (« transient inward current ») impliqué dans le développement des postdépolarisations tardives.

IV- INFLUENCE DE LA FREQUENCE DE STIMULATION SUR LES EFFETS DE BLOCAGE DES COURANTS SODIQUES ET POTASSIQUES:

L'influence de la fréquence de stimulation (ou de la fréquence cardiaque) sur les effets de type antiarythmique, qu'ils soient de classe I, III ou IV a été mieux comprise grâce à la théorie du récepteur modulé proposée par Hondeghem et Katzung en 1984. La théorie du récepteur modulé implique que l'interaction d'une substance avec son récepteur, c'est-à-dire son affinité pour le canal, dépend du potentiel de membrane et de l'état conformationnel (fermé ou au repos, activé ou ouvert, inactivé) dans lequel se trouve le canal sodique, calcique ou potassique (Figure 12). La fixation ou l'association d'une substance à son récepteur et sa dissociation se font avec des constantes d'association et de dissociation particulières à chaque état du canal:

(i) la fixation au canal à l'état de repos, c'est-à-dire en l'absence de stimulation ou pendant la diastole, entraine un bloc dit bloc tonique ou bloc de repos. Il est indépendant de la fréquence de stimulation et son intensité dépend de la concentration de la substance et de la durée de la quiescence. L'hyperpolarisation membranaire atténue le bloc tonique, alors que la dépolarisation ou l'acidose l'accentue (Courtney, 1987).

(ii) la fixation à l'état activé ou inactivé appelé bloc phasique (« use-dependent ») se caractérise par un effet dépresseur du courant qui augmente de façon exponentielle avec les dépolarisations, pour atteindre un état stationnaire dont le niveau va dépendre de la concentration étudiée et de la fréquence de stimulation (Hondeghem et Katzung, 1977). Si les constantes d'association et de dissociation de la substance au canal sont relativement rapides, le bloc phasique atteindra un état stable en quelques dépolarisations. Si la dissociation de la substance sur le canal est lente, le bloc sera incrémentiel et l'état stable ne sera atteint qu'après un certain nombre de dépolarisations.

52



D'après Hondeghem et Katzung, 1975

Figure 12: Représentation schématique du récepteur modulé. Les canaux ioniques existent sous trois états conformationels: fermé (R), activé (A) et inactivé (I). La molécule (D) interagit avec le récepteur-canal selon des constantes d'association (k) et de dissociation (l). Les transitions entre deux états du canal sont gouvernées par la constante de Hodgkin et Huxley (HH), modifiées (HH') par la fixation de la molécule sur son site.

Les bloqueurs du courant sodique rapide (antiarythmiques de classe I, selon Vaughan-Willimas, 1975) ont été séparés en trois sous-groupes (Ia, Ib et Ic) en fonction de leurs effets sur les paramètres des potentiels d'action et plus particulièrement selon les constantes d'association et de dissociation de la substance considérée sur le canal sodique rapide (Campbell, 1983). La grande majorité des antiarythmiques de classe I présentent une plus grande affinité pour les canaux sodiques à l'état activé et/ou inactivé, et une plus faible affinité pour les canaux à l'état de repos (Colatsky, 1982; Bean et coll., 1983). Ils se fixent donc plus facilement sur le canal à l'état ouvert ou inactivé, ce qui explique que les effets de classe I sont généralement majorés par l'élévation de la fréquence de stimulation. Cependant, des distinctions existent entre les différents sous-groupes et sont reliées au coefficient de solubilité des molécules (Courtney, 1983). Les substances peu lipophiles quitteront plus facilement le site sur lequel elles sont fixées que les molécules très liposolubles. Pour les antiarythmiques de classe Ib, comme la lidocaïne, la méxilétine et le tocaïnide, l'installation des effets de blocage et la levée du blocage du canal sodique pendant la diastole sont très rapides. La résultante de ces propriétés est que la diminution du courant sodique ne sera pas majorée avec les dépolarisations successives (Figure 13) mais augmentera uniquement aux fréquences de stimulation rapides, ne permettant pas la levée complète du blocage pendant la diastole. La diminution de la Vmax, indicative des changements du courant sodique rapide global, ne sera donc observée qu'aux fréquences de stimulation rapides ou dans des cellules partiellement dépolarisées.

En revanche, si la levée du blocage du canal est lente, comme cela a été démontré pour la quinidine ou le disopyramide (antiarythmiques de classe Ia) et plus particulièrement pour l'encaïnide et le flécaïnide (antiarythmiques de classe Ic), le blocage des canaux sodiques s'accumule avec les dépolarisations successives (Figure 13) même aux fréquences de stimulation dites normales (1 Hz) (Courtney, 1987) et entraîne une réduction de la Vmax à toutes les fréquences de stimulation. La meilleure compréhension des mécanismes du blocage du canal sodique rapide par les antiarythmiques de classe I a permis d'optimiser leur efficacité dans le traitement des différentes arythmies ventriculaires mais également d'expliquer la plus forte potentialité arythmogène des médicaments antiarythmiques de classe Ic, et à moindre degré, de ceux de classe Ia, par rapport aux médicaments antiarythmiques de classe Ib.



Figure 13: Représentation schématique de l'évolution du blocage du canal sodique rapide au cours de potentiel d'action successifs.

Les effets des antagonistes calciques, appelés effets de type antiarythmique de classe IV (selon la classification de Vaughan-Williams, 1975) obéissent également à la théorie du récepteur modulé. De ce fait, leurs effets sur les courants calciques de type L sont accentués par l'élévation de la fréquence de stimulation.

Les canaux potassiques voltage-dépendants n'existent que sous deux conformations stables, leur inactivation étant très rapide. Ils sont soit à l'état fermé, soit à l'état ouvert, la transition entre les deux états étant gouvernée par des constantes de temps dépendantes du potentiel de membrane. Les répercussions du blocage d'un ou de plusieurs canaux potassiques voltage-dépendants sur la repolarisation sont beaucoup plus complexes que celles du blocage des canaux sodiques et/ou calciques. En effet, la repolarisation est un phénomène qui est la conséquence d'une fine balance entre les courants ioniques entrants et les courants ioniques sortants. Ainsi, l'allongement de la repolarisation peut être le résultat de l'augmentation des courants entrants sodiques et/ou calciques ou de la diminution d'un ou plusieurs courants potassiques, ou les deux.

Les effets de type antiarythmique de classe III sont caractérisés par une fréquencedépendance inverse (« reverse rate-dependence »), c'est-à-dire que l'allongement de la repolarisation est plus marqué à basse fréquence qu'à haute fréquence de stimulation.

Ce terme de fréquence-dependance « inverse » a été proposé par Hondeghem et Snyders (1990) pour expliquer les effets des bloqueurs des canaux potassiques sur la durée du potentiel d'action, par opposition à la fréquence-dependance dite « normale » des bloqueurs de canaux sodiques et calciques (Hondeghem et Katzung, 1984).

La fréquence dépendance inverse des effets antiarythmiques de classe III a tout d'abord été attribuée à la fixation préférentielle de la substance sur le canal à l'état fermé (« reverse usedependent block ») (Hondeghem et Snyders, 1990). A ce jour, seule la 4-AP exerce un blocage de ce type sur le canal I_{to1} puisqu'elle se fixe sur le canal à l'état fermé et se dissocie du canal à l'état ouvert (Castle et Slawsky, 1992; Campbell et coll., 1993). La résultante est que le blocage d'I_{to1} est plus important aux fréquences de stimulation basses et qu'il diminue avec

l'élévation de la fréquence de stimulation. Bien que certains médicaments comme le sotalol ou le tédisamil exercent sur IKr un bloc tonique, indépendant de la fréquence, un grand nombre d'entre eux, comme l'amiodarone, l'almokalant, le dofétilide ou le E-4031, exercent un blocage « use-dependent », i.e un blocage du canal à l'état ouvert qui augmente avec les dépolarisations successives (Carmeliet, 1993a, 1993b). Ceci implique que la substance se fixe sur le canal à l'état ouvert lors d'une dépolarisation et que sa dissociation du canal s'opère au potentiel de repos entre deux dépolarisations. Comme il a été démontré pour le dofétilide (Carmeliet, 1992a), un bloc « use-dependent » du canal n'a pas toujours pour résultat un effet fréquence-dépendant sur la durée du potentiel d'action : si la constante de temps d'association de la drogue sur la canal est relativement lente (de l'ordre de la seconde), le bloc sera facilité aux basses fréquences de stimulation et la repolarisation cellulaire sera d'autant plus retardée; si la constante de temps de dissociation de la drogue sur le canal est encore plus lente (de quelques secondes à une minute), la levée du bloc sera incomplète si la diastole est insuffisante. Le blocage du canal s'accumulera alors avec les dépolarisations et atteindra un niveau stable qui ne sera pas modifié par la fréquence de stimulation et apparaîtra comme un bloc tonique, dépendant uniquement de la concentration de la drogue. Il existe donc une distinction très claire entre les effets d'un composé sur la durée du potentiel d'action (fréquence-dépendance normale ou inverse) et les effets de blocage de cette drogue sur le canal (« use-dependence » normale ou inverse).

La fréquence-dépendance inverse des effets de classe III sur la durée du potentiel d'action peut aussi s'expliquer par les différentes contributions des autres courants ioniques entrants et sortants pendant le processus de repolarisation. En effet, les contributions relatives des courants I_{Kr} et I_{Ks} pendant la repolarisation cellulaire sont fortement dépendantes de la fréquence de stimulation. Dans les myocytes ventriculaires de cobaye, les cinétiques d'activation et de déactivation relativement lentes d' I_{Ks} (Jurkiewicz et Sanguinetti, 1993) sont responsables de la faible contribution de ce courant pendant la repolarisation aux fréquences dites « normales » et basses. Par contre, aux fréquences de stimulation rapides, I_{Ks} s'accumule

progressivement et de ce fait, entraîne le raccourcissement de la durée des potentiels d'action. Cette hypothèse reste valable dans les espèces animales où la déactivation du courant I_{Ks} est plus lente que celle d' I_{Kr} , ce qui n'est pas le cas dans les myocytes ventriculaires de chien où I_{Kr} se déactive plus lentement qu' I_{Ks} (Gintant, 1996). Ceci explique le regain d'intérêt qu'a suscité le blocage sélectif du courant I_{Ks} dans le développement des agents antiarythmiques de classe III par sa capacité à retarder la repolarisation cellulaire aux fréquences élevées et sa potentialité arythmogène réduite aux fréquences basses, comparée à celle observée consécutivement au blocage sélectif d' I_{Kr} (Wang, 1994b; Hondeghem, 1995; Nair et Grant, 1997).

Les courants ioniques entrants comme le courant calcique $I_{Ca(L)}$ et le courant sodique à inactivation lente $I_{Na-slow}$, sont également impliqués dans les modifications fréquencedépendantes de la durée des PA. Parce que ces courants s'inactivent relativement lentement, leur participation à la repolarisation est réduite aux fréquences de stimulation élevées et contribue au raccourcissement de la durée des potentiels d'action (Li et coll., 1999). A l'inverse, elle est augmentée aux fréquences basses, ce qui allonge la durée des PA.

V- MECANISMES CELLULAIRES ET SUBCELLULAIRES DES TROUBLES DU RYTHME VENTRICULAIRE:

La compréhension des mécanismes ioniques cellulaires responsables des arythmies cardiaques s'est considérablement améliorée durant les vingt dernières années. Les causes cellulaires initiant des troubles du rythme peuvent être classées en deux principaux groupes: les anomalies de la conduction de l'influx et les anomalies de la génèse de l'influx (automatisme anormal ou activités déclenchées) (Wit, 1985).

58

1) Les anomalies de la conduction de l'influx:

Les anomalies de la conduction de l'influx comprennent les blocs de conduction et les circuits de réentrée. L'initiation des circuits de réentrée est basée sur l'existence d'un bloc unidirectionnel et d'un ralentissement de la conduction. Les circuits de réentrée (Figure 14) peuvent être délimités par une barrière anatomique ou une zone de cellules dépolarisées (après ischémie myocardique) mais également être d'origine fonctionnelle, déterminés par l'état d'excitabilité des cellules ou par un panachage de ces mécanismes. Le ralentissement de la vitesse de conduction est un facteur déterminant dans la formation de circuits de réentrée. Il est la conséquence d'une diminution des courants ioniques entrants sodiques ou calciques ou d'un découplage cellulaire. Dans les fibres de Purkinje et dans le myocarde contractile, la dépolarisation cellulaire est dépendante des courants sodiques rapides. La vitesse de conduction sera plus lente si l'activation traverse une zone où les cellules sont partiellement dépolarisées. De même, un battement ventriculaire prématuré pourra initier un circuit de réentrée car sa vitesse de conduction sera plus lente.

Des effets proarythmiques de cette nature ont été incriminés en clinique chez des patients recevant des médicaments antiarythmiques de classe Ic, bloqueurs des courants sodiques rapides (Vaughan-Williams, 1970, 1975) comme le flécainide ou l'encainide (étude CAST, 1989) dont la potentialité arythmogène est supérieure à celle des antiarythmiques de classe Ia ou Ib, conséquence de leurs effets dépresseurs plus importants sur les courants sodiques (Levine et coll., 1989). Certains médicaments non cardiotropes, à doses thérapeutiques tels que des agents antihistaminiques (Tobin et coll., 1991) ou à doses toxiques lors de surdosage ou de tentative d'autolyse comme les neuroleptiques (Kemper et coll., 1983; Kriwiski et coll., 1990; Guy et coll., 1991), ont été aussi associés à l'apparition de troubles de conduction d'origine iatrogène.



D'après Schmitt et Erlanger, 1913

4

Figure 14: Représentation schématique d'un circuit de réentrée. (A) situation normale sans différence entre les deux trajets. (B) développement d'une réentrée consécutif à un ralentissement de la conduction et à un bloc unidirectionnel.

Les effets électrophysiologiques des antiarythmiques de classe I et de classe IV ont été largement décrits: les effets antiarythmiques de classe I diminuent la vitesse maximale de dépolarisation de la phase 0 (Vmax), l'amplitude du potentiel d'action et à de plus fortes concentrations, le potentiel de repos membranaire (Varro et coll, 1985). Les effets antiarythmiques de classe IV diminuent la durée et/ou la hauteur du plateau et induisent une triangulation du potentiel d'action caractéristique de leurs effets. Les canaux sodiques ou calciques, répondant à la théorie du récepteur modulé (Hondeghem et Katzung, 1984), le blocage de ces canaux se majore avec l'élévation de la fréquence de stimulation.

2) Les anomalies de la génèse de l'influx:

Les anomalies de la génèse de l'influx sont la conséquence d'une instabilité électrique membranaire conduisant à une dépolarisation spontanée des cellules (automatisme anormal) ou à l'apparition d'activités déclenchées.

L'automatisme anormal, en référence à l'automatisme normal des cellules douées d'activité pacemaker (noeud sinusal, auriculoventriculaire et fibres de Purkinje, est un mécanisme par lequel des impulsions spontanées sont générées dans des fibres partiellement dépolarisées (Cranefield et Aronson, 1988a) (Figure 15). La réduction du potentiel de membrane peut survenir dans le myocarde ventriculaire (Katzung et Morgenstern, 1977) ou dans les fibres de Purkinje (Hauswirth et coll, 1969). Elle est favorisée par la réactivation de courants entrants sodiques ou calciques selon le potentiel de membrane, possible pendant la déactivation des courants potassiques (Katzung et Morgenstern, 1977; Kimura et coll, 1988). Cependant, dans des fibres partiellement dépolarisées, l'inactivation d'un certain nombre de canaux sodiques implique que l'automatisme soit généré par le courant calcique. Contrairement à l'automatisme normal, l'automatisme anormal n'est pas supprimé la stimulation à fréquence rapide (« overdrive suppression ») (Figure 15).

CL 1000 CL 800 CL 600 CL 400 CL 300 CL 260 **]**15 mV 2 ms

D'après Danilo et Rosen, 1980

Figure 15: Apparition d'un automatisme anormal dans des fibres de Purkinje de chien en présence d'une forte dose de glycosides digitaliques. (CL) période de la fréquence de stimulation (ms). L'automatisme anormal s'interrompt lorsqu'on augmente la concentration potassique extracellulaire. Il est favorisé par l'hypokaliémie marquée (inférieure à 1,5 mM) qui réduit le potentiel de membrane des fibres de Purkinje d'un état bien polarisé (-90 mV) à un état moins polarisé (-50 mV), consécutivement à la diminution de l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase (Gadsby et Cranefield, 1977). L'automatisme anormal qui apparait dans les fibres de Purkinje d'une région ischémiée après un infarctus du myocarde peut conduire à un rythme idioventriculaire accéléré.

Une activité déclenchée désigne une impulsion d'amplitude suffisante pour se propager dans le myocarde voisin et initiée à partir d'une postdépolarisation (Cranefield et Aronson, 1988a). Les postdépolarisations sont des dépolarisations spontanées de la membrane. Elles peuvent survenir après la phase de repolarisation cellulaire, pendant la phase 4 du potentiel d'action, ce sont les postdépolarisations retardées ou « delayed afterdepolarizations » (DADs). Lorsqu'elles interrompent la phase de repolarisation du potentiel d'action, elles sont dénommées postdépolarisations précoces ou « early afterdepolarizations » (EADs).

Les postdépolarisations retardées surviennent après la repolarisation complète cellulaire (Figure 16). Elles apparaissent dans des conditions qui provoquent une surcharge calcique intracellulaire, la plus caractéristique étant celle provoquée par des doses élevées de glucosides cardiotoniques (Davis, 1973; Ferrier et Moe, 1973; Kass et coll., 1978a, b; Rosen et Danilo, 1980; Ferrier, 1991) mais elle peut également être induite par les catécholamines ou l'ischémie myocardique (Cranefield 1977; Rosen, 1990). Au niveau cellulaire, elles sont favorisées par la dépolarisation membranaire à des potentiels très négatifs, induite par un courant ionique non sélectif I_{TI} (transient inward) (Lederer et Tsien, 1976; Cannel et Lederer, 1986). De nombreuses études expérimentales ont démontré que le courant électrogènique dans le sens entrant de l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ (Marban et coll, 1986; Levi et coll., 1997) et le courant I_{to2} (Han et Ferrier, 1996) pouvaient favoriser la formation des DADs.



D'après Ferrier et Moe., 1973

Figure 16: Influence de la fréquence de stimulation et de la concentration extracellulaire en potassium (KCl) sur l'apparition de postdépolarisations tardives en présence d'acétylstrophantidine dans des fibres de Purkinje de chien.

L'amplitude des DADs augmente avec la diminution de la concentration extracellulaire en potassium et l'élévation de la fréquence de stimulation, qui diminue leur temps de couplage (Hogan et coll., 1973; Kass et coll., 1978b; Hoffman et Rosen, 1981), et les amène au seuil de déclenchement d'un potentiel d'action ectopique (Figure 16). Les DADs sont capables d'initier des activités rythmiques soutenues. Elles peuvent être responsables d'extrasystoles ventriculaires simples ou en salve, d'arythmies ventriculaires tachycardie-dépendantes pouvant dégénérer en fibrillation ventriculaire.

Lorsque les postdépolarisations interrompent le processus de repolarisation, elles sont appelées postdépolarisations précoces ou EADs (Figure 17). Elles ont été proposées comme étant l'évènement cellulaire à l'origine des Torsades de Pointes (TdP) (Brachmann et coll., 1983; El-Sherif et coll., 1988, 1990; Zabel et coll., 1997). Expérimentalement, elles apparaissent dans des conditions qui retardent la repolarisation cellulaire. D'amplitude suffisante, elles peuvent donner naissance à un autre potentiel d'action ou à des activités rythmiques soutenues (Cranefield, 1977; Roden et Hoffman, 1985) (Figure 17C). Les EADs partagent avec les Torsades de Pointes des facteurs suppresseurs et des facteurs favorisants. Leur développement, en présence d'agents qui allongent la repolarisation, comme les médicaments antiarythmiques de classe Ia (Davidenko et coll, 1989) ou de classe III (Brachmann et coll, 1983; Levine et coll, 1985; Patterson et coll, 1997) est favorisé par la bradycardie, l'hypomagnésémie, l'hypokaliémie (Cranefield et Aronson, 1988a). Inversement, elles sont supprimées par l'élévation de la concentration extracellulaire en potassium ou en magnésium et par l'élévation de la fréquence de stimulation. Les EADs et les activités rythmiques soutenues ont d'abord été décrites dans les fibres de Purkinje (Damiano et Rosen, 1984) puis plus récemment dans les cellules « M » (Sicouri et Antzelevitch, 1991, 1993; Antzelevitch et Sicouri, 1994). Par contre, elles sont plus rarement observées à l'endocarde et à notre connaissance, n'ont jamais été décrites à l'épicarde. L'émergence d'activités rythmiques soutenues dans les cellules M a été proposée comme l'un des mécanismes responsables de l'apparition d'une onde T/U proéminente pouvant donner naissance à des extrasystoles ventriculaires (Antzelevitch et Sicouri, 1994).



D'après Damiano et Rosen, 1984

Figure 17: Postdépolarisations précoces (EAD) apparaissant au niveau du plateau (EAD de phase 2), à des potentiels de membrane (AV) voisins de -30 mV (A) ou pendant la phase terminale de repolarisation du potentiel d'action (EAD de phase 3), à des potentiels de membrane voisins -50 mV (B) et pouvant initier des activités rythmiques soutenues (C) sur des potentiel d'action de fibres de Purkinje de chien stimulées à différentes fréquences (CL) en présence de césium. (CI) intervalle de couplage entre la phase 0 du potentiel d'action et l'émergence de l'EAD.

Le ralentissement de la repolarisation et l'allongement critique de la durée des potentiels d'action peut être le résultat d'une augmentation d'un ou plusieurs courants entrants dépolarisants, de la diminution d'un ou plusieurs courants sortants repolarisants, ou les deux. La repolarisation cellulaire peut être retardée sans développement d'EAD. Par contre, l'apparition d'EADs s'accompagne d'un allongement de la repolarisation cellulaire. Les principaux courants ioniques impliqués dans les développement des EADs comprennent: (i) le courant entrant sodique de "fenêtre" ($I_{Na-window}$), le courant entrant sodique à inactivation lente ($I_{Na-slow}$), le courant entrant calcique de type L ($I_{Ca(L)}$), le courant calcique de "fenêtre", (I_{Ca} -window), (ii) le courant transitoire potassique sortant I_{to} formé de deux composantes I_{to1} et I_{to2} , le courant potassique rectifiant retardé I_K formé de deux courants I_{Kr} et I_{Ks} , le courant potassique rectifiant dans le sens entrant I_{K1} . Ainsi, l'allongement de la repolarisation peut être le résultat d'une augmentation des courants calciques (January et coll, 1989), du ralentissement de l'inactivation des courants sortants potassiques (Levine et coll, 1991) et/ou du blocage d'un ou plusieurs courants sortants potassiques (Levine et coll, 1985; Colatsky et Follmer, 1990).

D'autre part, la possibilité pour une substance d'induire des EADs dépend de sa capacité à retarder la repolarisation et à maintenir le potentiel de membrane à des valeurs permettant la réactivation de courants entrants. L'augmentation du courant calcique $I_{Ca(L)}$ par le Bay K8644 a pour conséquence de prolonger la durée du potentiel d'action et de favoriser l'émergence d'anomalies de la repolarisation de type EADs (January et coll, 1988). Shorofsky et January (1992) ont montré que le développement des EADs apparaissant au niveau du plateau des potentiels d'action (Figure 17A) est lié à la réactivation du courant calcique $I_{Ca(L)}$ qui renforce le courant de fenêtre $I_{Ca-window}$. En revanche, les EADs apparaissant à des potentiels de membrane plus négatifs, pendant la phase finale de repolarisation (Figure 17B) peuvent être induites par le courant sodique à inactivation lente (Kiyosue et Arita, 1989) ou le courant sodique de fenêtre (Coulombe et coll, 1985; Nattel et Quantz, 1988). Aux potentiels de membrane relativement négatifs (aux environs de -50 mV), on ne peut exclure la participation du courant électrogénique produit par l'échangeur Na^+/Ca^{2+} dans l'initiation de la dépolarisation membranaire favorisant ainsi le développement des EADs (Szabo et coll., 1994; Luo et Rudy, 1994b; Nordin et Ming, 1995; Patterson et coll, 1997).

3) Cas particulier des Syndromes du QT long:

Les syndromes du QT long (SQTL) doivent leurs noms à l'allongement de l'intervalle QT de l'électrocardiogramme qui caractérise le phénotype des sujets atteints et qui reflète une anomalie de la repolarisation ventriculaire. Il favorise le développement de tachycardies ventriculaires à type de Torsade de Pointes. Celles-ci se manifestent fréquemment par des syncopes ou par la mort subite des patients. Le SQTL peut être soit d'origine acquise, induit par les médicaments qui favorisent le développement de TdPs bradycardie-dépendantes, soit d'origine congénitale. Les SQTL d'origine congénitale sont responsables de TdPs parfois motelles, qui sont souvent déclenchées par des facteurs liés à l'environnement comme l'effort physique ou les situations de stress.

Le premier type de SQTL congénital est attribué à Jervell et Lange-Nielsen en 1956. Ils décrivent 4 enfants sourds présentant un intervalle QT prolongé et faisant des syncopes répétitives ; 3 d'entre eux mourront subitement. Ce syndrome, caractérisé par des TdPs associées à une surdité bilatérale congénitale est très rare puisqu'il ne concerne que 1 % des enfants sourds, dont la durée de vie sera courte en l'absence de tout traitement. Romano et coll. (1963) puis Ward (1964) décrivent successivement des familles dont les membres atteints d'un autre type de SQTL font des syncopes et meurent subitement, mais ne sont pas atteints de surdité.

Les phénotypes:

Des différences significatives des caractéristiques de l'ECG ont été répertoriées en fonction des syndromes (LQT1, 2, 3, 4 ou 5) dont sont atteints les patients (Figure 18). La bradycardie est considérée comme un élément phénotypique des SQTL. Les fréquences cardiaques sont comparables pour LQT1, LQT2 et LQT3. Pour LQT4, la bradycardie est beaucoup plus marquée. Outre l'allongement de l'intervalle QT, la morphologie de l'onde T diffère selon le locus considéré (Moss et Robinson, 1992). La repolarisation de LQT1 montre une onde T de durée prolongée alors que pour LQT3, la durée de l'onde T est courte mais, de façon très caractéristique, le segment ST est très prolongé. La repolarisation de LQT2 se situe entre celle de LQT1 et celle de LQT3. L'onde T de LQT4 montre une allure sinusoïdale. Il existe également des différences importantes dans l'adaptation de la repolarisation à la fréquence cardiaque. Les formes LQT1, LQT2 et LQT4 ont une repolarisation qui se normalise à l'effort et les accidents rythmiques surviennent lors de situations de stress, à fréquence cardiaque élevée. La repolarisation LQT3 est très anormale au repos, se normalise à l'effort et les accidents cardiaques apparaissent le plus souvent au repos voire pendant le sommeil à fréquence cardiaque relativement lente.

Les mécanismes moléculaires responsables du SQTL:

La Figure 18 illustre les relations entre les différents gènes mutés et les syndromes du QT long correspondants. Au moins 5 chromosomes sont impliqués dans le SQTL congénital. Cinq loci ont été répertoriés sur les chromosomes 3, 4, 7, 11 et 21 et pour 4 d'entre eux, les gènes correspondant ont été identifiés. Ils codent tous pour des sous-unités (SU) de canaux ioniques sodiques ou potassiques (Guicheney et coll., 1998). Les gènes KCNQ1 et HERG codent chacun pour une SU alpha de canaux potassiques voltage-dépendants et les gènes KNCQ1 et HERG mutés correspondent aux syndromes LQT1 et LQT2, respectivement.



Adapté d'après Moss et Robinson, 1992 et Le Marec et coll., 1997

Figure 18: Relations entre les différents aspects de l'ECG (à gauche) chez les patients atteints d'un Syndrome du QT Long (SQTL) et les génotypes (à droite) responsables des différents syndromes (LQT).

Le gène SCN5A code pour la SU alpha du canal sodique rapide. Lorsqu'il est muté, il est responsable du syndrome LQT3. Le gène situé sur le chromosome 4 et correspondant au syndrome LQT4 n'a pas encore été indentifié.

La SU alpha des canaux sodiques et potassiques voltage-dépendants est responsable des propriétés pharmacologiques et cinétiques de ces canaux. La SU alpha des canaux sodiques voltage-dépendants est constituée de 4 domaines répétés en une seule molécule. Chaque domaine est constitué de 6 hélices transmembranaires (S1 à S6) dont l'une (S4) porte la fonction sensible au potentiel transmembranaire (« voltage sensor »). La partie S5-S6, le domaine P, participe à la formation du pore du canal. Les SU alpha équivalentes des canaux potassiques voltage-dépendants présentent un seul domaine et s'associent en tétramère pour former un canal. Cette particularité permet une grande diversité des canaux potassiques par rapport au nombre de gènes présents dans le génome car le plus souvent, les canaux potassiques formés sont des hétérotétramères (SU codées par des gènes différents).

LQT1 a été le premier locus découvert (Keating et coll., 1991). Le gène KCNQ1 muté correspondant au syndrome LQT1 a été localisé sur le chromosome 11 (Wang et coll., 1996). Il code pour la SU principale du canal potassique voltage-dépendant KvLQT1 qui s'associe à une petite protéine membranaire IsK (ou minK), codée par le gène KCNE1, pour former le canal I_{Ks} (Barhanin et coll., 1996). Les mutations du gène KCNQ1 sont concentrées dans des régions importantes pour l'activation du canal KvLQT1 (11p15.5). Les mutations du gène KCNE1, situé sur le chromosome 21 sont responsables du syndrome LQT5. Les mutations du gène KCNQ1 ou du gène KCNE1 entrainent une perte de fonction du canal car elles diminuent ou annulent le courant I_{Ks} . Ce courant contribue à la repolarisation cellulaire aux fréquences élevées. L'adaptation de la durée de la repolarisation cardiaque à l'augmentation de la fréquence cardiaque est déficiente chez les patients porteurs d'anomalies de KCNQ1 ou de KCNE1, ce qui favorise les arythmies ventriculaires.

Le courant I_{Ks} est exprimé dans les cellules cardiaques où ils participent à l'électrogénèse et dans les cellules marginales de la strie vasculaire de la cochlée où ils contribuent à l'homéostasie potassique de l'endolymphe, capitale pour l'activité des cellules ciliées neurosensorielles de l'oreille interne. Les mutations homozygotes de KCNQ1 ou de KCNE1 provoquent l'absence totale du courant I_{Ks} et conduisent à un phénotype cardio-auditif, c'est-àdire au syndrome de Jervell et Lange-Nielsen qui se transmet selon un mode autosomique récessif et dont la surdité caractéristique est le résultat de la perte de fonction du canal I_{Ks} dans l'oreille. Les mutations hétérozygotes de KCNQ1 ou de KCNE1 diminuent le courant I_{Ks} et conduisent à un phénotype uniquement cardiaque, le syndrome de Romano-Ward, dont le mode de transmission est autosomique dominant (Chouabe et coll., 1997).

A partir d'un gène eag (ether-a-go-go) identifié chez la drosophile codant pour un canal potassique, un gène homologue HERG a pu être cloné dans le cerveau humain (Warmke et Ganetzky, 1994). HERG est également fortement exprimé dans le coeur où il est présent sous deux isoformes: HERGA et HERGB. Ce gène code pour la SU alpha du canal potassique à l'origine du courant I_{Kr} . Une particularité de ce courant est que son amplitude augmente avec la concentration extracellulaire en potassium (Sanguinetti et coll., 1995). Les mutations de HERG, situé sur le chromosome 7 en 7q35-36, sont responsables du syndrome LQT2. Elles entrainent une perte de fonction du canal : certaines sont à l'origine de SU alpha incapables de former des structures tétramèriques fonctionnelles et conduisent à une diminution du nombre de canaux fonctionnels ; d'autres aboutissent à la formation de canaux constitués d'un assemblage de SU normales et de SU mutées produisant des canaux peu ou pas fonctionnels. Les mutations répertoriées du gène HERG diminuent le courant I_{Kr} et entraînent un retard de la repolarisation cellulaire et donc un allongement de l'intervalle QT.

Le gène muté responsable du syndrome LQT3 est le gène SCN5A situé sur le chromosome 3 en 3p21-24. Ce gène code pour la SU alpha du canal sodique rapide I_{Na} (Wang et coll., 1995). Les mutations identifiées entrainent un gain de fonction du canal. En effet, l'inactivation du courant sodique de la forme mutée n'est pas complète et un faible courant entrant résiduel persiste. La résultante de ces modifications est une augmentation des courants entrants durant la phase du plateau des potentiels d'action, ce qui retarde la repolarisation cellulaire et se traduit par un allongement de l'intervalle QT de l'électrocardiogramme.
Les progrès de la génétique ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables des SQTL et d'envisager des solutions thérapeutiques spécifiques, adaptées pour chaque SQTL. Ainsi la prévention des troubles du rythme chez les patients présentant un SQTL passe par la proscription de toute substance capable d'allonger la repolarisation (Liste 1). Pour les patients atteints d'un syndrome LQT 1, 2 ou 4, les traitements cliniques actuels reposent sur l'administration de β -bloquants afin d'éviter les effets liés à l'augmentation du tonus adrénergique, la mise en place d'un stimulateur cardiaque pour pallier la bradycardie, ou même d'un défibrillateur implantable. Par exemple, la composante soutenue du courant sodique rapide étant particulièrement sensible à la méxilétine (Wang et coll., 1997), médicament antiarythmique de classe Ib (Mexitil®), l'administration d'agents antiarythmiques de classe Ib a été proposée comme nouvelle thérapie pour les patients porteurs d'une mutation du gène SCN5A (elle est en cours d'évaluation). L'augmentation de la kaliémie, dans des proportions limitées mais capables d'augmenter le courant I_{Kr}, semble constituer un traitement adapté chez les patients atteints du Syndrome LQT2.

Par ailleurs, un rôle potentiel d'anomalies génétiques a été suggéré dans le syndrome du QT long acquis par la présence d'une forme fruste de SQTL congénital qui serait dévoilée par la prise médicamenteuse. Il est permis de penser qu'une ou plusieurs anomalie(s) génétique(s) de canaux ioniques cardiaques ne soient pas exprimées phénotypiquement, c'est-à-dire qu'elles n'aient pas de répercussion sur la repolarisation ventriculaire, mais qu'elle(s) influence(nt) la sensibilité des canaux ioniques mutés aux médicaments interagissant avec ce canal. Ce mécanisme constituerait un contexte favorable à l'apparition des Torsades de Pointes en potentialisant les effets de type antiarythmique de classe III. La découverte récente chez certains patients d'anomalies génétiques « silencieuses » de gènes codant pour des protéines canalaires (Donger et coll., 1997; Priori et coll., 1999a, b), c'est-à-dire sans conséquence sur l'électrogénèse cardiaque, constitue un argument solide en faveur de cette hypothèse.

Chez l'animal, il a été découvert récemment une colonie de chiens de berger allemands (Moïse et coll., 1994) présentant la particularité de développer des tachycardies ventriculaires et des TdP spontanées qui dégénèrent en fibrillation ventriculaire (FV) et provoquent leur mort subite. Bien que le mode de transmission soit encore incertain, il est bien établi que ces arythmies sont d'origine congénitale (Moïse et coll., 1994). L'examen clinique des chiens atteints ne révèle pas de signe macroscopique d'anomalie cardiaque hormis la finesse de la paroi libre du ventricule gauche (VG) et du septum interventriculaire en comparaison avec les chiens normaux. L'ECG et les taux sériques d'ions organiques ne diffèrent pas des chiens normaux, ce qui exclut l'intervention éventuelle de l'hypomagnésémie ou de l'hypokaliémie dans l'apparition des TdP.

Les arythmies ventriculaires sont généralement bradycardie-dépendantes, de type polymorphe, non soutenues (<30 complexes ventriculaires) mais très rapides (>480 battements/minute), avec un temps de couplage différant d'un chien à l'autre. L'intervalle QT de l'ECG n'est pas significativement prolongé par rapport aux chiens normaux mais la morphologie de l'onde T des chiens atteints est caractérisée par une encoche. Les arythmies ventriculaires sont corrigées par l'augmentation de la fréquence cardiaque induite par les composés vagolytiques et les agonistes des récepteurs β -adrénergiques, comme l'isoprénaline. Inversement, elles sont favorisées par la stimulation α 1-adrénergique (Moïse et coll., 1996, 1997).

Le mode de déclenchement de ces TdP n'est pas sans évoquer celui observé chez les patients atteints d'un syndrome LQT1, LQT2 ou LQT4. Un certain nombre de travaux ont été menés sur l'influence du déséquilibre de l'innervation sympathique entre le ventricule droit et le ventricule gauche, connu pour jouer un rôle dans la génèse des TdP (Schwartz et coll., 1990) sur le développement. Chez les chiens atteints, il a été mis en évidence une diminution de l'amplitude du courant transitoire sortant 4-AP sensible I_{to1} relative à une altération de l'inactivation de ces canaux dans les fibres de Purkinje (Freeman et coll., 1997).

Il reste à déterminer si la diminution du courant I_{to1} est la cause ou la conséquence du SQTL congénital des chiens atteints. Une hypothèse formulée est que pendant son développement, le système nerveux autonome a influencé l'expression génétique des canaux I_{to1} dans le myocarde. La mise en évidence du rôle des interactions cellulaires entre le système nerveux autonome et les myocytes ventriculaires dans l'expression des courants I_{to1} permettrait de mieux appréhender les relations entre le déséquilibre de l'innervation sympathique et l'apparition des arythmies ventriculaires observées chez des patients atteints du SQTL congénital. Par contre, à notre connaissance, il n'a pas encore été décrit de SQTL congénital consécutif à une altération du courant Ito. De ce fait, cette race de chien ne peut constituer un modèle expérimental *in vivo* de TdP. Cependant, elle constitue un élément précieux dans la recherche des mécanismes physiopathologiques des altérations congénitales de la repolarisation.

VI- MODELES EXPERIMENTAUX DE TORSADE DE POINTES ET EVALUATION DE LA POTENTIALITE ARYTHMOGENE:

L'évaluation du risque proarythmique relatif à l'usage des médicaments nécessite la mise au point de modèles expérimentaux fiables, reproductibles et adéquats aux propriétés électrophysiologiques des cellules cardiaques humaines.

Actuellement, un certain nombre de modèles expérimentaux ont été proposés pour l'évaluation de la potentialité arythmogène des médicaments. Les modèles élaborés réunissent dans un contexte expérimental et le plus fidèlement possible, les conditions connues pour favoriser l'apparition des TdP ou des anomalies de la repolarisation à type d'EAD. Ces modèles sont soit réalisés *in vitro* sur des préparations multicellulaires ou sur des myocytes cardiaques (chien, cobaye, lapin ou rat) ou encore sur des canaux clonés, soit *in vivo* chez le chien ou le lapin.

1) Modèles pharmacologiques in vitro:

La potentialité arythmogène d'un médicament, en particulier ce qui concerne le développement de TdP, peut être en partie estimée par la mise en évidence de ses effets sur l'électrogénèse cardiaque et de sa capacité à induire *in vitro* des EAD et des activités rythmiques soutenues sur des myocytes isolés ou des préparations multicellulaires. Son évaluation s'effectue dans des conditions normales et dans des situations reconnues pour favoriser l'initiation des EAD et des TdP, c'est-à-dire la stimulation à basse fréquence, l'hypokaliémie et l'hypomagnésémie.

Les modèles expérimentaux réalisés sur coeur isolé et perfusé ont été élaborés dans le but de pouvoir étudier la capacité d'un médicament à retarder la repolarisation ventriculaire, à augmenter la dispersion de la repolarisation ventriculaire et à provoquer des Torsades de Pointes. Cependant, le faible nombre de modèles développés à ce jour souligne la difficulté de mettre en place un modèle de coeur isolé reproductible et fiable. Les seuls modèles existants sont réalisés chez le cobaye (Sean et coll., 1995) et le lapin (Asano et coll., 1997; Zabel et coll., 1997; Eckardt et coll., 1998b).

Dans tous les modèles, la bradycardie est provoquée par ablation du noeud auriculoventriculaire (AV). Le rythme idioventriculaire est alors voisin de 30 battements par minute. Les études sont réalisées en situation d'hypokaliémie (de 1.5 à 3 mM) et d'hypomagnésémie (inférieure à 0.5 mM), en présence de composés capables d'allonger la repolarisation comme le E-4031 (Asano et coll., 1997) ou le clofilium (Eckardt et coll., 1998b) ou en présence de médicaments antiarythmiques comme la quinidine (Asano et coll., 1997) ou le sotalol (Zabel et coll., 1997; Eckardt et coll., 1998b). Ce type de modèle a permis de confirmer la potentialité arythmogène de l'érythromycine (Eckardt et coll., 1998b) démontrée *in vitro* sur des préparations multicellulaires (suite du paragraphe) (Antzelevitch et coll., 1996). Les modifications de l'électrogénèse cardiaque sont évaluées à partir de l'enregistrement de l'ECG de surface et des potentiels d'action monophasiques (PAM). Ceux-ci sont enregistrés, à l'aide de cathéter-électrodes, à l'épicarde ou à l'endocarde et représentent la somme des

potentiels d'action des cellules sous-jacentes. Les déflections secondaires apparaissant sur les PAM sont considérées comme le reflet des EAD se développant dans les cellules sous-jacentes. La validité des résultats est estimée par la capacité de la superfusion de magnésium (8 mM) (Eckardt et coll., 1998b) ou de la stimulation cardiaque à fréquence rapide (Zabel et coll., 1997; Eckardt et coll., 1998b) à supprimer les EAD sur les PAM et les tachycardies ventriculaires (TV) apparaissant sur l'ECG. Celles-ci présentent le plus souvent des caractéristiques communes aux Torsades de Pointes observées en clinique, c'est-à-dire l'alternance de cycles longs et de cycle courts précédant une TV de type polymorphe avec rotation périodique des complexes QRS autour de l'axe isoélectrique.

Cependant, il est plus difficile d'induire des TV sur coeur isolé en comparaison avec les modèles *in vivo* (Vos et coll., 1995) (voir paragraphe suivant). Cette particularité peut s'expliquer par l'absence d'innervation du coeur par le système nerveux autonome. Dans la plupart des cas, les concentrations des composés utilisés sont relativement élevées (Zabel et coll., 1997; Eckardt et coll., 1998b) et l'hypokaliémie très marquée (Zabel et coll., 1997; Eckardt et coll., 1998b). Par ailleurs, le rythme idioventriculaire est parfois très lent (inférieur à 30 battements par minute) (Asano et coll., 1997) et de ce fait, peu représentatif des situations cliniques.

La plupart des études réalisées sur des préparations multicellulaires utilisent les fibres de Purkinje de lapin (Carmeliet et coll., 1985; Adamantidis et coll., 1993, 1994, 1995; Neto et coll., 1997) ou de chien (Coulombe et coll., 1985; Nattel et Quantz, 1988; Blair et coll., 1989; Gallagher et coll., 1989; Gwilt et coll., 1990; Rubart et coll., 1993). Elles sont également entreprises sur des lambeaux de myocarde ventriculaire ou des myocytes de lapin (Carmeliet, 1985, 1992; Neto, 1993; Adamantidis et coll., 1994), de chien (Gwilt et coll., 1990) ou de cobaye (Tande et coll., 1990; Escande et coll. 1992; Kii et Ito, 1997). La stimulation à basse fréquence (inférieures à 0.5 Hz) est un caractère commun aux études réalisées *in vitro*. Son influence sur le développement des EAD a bien été démontré dans des fibres de Purkinje de chien, en présence de composés capables de bloquer un ou plusieurs courant(s) potassique(s) comme le césium (Brachmann et coll., 1983; Davidenko et Rosen, 1984), en présence de médicaments antiarythmiques comme la quinidine (Roden et Hoffman, 1985) ou non cardiotropes comme l'érythromycine (Rubart et coll., 1993). En outre, le ralentissement de la fréquence de stimulation, la diminution de la concentration extracellulaire en potassium [K]e (de 2 à 3.5 versus 1 mM) (Damiano et Rosen, 1984, Coulombe et coll., 1985) et/ou en magnésium [Mg]e (de 0.1 à 0.5 versus 1 mM) (Roden et Hoffman, 1985; Nattel et Quantz, 1988) constituent des manoeuvres efficaces, favorisant le développement des EAD en potentialisant les effets d'allongement de la repolarisation.

L'implication des courants calciques dans l'apparition des EAD est mise en évidence par la capacité des antagonistes calciques (Roden et Hoffman, 1985; Nattel et Quantz, 1988) et, dans une certaine mesure, de l'augmentation de [Mg]e (de 1 à 5 mM) (Davidenko et coll., 1989; Borgat et coll., 1992) à supprimer les EAD. De la même façon, de faibles concentrations de bloqueurs des canaux sodiques, comme la tétrodotoxine, sont le plus souvent utilisées pour démontrer la participation de ces canaux dans l'initiation des EAD (Brachmann et coll., 1983; Coulombe et coll., 1985; Roden et Hoffman, 1985; Nattel et Quantz, 1988).

Les cellules M, particulièrement sensibles aux effets d'allongement de la repolarisation, sont parfois utilisées comme modèle d'évaluation *in vitro* de la potentialité arythmogène des médicaments. Les études expérimentales sont alors réalisées sur des coupes transversales de la paroi libre du ventricule gauche (Sicouri et Antzelevitch, 1993; Antzelevitch et coll., 1996), le plus souvent chez le chien où elles ont été découvertes. Leur existence a également été démontrée *in vitro* chez le chien (Sicouri et Antzelevitch, 1991; Balati et coll., 1998), l'homme (Drouin et coll., 1995), le cobaye (Sicouri et coll., 1996) et le lapin (Weirich et coll., 1996). L'utilisation des coupes transversales de la paroi ventriculaire permet d'avoir une estimation de la dispersion de la repolarisation transmurale, impliquée dans la perpétuation des TdP (Habbab et El-Sherif, 1990). Cependant, bien que les forts gradients de dispersion de la repolarisation transmurale, invivo (El-Sherif, 1996). Bien plus, les études cliniques ne rapportent pas de gradient biphasique de la repolarisation ventriculaire transmurale qui suggèrerait la présence de cellules M *in vivo* (Näbauer, 1998).

Cependant, les préparations multicellulaires les plus largement utilisées restent les fibres de Purkinje qui sont des préparations facilement accessibles, dans lesquelles l'allongement de la repolarisation des potentiels d'action est beaucoup plus important que dans le myocarde ventriculaire et permet plus facilement l'apparition d'EAD (Carmeliet, 1985; El-Sherif et coll., 1988; Nattel et Quantz, 1988). Bien sûr, la potentialité arythmogène d'un composé ne peut raisonnablement être estimée sur sa seule capacité à retarder la repolarisation cellulaire et à induire des EAD et des activités rythmiques soutenues dans une seule espèce animale. Etant donné la grande hétérogénéité de la durée des potentiels d'action, les études sont généralement élargies à différents tissus ou espèces animales (Janse et coll., 1998).

Les différences de densité des canaux ioniques contribuant à la repolarisation cellulaire entre les espèces animales et au sein d'une même espèce animale, entre les tissus, peuvent être mises à profit afin d'étudier plus sélectivement les effets d'un composé sur une population de canaux ioniques.

Ainsi, le courant potassique voltage-dépendant transitoire sortant I_{to1} est le principal courant responsable de la repolarisation des potentiels d'action des myocytes ventriculaires de rat (Josephson et coll., 1984) alors qu'il est absent chez le cobaye. De ce fait, une étude réalisée sur des préparations multicellulaires ou des myocytes isolés de ventricule de cobaye permet de s'affranchir de l'influence du courant I_{to} sur la repolarisation. De la même façon, l'amplitude du courant I_{to} est plus importante à l'étage atrial qu'à l'étage ventriculaire. Les deux composantes I_{to1} et I_{to2} sont bien représentées dans les myocytes auriculaires humains (Escande et coll., 1987) et de lapin (Giles et Imaizumi, 1988). Elles sont d'amplitude plus modeste dans les cellules ventriculaires de chien (Tseng et Hoffman, 1989), de lapin (Giles et Imaizumi, 1988; Hiraoka et Kawano, 1989; Zygmunt et Gibbons, 1991) de chat (Furukawa et coll., 1990) et les cellules ventriculaires humaines (Li et coll., 1996b). Par ailleurs, au sein de la paroi ventriculaire, le courant I_{to1} est plus important à l'épicarde qu'à l'endocarde (Litovsky et Antzelevitch, 1988; Fedida et Giles, 1991; Li et coll., 1998). Les deux composantes I_{to1} et I_{to2}

représentent un large courant dans les fibres de Purkinje de veau (Siegelbaum et Tsien, 1980), de mouton (Carmeliet et Corabaoeuf, 1982) et de lapin (Sipido et coll., 1993).

Le courant rectifiant retardé I_K est également sujet à de grandes variations interespèces. Les deux composantes I_{Kr} et I_{Ks} sont bien représentées dans les myocytes ventriculaires de cobaye (Sanguinetti et Jurkiewicz, 1990) et de chien (Gintant, 1996). Elles sont d'amplitude moindre dans les cellules ventriculaires humaines où par ailleurs, le courant IKur est absent (Konarzewska et coll., 1995; Li et coll., 1996b). Par contre, le courant I_{Ks} est de faible amplitude dans les myocytes ventriculaires de lapin (Salata et coll., 1996) et est absent chez le chat (Follmer et Colatsky, 1990; Furukawa et coll., 1992). Les deux composantes du courant I_K sont absentes dans les myocytes ventriculaires de rat (Tande et coll., 1990). L'amplitude du courant IK est beaucoup plus faible dans les myocytes auriculaires que dans les myocytes ventriculaires (Wang et coll., 1994, Nygren et coll., 1998). En revanche, il est très important dans les fibres de Purkinje de nombreuses espèces (Carmeliet, 1985; Gintant, 1985; Scamp et Carmeliet, 1989). Enfin, le courant rectifiant retardé IK1 est important dans les myocytes ventriculaires de lapin (Kameyama et coll., 1983; Shimoni et coll., 1991; Varro et coll., 1991), de cobaye (Hume et Uehara, 1985; Kurachi, 1985; Ishihara et coll., 1989; Jurkiewicz et Sanguinetti, 1996) et de rat (McLarnon et Xu, 1995), dans les myocytes ventriculaires humains (Konarzewska et coll., 1995) et les fibres de Purkinje (Noma et coll., 1984). Il est de plus faible amplitude à l'étage atrial (Heidbüchel et coll., 1990; Wu et coll., 1991).

Depuis l'avancée des techniques de potentiel imposé et de biologie moléculaire, de nombreuses études sont réalisées sur des canaux ioniques natifs ou sur des canaux clonés et réexprimés dans des systèmes d'expression comme les ovocytes de Xénope. Un grand nombre de gènes codant pour des SU de différents types de canaux potassiques ont été clonés. Ils proviennent de tissus (cerveau ou coeur) et d'espèces animales différents comme la drosophile, le rat, la souris ou l'homme (Priori et coll., 1999). Les SU codées par ces gènes sont divisées

en familles en fonction de leur structure et de leur fonction: la famille des canaux voltagedépendants, la famille des courants rectifiants dans le sens entrant et la famille des courants dits « de fond » (« background channels »). Cependant, l'identification des courants générés par les canaux clonés aux courants natifs est délicate en raison de la grande diversité de structure des canaux potassiques.

L'utilisation des gènes clonés permet d'étudier directement les effets d'un composé sur un type de canal ionique. Cependant, l'extrapolation des résultats obtenus dans ce type de modèle présente certaines limites: les ovocytes de Xénope possèdent des protéines canalaires endogènes et des charges à la surface de la membrane cellulaire, qui sont susceptibles de modifier le comportement du canal cloné, et qui sont différentes de celles des myocytes natifs. Bien plus, les ovocytes de Xénope ne possèdent pas l'ensemble des mécanismes indispensables à la maturation des protéines, ni les systèmes de régulation intracellulaire, ce qui altère les propriétés des canaux clonés. En outre, les études réalisées dans ces modèles se font à des températures relativement basses, souvent la température ambiante, ce qui ralentit les cinétiques des canaux ioniques. Enfin, l'extrapolation des résultats obtenus dans ce type de modèle, à la cellule cardiaque entière est difficile surtout lorsqu'un médicament exerce des effets multiples sur différents types de canaux ioniques cardiaques.

2) - Les modèles expérimentaux pharmacologiques in vivo:

Il existe peu de modèles expérimentaux *in vivo* pour l'évaluation de la potentialité arythmogène des médicaments. Les modèles existants sont réalisés chez le chien vigile (Weissenbuger et coll., 1991) ou anesthésié (Vos et coll., 1995; Verduyn et coll., 1997a, b) ou chez le lapin vigile ou anesthésié (Carlsson et coll., 1990; 1993; Buchanan, 1993).

Dans ce type de modèle, la potentialité arythmogène d'un médicament est basée sur sa capacité à induire des EAD sur des PAM enregistrés à l'épicarde et/ou à l'endocarde, à allonger l'intervalle QT et à provoquer des TV de type polymorphe sur l'ECG de surface enregistré simultanément.

Des études déjà anciennes réalisées chez le chien anesthésié en présence de césium (Lévine et coll., 1985) ou d'AP-A (El-Sherif et coll., 1988) ont montré l'étroite relation existant entre l'apparition des EAD sur des PAM à l'épicarde et à l'endocarde, et le développement d'extrasystoles ventriculaires sur l'ECG (Lévine et coll., 1985) (Figure 19). Elles ont fourni des arguments supplémentaires en faveur de la propagation dans le myocarde ventriculaire des EAD initiées dans les fibres de Purkinje et de leur rôle dans l'apparition d'une onde U proéminente pouvant donner naissance à des extrasystoles ventriculaires et des Torsades de Pointes (TdP) (El-Sherif, 1988) (Figure 20).

Chez le chien, une bradycardie peut être obtenue par stimulation vagale (Lévine et coll., 1985), par écrasement du noeud sinusal (Ben-David et Zipes, 1990) ou par fulguration du noeud AV (Brachmann et coll., 1983). Le plus souvent, elles est induite par un bloc AV complet consécutivement à l'injection de formaldéhyde dans le noeud AV (Weissenburger et coll., 1991; Vos et coll., 1995; Verduyn et coll., 1997). Une hypokaliémie peut être surajoutée par l'administration chronique de fortes doses de diurétiques comme le furosémide et l'hydrochlorothiazide pendant plusieurs semaines chez le chien (Weissenburger et coll., 1991). Cependant, l'hypokaliémie peut induire à elle seule une insuffisance rénale et de ce fait, augmenter les taux plasmatiques des composés éliminés par le rein.

Dans ces modèles, un allongement bradycardie-dépendant de l'intervalle QT et des tachycardies ventriculaires de type polymorphe, présentant des caractéristiques communes aux TdP ont été observées chez le chien en présence de quinidine (Weissenburger et coll., 1991), de sotalol (Vos et coll., 1995; Verduyn et coll., 1997a) ou d'almokalant (Verduyn et coll., 1997a). Il faut souligner la faible incidence (12 % des essais) des TdP spontanées induites par le sotalol (Figure 21A) et favorisées voire induites par une stimulation électrique programmée à l'épicarde (Figure 21B) (Verduyn et coll., 1997a). Celle-ci favorise la dispersion de la repolarisation ventriculaire en reproduisant les changements brusques de la fréquence cardiaque, c'est-à-dire l'alternance de cycles longs et de cycles courts et l'apparition d'extrasystoles, caractérisant les séquences qui précèdent les TdP d'origine acquise observées en clinique.



D'après Levine et coll., 1985

Figure 19: Exemple représentatif de salves de tachycardies ventriculaires (TV) non soutenues après administration intraveineuse de césium chez le chien. Electrocardiogramme de surface (ECG), potentiels d'action monophasiques enregistrés à l'épicarde (EPI) et à l'endocarde (ENDO).



D'après El-Sherif et coll., 1988

Figure 20: Enregistrements simultanés de potentiels d'action monophasiques (PAM) et transmembranaires (PAT) à l'épicarde et à l'endocarde et de l'électrocardiogramme de surface (ECG) après administration intraveineuse d'anthopleurine-A chez le chien anesthésié. (flèche) EAD; (*) onde U.



D'après Vos et coll., 1995

Figure 21: (A) Enregistrement d'EAD (*) sur des potentiels d'action monophasiques (PAM) simultanés au développement d'extrasystoles spontanées (A) et d'épisodes de Torsades de Pointes (TdP) sur l'ECG (voies I, II et III), induites par stimulations (S) électriques (B) après injection de d-sotalol chez le chien anesthésié en bloc auriculoventriculaire. Chez le lapin, les TV et les TdP ne sont apparues que sous stimulation α_1 -adrénergique associé à un agent antiarythmique de classe III comme le clofilium (Figure 22), le sématilide, l'ampérozide (Carlsson et coll., 1990), l'ibutilide et le sotalol à fortes doses, le dofétilide (Buchanan et coll., 1993), et l'almokalant (Carlsson et coll., 1993).

La stimulation cardiaque à fréquence rapide, l'administration intraveineuse de tétrodotoxine ou de magnésium diminuent l'incidence des EAD et/ou les accès de TV et de TdP chez le chien (Brachmann et coll, 1983; Levine et coll., 1985; Bailie et coll., 1991 Weissenburger et coll., 1991; Vos et coll., 1995; Verduyn et coll., 1997a, b) et le lapin (Carlsson et coll., 1990, 1993).

Ainsi, des TdP peuvent être obtenues *in vivo* sur des animaux conscients ou anesthésiés. Cependant, chez le chien vigile dont l'activité neurovégétative est préservée, le stress de l'animal, et donc l'influence des catécholamines endogènes, peut conduire à de grandes variations dans la reproductivité des TV. L'administration de doses élevées (mais non toxiques) de médicaments n'est pas toujours bien tolérée (vomissements), ce qui rend difficile l'application de larges gammes de doses. D'autre part, l'utilisation de l'alphachloralose chez le lapin provoque une hypokaliémie ([K]e inférieure à 3 mM) et, de ce fait, ne permet pas une étude en situation de normokaliémie. Bien plus, les TdP n'apparaissent chez le lapin que sous stimulation α_1 -adrénergique qui n'est pas sans rappeler le mode de déclenchement des Torsades de Pointes chez des patients atteints du syndrome du QT long congénital. Par ailleurs, la potentialité arythmogène des médicaments pourrait être surestimée en raison de la forte densité des récepteurs α 1-adrénergiques dans cette espèce animale en comparaison avec l'homme.



D'après Carlsson et coll., 1990

Figure 22: Enregistrement d'un électrocardiogramme présentant une onde T proéminente (A), des extrasystoles ventriculaires (B) et une Torsade de Pointes (C) après administration intraveineuse de clofilium en présence de méthoxamine chez le lapin anesthésié. En résumé, la mise en place d'un modèle expérimental animal fiable et adéquat aux propriétés électrophysiologiques des cellules cardiaques humaines reste un problème majeur (Eckardt et coll., 1998a). La complexité de certains protocoles mis en place souligne la difficulté de déclencher des TdP avec une incidence satisfaisante. Les Torsades de Pointes apparaissent dans un contexte réunissant un grand nombre de facteurs, très difficiles voire impossibles à reproduire simultanément dans un modèle expérimental. Les modèles pharmacologiques développés sont limités par l'incompatibilité de certains résultats avec les caractéristiques cliniques des TdP et par la difficulté d'établir un lien direct de cause à effet entre les conditions expérimentales, les évènements cellulaires (EAD) et subcellulaires (effets sur les canaux ioniques) et/ou l'apparition de TdP.

Nos travaux de recherche se sont inscrits dans le cadre de l'évaluation des effets proarythmiques de médicaments non cardiotropes en développement ou suspectés de favoriser des troubles du rythme ventriculaires, en utilisant le recueil *in vitro* des potentiels d'action transmembranaires de fibres de Purkinje de lapin. Dans cette espèce animale, les fibres de Purkinje se sont révélées particulièrement sensibles à la détection des modifications de l'activité électrique cellulaire cardiaque, avec une bonne corrélation entre les modifications des paramètres des potentiels d'action et les arythmies observées chez l'homme, sur l'ECG. Cependant, il est apparu que les paramètres du potentiel d'action habituellement relevés ne tenaient pas compte de certaines modifications du profil des potentiels d'action et plus particulièrement de la morphologie de la phase initiale de repolarisation.

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié les répercussions de la diminution de différents courants ioniques sur le profil des potentiels d'action transmembranaires de fibres de Purkinje de lapin, enregistrés par microélectrode de verre.

Dans une seconde partie, nous avons évalué les effets électrophysiologiques et la potentialité arythmogène de médicaments non cardiotropes, appartenant à des familles thérapeutiques différentes, associés en clinique à un allongement de la repolarisation ventriculaire et/ou à l'apparition de graves troubles du rythme cardiaque.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons étudié les cinétiques d'installation et de retrait des effets d'allongement de la repolarisation exercé par un médicament, dont l'utilisation est associée au développement de Torsades de Pointes.

89

Résultats

Nous avons pensé qu'il était important pour des études de première intention de disposer d'une préparation sensible disposant des canaux ioniques correspondant à ceux qui contribuent à la repolarisation des cellules cardiaques humaines. Cependant, les paramètres habituellement mesurés ne rendent pas compte des modifications du profil, en particulier de la morphologie du « spike-and-dome » des potentiels d'action. Les travaux réalisés antérieurement ont souligné la pertinence des résultats obtenus sur les fibres de Purkinje de lapin (Adamantidis et coll., 1993, 1995). Afin de faciliter les études de type explicatif, nous avons entrepris (i) d'évaluer les répercussions de la diminution de courants ioniques entrants ou sortants sur le profil des potentiels d'action de fibres de Purkinje de lapin, (ii) d'appliquer les apports de nos observations à l'étude des effets électrophysiologiques de quelques médicaments appartenant à des familles thérapeutiques différentes et qui ont été associés à un allongement de l'intervalle QT ou à la survenue de trouble du rythme à type de Torsades de Pointes. Il s'agit du cisapride, un médicament prokinétique, du diphémanil, un médicament anticholinergique, et de la sparfloxacine, un agent antibiotique de la famille des fluoroquinolones. L'étude a tenu compte, dans un premier temps, des paramètres habituellement mesurés dont les résultats ont fait l'objet de publications présentées ci-après. Dans un second temps, l'étude a été complétée par l'évaluation des modifications du profil du « spike-and-dome ».

I - LES REPERCUSSIONS DE LA DIMINUTION DE COURANTS IONIQUES SUR LE PROFIL DES POTENTIELS D'ACTION DE FIBRES DE PURKINJE DE LAPIN. SONT-ELLES PREDICTIVES D'UNE POTENTIALITE ARYTHMOGENE ?

Article n°1: Dumotier BM, Adamantidis MM, Puisieux FL, Bastide MM, Dupuis BA. Repercussions of pharmacologic reduction in ionic currents on action potential profile recorded from rabbit Purkinje fibers: are they indicative of arrhythmogenic potential ? Drug Dev Res 1999; 46: sous-presse.

Les travaux de recherche réalisés sur des fibres de Purkinje de lapin ont montré que les altérations du profil des potentiels d'action pouvaient être reliées à la modification de certains courants ioniques. Cependant, il existe peu de données concernant les conséquences du blocage sélectif des courants ioniques sur la repolarisation et particulièrement sur le caractéristique « spike-and-dome » des potentiels d'action des fibres de Purkinje. Nous avons donc entrepris d'étudier les répercussions d'une diminution des courants entrants ou sortants sur la repolarisation des potentiels d'action de fibres de Purkinje de lapin et d'en évaluer la prédictivité en terme de potentialité arythmogène.

Repercussions of Pharmacologic Reduction in Ionic Currents on Action Potential Configuration in Rabbit Purkinje Fibers: Are They Indicative of Proarrhythmic Potential?

Bérengère M. Dumotier, Monique M. Adamantidis,* François L. Puisieux, Michèle M. Bastide, and Bernard A. Dupuis

Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine Henri Warembourg, Pôle Recherche, Lille, France

Strategy, Management and Health Policy					
Venture Capital Enabling Technology	Predinical Research	Preclinical Development Toxicology, Formulation Drug Delivery, Pharmacokinetics	Clinical Development Phases I-III Regulatory, Quality, Manufacturing	Postmarketing Phase IV	

ABSTRACT The evaluation of the cardiac safety of newly developed drugs by electrophysiological studies are today mandatory in several countries. A number of experimental models performed either on multicellular preparations or on native or cloned ionic channels have been used but the predictivity of the results remains a matter of debate, particularly if a drug exerts mixed ionic channel-blocking effects. The present study was designed to scrutinize the repercussions of selectively decreasing the main ionic currents which play a role in the repolarization process. Using conventional microelectrodes, action potentials were recorded from rabbit Purkinje fibers stimulated at 1 Hz and 0.2 Hz and exposed to a broad range of cumulative and increasing concentrations. The compounds used were 1) potassium channel blockers (4-aminopyridine, dofetilide, terikalant, and indapamide), 2) chloride current blocker (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid), and 3) calcium channel antagonists (nifedipine, verapamil, and cadmium). It appears from our results that the modifications observed in the repolarization phase and in the spike-and-dome aspect showed that the antagonists evaluated were not as specific as one would expected and that they affected action potential profiles as a result of additional nonspecific effects which may influence the incidence of proarrhythmic events. In conclusion, we propose the use of rabbit Purkinje fibers as an in vitro model adequate for the evaluation of the cardiac safety of newly developed drugs. Drug Dev. Res. 46:000-000, 1998. © 1998 Wiley-Liss, Inc.

91

Key words: action potential; rabbit Purkinje fibers; ionic current blockade; proarrhythmic potential

INTRODUCTION

It is now well recognized that both cardiac and noncardiac drugs may promote arrhythmias [Kerin and Somberg, 1994]. Such arrhythmogenic effects can be clinically manifested as an increased rate in ventricular premature complexes and/or cause life-threatening ventricular tachycardias, such as the polymorphic ventricular tachycardia so-called torsade de pointes (TdPs). The proarrhythmic potential of antiarrhythmic drugs has been dawning on the clinical studies Cardiac Arrhythmia Suppression Trial Investigators [CAST, 1989] and SWORD [Waldo et al., 1996] with class I and class III antiarrhythmic drugs (according to the classification of Vaughan-Williams [1975]), respectively. Thus, it might be expected from sodium channel blocking effects that a decrease in conduction velocity may promote reentry, and from prolonged repolarization, abnormal impulse formation, e.g., afterdepolarizations and/or triggered activity.

9

Recent animal studies have demonstrated that an increasing number of noncardiac drugs have been associated with acquired long QT syndrome and TdPs and that they are able to alter action potential (AP) configuration by blocking cardiac ionic channels [for review, see

Received 30 November 1998; Accepted 24 February 1999s

© 1998 Wiley-Liss, Inc.

9/

^{*}Correspondence to: M.M. Adamantidis, Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine Henri Warembourg, Pôle Recherche, 1 place de Verdun, F59045 Lille Cedex, France.

Eckardt et al., 1998]. Their effects on ionic currents were even found equipotent to those exerted by highly selective potassium channel blockers. For example, the antihistamine agent terfenadine [Salata et al., 1995], the gastrointestinal prokinetic agent cisapride [Drolet et al., 1998], and the antipsychotic agent sertindole [Rampe et al., 1998] have been reported to block the rapid component of the delayed rectifier current with an IC₅₀ value similar to that of dofetilide. However, in most of cases these noncardiac drugs were also found to exert additional blocking effects on other cardiac ionic channels; for instance, the antihistamine terfenadine was demonstrated to decrease the inward sodium and calcium currents at concentrations that also block the delayed rectifier current [Ming and Nordin, 1995].

All these observations have contributed to the awareness that drugs other than antiarrhythmics can cause unexpectedly life-threatening arrhythmias and prompted the Agencies of Drug Registration to recommend the evaluation of cardiac safety and tolerability for the newly developed drugs by electrophysiological studies, which are today mandatory in several countries.

Numerous experimental models have been proposed to evaluate the proarrhythmic risk [for review, see Eckardt et al., 1998] but the predictivity of the results remains a matter of debate. Because of the discovery of a number of human cardiac K⁺ currents and of the cloning of their related genes [Wang et al., 1993; Sanguinetti et al., 1995; Wible et al., 1995], it is tempting to investigate the electrophysiologic effects of newly developed drugs by screening their effects either on cloned human channels [Rampe et al., 1993, 1998] or on the main voltagedependent ionic channels in various animal species. However, if a drug exerts mixed ionic channel blocking effects, the resulting alterations on cardiac electrogenesis will depend on the respective influence on each ionic channel and on the overlap between active concentration ranges.

We have used APs recorded from rabbit Purkinje fibers to study the effects of several noncardiac drugs that have been associated with QT interval prolongation and TdPs in patients [Adamantidis et al., 1993, 1994, 1995, 1998a,b; Puisieux et al., 1996] and we have emphasized, in all cases, the clinical relevance of our results. In addition, we have shown that these drugs could evoke early afterdepolarizations (EADs), which are considered the cellular events initiating TdPs [Eckardt et al., 1998] and exert either typical Class III antiarrhythmic effects [Adamantidis et al., 1994, 1996, 1998a,b] or mixed Class III-Class I antiarrhythmic effects [Adamantidis et al., 1993, 1994, 1995].

Therefore, we feel that rabbit Purkinje fibers can be useful as an in vitro model for the evaluation of drug proarrhythmic potential which can be further explained at the channel level using the patch clamp technique. However, from our experience it seems that the classically measured AP parameters did not take into account some of the modifications in AP configuration, particularly in the characteristic "spike-and-dome" aspect. Whether these alterations may lead per se to arrhythmogenic potential or simply contribute to risk factors was not well defined and required further investigation. Thus, the present study was designed to scrutinize the repercussions of selectively decreasing the main ionic currents which play a role in the AP profile. It appears that the antagonists evaluated were not as specific as one would expect, and that they unexpectedly affected AP profile as a result of additional nonspecific effects. We thought that this information may be helpful in the evaluation of the cardiac safety of newly developed drugs.

METHODS

New Zealand white rabbits of either sex (1.5-2.0 kg) were anesthetized with chloral hydrate (250 mg per kg) and exsanguinated. The heart was quickly excised and placed in Tyrode's solution with the following composition (in mM): NaCl, 108.2; KCl, 27.0; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 1.0; NaH₂PO₄, 1.8; NaHCO₃, 25; and glucose, 55; pH 7.35 ± 0.05 . This solution was bubbled continuously with 95% O_2 , 5% CO_2 , and warmed to 34 \pm 2°C. Running Purkinje fibers with ventricular muscle attached to both extremities were dissected carefully from the left ventricle, mounted in a 2.5 ml tissue bath perfused at 2.5 ml/ min, and kept at 36±0.5°C. The superfusate was changed to normal Tyrode's solution, which differed from the above Tyrode's solution by a lower concentration of KCl (from 27 to 4 mM) and glucose (from 55 to 11 mM). Once the resting membrane potential repolarized towards -80 mV, electrical stimulation at the frequency of 2 Hz was initiated by using 1 msec duration square wave stimuli at 1.5 times diastolic threshold amperage delivered by a JSI 0198 stimulator through a Teflon-coated bipolar steel wire electrode. After 30 min, the frequency was reduced to 1 Hz for at least 120 min stabilization.

Action potentials (AP) were recorded intracellularly with a glass microelectrode (15–25 megaohm resistance) filled with 3 M KCl connected to a high-input impedance neutralizing amplifier (model 750, WPI, New Haven, USA). They were displayed on a digital oscilloscope (DSO 1602, Gould, Valley View, OH, USA), analyzed by means of a high resolution data acquisition system (DATAPAC, Bio-Logic, Claix, France), and stored on a digital magnetic tape recorder (DTR 1201, Bio-Logic, Claix, France), which, after each experiment, allowed display on paper recordings (TA 240, Gould) of AP profiles and the occurrence and development of electrical abnormalities.

The basal stimulation rate was 1 Hz. The drug was

added to the bathing solution in increasing cumulative concentrations, each being superfused for 30 min. In control conditions and during drug superfusion, the stimulation rate was decreased from 1 to 0.2 Hz for 2 min, between the 20th and the 22nd min, and then returned to 1 Hz. This maneuver was performed to favor the occurrence of bradycardia-dependent abnormalities in the repolarization phase such as EADs. Electrophysiological measurements were made just before the changing stimulation frequency and switching to the next concentration.

Data Measurements and Compounds

All animal studies were conducted with the approval of the Ministere de L'Agriculture et de La Fôret (Certificate 01362). Figure 1 illustrates the characteristic "spikeand-dome" aspect of APs recorded from rabbit cardiac Purkinje fiber and the measured AP parameters: resting membrane potential (RMP), amplitude (APA), overshoot (OS), maximal upstroke velocity (Vmax), amplitude of the phase 1 (P1A), and AP duration at 50% and 90% repolarization (APD₅₀ and APD₉₀, respectively). In addition, Figure 1 indicates the main voltage-dependent ionic currents involved in different phases of AP: the fast inward Na⁺ current I_{Na}, the slow inward Ca²⁺ current I_{Ca(L)}, the transient outward K⁺ current I_{to}, the delayed rectifier K⁺ current I_K, and the inward rectifier K⁺ current I_{K1}.

We used 1) 4-aminopyridine (4-AP) to predominantly block I_{to1} , the calcium-independent component of I_{to} ; 2) DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid) to block I_{to2} , the 4-AP-insensitive, calcium-dependent component of I_{to} —DIDS is predominantly an an-

"spike-and-dome" predominant currents during repolarization phase: 0 mV - APA | Ito APA | Na | APD50 | Ito Na | APD90 | Ito

Fig. 1. Measurements of action potential (AP) parameters recorded in rabbit Purkinje fiber: resting membrane potential (RMP), amplitude (APA), overshoot (OS), amplitude of the early phase of repolarization termed phase 1 (P1A), and AP duration at 50% (APD₅₀) and at 90% (APD₉₀) of repolarization. I_{Na}, fast inward sodium current; I_{Ca(L)}, slow inward calcium current; I_{ro}, transient outward potassium current; I_K, delayed rectifier potassium current; I_{K1}, inward rectifier potassium current.

ion transport blocker which also blocks P2 purinergic receptors [Soltoff et al., 1993], these being not activated in our physiologic experimental conditions; 3) dofetilide to selectively block I_{Kr} , the rapidly-activating component of I_{K} ; 4) terikalant as mixed blocker of I_{Kr} and I_{K1} with some nonspecific effects on I_{to} and I_{Na} [MacLarnon and Xu, 1995]; 5) indapamide, as blocker of I_{Ks} , the slowly-activating component of I_{K} , which also blocks I_{to} and I_{Na} [Lu et al., 1998]; and 6) nifedipine, cadmium, and verapamil to block $I_{Ca(L)}$, each exerting additional effects on other ionic conductances.

In some cases, the drug-induced prolongation became so important that the preparation no longer responded to each 1 Hz stimulus. Therefore, to keep this drastic effect out of the final results, APD_{50} and APD_{90} values were estimated to 800 and 1,000 ms duration, respectively. When the fiber no longer responded to 0.2 Hz stimuli, APD_{50} and APD_{90} values were estimated to 4,000 and 5,000 ms duration, respectively. As illustrated in Figure 2, single EAD appeared as secondary depolarizations that interrupt or delay AP repolarization. It developed either at the end of AP plateau (so-called plateau-end EAD in Fig. 2a) or during the final repolarization (Fig. 2b). Less than six successive EADs were named multiple EADs (Fig. 2c) and more than six EADs was defined as sustained rhythmic activity (Fig. 2d).

4-Aminopyridine, DIDS (4,4'-diisothiocyanato-



Fig. 2. Typical examples of single and multiple early afterdepolarizations (EADs) and sustained withmic activities. (a) Plateau-end EAD (*) induced by either 1 mM 4-AP, or 10 nM dofetilide or 30 nM terikalant. (b) Single EAD (*) induced by either 10 nM dofetilide or 3 nM terikalant during late repolarization. (c) Multiple EADs arising at plateau level, induced by either 10 nM dofetilide or 10 nM terikalant. (d) Multiple EADs arising at a more negative level and initiating sustained rhythmic activities in the presence of 100 nM dofetilide or 10 nM terikalant. Open circles indicate stimulation artifacts.

stilbene-2,2'-disulfonic acid), indapamide nifedipine, and cadmium chloride were obtained commercially from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Dofetilide was a gift from Pfizer (Paris, France). Terikalant was kindly supplied by Dr. D. Escande. Verapamil (Isoptine[®]) was diluted in Tyrode's solution to a final concentration. 4-AP and cadmium chloride were dissolved in Tyrode's solution. If necessary, pH was readjusted to 7.35 ± 0.05 with 0.1 N HCl. Indapamide was first dissolved in 700 µl dimethyl sulfoxide (DMSO), then in Tyrode's solution to obtain 10 ml of 1 mM solution. DIDS, dofetilide, terikalant, and nifedipine were dissolved in 1 ml DMSO as 10 mM stock solutions, deep frozen, and used within the following 5 days. In three experiments, we tested the effects of increasing concentrations of DMSO alone on cardiac AP; to a concentration of 1%, DMSO did not significantly modify AP parameters. Stock solutions of each compound were further diluted with Tyrode's solution until final concentration Nifedipine and DIDS were continuously protected from light exposure.

The results are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). The statistical differences from the control values were identified by analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements, followed by Dunnett's test. Statistical tests were done with the statistical analysis program Instat GraphPad 1.3 (GraphPad Software, San Diego CA, USA); P < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Action Potential Changes Related to Ito1 or Ito2 Modifications

The effects of 4-AP and DIDS on APs are shown in Figure 3. At the stimulation rate of 1 Hz (Fig. 3A, left panel), 4-AP (0.03–1 mM) induced a marked concentration-dependent increase in the plateau height and lengthened the AP duration, without slowing the final repolarization. 4-AP and, to a larger extent, DIDS (3–100 μ M) caused the basal point of the notch to become increasingly positive with higher concentrations. Concomitantly, DIDS decreased APA and plateau height, thus profoundly modifying the spike-and-dome aspect. Reducing the stimulation rate from 1 Hz to 0.2 Hz (Fig. 3A, right panel) strengthened the APD-prolonging effect exerted by 4-AP and enhanced the depressing effect of DIDS on plateau height.

Quantitatively (Fig. 3B), 4-AP (0.03–3 mM, n = 6) concentration-dependently increased APD₅₀ and APD₉₀, this effect being significant from the concentrations of 0.1 and 0.3 mM, respectively. At each concentration, the magnitude of 4-AP effects on APD₅₀ and APD₉₀ was similar: $+28 \pm 3\%$ and $+22 \pm 2\%$ vs. control values (% vs. C) at 0.3 mM and $+98 \pm 19\%$ and $+88 \pm 14\%$ vs. C at 1 mM,

respectively. At the concentration of 3 mM, the lengthening in APD became so strong that 5/6 fibers showed 5 out of 4 - 2/1 responses to 1 Hz stimulation. A low stimulation rate 2/Amarkedly accentuated the 4-AP effects on AP duration (Fig. 3B, right panel). APD increased from 334 ± 20 to 486 ± 51 ms at 0.03 mM and from 393 ± 23 to 591 ± 49 ms at 0.3 mM, respectively, and 2/1 responses were ob-2/Aserved in 2/6 fibers exposed to 3 mM. 2 out of 6 -

In contrast, DIDS (n = 7) significantly reduced APD₅₀ and APD₉₀ from the concentration of 10μ M. These / # parameters were reduced by $22 \pm 5\%$ and $10 \pm 2\%$ vs. C at 10 μ M and by 31 \pm 6% and 13 \pm 3% vs. C at 30 μ M, respectively. A low stimulation rate enhanced the depressing effect of DIDS on APD in a more pronounced manner on APD₅₀ than on APD₉₀. These parameters were reduced by $28 \pm 7\%$ and $13 \pm 4\%$ vs. C at $10 \,\mu$ M and by $36 \pm 8\%$ and $14 \pm 7\%$ vs. C at 30 μ M, respectively. At the stimulation rate of 1 Hz, DIDS induced a concentrationdependent decrease in APA and P1A and concomitantly reduced Vmax, RMP, and OS (Table 1), these effects being drastic at the highest concentration tested. Interestingly, a low stimulation rate tended to minimize the P1A and Vmax depression induced by DIDS but did not affect drug effects on APA.

At the 0.2 Hz stimulation rate, 4-AP caused plateau-end EADs to develop in 146 fibers exposed to 1 mM / out of 6 (Fig. 2a) and in 246 fibers to 3 mM. They showed little 2 out of 6 amplitude but never became multiple. In contrast, EADs were never observed during exposure to DIDS.

Action Potential Changes Related to I_{Ks} , I_{Kr} and/or I_{K1} Modifications

The effects of indapamide, dofetilide, and terikalant on AP are shown in Figure 4A. The I_{Ks} -blocking drug indapamide (10-100 µM) did not alter APA but moderately heightened the notch in a concentration-dependent manner and at 100 µM shortened AP duration. As expected, dofetilide (1-100 nM) induced a marked concentration-dependent APD lengthening which appeared at the plateau level without modifying the phase 1 amplitude. A low stimulation rate strongly enhanced dofetilide effects, especially at the concentrations of 10 and 30 nM. At 100 nM (not shown) the prolonging effect was so pronounced that the fiber no longer responded to the stimu- each of h lug. At the stimulation rate of 1 Hz, terikalant (10 to 100 i H nM) concentration-dependently increased the plateau height without altering the "spike-and-dome" configuration and lengthened AP duration with a moderate slowing down in the final repolarization (Fig. 4A). This was observed in 6+8 fibers. In the two remaining fibers (not 6 out of 8 shown), terikalant did not heighten the plateau but markedly delayed the final repolarization, this being more evident at a low stimulation rate.

Quantitative results are shown graphically in Fig-

was A ichieved 4

#

ACTION POTENTIAL AND IONIC CURRENT BLOCKERS



dent effects of 4-AP and DIDS on action potentials recorded from rabbit Purkinje fibers. Left panels give the results obtained at the stimulation rate of 1 Hz and right panels at 0.2 Hz. (A) Representative examples of superimposed traces in control (c) and in the presence of increasing concentrations of 4-AP and DIDS. The dotted lines underline the evolution of the phase 1 amplitude (P1A) with increasing concentrations. (B) Quantitative results of concentration-dependent effects of 4-AP (n = 6) and DIDS (n = 7) on AP duration at 50% (APD₅₀) and 90% (APD₉₀) of repolarization, on AP amplitude (APA) and P1A. Data are expressed as means ± SEM (vertical bars). *P < 0.05 vs. control values (0). See text for details.

Fig. 3. Concentration-depen-

ure 4B. At the stimulation rate of 1 Hz (Fig. 4B, left panel), only 100 µM indapamide (n = 6) slightly but significantly shortened APD₅₀ and APD₉₀ by -10 ± 1 and -7 ± 1% vs. C, respectively, this effect being more important at a low stimulation rate (Fig. 4B, right panel). Dofetilide (0.3-100 nM, n = 6) prolonged APD₅₀ and APD₉₀, this effect being significant from the concentration of 1 nM (+18±% / 2/and +16 ± 2% vs. C, respectively). Its intensity becomes of 6 fibers at 10 nM, 1/6 fibers at 30 nM and 1/6 fibers at 100 nM, and was furthermore strengthened by a low stimulation rate. Similarly, terikalant (3-300 nM, n = 8) concentration-dependently lengthened APD₅₀ and APD₉₀

 $(+19 \pm 4/and +22 \pm 3\% \text{ vs. C at 10 nM and } +122 \pm 17\% / \% / \% / \% / and +119 \pm 16\% \text{ vs C. at 100 nM, respectively} and 2+1 2/4 responses were induced in 3+8 fibers by 100 nM and in 3 out of 8 in 3+8 fibers by 300 nM terikalant. 3 out of 8 in 3 out$

The reduction of the phase 1 induced by indapamide was slight but significant at the lowest concentration, being more marked at a low stimulation rate. However, APA remained unchanged at both frequencies. With dofetilide, P1A and APA were never significantly modified and only P1A was significantly decreased by 300 μ M terikalant. Neither indapamide nor dofetilide modified RMP, Vmax, or OS, but 100 μ M terikalant significantly reduced Vmax (Table 2).

		RMP (mV)		Vmax (V/s)		OS (mV)	
# / 4-AF(mN	4-AF(mM)	1 Hz	0.2 Hz	1 Hz	0.2 Hz	1 Hz	0.2 Hz
	(n = 6)						
	С	-92.7 ± 0.7	-93.4 ± 0.4	587 ± 38	566 ± 51	34.0 ± 0.6	32.4 ± 0.9
	0.03	-92.5 ± 0.8	-93.0 ± 0.6	563 ± 44	552 ± 49	33.5 ± 0.6	32.8 ± 0.8
	0.1	-92.7 ± 0.8	-92.6 ± 0.9	523 ± 43	535 ± 50	33.8 ± 0.6	32.6 ± 0.7
	0.3	-92.3 ± 0.7	-91.6 ± 0.9	498 ± 38	517 ± 58	33.3 ± 0.5	33.0 ± 0.8
	1	-91.5 ± 0.8	$-90.0 \pm 0.9^*$	467 ± 38*	487 ± 45	32.7 ± 0.7	32.6 ± 0.8
	3	-90.6 ± 0.4	-87.0 ± 1.0	469 ± 37	485 ± 68	32.0 ± 0.8	34.0 ± 0.6
Shi							
NG	(n = 7)						
	С	-91.0 ± 0.4	-90.6 ± 0.5	558 ± 26	566 ± 37	31.4 ± 0.4	31.7 ± 0.7
	3	-90.1 ± 0.6	-89.3 ± 0.6	384 ± 21*	446 ± 38*	30.0 ± 0.5	30.6 ± 0.6
	10	-89.0±0.5*	$-88.3 \pm 0.6^*$	271 ± 41*	316 ± 46*	24.7 ± 1.1*	25.3 ± 1.5*
	30	$-88.3 \pm 0.7^*$	-87.1 ± 0.7*	167 ± 22*	185 ± 21*	17.7 ± 2.0*	18.9±1.5*
	100	-87.7 ± 0.7*	$-86.9 \pm 0.9^*$	$146 \pm 14^*$	$143 \pm 14^*$	$16.9 \pm 2.1*$	16.6±1.9*

TABLE 1. Concentration-Dependent Effects of 4-AP and DIDS on Action Potential Recorded From Rabbit Purkinje Fibers Stimulated at the Rate of 1 Hz and 0.2 Hz

Data are expressed as mean \pm SEM and compared by ANOVA followed by Dunnett's test. RMP, resting membrane potential; Vmax, maximal upstroke velocity of phase 0; OS, overshoot; 4-AP, 4-aminopyridine; C, control. *P < 0.05 vs. control values.

EADs developed in the presence of dofetilide and terikalant. At the very low concentration of 10 nM, dofetilide induced the appearance of plateau-end 2 out of 6 HEADs (Fig. 2a) in 2/6 fibers and of multiple EADs A our of 6 H(Fig. 2c) in 1+6 fibers. In this latter fiber and in another one exposed to 100 nM dofetilide, multiple EADs initiated sustained rhythmic activities (Fig. 2d) which ceased before complete repolarization of the م مده الم 8 → cell. In 148 fibers, terikalant caused single EADs (Fig. 2b) to appear late in the repolarization phase at the very low concentration of 3 nM and multiple EADs (Fig.2c) at the concentration of 10 nM. Multiple EADs initiating sustained rhythmic activities (Fig. 2d) also out of 8 developed during late repolarization in 148 other fibers. In the latter, 30 nM terikalant caused multiple EADs (Fig. 2c) of large amplitude to occur at the stimulation rate of 1 Hz, thus rendering the fiber unresponsive to each stimulus. On the other hand, 30, 100, and 300 nM terikalant induced plateau-end EADs 1 out of 8 2 out of 8 (Fig. 2a) under a low stimulation rate in 148 fibers, 24 8 fibers, and 348 fibers, respectively. 3 out of 8

Action Potential Modifications Related to ICa(L) Block

At the stimulation rate of 1 Hz, nifedipine (0.1 to 10 μ M) concentration-dependently altered the "spikeand-dome" configuration (Fig. 5A). It lessened the dome, rendered the basal point of the notch less negative, and shortened the plateau duration without altering the rate of final repolarization. Cadmium (1–100 μ M) increasingly depressed the dome so far that it disappeared, rendered the basal point of the notch more negative, and lowered the plateau height, thus leading to an increase in the

amplitude of the early phase of repolarization. At the highest concentration, APA was slightly reduced. Verapamil $(0.3-30 \mu M)$ increasingly reduced the amplitude of the early phase of repolarization, rendered the basal point of the notch less negative, and decreased the height of the dome, thus leading to the suppression of the "spike-anddome" configuration. Plateau duration was shortened and the final repolarization delayed by the high concentrations of 10 and 30 µM. A low stimulation rate did not modify nifedipine and cadmium effects on AP. It minimized the depressing effect of verapamil on plateau duration and on the early phase of repolarization, but reinforced its prolonging effects on final repolarization. Interestingly, the height of the dome was increased in the 0.3-3 µM concentration range and reduced by the higher concentrations.

Quantitatively, the dose-dependent decrease in APD_{50} and APD_{90} induced by nifedipine (n = 8) at the stimulation rate of 1 Hz (Fig. 5B, left panel), became significant from the concentration of 1 µM. APD₅₀ and APD₉₀ were reduced by $17 \pm 4\%$ and $12 \pm 2\%$ vs. C at 1 μ M and by 40 \pm 5% and 31 \pm 4% vs. C at 10 μ M, respectively. From the concentration of 30 μ M, cadmium (n = 7) significantly reduced APD₅₀ (-10 ± 3 and $-17 \pm 5\%$ vs. C at % Å 30 and 100 µM, respectively) but lengthened APD 90 (+10 # 6 $\pm 4\%$ vs. C at 30 and $\pm 10\pm 5\%$ vs. C at 100 μ M). Verapamil $(0.1-30 \mu M, n = 9)$ significantly shortened APD₅₀ from the concentration of 10 μ M (-13 ± 5% vs. C) and conversely significantly prolonged APD₉₀ from the concentration of $3 \mu M$ (+18 ± 3% vs. C). A low stimulation rate (Fig. 5B, right panel) barely enhanced the effects of nifedipine and cadmium on APD₉₀. In contrast, a low

ACTION POTENTIAL AND IONIC CURRENT BLOCKERS



Fig. 4. Concentration-dependent effects of indapamide, dofetilide, and terikalant on APs recorded from rabbit Purkinje fibers. Left panels give the results obtained at the stimulation rate of 1 Hz and right panels at 0.2 Hz. (A) Representative examples of superimposed traces in control (c) and in the presence of increasing concentrations of indapamide (INDA), dofetilide (DOFE), and terikalant (TERI). The dotted lines underline the evolution of the phase 1 amplitude (P1A) with increasing concentrations. (B) Quantitative results of concentration-dependent effects of INDA (n = 6), DOFE (n = 6), and TERI (n = 8)on AP duration at 50% (APD₅₀) and 90% (APD₉₀) of repolarization, on APA and on P1A. Data are expressed as means ± SEM (vertical bars). *P < 0.05 vs. control values (0). See text for details.

7

stimulation rate reversed the depressing effects of $0.3-10 \ \mu$ M verapamil on APD₅₀, which was significantly lengthened (+15±2/and +18±7% vs. C at 1 and 10 μ M, respectively) and noticeably accentuated its prolonging effect on APD₉₀ (+44±18% vs. C at 3 μ M).

At the stimulation rate of 1 Hz, P1A was concentration-dependently and significantly decreased by 1– % \bigwedge 10 μ M nifedipine (-17 ± 5 and -29 ± 11% vs. C at 1 and 10 μ M, respectively) and by 10–30 μ M verapamil (-19 ± % \bigwedge 5 and -64 ± 9% vs. C, respectively), but was significantly increased by 100 μ M cadmium (+13 ± 6% vs. C). On the other hand, APA was significantly decreased by 100 μ M cadmium (-5±1% vs. C) and 30 μ M verapamil (-12±3% vs. C). A low stimulation rate did not influence nifedipine effects on P1A and APA but it reinforced the cadmium-induced increase in P1A and markedly reduced the depressing effect of 30 μ M verapamil on P1A and APA. It should be emphasized that a decrease in Vmax was induced in a concentration-dependent manner by verapamil and cadmium (Table 3), this effect being significant from the concentrations of 3 μ M and 10 μ M, respectively. A significant reduction in RMP was observed in the presence of 30–100 μ M cadmium and 30 μ M verapamil.

	RMI	P (mV)	Vmax	(V/s)	OS (r	nV)¢	14
Indapamide (µM)	1 Hz	0.2 Hz	1 Hz	0.2 Hz	1 Hz	0.2 Hz	
(n = 6)							
С	-91.8 ± 0.8	-91.8 ± 0.7	605 ± 42	588±59	31.8 ± 0.7	31.5 ± 0.4	
10	-92.0 ± 0.5	-91.5 ± 0.6	572 ± 50	562 ± 51	30.8 ± 0.9	32.5 ± 0.6	
30	-92.8 ± 0.7	-90.0 ± 0.0	553 ± 45	547 ± 59	31.0 ± 0.6	32.2 ± 0.9	
100	-92.3 ± 0.4	-91.5 ± 0.7	548 ± 46	522 ± 50	31.2 ± 0.8	32.7 ± 0.7	
Dofetilide (mM)							
(n = 6)							
С	-89.3 ± 1.0	-89.7 ± 0.6	494 ± 44	531 ± 42	32.5 ± 1.3	31.7 ± 1.0	
0.3	-90.0 ± 0.6	-87.8 ± 1.9	512 ± 60	544 ± 48	32.0 ± 1.1	34.3 ± 1.9	
1	-90.7 ± 0.2	-89.3 ± 0.5	500 ± 44	515 ± 48	31.8 ± 1.3	31.2 ± 1.0	
3	-90.3 ± 0.4	-89.8 ± 0.6	515 ± 60	558 ± 50	31.8 ± 0.9	32.0 ± 1.8	
10	-90.5 ± 0.4	-89.3 ± 0.8	490 ± 48	497 ± 50	32.5 ± 1.0	32.5 ± 1.0	
30	-87.8 ± 1.2	-88.7 ± 1.9	461 ± 58	526 ± 66	33.2 ± 1.0	32.3 ± 1.5	1
100	-88.3 ± 1.2	-89.0 ± 0.0	445 ± 35	489 ± 21	33.0±1.0	32.5 ± 1.9	5/
Terikalant (nM)							
(n = 8)							
С	-91.1 ± 0.5	-89.5 ± 0.6	519±16	542 ± 18	33.9 ± 1.1	35.5±1.3	
3	-91.3 ± 0.6	-89.5 ± 0.4	519±17	533 ± 21	34.1 ± 0.9	35.6 ± 1.1	
10	-91.0 ± 0.3	-89.3 ± 0.7	508 ± 19	546 ± 38	34.4 ± 0.9	36.1 ± 1.0	
30	-90.5 ± 0.3	-89.0 ± 0.5	501 ± 21	489 ± 45	34.6 ± 0.9	35.3 ± 0.9	
100	-89.8 ± 0.4	-88.8 ± 0.7	516 ± 34	477 ± 32*	33.6±1.1	36.0 ± 1.0	
300	-90.5 ± 0.5	-87.5 ± 4.5	518 ± 70	474 ± 80	31.5 ± 1.5	32.0 ± 1.0	

TABLE 2. Concentration-Dependent Effects of Indapamide, Dofetilide, and Terikalant on Action Potential Recorded From Rabbit Purkinje Fibers Stimulated at the Rate of 1 Hz and 0.2 Hz

Data are expressed as mean ± SEM and compared by ANOVA followed by Dunnett's test. RMP, resting membrane potential; Vmax, maximal upstroke velocity of phase 0; OS, overshoot; C, control bituation. *P < 0.05 vs. control values.

DISCUSSION

The present study shows that the effects of various channel antagonists on AP profile are not as specific as one would suspect from their targeted channel and that mixed effects on several ionic channels can be accurately evidenced in rabbit Purkinje fibers. Thus, drastic prolongation in AP repolarization and EAD occurrence were obtained with 4-AP, dofetilide, and terikalant, which did not notably modify the "spike-and-dome" configuration, whereas verapamil and cadmium exerted dual effects on repolarization without EAD development. Almost no effect on AP parameters and profile was observed with indapamide. In contrast, the "spike-and-dome" aspect was modified and even abolished by DIDS, which furthermore dramatically depressed Vmax. On the other hand, the spike was also reduced but to a lesser degree by nifedipine and verapamil, whereas it was accentuated through a lowering of the notch by cadmium. Thus, the proarrhythmic potential of a drug will follow alterations in APD and modifications in "spike-and-dome" shape with or without Vmax depression.

be drawn From H

Alterations in Action Potential Duration

AP duration is determined by a fine balance between inward and outward currents. APD prolongation can be induced by decreasing outward (K⁺) currents, by increasing inward (Na⁺ or Ca²⁺) currents, or both. In our study, only the decrease in I_{to1} by 4-AP or in I_{Kr} either selectively by dofetilide or associated with the reduction of I_{K1} by terikalant has caused APD lengthening, which occurred increasingly with concentrations and without alteration of the other AP parameters (APA, OS, Vmax, RMP) as expected from their "pure" Class III antiarrhythmic properties. The lengthening effect induced by 4-AP and dofetilide was obvious at the plateau level. This fits well with the contribution of I_{to1} and I_{Kr} to repolarization at membrane potentials positive to -40 mV [Hiraoka and Kawano, 1989; Sanguinetti and Jurkiewicz, 1990] and corresponds to the predominant contribution of Itol and I_{Kr} to the early repolarization and to the plateau phase, respectively. Accordingly, terikalant lengthened repolarization at the plateau level consistently with its potent Ikr-blocking property [Jurkiewicz et al., 1996] and at final repolarization, as expected from its IK1-blocking effect [Escande et al., 1992]. This assumption is reinforced by the fact that at high concentrations (100 nM), terikalant slightly decreased RMP in relation to the essential role of I_{K1} in maintaining the resting membrane potential during diastole. This confirms that APD lengthening at the plateau level can reasonably indicate a blocking ef-



ACTION POTENTIAL AND IONIC CURRENT BLOCKERS



Fig. 5. Concentration-dependent effects of nifedipine, cadmium, and verapamil on APs recorded from rabbit Purkinje fibers. Left panels give the results obtained at the stimulation rate of 1 Hz and right panels at 0.2 Hz. (A) Superimposed traces are recorded in control (c) and in the presence of increasing concentrations of nifedipine, cadmium, and verapamil. The dotted lines underline the evolution of the phase 1 amplitude (P1A) with increasing concentrations. (B) Quantitative results of concentration-dependent effects of nifedipine (NIFE; n = 8), cadmium (CAD; n = 7), and verapamil (VERA; n = 9) on AP duration at 50% (APD₅₀) and 90% (APD₉₀) of repolarization, on APA and P1A. Data are expressed as mean ± SEM (vertical bars). *P < 0.05 vs. control values (0). See text for details

fect on I_{to} or I_{Kr} (or both) and might be advisable for further explicative investigations at the channel level.

As expected from potassium channel blockade, the prolonging effect induced by 4-AP, dofetilide, and terikalant exhibited reverse rate-dependency (i.e., more effect at slow rates), which is held responsible for the proarrhythmic potential of "pure" Class III effects [Colatsky et al., 1990; Hondeghem and Snyders, 1990], particularly their ability to cause in vivo the bradycardia-dependent polymorphic ventricular tachycardia termed TdPs and in vitro the development of EADs. There is wide agreement among investigators that TdPs could be initiated from EADs that interrupt the repolarization phase in cells with prolonged AP duration and perpetuated through reentrant excitation due to dispersion of repolarization [Habbab and El-Sherif, 1990; El-

Nifedipine (μM)	RMP (mV)		Vmax (V/s)		OS (mV)	
	1 Hz	0.2 Hz	1 Hz	0.2 Hz	1 Hz	0.2 Hz
(n = 8)						
С	-92.3 ± 0.6	-92.3 ± 0.7	509 ± 47	520 ± 40	31.1 ± 0.8	30.6 ± 1.0
0.1	-92.4 ± 0.6	-91.3 ± 0.5	481 ± 43	514 ± 45	31.4 ± 1.0	30.9 ± 0.9
0.3	-92.5 ± 0.5	-92.1 ± 0.4	484 ± 42	492 ± 40	30.8 ± 0.7	30.6 ± 0.8
1	-92.4 ± 0.5	-91.4 ± 0.6	466 ± 39	485 ± 35	31.5 ± 0.7	30.9 ± 0.9
3	-91.3 ± 0.8	-90.8 ± 1.0	470 ± 46	459 ± 37	31.1 ± 0.5	30.0 ± 0.7
10	-90.4 ± 1.1	-89.4 ± 1.5	457 ± 39	429 ± 53*	30.3 ± 0.7	30.0 ± 0.9
Cadmium (µM)						
(n = 7)						
С	-92.6 ± 0.6	-91.7 ± 0.7	578 ± 37	568 ± 37	32.6 ± 0.9	32.8 ± 1.6
1	-91.7 ± 0.5	-91.8 ± 0.7	549 ± 26	537 ± 33	32.8 ± 1.5	33.1 ± 1.6
3	-92.0 ± 0.7	-91.5 ± 0.7	527 ± 33	536 ± 31	32.7 ± 1.4	33.1±1.7
10	$-91.4 \pm 0.8^*$	-91.3 ± 0.8	499 ± 35*	517 ± 35	32.9 ± 1.5	33.0 ± 2.1
30	-90.0 ± 1.2*	-89.8 ± 1.3	390 ± 33*	407 ± 48*	31.1 ± 2.6	32.0 ± 2.1
100	-89.2 ± 1.1*	-89.1 ± 1.1*	328 ± 42*	340 ± 37*	29.6 ± 2.1	29.7 ± 2.2
Verapamil (µM)						
(n = 9)						
С	-91.4 ± 0.4	-91.2 ± 0.5	591 ± 26	595 ± 25	30.1 ± 0.6	31.4 ± 0.7
0.1	-91.0 ± 0.4	-90.7 ± 0.4	585 ± 16	576 ± 24	30.0 ± 0.5	31.2 ± 1.0
0.3	-91.0 ± 0.4	-90.2 ± 0.1	554 ± 30	559 ± 30	30.3 ± 0.6	31.1 ± 0.6
1 .	-91.3 ± 0.5	-90.7 ± 0.4	550 ± 28	537 ± 37*	30.3 ± 0.7	31.1 ± 0.8
3	-91.0 ± 0.4	-90.7 ± 0.4	507 ± 38*	520 ± 43*	30.6 ± 0.4	30.6 ± 0.6
10	-89.6 ± 0.8	-89.8 ± 0.6	407 ± 37*	449 ± 35*	30.1 ± 0.4	30.3 ± 0.7
30	-85.2 ± 1.8*	-87.2 ± 1.3*	303 ± 34*	387 ± 31*	21.9 ± 2.7*	27.9±0.7*

TABLE 3. Concentration-Dependent Effects of Nifedipine, Cadmium, and Verapamil on Action Potential Recorded From Rabbit Purkinje Fibers Stimulated at the Rate of 1 Hz and 0.2 Hz

Data are expressed as mean ± SEM and compared by ANOVA followed by Dunnett's test. RMP, resting membrane potential; Vmax, maximal upstroke velocity of phase 0; OS, overshoot; C, control tituation.

*P < 0.05 vs. control values.

P

induced |

Sherif et al., 1996; Antzelevitch et al., 1996; Verduyn et al., 1997].

In our study, plateau-end EADs of little amplitude were predominantly observed under Itol teo decrease by 4-AP, whereas the decrease in I_{Kr} current by dofetilide or by terikalant more frequently caused the development of multiple EADs and sustained rhythmic activities, particularly under a low stimulation rate. It is noteworthy that previous reports on dofetilide effects on AP recorded from canine Purkinje fibers [Knilans et al., 1991; Gwilt et al., 1991] or on terikalant effects on guinea pig ventricular myocardium [Escande et al., 1992; Jurkiewicz et al., 1996] did not mention the appearance of arrhythmogenic events in these tissues. However, dofetilide-induced multiple EADs have been reported in guinea pig papillary muscle [Tande et al., 1990], but concentrations were 100-fold higher than those found arrhythmogenic in our study. To our knowledge, sustained rhythmic activities such as those observed in the present study with relatively low concentrations of dofetilide (100 nM) or terikalant (10 nM) and in previous studies with noncardiac drugs, such as droperidol [Adamantidis et al., 1993] and cisapride [Puisieux et al., 1996], are rarely observed (if at all) in canine or sheep Purkinje fibers or in M cells, even if these cells can generate EADs [Antzelevitch and Sicouri, 1994]. Thus, according to previous reports [Rasmussen et al., 1992; Abrahamsson et al., 1993], rabbit Purkinje fibers have exhibited a relatively high responsiveness to APD lengthening effects in comparison to Purkinje fibers and ventricular myocardium from other animal species. In addition, our results show that EADs developed at lower concentrations under 0.2 Hz than under 1 Hz. Even brief (2 min) trains of low stimulation rate seem to be a powerful maneuver in detecting arrhythmogenic potential. Therefore, it is reasonable to consider this preparation adequate in detecting arrhythmogenic potential.

G

The ability of a drug to induce EAD or subsequent triggered activities depends on its capacity to delay repolarization in a voltage range within reactivation of inward currents (Na⁺ or Ca²⁺ currents, or both) could be possible. On the one hand, the occurrence of EADs during the final repolarization at membrane potentials more negative than -40 mV is

11

consistent with a role for the "Na⁺ window" current [Coulombe et al., 1985; Nattel and Quantz, 1988]. Interestingly, sodium channel blockade has been reported in vitro to suppress such EADs and in vivo to prevent and/or treat TdPs in patients [Shimizu and Antzelevitch, 1997]. On the other hand, the facilitating role of the L-type Ca²⁺current and of the "Ca²⁺ window" current on EAD development has been well established [Shorofsky and January, 1992] and calcium blocking drugs have been found effective in suppressing EADs [Nattel and Quantz, 1988; Adamantidis et al., 1993] and in preventing TdPs in patients [Jackman et al., 1990].

In agreement with previous reports, we found APDprolonging effects with the calcium blockers verapamil [Rosen et al., 1974] and, to a lesser degree, cadmium. These observations are consistent with their blocking effects on IKr [Zhang et al., 1997; Daleau et al., 1997]. However, neither verapamil nor cadmium were able to cause EAD development, possibly owing to their Ca²⁺ antagonistic properties. However, it should be emphasized that the concentration-dependent curves of verapamil (and to a lesser degree cadmium) effects on final repolarization (i.e., APD₉₀) showed a bell-shaped profile, the prolonging effect being somewhat reversed by the highest concentrations, which strongly depressed the plateau phase (i.e., APD₅₀). This was still more obvious at the low stimulation rate of 0.2 Hz, which favors the prolonging effect. In our experience, similar bellshaped curves have been observed with the neuroleptic drug droperidol (APD was even shortened by the highest concentrations tested, see Adamantidis et al. [1993]) and the antihistamine astemizole [Adamantidis et al., 1995] and interpreted through mixed drug-induced effects on ionic channels.

In contrast, the present study shows that the I_{Ks} channel blockade by the diuretic drug indapamide [Turgeon et al., 1994] failed to prolong AP duration, which was rather shortened as a result from reduced plateau height. The existence of both components I_{Ks} and I_{Kr} of the delayed rectifier I_K in rabbit ventricular myocytes has been recently shown by Salata et al. [1996], who also demonstrated that IKs is prominent at relatively positive membrane potentials (0 to +60 mV). Furthermore, because of its slow activation and deactivation kinetics, IKs contributes little to repolarization at normal heart rate, whereas it accumulates at high rates. In Purkinje fibers, the duration of phase 1 is very short (on the order of a few milliseconds) and the membrane potential at plateau level lies near 0 mV. Therefore, in our experimental conditions IKs seems of minor importance in the AP configuration. Another interpretation of the lack of indapamide influence on APD implies its mixed blocking effects on I_{Ks} , I_{Na} , and I_{to} with quite similar IC₅₀ values [Lu et al., 1998]. It may be hypothesized that the depressing effects on the inward current can counterbalance the depressing effect on the outward currents. However, it must be kept in mind that indapamide may favor proarrhythmic events through a diuretic-induced hypokalemia.

Modifications in the Spike-and-Dome Configuration.

Our results clearly indicate that the "spike-anddome" configuration was affected differently by either drug. The spike amplitude appeared more closely related to the Ca^{2+} -dependent current I_{to2} , which is activated by intracellular calcium level [Papp et al., 1995; Zygmunt et al., 1997], than to the Ca2+-independent current Itol. Actually, high concentrations of 4-AP moderately decreased the spike amplitude by heightening the basal point of the notch towards less negative membrane potentials, as previously reported by other authors [Kenyon and Gibbons, 1979]. By contrast, the spike amplitude was drastically reduced or even suppressed by the Ito2 blocker DIDS. In addition, DIDS strongly depressed Vmax, in agreement with its blocking effects on the fast inward sodium current [Liu et al., 1998], thus contributing to the reduction in the spike amplitude. Furthermore, DIDS markedly depressed the dome amplitude. An interpretation is brought about by its property to block anion transporters. Actually, it may alter the regulation of intracellular H⁺ concentration through a blockade of the Cl'/HCO3' exchanger, thus leading to an intracellular acidosis and a reduction in the slow inward Ca²⁺ current. In fact, the dome amplitude is dependent on intracellular calcium level and follows the time course of Ca²⁺ transients.

As expected from L-type calcium current antagonism, nifedipine, cadmium, and verapamil induced a progressive decline until the disappearance of dome amplitude. In addition, both nifedipine and verapamil reduced the spike amplitude by elevating the basal point of the notch towards less negative membrane potentials. This effect may be interpreted as consecutive to a blocking effect on the transient outward current I_{to} [Gotoh et al., 1991; Jahnel et al., 1994]. By contrast, cadmium increased the spike amplitude by rendering more negative the basal point of the notch. This may be explained by its suppressing effect on the slowly inactivating Na⁺ current, which plays an important role in maintaining the plateau height in Purkinje fibers [Carmeliet, 1987]. In agreement with previous observations, we found a concentration-dependent depression in Vmax with verapamil [Rosen et al., 1974] and with cadmium consistent with its blocking effect on the fast inward Na⁺ current [DiFrancesco et al., 1985]. It should be emphasized that the effective concentrations found to induce nonspecific effects in our study are in the same range as those reported previously.

have

How Can Drug-Induced Proarrhythmic Potential **Be Drawn From Experimental Results?**

Despite the significant progress made in the understanding of the mechanisms underlying cardiac arrhythmias, the interpretation of experimental results in predicting drug-induced proarrhythmic potential remains difficult. On the one hand, as is well-established by studies on antiarrhythmic drugs, impulse conduction disturbances can be expected from drugs which show potent Class I (decreased Vmax, RMP, and APA) or Class IV (decreased AP plateau) type antiarrhythmic effects. Such effects that generally show use-dependency [Hondeghem and Katzung, 1984], i.e., more effects at higher stimulation rates, have been observed in our study with DIDS ($I_{to2} > I_{Na}$ blocker), verapamil ($I_{Ca(L)} > I_{Kr} >$ I_{Na} blocker), nifedipine ($I_{Ca(L)}>>I_{to1}$ blocker) and cadmium ($I_{Ca(L)}>>I_{Kr}>I_{Na}$ blocker). Among them, verapamil and cadmium modified the "spike-and-dome" aspect but did not prolong repolarization enough to elicit the appearance of EADs, possibly in relation with the concomitant diminution in the Na⁺ or Ca²⁺ inward currents. On the other hand, it is widely recognized that abnormal impulse initiation and more precisely triggered activity arising from EADs require marked prolongation of repolarization, which usually exhibits reverse ratedependency, i.e., more effects at a slower stimulation rate. Conversely, a proarrhythmic potential may be reasonably expected from an increasing concentration-dependent lengthening in AP repolarization.

However, it is more difficult to draw a proarrhythmic potential in the case of a bell-shaped dose-response curve of an APD-prolonging effect. Actually, a bell-shaped curve indicates that the tested drug exerts mixed effects on both inward and outward currents: the APD-prolonging effect that primarily appears at relatively S in low concentrations, und is partially or even totally reversed at high concentrations. For example, as observed in the present study and in a previous report [Rosen et al., 1974], APD was significantly prolonged by low concentrations (3 µM) of verapamil, which affect plateau phase little or not at all (i.e., L-type Ca²⁺ current) or Vmax (i.e., fast Na⁺ current), this effect being less pronounced at the high concentrations (10–30 μ M), which decrease d these inward currents. In our experience, we describe a similar bell-shaped curve on APD with droperidol [Adamantidis et al., 1993] and with astemizole [Adamantidis et al., 1995] and the appearance of EADs at the acme of the curve at clinically relevant arrhythmogenic concentrations. We found similar features with terfenadine (unpublished data) at concentrations which have been demonstrated to depress K⁺ currents, but also Na⁺ and Ca²⁺ currents [Ming and Nordin, 1995].

We used a low stimulation rate (0.2 Hz) to favor a

prolonging effect and to relieve the rate-dependent depressing effect on Vmax and on plateau duration. In addition, to reinforce the APD-prolonging effect, we found that even brief trains of low stimulation rate precipitated the development of EADs and thus could constitute valuable means for the in vitro detection of proarrhythmic potential. In this respect, it should be kept in mind that the amplitude and the number of successive EADs have been demonstrated to be a reliable index of the ability of a drug to cause TdPs [El-Sherif et al., 1996; Verduyn et al., 1997].

In conclusion, the present data strongly support the use of rabbit Purkinje fibers as an in vitro model adequate for the evaluation of proarrhythmic potential of newly developed drugs.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Marie-Claude Guillaume for technical assistance.

REFERENCES

- Abrahamsson C, Duker G, Lundberg C, Carlsson L. 1993. Electrophysiological and inotropic effects of H 234/09 (almokalant) in vitro: a comparison with two other novel IK blocking drugs, UK-68,798 (dofetilide) and E-4031. Cardiovasc Res 27:861-867.
- Adamantidis MM, Kerram P, Caron JF, Dupuis BA. 1993. Droperidol exerts dual effects on repolarization and induces early afterdepolarizations and triggered activity in rabbit Purkinje fibers. J Pharmacol Exp Ther 266:884-893.
- Adamantidis MM, Kerram P, Dupuis BA. 1994. Electrophysiological detection of iatrogenic arrhythmogenicity. Fundam Clin Pharmacol 8:391-407
- Adamantidis MM, Lacroix DL, Caron JF, Dupuis BA. 1995. Electrophysiological and arrhythmogenic effects of the histamine type 1receptor antagonist astemizole in rabbit Purkinje fibers: clinical relevance. J Cardiovasc Pharmacol 26:319-327.
- Adamantidis MM, Dumotier BM, Caron JF, Bordet R. 1998a. Sparfloxacin but not levofloxacin or ofloxacin prolongs cardiac repolarization in rabbit Purkinje fibers. Fundam Clin Pharmacol 12:70-76.
- Adamantidis M, Dumotier B, Caron J, Dupuis B. 1998b. Effets électrophysiologiques et potentialité arythmogène du diphémanil méthylsulfate sur les fibres de Purkinje de lapin. Corrélations avec les observations cliniques d'allongement de QT en pédiatrie. Arch Mal Coeur Vaise 91:1487-1494.

-9

- Antzelevitch C, Sicouri S. 1994. Clinical relevance of cardiac arrhythmias generated by afterdepolarizations: the role of M cells in the generation of U waves, triggered activity and torsade de pointes. J Am Coll Cardiol 23:259-277.
- Antzelevitch C, Sun ZQ, Zhang ZQ, Yan GX. 1996. Cellular and ionic mechanisms underlying erythromycin-induced long QT and torsade de pointes. J Am Coll Cardiol 28:1836-1848.
- Carmeliet E. 1987. Slow inactivation of the sodium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. Pflügers Arch 408:18-26.
- CAST (Cardiac Arrhythmia Suppression Trial) Investigators. 1989. Preliminary report: effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmia suppression after myocardial infarction. N Engl J Med 321:406-412.

- Colatsky TJ, Follmer CH, Starmer CF 1990. Channel specificity in antiarrhythmic drug action. Mechanism of potassium channel block and its role in suppressing and aggravating cardiac arrhythmias. Circulation 182:2235–2242.
- Coulombe A, Coraboeuf E, Malecot C, Deroubaix E. 1985. Role of the "Na window" current and other ionic currents in triggering early afterdepolarizations and resulting re-excitations in Purkinje fibers. In: Zipes DP, Jalife J, editors. Cardiac electrophysiology and arrhythmias. New York: Grune & Stratton. p 43–49.
- Daleau P, Khalifa M, Turgeon J. 1997. Effects of cadmium and nisoldipine on the delayed rectifier potassium current in guinea pig ventricular myocytes. J Pharmacol Exp Ther 281:826–833.
- DiFrancesco D, Ferroni A, Visentin S, Zaza A. 1985. Cadmium induced blockade of the fast Na channels in Purkinje fibres. Proc R Soc Lond B 223:475–484.
- Drolet B, Khalifa M, Daleau P, Hamelin BA, Turgeon J. 1998. 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 97:204–210.
- Eckardt L, Haverkamp W, Borggrefe M, Breithardt G. 1998. Experimental model of torsade de pointes. Cardiovasc Res 39:178–193.
- El-Sherif N, Caref EB, Yin H, Restivo M. 1996. The electrophysiologic mechanism of ventricular arrhythmias in the long QT syndrome: tridimensional mapping of activation and recovery patterns. Circ Res 79:474–492.
- Escande E, Mestre M, Cavero I, Brugada J, Kirchhof C. 1992. RP 58866 and its active enantiomer RP 62719 (terikalant): blockers of the inward rectifier K⁺ current acting as pure class III antiarrhythmic agents. J Cardiovasc Pharmacol 20(suppl 2):S106–S113.
- Gotoh Y, Imaizumi Y, Watanabe M, Shibata EF 1991. Inhibition of transient outward K⁺ current by DHP Ca²⁺ antagonists and agonists in rabbit cardiac myocytes. Am J Physiol 260:H1737-H1742.
- Gwilt M, Arrowsmith JE, Blackburn KJ, Burges RA, Cross PE, Dalrymple HW, Higgins AJ. 1991. UK-68,798: a novel, potent and highly selective class III antiarrhythmic agent which blocks potassium channels in cardiac cells. J Pharmacol Exp Ther 256:318–326.
- Habbab MA, El-Sherif N. 1990. Drug-induced torsades de pointes: role of early afterdepolarizations and dispersion of repolarization. Am J Med 89:241–246.
- Hiraoka M, Kawano S. 1989. Calcium-sensitive and -insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. J Physiol 410:187–212.
- Hondeghem LM, Katzung BG. 1984. Antiarrhythmic agents: the modulated receptor mechanism of action of sodium and calcium channelblocking drugs. Annu Rev Pharmacol Toxicol 24:387–423.
- Hondeghem LM, Snyders DJ. 1990. Class III antiarrhythmic agents have a lot of potential but a long way to go. Reduced effectiveness and dangers of reverse use-dependence. Circulation 81:686–690.
- Jackman WM, Szabo B, Friday KJ, Margolis D, Moulton K, Wang X, Patterson E, Lazzara R. 1990. Ventricular tachyarrhythmias related to early afterdepolarizations and triggered firing: relationship to QT interval prolongation and potential therapeutic role for calcium channel blocking agents. J Cardiovasc Electrophysiol 1:170–195.
- Jahnel U, Klemm P, Nawrath H. 1994. Different mechanisms of the inhibition of the transient outward current in rat ventricular myocytes. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 349:87–94.
- Jurkiewicz NK, Wang J, Fermini B, Sanguinetti MC, Salata JJ. 1996. Mechanism of action potential prolongation by RP 58866 and its enantiomer, terikalant. Block of the rapidly activating delayed rectifier K⁺ current, I_{Kr} . Circulation 94:2938–2946.

- Kenyon JL, Gibbons WR. 1979. 4-aminopyridine and the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. J Gen Physiol 73:139–157.
- Kerin NZ, Somberg J. 1994. Proarrhythmia: definition, risk factors, causes, treatment, and controversies. Am Heart J 128:575–585.
- Knilans TK, Lathrop DA, Nanasi PP, Schwartz A, Varro A. 1991. Rate and concentration-dependent effects of UK-68,798, a potent new class III antiarrhythmic, on canine Purkinje fibre action potential duration and V_{max} . Br J Pharmacol 103:1568–1572.
- Liu J, Lai Z, Wang X, Tokutomi N, Nishi K. 1998. Inhibition of sodium current by chloride channel blocker 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) in guinea pig cardiac ventricular cells. J Cardiovasc Pharmacol 31:558–567.
- Lu Y, Yue L, Wang Z, Nattel. 1998. Effects of the diuretic agent indapamide on Na+, transient outward, and delayed rectifier currents in canine atrial myocytes. Circ Res 83:158–166.
- MacLarnon JC, Xu R. 1995. Actions of the benzopyran compound terikalant on macroscopic currents in rat ventricular myocytes. J Pharmacol Exp Ther 275:389–396.
- Ming Z, Nordin C. 1995. Terfenadine blocks time-dependent Ca²⁺, Na⁺, and K⁺ channels in guinea pig ventricular myocytes. J Cardiovase Pharmacol 26:761–769.
- Nattel S, Quantz M. 1988. Pharmacological response of quinidine induced early afterdepolarisations in canine cardiac Purkinje fibres: insights into underlying ionic mechanisms. Cardiovasc Res 22:808–817.
- Papp Z, Sipido K, Callewaert G, Carmeliet E. 1995. Two components of [Ca²⁺]i-activated Cl⁻ current during large [Ca²⁺]i transients in single rabbit heart Purkinje cells. J Physiol 483:319–330.
- Puisieux FL, Adamantidis MM, Dumotier BM, Dupuis BA. 1996. Cisapride-induced prolongation of cardiac action potential and early afterdepolarizations in rabbit Purkinje fibres. Br J Pharmacol 117:1377–1379.
- Rampe D, Wible B, Brown AM, Dage RC. 1993. Effects of terfenadine and its metabolites on a delayed rectifier K⁺ channel cloned from human heart. Mol Pharmacol 44:1240–1245.
- Rampe D, Murawsky MK, Grau J, Lewis EW. 1998. The antipsychotic agent sertindole is a high affinity antagonist of the human cardiac potassium channel HERG. J Pharmacol Exp Ther 286:788–793.
- Rasmussen HS, Allen MJ, Blackburn KJ, Butrous GS, Dalrymple HW. 1992. Dofetilide, a novel class III antiarrhythmic agent. J Cardiovasc Pharmacol 20(suppl 2):S96–S105.
- Rosen MR, Ilvento JP, Gelband H, Merker C. 1974. Effects of verapamil on electrophysiological properties of canine cardiac Purkinje fibers. J Pharmacol Exp Ther 189:414–422.
- Salata JJ, Jurkiewicz NK, Wallace AA, Stupienski RF, Guinosso PJ Jr, Lynch JJ. 1995. Cardiac electrophysiological actions of the histamine H1-receptor antagonists astemizole and terfenadine compared with chlorpheniramine and pyrilamine. Circ Res 76:110–119.
- Salata J, Jurkiewicz N, Jow B, Folander K, Guinosso PJ, Raynor B, Swanson R, Fermini B. 1996. I_K of rabbit ventricle is composed of two currents: evidence for I_{Ks}. Am J Physiol 271:H2477-<u>2</u>489.
- Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. 1990. Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. J Gen Physiol 96:195–215.
- Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT. 1995. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. Cell 81:299–307.

Shimizu W, Antzelevitch C. 1997. Sodium channel block with

mexiletine is effective in reducing dispersion of repolarisation and preventing torsade de pointes in LQT2 and LQT3 models of the long-QT syndrome. Circulation 96:2038–2047.

- Shorofsky SR, January CT. 1992. L- and T-type Ca²⁺ channels in canine cardiac Purkinje cells. Single-channel demonstration of L-type Ca²⁺ window current. Circ Res 70:456–464.
- Soltoff SP, McMillian MK, Talamo BR, Cantley LC. 1993. Blockade of ATP binding site of P2 purinoceptors in rat parotid acinar cells by isothiocyanate compounds. Biochem Pharmacol 45:1936–1940.
- Tande PM, Bjornstad H, Yang T, Refsum H. 1990. Rate-dependent class III antiarrhythmic action, negative chronotropy, and positive inotropy of a novel I_K blocking drug, UK-68,798: potent in guinea pig but no effect in rat myocardium. J Cardiovasc Pharmacol 16:401-410.
- Turgeon J, Daleau P, Bennett P, Wiggins SS, Selby L, Roden DM. 1994. Block of I_{Ks} , the slow component of the delayed rectifier K⁺ current, by the diuretic agent indapamide in guinea pig myocytes. Circ Res 75:879–886.
- Vaughan-Williams EM. 1975. Classification of anti-dysrhythmic drugs Pharmacol Ther 1:115–138.
- Verduyn SC, Vos MA, Van Der Zande J, Kulcsàr A, Wellens HJJ. 1997. Further observations to elucidate the role of interventricular dis-

persion of repolarization and early afterdepolarizations in the genesis of acquired torsades de pointes arrhythmias. A comparison between almokalant and *d*-sotalol using the dog as its own control. J Am Coll Cardiol 30:1575–1584.

- Waldo AL, Camm AJ, deRuyter H, Friedman PL, MacNeil DJ, Pauls JF, Pitt B, Pratt CM, Schwartz PJ, Veltri EP, for the SWORD Investigators. 1996. Effects of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. N Engl J Med 348:7–12.
- Wang Z, Fermini B, Nattel S. 1993. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. Circ Res 73:1061–1076.
- Wible BA, De Biasi M, Majumder K, Taglialatela M, Brown AM. 1995. Cloning and functional expression of an inwardly rectifying K⁺ channel from human atrium. Circ Res 76:343–350.
- Zhang S, Sawanobori T, Hirano Y, Hiraoka M. 1997. Multiple modulations of action potential duration by different calcium channel blocking agents in guinea pig ventricular myocytes. J Cardiovasc Pharmacol 30:489–496.
- Zygmunt A, Robitelle D, Eddlestone G. 1997. I_{tol} dictates behavior of I_{Cl(Ca)} during early repolarization of canine ventricle. Am J Physiol 273:H1096–H1106.

II - EVALUATION DE LA POTENTIALITE ARYTHMOGENE DE MEDICAMENTS NON CARDIOTROPES.

L'étude que nous avons réalisée sur les répercussions de la diminution sélective des courants ioniques sur la repolarisation des fibres de Purkinje a montré que les modifications de la morphologie du « spike-and-dome » et plus particulièrement de l'amplitude de la phase précoce de repolarisation étaient relatives à la diminution du courant chlore calcium-dépendant I_{to2} et/ou du courant entrant de calcium $I_{Ca(L)}$. Elles n'avaient pas été prises en compte lors de la parution des articles suivants. Afin de compléter ce travail, les résultats concernant la phase précoce de repolarisation seront présentés à la fin de chaque article.

1) Evaluation de la potentialité arythmogène du cisapride.

Article n° 2: Puisieux FL, Adamantidis MM, Dumotier BM, Dupuis BA. Cisapride-induced prolongation of cardiac action potential and early afterdepolarizations in rabbit Purkinje fibres. Br J Pharmacol 1996; 17: 1377-1379.

Le cisapride (Prepulsid®) est un agent prokinétique largement prescrit dans le reflux gastro-oesophagien. Des études cliniques ont montré que son utilisation était associée à de graves troubles du rythme ventriculaire à type de Torsade de Pointes (Ahmad et Wolfe, 1995). La littérature étant muette à propos des effets du cisapride sur l'électrogénèse cardiaque, nous avons étudié ses effets électrophysiologiques sur des potentiels d'action de fibres de Purkinje de lapin.

SPECIAL REPORT Cisapride-induced prolongation of cardiac action potential and early afterdepolarizations in rabbit Purkinje fibres

¹François L. Puisieux, Monique M. Adamantidis, Bérengère M. Dumotier & Bernard A. Dupuis

Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine, 1, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France

Cisapride, a gastrointestinal prokinetic agent, has been associated with cases of Torsades de Pointes but its effects on the cardiac action potential have not been described. We investigated its electrophysiological effects on rabbit isolated Purkinje fibres. The results demonstrated that cisapride $(0.01-10 \ \mu\text{M})$ lengthened concentration-dependently the action potential duration without modifying other parameters and induced early after depolarizations and subsequent triggered activity. This typical class III antiarrhythmic effect, that showed 'reverse' rate-dependence and was reduced by increasing external K concentration, can account for clinical arrhythmogenesis.

Keywords: Cisapride; Torsades de Pointes; cardiac Purkinje fibres; Class III antiarrhythmic effects

Introduction Cisapride (Prepulsid or Propulsid), a widely used gastrointestinal prokinetic agent, has been recently associated with long QT syndrome (Bran *et al.*, 1995) and reported to cause Torsades de Pointes (TdP) life-threatening arrhythmias (Ahmad & Wolfe, 1995). Because the cardiac cellular effects of cisapride have not been described, an explanation for the cause of arrhythmogenesis is lacking. Therefore we investigated its electrophysiological effects on rabbit Purkinje fibres and the likelihood of its causing early afterdepolarizations (EADs) and subsequent triggered activity that are believed to be the cellular basis for initiating TdP (Antzelevitch & Sicouri, 1994).

Methods As previously described in detail (Adamantidis et al., 1995) Purkinje fibres were isolated from New Zealand rabbit hearts, then superfused with oxygenated (95% O2, 5% CO₂) Tyrode solution of the following composition (mM): NaCl 108.2, KCl 4.0, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.0, NaH₂PO₄ 1.8, NaHCO₃ 25.0 and glucose 11.0; pH 7.35 ± 0.05 at $36.5 \pm 0.5^{\circ}$ C; and electrically stimulated by rectangular pulses of 1 ms duration with an intensity 50% above threshold at the basal frequency of 1 Hz. Action potentials were recorded with conventional glass microelectrodes. The concentration-dependent effects were studied by adding cisapride to Tyrode solution in increasing cumulative concentrations $(0.01-10 \ \mu M)$ each of which was superfused for 30 min. In control (drug-free) conditions and then in the presence of the drug, the pacing rate was decreased from 1 to 0.2 Hz between the 20th and the 22nd min at each drug concentration. In other preparations, we investigated the rate-dependence of the cisapride effects on APD by increasing pacing rates (0.2-3 Hz) using a protocol applied in control conditions then in the presence of cisapride. In each series of experiments, electrophysiological measurements were made just before changing to the next concentration or the next rate frequency. Then we evaluated the timedependent effects of cisapride in a separate series of experiments by exposing Purkinje fibres, bathed in Tyrode solution containing either 4 mM KCl or 5.4 mM KCl, to a low stable cisapride concentration for 2 h. Action potentials were recorded and analysed every 30 min. The data are expressed as mean ± s.e.mean. Statistical analysis was calculated by Student's paired and unpaired t test. A probability value of P < 0.05 was considered significant.

Results Cisapride increased the action potential duration (APD) concentration-dependently (Figure 1a,d) without altering significantly the resting membrane potential, action potential amplitude and maximal rate of phase 0 depolarization (data not shown). The APD lengthening was so marked that in 5 of 8 fibres, a cellular one-to-one response to pacing could no longer be elicited at cisapride concentrations ranged from 1 to 10 μ M. In these cases, the APD data collected for Figure 1d have been estimated to 800 ms and 1000 ms for APD measured at 50% (APD₅₀) and 90% (APD₉₀) repolarization respectively, to visualize the striking lengthening of the repolarization phase. In addition (Figure 1c) abrupt reduction of pacing rate from 1 to 0.2 Hz increased cisapride-induced effects on APD and single or multiple EADs initiating subsequent sustained triggered activity (defined as more than 6 consecutive EADs) developed at plateau level. Furthermore the prolonging effect induced by 0.3 μ M cisapride (n=6) showed 'reverse rate-dependence' (Figure 1e) that is, increasing the pacing rate from 0.016 to 3 Hz reduced APD lengthening progressively; nevertheless this still remained significant at 3 Hz.

In other experiments, it was found that the APD lengthening induced by 0.3 µM cisapride developed with time of exposure but did not reach a steady-state after 2 h (Figure 2) and that two types of fibres could be identified, one with APD₉₀ of less than 300 ms ('short APs') and the other with APD₉₀ of more than 300 ms ('long APs'). Both types of fibre could be found in the same heart but the fibres with 'short APs' were excised near the septum and the fibres with 'long APs' more distally, between the free wall of the left ventricle and papillary muscles. In 4 mM KCl conditions, 'long APs' (6 of 19 fibres) were so prolonged by cisapride that after the first 30 min of exposure, all the fibres failed to respond to each stimulus and EADs developed. In 5.4 mM KCl medium, cisapride induced less pronounced effects on long APs (7 of 18 fibres) and a reduced incidence (3/7 versus 6/6) of EADs; however, in short APs, the prolonging effects exerted by cisapride were quite similar in 4 mM KCl or in 5.4 mM KCl medium.

Discussion The present study demonstrates that cisapride exerts typical class III antiarrhythmic effects (according to Vaughan-Williams' classification), i.e. it prolongs dose-dependently the repolarization phase without alteration of other parameters over a range of concentrations $(0.1-1 \ \mu M)$ that are clinically relevant to the plasma concentrations found in healthy subjects following oral administration of a therapeutic dose (McCallum *et al.*, 1988). The prolonging effect was more

¹Author for correspondence.



Figure 1 Concentration- and frequency-dependent effects of cisapride on action potential duration at 50% (APD₅₀) and 90% (APD₉₀) repolarization recorded in rabbit Purkinje fibres. (a,b,c): Representative examples of the prolonging effect exerted by increasing cumulative concentrations of cisapride on the same fibre stimulated at 1 Hz (a), 0.2 Hz (b) and 0.1 Hz (c). Early afterdepolarizations are labelled with asterisks in (a) and (b). In (c) small arrows indicate oscillations which initiated multiple EADs and triggered activity (TA). (d,e) Show quantitative results. Points represent means \pm s.e.means. (d) Concentration-dependent effects of cisapride on APD₅₀ (\blacksquare) and APD₉₀ (\bigcirc), (n=8; data were obtained from both short- and long-type cells); *P<0.05 vs control (c) values. (e) Influence of increasing stimulation frequency on APD₉₀ in the absence (control, \blacktriangle) and in the presence (\diamondsuit) of 0.3 μ m cisapride (n=6). The protocol of increasing stimulation frequency from 0.2 to 3 Hz (each step for 5 min) was applied before and after exposure to the drug. *P<0.05 cisapride vs control.



Figure 2 Time-dependent effects of $0.3 \,\mu$ M cisapride on action potential duration measured at 90% repolarization (APD₉₀) in separate series of Purkinje fibres stimulated at 1 Hz and bathed in 4 mM KCl or in 5.4 mM KCl Tyrode solution. 'Short' and 'long' action potentials were identified, depending on the control APD₉₀ values measured in 4 mM KCl conditions (less or more than 300 ms, respectively). Points are means \pm s.e.mean. n = 13 in short-4 mM KCl group (\blacksquare), n = 6 in long-4 mM KCl group (\bigcirc), n = 11 in short-5.4 mM KCl group (\square) and n = 7 in long-5.4 mM KCl group (\bigcirc). In the long 4 mM KCl group, cisapride-induced effects on APD were so pronounced that after the first 30 min of exposure, the 6 fibres no longer responded to stimulation at 1 Hz frequency. *P < 0.05 5.4 mM KCl versus 4 mM KCl conditions.

prominent at slow pacing rates and showed reverse rate-dependence, as widely described for class III drugs (Hondeghem & Snyders, 1990). Furthermore EADs developed at plateau level and triggered sustained rhythmic activities that are proposed as the cellular basis for initiating TdP (Antzelevitch & Sicouri, 1994). Although the precise mechanism of cisapride effects at ionic channel level cannot be determined from our results, they fit well with the clinical observations of a long QT syndrome associated with high doses of cisapride (Bran *et al.*, 1995) and of TdP in patients taking cisapride (Ahmad & Wolfe, 1995).

In addition, it is noteworthy that the effects of cisapride were much stronger in fibres with initial long APD (>300 ms) but were attenuated by increasing extracellular K concentration. In the whole heart, it may be hypothesized that this may contribute to an increased dispersion of repolarization, thus providing an ideal substrate for re-entry which allows perpetuation of TdP (Surawicz, 1989). Although great care must be taken in the direct extrapolation from experimental study to clinical observations (Antzelevitch & Sicouri, 1994), this feature may be referred to the more marked effects of class III antiarrhythmic drugs in patients with an already prolonged cardiac repolarization i.e. patients with congenital or acquired long QT syndrome or with other predisposing factors to TdP such as bradycardia, hypokalaemia or hypomagnesaemia.

We wish to thank Mrs M.C. Guillaume for her technical assistance and Dr J.F. Caron for his helpful comments of the manuscript.
References

- ADAMANTIDIS, M.M., LACROIX, D.L., CARON, J.F. & DUPUIS, B.A. (1995). Electrophysiological and arrhythmogenic effects of the histamine type 1-receptor antagonist astemizole on rabbit Purkinje fibres: clinical relevance. J. Cardiovasc. Pharmacol., 26, 319-327.
- AHMAD, S.R. & WOLFE, S.M. (1995). Cisapride and torsades de pointes. Lancet, 345, 508.ANTZELEVITCH, C. & SICOURI, S. (1994). Clinical relevance of
- ANTZELEVITCH, C. & SICOURI, S. (1994). Clinical relevance of cardiac arrhythmias generated by afterdepolarizations. Role of M cells in the generation of U waves, triggered activity and Torsades de Pointes. J. Am. Coll. Cardiol., 23, 259-277.
- BRAN, S., MURRAY, W.A., HIRSCH, A.B. & PALMER, J.P. (1995). Long QT syndrome during high-dose cisapride. Arch. Intern. Med., 155, 765-768.
- HONDEGHEM, L.M. & SNYDERS, D.J. (1990). Class III antiarrhythmic agents have a lot of potential but a long way to go: reduced effectiveness and dangers of reverse use-dependence. *Circulation*, **81**, 686-690.
- McCALLUM, R.W., PRAKASH, C., CAMPOLI-RICHARDS, D.M. & GOA, K.L. (1988). Cisapride. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use as a prokinetic agent in gastrointestinal motility disorders. Drugs, 36, 652-681.
- SURAWICZ, B. (1989). Electrophysiologic substrate of torsades de pointes: dispersion of repolarization or early afterdepolarizations? J. Am. Coll. Cardiol., 14, 172-184.

(Received December 11, 1995 Accepted January 22, 1996)

EFFETS DU CISAPRIDE SUR LA PHASE DE REPOLARISATION PRECOCE.

La Figure 25 représente les effets du cisapride sur l'amplitude de la phase 1 (AP1). Les résultats montrent que des concentrations croissantes de cisapride (0.01-10 μ M; n=8) ne modifient pas de façon significative AP1, même aux fortes concentrations.



Figure 25: Effets du cisapride sur l'amplitude de la phase 1 (AP1) de potentiels d'action de fibres de Purkinje de lapin.

Le cisapride n'a pas modifié de façon notable la phase précoce de repolarisation. Cette absence d'effet du cisapride sur la repolarisation précoce suggère que le courant chlore calciumdependant I_{to2} et le courant calcique $I_{Ca(L)}$ ne sont pas altérés par ce médicament. Par contre, les effets antiarythmiques de classe III purs exercés par le cisapride et sa capacité à favoriser l'émergence des EAD suggèrait des effets de blocage d'un ou plusieurs courant(s) potassique(s). Cette hypothèse a été confirmée par des études récentes rapportant les effets de blocage du cisapride des composantes rapide (I_{Kr}) et lentes (I_{Ks}) du courant rectifiant retardé I_{K} sur des myocytes ventriculaires de lapin (Carlsson et coll., 1997) et de cobaye (Drolet et coll., 1998). Deux études ont également rapporté un effet de blocage du canal cloné HERG par le cisapride aussi puissants que ceux exercés par le dofétilide (Mohammad et coll., 1997; Rampe et coll., 1997). Pour notre part, nous avons mis en évidence les effets de blocage du courant rectifiant dans le sens entrant I_{K1} par le cisapride sur des myocytes ventriculaires de lapin (Bastide et coll., 1998). Cette étude est rapportée au chapitre III de ce travail.

2) Evaluation de la potentialité arythmogène du diphémanil méthylsulfate.

Article n°3: Adamantidis MM, Dumotier B, Caron J, Dupuis B.
 Effets électrophysiologiques et potentialité arythmogène du diphémanil méthylsulfate sur les fibres de Purkinje de lapin.
 Arch Mal Coeur 1998; 91: 1487-1494.

Le diphémanil méthylsulfate (PRANTAL®) est un médicament doué de propriétés anticholinergiques, indiqué en pédiatrie chez les nouveau-nés dans le traitement de l'hyperreflectivité vagale. Des effets indésirables graves ont été décrits sous ce traitement. Les accidents décrits sont des blocs auriculo-ventriculaires avec ou sans allongement de l'intervalle QT et des allongements de l'intervalle QT, associés ou non à des Torsades de Pointes chez le grand prématuré et le nouveau-né sujets à une grande bradycardie. En outre, le diphémanil méthylsulfate était dans certains cas, associé au cisapride. Il apparaissait important d'évaluer la responsabilité du diphémanil méthylsulfate dans la survenue de ces effets indésirables. Nous avons donc évalué la potentialité arythmogène du diphémanil méthylsulfate en étudiant ses effets électrophysiologiques sur des potentiels d'action de fibres de Purkinje de lapin.

ARTICLE ORIGINAL

Effets électrophysiologiques et potentialité arythmogène du diphémanil méthylsulfate sur les fibres de Purkinje de lapin

Corrélations avec les observations cliniques d'allongement de QT en pédiatrie

Summary

Electrophysiological Effects and Arrhythmogenic Potential of Diphemanil Methylsulfate on Purkinje Fibres of the Rabbit. Correlations with Clinical Observations of QT Prolongation in Paediatrics

Serious undesirable cardiac side effects have been reported with treatment with diphemanil methylsulfate (Prantal) in premature babies or neonates. To understand the origin of this problem, the authors undertook an electrophysiological study of the effects of this product in vitro on rabbit Purkinje fibres.

In three separate series (N= 5 to N= 8), the effects of increasing concentrations (0.1 μ M-30 μ M) of diphemanil methylsulfate, different frequencies of stimulation (0.2 Hz, 1 Hz, 2 Hz) and duration of exposition (60 min followed by 120 min washout) were observed on the properties of the action potential. The results show a clearcut antiarrhythmic Class III type action characterised by a concentration-dependent prolongation of the action potential duration with an inverse frequency dependency without significant changes of the other parameters. During stimulation at 0.2 Hz, early postdepolarisations and induced activity were observed in 3/8 of the fibres exposed to 10 μ M and 8/8 fibres exposed to 30 μ M. The effect did not attain a steady state after 60 min of exposition. It was not reversed by 120 min of washout of the preparation.

These results were compatible with the reported cardiac arrhythmic effects of prolongation of the QT interval and torsades de pointe. Arch Mal Cœur 1998 ; 91 : 1487-94.

Résumé

Des effets indésirables cardiaques graves ont été rapportés sous traitement par le diphémanil méthylsulfate (Prantal) chez des nourrissons prématurés ou des nouveau-nés. Pour en comprendre l'origine, une étude des effets électrophysiologiques du diphémanil méthylsulfate a été menée *in vitro* sur fibres de Purkinje de lapin.

Dans trois séries séparées d'essais (n = 5 à 8) il a été évalué l'influence d'une gamme de concentrations croissantes (0,1 μ M-30 μ M) de diphémanil méthylsulfate, l'influence de la fréquence de stimulation (0,2 Hz, 1 Hz, 2 Hz) et de la durée d'exposition (60 min suivies de 120 min de lavage) sur les caractéristiques du potentiel d'action. Les résultats montrent que le diphémanil méthylsulfate exerce très clairement un effet antiarythmique de classe III pur caractérisé par un allongement concentration-dépendant de la durée du potentiel d'action, présentant une fréquence-dépendance inverse, sans modification notable des autres paramètres. Sous stimulation à 0,2 Hz, des postdépolarisations précoces et des activités déclenchées sont observées dans 3/8 des fibres exposées à 10 μ M et 8/8 fibres exposées à 30 μ M. L'effet n'atteint pas un état stable au bout de 60 min d'exposition. Il n'est pas réversé par 120 min de lavage des préparations.

Ces résultats sont compatibles avec les troubles du rythme cardiaque à type d'allongement de l'intervalle QT et de torsades de pointes rapportés en clinique. Arch Mal Cœur 1998 ; 91 : 1487-94.

M. Adamantidis^{*}, B. Dumotier^{*}, J. Caron^{**} et B. Dupuis^{*}

(*) Laboratoire de pharmacologie, Faculté de médecine, CHU de Lille,

(**) Centre régional de pharmacovigilance, CHU de Lille, 1, place de Verdun, 59045 Lille Cedex.

(Tirés à part : Dr M. Adamantidis).

Article reçu en mai et accepté en septembre 1998.

M. ADAMANTIDIS ET COLLABORATEURS

Le diphémanil méthylsulfate [méthylsulfate de 4-(diphénylméthylène)-1,1-diméthylpipéridinium, Prantal] est un médicament atropinique utilisé depuis de nombreuses années en pédiatrie chez le nouveau-né et le nourrisson prématuré ou à terme ayant fait des malaises avec bradycardie attribués à une hyperréflectivité vagale [1]. Des effets indésirables graves ont été décrits sous ce traitement. Ils surviennent principalement chez les grands prématurés (d'âge gestationnel inférieur à 32 semaines) après 1 à 18 jours de traitement. Les accidents décrits sont des blocs auriculo-ventriculaires avec ou sans allongement de l'intervalle QT et des allongements de l'intervalle QT associés ou non à des torsades de pointes et/ou des effets indésirables digestifs.

Le prolongement de l'intervalle QT de l'électrocardiogramme est susceptible d'entraîner des torsades de pointes, qu'il soit lié à un syndrome de QT long congénital ou de QT long acquis, généralement d'origine médicamenteuse [2-7]. Les facteurs prédisposants sont la bradycardie, l'hypokaliémie, l'hypomagnésémie et possiblement les formes frustes de QT long congénital révélées par la prise médicamenteuse. Il est actuellement bien établi que le prolongement de la repolarisation et la survenue des torsades de pointes sont liés, à l'échelon cellulaire, à un allongement de la durée du potentiel d'action cardiaque et à l'apparition d'anomalies de la repolarisation cellulaire décrites expérimentalement et appelées postdépolarisations précoces [8, 9]. Ces postdépolarisations précoces interrompent la phase de repolarisation et donnent lieu à une dépolarisation secondaire ou activité déclenchée qui peut se propager dans le myocarde voisin. Le développement de ces postdépolarisations précoces est favorisé par les mêmes situations que celles qui prédisposent aux torsades de pointes en clinique. Elles surviennent avec une plus grande incidence dans le tissu conducteur (fibres de Purkinje) que dans les cellules du myocarde contractile. La plupart des agents pharmacologiques qui allongent l'intervalle QT, que ce soient des médicaments cardiotropes ou non cardiotropes, sont susceptibles de provoquer la survenue de torsades de pointes en clinique [10, 11]. Dans notre expérience, ils induisent in vitro un allongement de la durée du potentiel d'action, des postdépolarisations précoces et des activités déclenchées [12-16] dans les fibres de Purkinje de lapin.

Les effets du diphémanil méthylsulfate sur l'électrogenèse cardiaque n'ont pas été explorés à ce jour. Pour mieux comprendre l'origine des effets indésirables cardiaques observés chez l'enfant et tenter d'en évaluer le risque, nous avons étudié les effets électrophysiologiques du diphémanil méthylsulfate sur des fibres de Purkinje de lapin, examiné l'influence de la fréquence de stimulation sur ces effets et évalué la cinétique d'installation des effets et de leur retrait.

METHODES

Technique expérimentale

Cette étude a été réalisée en accord avec les recommandations officielles du ministère français de l'Agriculture. Des faisceaux de fibres de Purkinje sont

prélevés dans le ventricule gauche de cœurs de lapins de race néo-zélandaise (1,5 à 2 kg) anesthésiés (hydrate de chloral, 250 mg/kg, voie i.v.) et saignés. Ils sont montés dans la cuve expérimentale perfusée par une solution de Tyrode modifiée (en mM : NaCl 108,2 ; KCl 27 ; CaCl₂ 1,8 ; MgCl₂ 1 ; NaH₂PO₄ 1,8 ; NaHCO₃ 25 ; glucose 55 ; pH 7,35 \pm 0,05), oxygénée à saturation par du carbogène (95 % O_2 , 5 % CO_2), thermostatée à 36,5 ± 0,5 °C. Après 30 min, la cuve est alimentée par la solution de Tyrode normale (en mM : NaCl 108,2 ; KCl 4 ; MgCl₂ 1 ; NaH₂PO₄ 1,8 ; CaCl₂ 1,8 ; NaHCO₃ 25 ; glucose 11). Les préparations sont stimulées à la fréquence de 1 Hz par des chocs rectangulaires de 1 à 2 ms de durée, avec une intensité 1,5 fois supérieure au seuil diastolique de stimulation, délivrés par un stimulateur (JSI 0198) par l'intermédiaire d'une électrode bipolaire en acier recouverte de Téflon, dénudée à son extrémité. L'activité électrique cellulaire est recueillie par microélectrode de verre emplie de KCI 3M et avant une résistance de pointe de 10 à 25 mégohms. La microélectrode, couplée à une électrode d'argent chlorurée est connectée à un adaptateur d'impédance. Le signal est transmis simultanément à un oscilloscope (Gould DSO 1602), analysé par un système informatique (DATAPAC, Bio-Logic) et enregistré sur bande magnétique (DTR 1200 Bio-Logic) qui permet, à la fin de l'essai, de transférer sur papier (Gould, Easy Graf TA 240) les différentes phases de l'expérimentation. La stabilisation dure au moins 2 heures.

Effets dépendants de la concentration et de la fréquence de stimulation

Dans une première série d'essais, avant l'application du diphémanil méthylsulfate, un « coup de frein » est donné à la fréquence de stimulation en la diminuant pendant 2 min de 1 Hz à 0,2 Hz, le but étant de favoriser le développement de postdépolarisations précoces ou d'automatismes anormaux. On vérifie ainsi qu'avant le début de l'essai, la préparation ne présente pas d'activité anormale de ce type. Une solution stock de diphémanil méthylsulfate (1 mM) dans la solution de Tyrode, préparée quotidiennement, est ensuite diluée dans la solution de Tyrode à la concentration désirée. Les concentrations (0,1 à 30 µM) sont appliquées de façon croissante et cumulée, chaque concentration étant maintenue pendant 30 min. La préparation est stimulée à la fréquence de base de 1 Hz sauf entre la 20^e et la 22^e min de perfusion de chaque concentration où la fréquence est abaissée à 0,2 Hz. Les paramètres du potentiel d'action sont mesurés à la fin des 30 min de perfusion de chaque concentration et à l'issue de chaque période de 2 min de stimulation à 0,2 Hz. Dans une seconde série d'essais, les effets de concentrations croissantes et cumulées de diphémanil méthylsulfate sont étudiés sur des préparations stimulées à la fréquence de stimulation de 2 Hz appliquée à la fin des 2 heures de stabilisation. Chaque concentration est superfusée durant 30 min et les paramètres du potentiel d'action sont relevés à l'issue de ces 30 min.

¹⁴⁸⁸ ARCHIVES DES MALADIES DU CŒUR ET DES VAISSEAUX, tome 91, n° 12, décembre 1998

Cinétiques d'installation et de retrait des effets du diphémanil méthylsulfate

Le diphémanil méthylsulfate est appliqué à la concentration de 10 μ M pendant 60 min à des fibres de Purkinje stimulées à la fréquence de 1 Hz. Puis les préparations sont replacées en milieu de Tyrode normal, sans diphémanil méthylsulfate et toujours sous stimulation à la fréquence de 1 Hz. Le lavage est poursuivi pendant 120 min. L'évolution des paramètres du potentiel d'action est surveillée toutes les 15 min.

Expression des résultats et statistiques

Les paramètres suivants sont relevés : potentiel de repos membranaire (mV), amplitude du potentiel d'action et overshoot (mV), vitesse maximale de la phase 0 de dépolarisation (V/s), durée du potentiel d'action mesurée à 50 et à 90 % (respectivement DPA50 et DPA90, ms) de la repolarisation. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes affectées de leur erreur standard. Leur évaluation statistique est effectuée selon une analyse de variance pour mesures répétées (ANOVA) corrigées par le test de Dunnett. Une valeur de p < 0,05 est considérée significative.

RÉSULTATS

Effets dépendants de la concentration et de la fréquence de stimulation

L'effet le plus important du diphémanil méthylsulfate est d'allonger la durée du potentiel d'action sans modifier notablement les autres paramètres. Un exemple représentatif des tracés recueillis sur des fibres stimulées aux fréquences de 1 Hz et de 0,2 Hz est donné dans la figure 1. En situation témoin, le ralentissement de 1 à 0,2 Hz de la fréquence de stimulation entraîne un allongement de la durée du potentiel d'action. En présence de 0,3 μ M de diphémanil méthylsulfate, la durée de la



FIG. 1 - Exemple représentatif des effets du diphémanil méthylsulfate appliqué à des concentrations croissantes et cumulées sur une fibre de Purkinje stimulée aux fréquences de 1 Hz et 0,2 Hz. Les courbes en pointillé sont les courbes témoins (T). Les flèches indiquent une postdépolarisation précoce se développant en fin de plateau du potentiel d'action (le même potentiel d'action est montré à deux échelles de dilatation). FIG. 1 - Representative example of the effects of diphemanil methylsulfate applied at increasing cumulative concentrations on a Purkinje fibre stimulated at frequencies of 1 Hz and 0,2 Hz. The dotted lines are the control values (T). The arrows indicate early post-depolarisations occurring at the end of the plateau phase of the action potential (the same action potential is shown in two scales of dilatation).

ARCHIVES DES MALADIES DU CCEUR ET DES VAISSEAUX, tome 91, n° 12, décembre 1998 1489

M. ADAMANTIDIS ET COLLABORATEURS

repolarisation s'allonge aussi bien à 1 Hz qu'à 0,2 Hz et l'effet se majore avec les concentrations. À la concentration de 3 µM, le « coup de frein » à 0,2 Hz amplifie l'effet du diphémanil méthylsulfate et favorise la survenue, à la concentration de 10 μ M, de postdépolarisations précoces. Celles-ci se développent en fin de plateau, de façon irrégulière d'un potentiel d'action à l'autre et d'une préparation à l'autre. Des postdépolarisations précoces ont été ainsi observées dans 3 préparations sur 8 exposées à 10 μ M et dans toutes les préparations exposées à la concentration de 30 μ M. Dans 5/8 fibres, l'allongement de la repolarisation s'intensifie au point qu'un bloc 2/1 est observé aussi bien à 1 Hz qu'à 0,2 Hz. Comme dans l'essai illustré par la figure 2, les postdépolarisations deviennent multiples conduisant à des activités rythmiques soutenues, sous forme d'oscillations d'amplitude croissante précédant la repolarisation complète de la cellule.

La figure 3 illustre graphiquement l'effet exercé par le diphémanil méthylsulfate sur la durée du potentiel d'action. L'effet d'allongement augmente avec les concentrations. Il est significatif dès la concentration de 0,3 μ M. Lorsqu'il atteint une intensité telle que les préparations ne répondent plus coup pour coup à la stimulation à 1 Hz, les valeurs de 800 ms et de 1 000 ms sont arbitrairement données aux DPA50 et DPA90 respectivement (1 000 ms étant la valeur de la période de stimulation). Exprimé en pourcentage des valeurs témoin, l'effet du diphémanil méthylsulfate s'exerce avec la même intensité au niveau du plateau du potentiel d'action (illustré par la DPA50) que de la repolarisation terminale (représentée par la DPA90). Cela indique que la vitesse de repolarisation n'est pas modifiée par le diphémanil méthylsulfate, même aux fortes concentrations. Les autres paramètres du potentiel d'action sont peu affectés par le diphémanil méthylsulfate (tableau I). On note une diminution de



Fig. 2 - Postdépolarisations multiples se développant sous l'influence du diphémanil méthylsulfate (10 µM) sur une fibre de Purkinje de lapin stimulée aux fréquences de 1 Hz et de 0,2 Hz, Les artéfacts de stimulation sont signalés par un astérisque. Tracés du haut : deux potentiels d'actions consécutifs sont superposés, montrant l'apparition d'une postdépolarisation précoce unique indiquée par une flèche. La durée du potentiel d'action est prolongée de façon si intense qu'un bloc 2/1 est observé (tracé de droite). Tracés du bas : à la fréquence de 0,2 Hz, les postdépolarisations multiples apparaissent comme une succession d'oscillations d'amplitude croissante, initiant une activité rythmique soutenue. FiG. 2 - Multiple post-depolarisations occurring with diphemanil methylsulfate (10 µM) on rabbit Purkinje fibres stimulated at 1 Hz and 0.2 Hz. The stimulation artefacts are shown by an asterisk. Top : two consecutive action potential superimposed, showing the appearance of a single early postdepolarisation indicated by an arrow. The duration of the action potential is prolonged so much that 2/1 block is observed (right). Bottom : during 0.2 Hz stimulation, multiple post-depolarisations appear as a succession of oscillations of increasing amplitude initiating sustained rhythmic activity.

¹⁴⁹⁰ ARCHIVES DES MALADIES DU CCEUR ET DES VAISSEAUX, tome 91, n° 12, décembre 1998



Fig. 3 - Effets d'allongement de la repolarisation exercés par le diphémanil méthylsulfate sur les fibres de Purkinje de lapin. DPA50 et DPA90 : durée du potentiel d'action mesurée à 50 % et à 90 % de la repolarisation exprimées en ms (symboles pleins) et en % (symboles vides) des valeurs témoin ; n = 6; *: p < 0.05. Fig. 3 - Effects of prolonged repolarisation induced by diphemanil methylsulfate on rabbit Purkinje fibres. DPA 50 and DPA 90 : duration of action potential measured at 50% and 90% of the repolarisation expressed in ms (full symbols) and in percentage (empty symbols) of control values ; n = 6; *: p < 0.05.

l'amplitude du potentiel d'action, qui devient significative à la concentration de 10 µM et qui résulte d'une diminution non significative du potentiel de repos membranaire et de l'overshoot. La vitesse maximale de dépolarisation subit un faible ralentissement qui, aux fortes concentrations, reste inférieur à 10 % de la valeur témoin et n'atteint jamais le seuil de significativité.

La figure 4 montre que la fréquence de stimulation influence l'effet de prolongement de la repolarisation induit par le diphémanil méthylsulfate. Le ralentisseDIPHÉMANIL MÉTHYLSULFATE ET REPOLARISATION CARDIAQUE



FIG. 4 - Influence de la fréquence de stimulation sur les effets du diphémanil méthylsulfate sur la durée du potentiel d'action mesurée à 90 % de la repolarisation de fibres de Purkinje de lapin. n = 6 dans chaque groupe ; * : p < 0,05 vs valeur témoin. FIG. 4 - Influence of the frequency of stimulation on the effects of diphemanil methylsulfate on the duration of the action potential measured at 90% of the repolarisation of rabbit Purkinje fibres ; n= 6 in each group ; * : p < 0.05 vs control.

ment de la fréquence de stimulation de 1 Hz à 0,2 Hz modifie peu l'effet d'allongement exercé par le diphé-manil méthylsulfate aux faibles concentrations comprises entre 0,1 et 1 μ M. À la concentration de 3 μ M, il le renforce de façon inégale d'une fibre à l'autre mais l'amplifie de façon considérable et dans toutes les fibres, à la concentration de 10 µM. En revanche sous stimulation à la fréquence de 2 Hz, l'effet du diphémanil méthylsulfate sur la durée du potentiel d'action est

TABLEAU I - EFFETS DU DIPHÉMANIL MÉTHYLSULFATE SUR LES PARAMÈTRES DU POTENTIEL D'AV	ACTION DE FIBRES DE PURKINJE STIMULÉES À LA FRÉQUENCE DE 1 H	Hz
---	--	----

	Témoins (6)	Témoins (6) Diphé			inil μM		
		0,1 (6)	0,3 (6)	1 (6)	3 (6)	10 (6)	30 (3)
PRM (mV)	-91,8	-92,0	-91,5	-91,2	-91,3	-90,8	-90,0
	±0,5	±0,4	±0,4	±0,5	±0,5	±0,5	±0,1
APA (mV)	124,3	124,7	124,0	122,8	122,7	121,0*	120,7
	±0,7	±0,9	±1,2	±1,2	±1,0	±0,7	±0,3
OS (mV)	32,5	32,7	32,5	31,7	31,3	30,2	30,7
	±0,7	±1,0	±0,8	±0,7	±0,8	±0,5	±0,3
Vmax (V/s)	642	642	641	641	628	592	575
	±34	±31	±28	±28	±30	±35	±62

APA : amplitude du potentiel d'action ; OS : *overshoot* ; PRM : potentiel de repos membranaire ; Vmax : vitesse maximale de dépolarisation ; (n) : nombres de fibres ; * : p < 0.05 versus valeur témoin.

ARCHIVES DES MALADIES DU CŒUR ET DES VAISSEAUX, tome 91, n° 12, décembre 1998 1491

M. ADAMANTIDIS ET COLLABORATEURS

moins marqué, bien qu'il reste cependant très important puisqu'il est significatif à la concentration de 1 μ M et qu'aux concentrations de 10 μ M et de 30 μ M, la DPA90 est augmentée de 42,8 ± 5,4 % et 74,4 ± 7,5 % respectivement. À cette fréquence de stimulation, les autres paramètres restent inchangés (tableau II) excepté la Vmax qui, à ces mêmes concentrations de 10 μ M et de 30 μ M, est ralentie de façon significative de 9,6 ± 2,3 % et de 18,1 ± 4,9 % respectivement.

Tableau II – Effets du diphémanil méthylsulfate sur les paramètres du potentiel d'action de fibres de Purkinje stimulées à la fréquence de 2 Hz

	Témoin		Diphén	nanil µM		
		1	3	10	30	
PRM (mV)	-91,6 ±0,7	-91,2 ±0,8	-91,5 ±0,7	-91,3 ±0,9	-90,8 ±1,0	
APA (mV)	121,7 ±1,9	122,2 ±1,7	123,2 ±1,8	122,3 ±1,9	121,0 ±1,8	
OS (mV)	30,5 ±1,2	31,0 ±1,0	31,7 ±1,1	31,0 ±1,1	30,2 ±1,0	
Vmax (V/s)	511 ±33	500 ±34	481 ±36	463* ±33	416* ±30	

APA : amplitude du potentiel d'action ; OS : overshoot ; PRM : potentiel de repos membranaire ; Vmax : vitesse maximale de dépolarisation ; n = 6 ; * : p < 0,05 versus valeur témoin.

Cinétiques d'installation et de retrait des effets du diphémanil méthylsulfate

La figure 5 représente graphiquement l'évolution de la durée du potentiel d'action de 5 fibres de Purkinje stimulées à la fréquence de 1 Hz pendant les 60 min d'exposition à la concentration de 10 μ M de diphémanil méthylsulfate et les 120 min de lavage des préparations qui ont suivi. Il apparaît clairement que l'effet du diphémanil méthylsulfate sur la repolarisation s'installe progressivement et que l'état stable, à la concentration étudiée, n'est pas atteint après une heure d'exposition. De plus, l'effet d'allongement de la repolarisation continue d'augmenter pendant les 15 premières minutes de lavage, puis se maintient à un niveau stable avant d'amorcer une réversion après 1 heure de retour en solution de Tyrode normal dans une fibre et 2 heures dans les 4 autres fibres.

DISCUSSION

Cette étude démontre clairement que le diphémanil méthylsulfate exerce sur le potentiel d'action de fibre de Purkinje de lapin, des effets de type antiarythmique de classe III « pur » selon la classification de Vaughan-Williams. Ceux-ci se caractérisent par un allongement de la durée du potentiel d'action, sans modification significative des autres paramètres du



FIG. 5 - Cinétiques d'installation et de retrait par lavage des effets du diphémanil méthylsulfate sur la repolarisation de fibres de Purkinje de lapin. Les fibres sont exposées à 10 µM de diphémanil méthylsulfate pendant 60 min puis lavées pendant 120 min. Les résultats de chaque essai sont représentés par une courbe. DPA90 : durée du potentiel d'action mesurée à 90 % de la repolarisation.

FIG. 5 - Kinetics of installation and withdrawal by washout of the effects of diphemanil methylsulfate on the repolarisation of rabbit Purkinje fibres. The fibres were exposed to 10 μ M of diphemanil methylsulfate for 60 min and then washed out for 120 minutes. The results of each trial were represented by a graph. DPA 90 : duration of the action potential measured at 90% of repolarisation.

potentiel d'action. Cet effet de classe III augmente avec les concentrations et présente une fréquencedépendance inverse [17], caractérisée par une intensité plus grande de l'effet d'allongement de la repolarisation à fréquence de stimulation basse et moins d'effet aux fréquences rapides. Bien que les résultats de cette étude ne puissent donner, à l'échelon membranaire, le mécanisme de l'effet exercé par le diphémanil méthylsulfate, il est permis de rapprocher ces observations des données rapportées dans la littérature avec des substances bloquant sélectivement une conductance potassique « voltage-dépendante » et qui présentent une fréquence-dépendance inverse des effets d'allongement de la durée du potentiel d'action. Le phénomène de fréquence-dépendance inverse a été relié à une modulation du bloc selon le potentiel de membrane ; si l'intensité du bloc est plus grande aux potentiels de membrane plus négatifs, elle traduit une affinité plus grande pour le site récepteur lorsque le canal est fermé ou au repos [17]. Il donne lieu à une vraie reverse use-dependence. C'est le cas par exemple des effets exercés par la 4-aminopyridine, qui bloque sélectivement la composante pente du courant transitoire sortant (I_{to1}) et dont l'intensité des effets, renforcée par les fréquences basses, se trouve très diminuée par les fréquences élevées [18]. C'est également le cas du sematilide qui bloque sélectivement la composante rapide IKr du courant rectifiant retardé IK avec une affinité plus grande pour le canal à l'état de repos [19]. Par contre, si l'affinité est plus grande pour le canal activé, le bloc est use-dependent, plus puissant aux potentiels de membrane peu négatifs ou positifs, comme ce qui a été décrit avec le dofétilide ou l'almokalant, bloqueurs sélectifs du courant IKr [20, 21]. Pourtant ce bloc use-dependent au niveau du canal n'a pas pour résultat, à l'échelon cellulaire, un effet d'allongement de la repolarisation qui s'accroît avec l'élévation de la fréquence, comme on pourrait s'y attendre, mais une fréquence-dépendance inverse. L'étude des cinétiques d'installation et de retrait du bloc de IKr a permis de mieux comprendre cette discordance apparente : dans le cas de l'almokalant, la constante de temps de l'installation du bloc est lente, de l'ordre de une seconde et celle de sa levée très lente, voisine de 14 secondes [21] : le bloc peut se développer avec une plus grande intensité aux fréquences basses où la durée des potentiels d'action (en particulier la durée du plateau) est longue, qu'aux fréquences rapides qui raccourcissent la durée du potentiel d'action. Par ailleurs, la levée du bloc est d'autant plus importante que la période de repos entre deux potentiels d'action est grande. Si la diastole électrique est insuffisante, le bloc reste maintenu et s'accumule avec le temps.

Un certain nombre de travaux ont bien mis en évidence qu'un effet d'allongement consécutif à un bloc use-dependent peut se développer très progressivement si la fréquence de stimulation n'est pas rapide (0,5 à 1 Hz), l'état stable étant alors atteint après une exposition prolongée [22-25]. Par contre, lorsque le bloc s'exerce avec une reverse use-dependence, l'effet est maximal après une période de repos (ou une longue diastole) et décroît rapidement jusqu'à un état stable qui s'établit en quelques minutes [24]. Nos résultats montrent que sur des préparations stimulées à la fréquence de 1 Hz, l'effet du diphémanil méthylsulfate sur la repolarisation s'intensifie avec le temps c'est-à-dire avec le nombre de potentiels d'action ; il n'a pas atteint un état stable après une heure d'exposition. Ces observations apparentent le diphémanil méthylsulfate aux bloqueurs sélectifs de la composante rapide du courant rectifiant retardé IKr et sont compatibles avec l'hypothèse d'un blocage sélectif *use-dependent* de ce courant.

Un autre argument en faveur de cette hypothèse est le développement de postdépolarisations précoces, qui apparaissent d'abord uniques, puis multiples, formant des oscillations se développant avec une amplitude croissante et induisant une activité rythmique soutenue. Il est actuellement admis que deux conditions essentielles sont requises pour la genèse des postdépolarisations précoces : (i) un allongement de la repolarisation résultant d'une augmentation d'un ou plusieurs courants entrants, de la diminution d'un ou plusieurs courants sortants, ou des deux, et (ii) une activation, dépendante du temps, d'un courant entrant. Les postdépolarisations précoces se formant

DIPHÉMANIL MÉTHYLSULFATE ET REPOLARISATION CARDIAQUE

au niveau du plateau du potentiel d'action requièrent l'activation et/ou la réactivation de canaux calciques de type L à des potentiels de membrane correspondant au courant calcique de fenêtre (calcium *window current*) [26, 27]. Il est permis de penser que le diphémanil méthylsulfate *per se* n'influence pas le courant calcique de type L, au moins dans le sens d'une diminution, mais que le maintien du potentiel de plateau à des valeurs stables voisines de - 25 mV favorise le courant calcique de fenêtre.

L'hypothèse d'une association forte entre l'apparition de postdépolarisations précoces d'abord uniques puis multiples, une majoration de la dispersion de la repolarisation et la survenue de torsades de pointes a été émise récemment dans une étude expérimentale réalisée chez le chien [28]. Cependant, l'évaluation du risque proarythmique en clinique humaine par extrapolation des faits expérimentaux ne peut être raisonnablement basée sur la capacité d'une substance à induire des postdépolarisations multiples. Elle doit tenir compte des données pharmacocinétiques, lorsque celles-ci sont disponibles. Dans le cas du diphémanil méthylsulfate, la concentration maximale plasmatique est de 0,02 à 0,2 µM chez le nouveau-né et l'enfant prématuré [29], ces valeurs étant plus basses que les concentrations trouvées actives expérimentalement. Cependant le volume de distribution est important (de l'ordre de 200 I . kg⁻¹) et sujet à de larges variations interindividuelles (70 à 670 I . kg⁻¹) [29]. Cette forte affinité tissulaire peut rendre les concentrations expérimentales de diphémanil méthylsulfate tout à fait pertinentes, si le rapport des concentrations cœur/plasma est élevé. Elle peut aussi expliquer que dans nos essais, les effets du diphémanil méthylsulfate sur la durée du potentiel d'action soient difficilement réversibles par le lavage des préparations. D'un autre côté, la littérature ne mentionne pas les voies métaboliques empruntées par le diphémanil méthylsulfate, notamment la voie du cytochrome P4503A4 qui est impliqué dans le métabolisme de nombreux médicaments, ce qui empêche une estimation éclairée des interactions médicamenteuses possibles.

Néanmoins, les résultats de cette étude indiquent que le diphémanil méthylsulfate peut être rangé aux côtés des médicaments « allongeurs » de la repolarisation cardiaque, dont la prescription est contre-indiquée chez les patients porteurs d'un syndrome de QT long congénital. Par ailleurs son association avec d'autres médicaments « allongeurs » comme le cisapride dont les effets proarythmiques ont été mis en évidence récemment aussi bien en clinique [30] qu'expérimentalement [16] ne peut que renforcer le prolongement de la repolarisation cardiaque et doit être fortement déconseillée.

MOTS CLÉS : diphémanil méthylsulfate, fibre de Purkinje, effet de classe III, potentialité arythmogène.

M. ADAMANTIDIS ET COLLABORATEURS

Références -

- Lucet V, Dongoc D, Cauchemez B et al. Traitement de l'hyperto-nie vagale réflexe du nourrisson. Place du diphémanil. Arch Fr Pediatr 1987 : 44 : 359-63.
 Jackman WM, Friday KJ, Anderson JI, Aliot EM, Clark MA, Lazzara R. The long QT syndromes : a critical review, new clini-cal observations and unitying hypothesis. Prog Cardiovasc Dis 1988 ; 2 : 115-72.
 Moss AJ, Robinson JL. Long QT syndrome. Heart Dis Stroke 1992 ; 1 : 309-14.
- 309-14.

- 1992; 1: 309-14.
 Guize L, Iliou MC, Baye TG, Lavergne T, Le Heuzey JY. Les torsades de pointes. Arch Mal Cœur 1993; 86: 769-76.
 Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ. Torsades de pointes. Mechanism and management. Drugs 1994; 47: 51-64.
 Tan HL, Hou CYJ, Lauer MR, Sung RJ. Electrophysiologic mechanisms of the long QT interval syndromes and torsades de pointes. Ann Intern Med 1995; 122: 701-14.
 Le Marec H, Schott JJ. Syndromes du QT long congénital. Arch Mal Cœur 1997; 90 (Special III): 25-35.
 El-Sherif N. Early afterdepolarizations and arrhythmogenesis. Experimental and clinical aspects. Arch Mal Cœur 1991; 84: 227-34.
 Antzelevitch C. Sicouri S. Clinical relevance of cardiac arrhythmetical and clinical aspects.
- Antzelevitch C, Sicouri S. Clinical relevance of cardiac arrhythmias generated by afterdepolarizations : the role of M cells in the generation of U waves, triggered activity and torsades de pointes. J Am Coll Cardiol 1994; 123 : 259-77.
 Benedict CR. The QT interval and drug-associated torsades de pointes. Drug Invest 1993; 5 : 69-79.
 Kerin NZ, Somberg J. Proarrhythmia : definition, risk factors, causes, treatment and controversis. Am Heart J 1994; 128 : 575-85.
 Amemortidia MM, Korzen P, Caren JE, Dunvis PA, Despecidal

- Adamantidis MM, Kerram P, Caron JF, Dupuis BA. Droperidol exerts dual effects on repolarization and induces early afterde-polarizations and triggered activity in rabbit Purkinje fibers. J Pharmacol Exp Ther 1993; 266: 884-93.
 Adamantidis MM, Kerram P, Dupuis BA. In vitro electrophysio-logical detection of iatrogenic arrhythmogenicity. Fundam Clin Pharmacol 1994; 8: 391-407.
 Adamantidis MM, Lacroix DL, Caron JF, Dupuis BA. Electrophy-siological and arrhythmogenic effects of the histamine type-1 receptor antagonist astemizole on rabbit Purkinje fibers. Clinical relevance. J Cardiovasc Pharmacol 1995; 26: 319-27.
 Adamantidis MM, Dumotier BM, Caron JF, Dupuis BA. Spar-floxacin but not levofloxacin or ofloxacin prolongs cardiac repo-larization in rabbit Purkinje fibers. Fundam Clin Pharmacol 1998; 12: 70-6.
 Puisieux FL, Adamantidis MM, Dumotier BM, Dupuis BA. Cisa-

- 1998; 12: 70-6.
 16. Puisieux FL, Adamantidis MM, Dumotier BM, Dupuis BA. Cisapride-induced prolongation of cardiac action potential and early afterdepolarisations in rabbit Purkinje fibres. Br J Pharmacol 1996; 117: 1377-9.
 17. Hondeghem LM, Snyders DJ. Class III antiarrhythmic agents have a lot of potential but a long way to go. Reduced effective-

ness and dangers of reverse use-dependence. Circulation 1990;81:686-90

- 18. Campbell DL, Qu Y, Rasmusson RL, Strauss HC. The calciumindependent transient outward potassium current in isolated fer-ret right ventricular myocytes. II. Closed state reverse use-depen-dent block by 4-aminopyridine. J Gen Physiol 1993; 101: 603-26
- dent block by 4-aminopyridine. J Gen Physiol 1993; 101: 603-26.
 19. Sawanobori T, Adaniya H, Namiki T, Hiraoka M. Rate-depen-dent effects of sematilide on action potential duration in isolated guinea-pig ventricular myocytes. J Pharmacol Exp Ther 1994; 271: 302-10.
 20. Carmeliet E. Voltage- and time-dependent block of the delayed K+ current in cardiac myocytes by dofetilide. J Pharmacol Exp Ther 1992; 262: 809-17.
 21. Carmeliet E. Use-dependent block and use-dependent unblock of the delayed rectifier K+ current by almokalant in rabbit ventri-cular myocytes. Circ Res 1993; 73: 857-68.
 22. Ohler A, Amos GJ, Wettwer E, Ravens U. Frequency-dependent effects of E-4031, almokalant, dofetilide and tedisamil on action potential duration : no evidence for " reverse use-dependent "block. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 1994; 349: 602-10.
 23. Ohler A, Ravens U. Effects of E-4031, almokalant and tedisamil on postrest action potential duration of human papillary muscles. J Pharmacol Exp Ther 1994; 270: 460-5.
 24. Dumotier BM, Adamantidis MM, Dupuis BA. Differential effects of K channel blockers on the postrest action potential duration on rabbit ventricular muscle (Résumé). J Mol Cell Cardiol 1996; 28 (8): A 256.
 25. Dumotier B, Adamantidis M M, Bastide M, Bordet R, Dupuis B. Cisapride effects on postrest action potential duration in isolated rabbit ventricular muscle (Résumé). Arch Mal Cœur 1998; 91: 474.
 26. Mina Z, Nordin C, Aronson RS, Role of L-type calcium chan-

- 474
- Ming Z, Nordin C, Aronson RS. Role of L-type calcium chan-nel window current in generating current-induced early after-depolarizations. J Cardiovasc Electrophysiol 1994 ; 5 : 323-34
- 34.
 Patterson E, Scherlag BJ, Lazzara R. Early afterdepolarizations produced by dl-sotalol and clofilium. J Cardiovasc Electrophysiol 1997; 8: 667-78.
 Verduyn SC, Vos MA, Van Der Zande J, Kulcsar A, Wellens HJJ. Further observations to elucidate the role of interventricular dispersion of repolarization and early after depolarizations in the genesis of acquired torsade de pointes arrhythmias. A comparison between almokalant and d-sotalol using the dog as its own control. J Am Coll Cardiol 1997; 30: 1575-84.
 Perriente-Khavat A, Vidal AM, Cheron G et al. Pharmacokine-
- 29. Pariente-Khayat A, Vidal AM, Cheron G et al. Pharmacokine-Partenie Klava A, Vial AW, Cheron G et al. Friamacontering tics of diphemanil methylsulphate in neonates and in premature infants. Eur J Clin Pharmacol 1996; 50: 429-30.
 Ahmad SR, Wolfe SM. Cisapride and torsades de pointes. Lan-cet 1995; 345: 508.

1494 ARCHIVES DES MALADIES DU CŒUR ET DES VAISSEAUX, tome 91, n° 12, décembre 1998

EFFETS DU DIPHEMANIL METHYLSULFATE SUR LA PHASE PRECOCE DE REPOLARISATION.

La Figure 26 illustre les effets du diphémanil méthylsulfate sur l'amplitude de la phase 1 (AP1). Elle montre que des concentrations croissantes de diphémanil méthylsulfate (0.1-30 µM; n=6) ne modifient pas AP1 de façon significative. La plus forte concentration de diphémanil méthylsulfate tend à diminuer AP1 mais cet effet n'atteint pas le seuil de significativité.



Figure 26: Effets de concentrations croissantes de diphémanil méthylsulfate sur l'amplitude de la phase 1 (AP1) de potentiels d'action de fibres de Purkinje de lapin.

Nos résultats montrent que les concentrations croissantes de diphémanil méthylsulfate ne modifient pas la phase précoce de repolarisation des potentiels d'action. Ceci suggère que le courant chlore calcium-dépendant I_{to2} et le courant calcique de type lent $I_{Ca(L)}$ ne sont pas modifiés par le diphémanil méthylsulfate aux concentrations testées. En revanche, les effets d'allongement importants de la phase 2 de repolarisation des potentiels d'action induits par le diphémanil et sa capacité à induire des EAD et des activités rythmiques soutenues sont en faveur d'une diminution de la composante rapide I_{Kr} du courant rectifiant retardé I_{K} .

3) Evaluation de la potentialité arythmogène de la sparfloxacine:

Article n°4: Adamantidis MM, Dumotier BM, Caron JF, Bordet R.
 Sparfloxacin but not levofloxacin or ofloxacin prolongs cardiac repolarization in rabbit Purkinje fibers.
 Fundam Clin Pharmacol 1998; 12: 70-76.

Des effets d'allongement de la repolarisation ventriculaire ont été rapportés chez des patients volontaires sains (Demolis et coll., 1996) ayant reçu des doses thérapeutiques de sparfloxacine (ZAGAM®). Ce médicament est un antibiotique appartenant à la famille des fluoroquinolones. D'autres représentants de cette famille chimique ne possèdent pas la propriété d'allonger l'intervalle QT de l'ECG. Expérimentalement, la sparfloxacine allonge l'intervalle QT de l'ECG de chiens traités pendant plusieurs semaines par des doses subthérapeutiques de ce médicament (Iida et coll., 1991). L'augmentation de l'intervalle QT est un facteur prédisposant à la survenue de Torsade de Pointes, surtout lorsqu'il est accompagné d'un déséquilibre ionique (Morganroth, 1993). Afin d'évaluer la potentialité arythmogène de la sparfloxacine, nous avons étudié ses effets électrophysiologiques sur des potentiels d'action de fibres de Purkinje de lapin. Nous les avons comparés à ceux de médicaments appartenant à la même famille thérapeutique, l'ofloxacine et son isomère optique S(-), la lévofloxacine.

Original article

Sparfloxacin but not levofloxacin or ofloxacin prolongs cardiac repolarization in rabbit Purkinje fibers

MM Adamantidis, BM Dumotier, JF Caron*, R Bordet

Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine; *Centre Régional de Pharmacovigilance, CH & U de Lille, I Place de Verdun, 59045 Lille cedex, France

(Received 5 August 1997; revised 9 September 1997; accepted 10 October 1997)

SUMMARY – Sparfloxacin, a fluoroquinolone antibacterial, has been reported to prolong cardiac repolarization in some patients. In this study, we have investigated the in vitro cardiac electrophysiological effects of two other fluoroquinolones, levofloxacin and ofloxacin, and compared them with those exerted by sparfloxacin. Cardiac action potentials have been recorded from rabbit Purkinje fibers using conventional glass microelectrodes. The influence of a sudden decrease in stimulation rate on repolarization is examined. It is found that ofloxacin and levofloxacin (1–100 μ M) do not alter the action potential parameters even at a concentration as high as 100 μ M. The stimulation rate is without effect on repolarization. On the contrary, sparfloxacin (1–100 μ M) lengthens concentration-dependently the duration of action potential, this effect being significant from the concentration of 10 μ M. A non significant decrease in maximal rate of rise of phase 0 depolarization was observed at the concentration of 100 μ M. Under low stimulation rate, the sparfloxacin-induced prolonging effect was magnified and early afterdepolarizations occurred in one of seven fibers from the concentration of 30 μ M and in four other fibers at the concentration of 100 μ M. These results suggest that levofloxacin and ofloxacin he prolongation of QT interval observed clinically in some patients and might become arrhythmogenic in the presence of other predisposing factors. © 1998 Elsevier, Paris.

levofloxacin / ofloxacin / sparfloxacin / cardiac Purkinje fibers / repolarization / early afterdepolarization

INTRODUCTION

Levofloxacin, an oral fluoroquinolone agent with a broad spectrum of antibacterial activity is the optical S-(-) isomer of the racemic compound ofloxacin. In vitro it has been found twice as potent as ofloxacin and in clinical trials, oral levofloxacin at half daily dosage of ofloxacin showed equivalent efficacy and a reduced incidence of adverse effects [10]. Sparfloxacin is another oral fluoroquinolone which presents marked chemical differences from ofloxacin and an improved activity against resistant strains of Grampositive organisms (particularly Streptococcus pneumoniae). Although the currently available fluoroquinolones share in common a range of adverse drug reactions and drug interactions [21], sparfloxacin has been shown to increase the duration of the OT interval when administered at subtoxic dosage in dogs [18] and at therapeutic dosage in humans [11].

Prolongation of the QT interval may be responsible

for arrhythmogenic effects such as torsades de pointes particularly if predisposing factors such as congenital long QT syndrome, bradycardia, hypokalemia and/or hypomagnesemia are present [23, 28, 30]. There is wide agreement among investigators that QT prolongation and torsades de pointes are somehow related to electrophysiological alterations in cardiac action potential, namely a lengthening in repolarization phase and beyond triggered activity brought about by early afterdepolarizations (EADs) [8, 15, 16, 31]. Most pharmacological agents capable of prolonging the QT interval appear capable of causing torsades de pointes. In our experience, EADs and triggered activity have been actually observed in rabbit Purkinje fibers exposed to a number of noncardiotropic drugs that had been associated with prolonged QT interval and torsades de pointes [1, 2, 3, 27].

The drug-induced lengthening in repolarization has been shown to exhibit reverse rate-dependence, that is more prolonging effect at low stimulation rate [14, 17, 25]. In addition several studies have provided evidence that the incidence of EADs and subsequent triggered activity is precipitated by low stimulation rates, low extracellular potassium or magnesium and that they arise more likely in Purkinje fibers than in ventricular muscle [9, 12, 26, 31].

Sparfloxacin has been briefly reported to prolong action potential duration in guinea-pig papillary muscle [24] but its effects in Purkinje fibers have never been investigated. To our knowledge, ofloxacine and levofloxacin have not been associated with clinical reports of cardiac adverse effects and their influence on cardiac electrogenesis is unknown. Our purpose was to test the hypothesis that the cellular electrophysiological effects of these three fluoroquinolones allow the same discrimination as that given by clinical observation, ie, the lack of cardiac adverse effects of levofloxacin and ofloxacin and the ability of sparfloxacin to prolong OT interval. Therefore we have compared the effects of the three fluoroquinolones on action potentials recorded from rabbit Purkinje fibers and evaluated the influence of low stimulation rate on their concentration-dependent effects.

MATERIALS AND METHODS

Isolated Purkinje fibers

All experiments have been performed in accordance with the official recommendations of the French Ministry of Agriculture. New Zealand white rabbits of either sex (1.5-2 kg) were killed by cervical dislocation and exsanguinated. Their hearts were quickly excised and placed in potassium- and glucose-enriched Tyrode's solution (in mM: NaCl 108.2; KCl 27; CaCl, 1.8; MgCl, 1; NaH₂PO₄ 1.8; NaHCO₃ 25; glucose 55; pH 7.35 \pm 0.05) oxygenated (95% O₂-5% CO₂) at a temperature of about 32 °C. The left ventricle was opened through an incision into the anterior interventricular groove. Purkinje fibers still attached to the ventricular muscle were carefully dissected and pinned to the silicone base of the experimental chamber (2 mL). The pins were exclusively placed in ventricular muscle to avoid stretching of the Purkinje fibers. The preparations were superfused for 30 min, at a flow rate of 2 mL/min with the above-described solution maintained at 36.5 ± 0.5 °C. Then the superfusate was switched to normal Tyrode's solution whose composition was as follows (in mM): NaCl 108.2; KCl 4; MgCl₂ 1; NaH₂PO₄ 1.8; CaCl₂ 1.8; NaHCO₃ 25; glucose 11. The preparations were electrically stimulated by rectangular pulses of 1 ms with a frequency of 120 pulses per min (ppm) and an intensity 1.5 times the diastolic threshold. Pulses were delivered by a stimulator (JSI 0198 Beerse, Belgium) through a bipolar Teflon-insulated (except at the tip) stainless-steel electrode. After 30 min at least, the stimulation frequency was turned to 60 ppm.

Action potential recordings

Transmembrane action potentials (APs) were recorded using 3M KCl glass microelectrodes with a tip resistance of 10-15 megohms, which were coupled with an Ag-AgCl bath electrode and connected to an impedance amplifier (WPI model 750, New Haven, CT, USA). Transmembrane action potentials were displayed on an oscilloscope with numerical memory (Gould DSO 1602, Valley View, OH, USA), analyzed by an external computer system (Datapac, Bio-Logic, Claix, France) and stored on a digital magnetic tape recorder (DTR 1200, Bio-Logic) which, after each experiment, allowed display on paper recordings (Gould TA 240) of the occurrence and development of electrical abnormalities. The following parameters were measured: resting membrane potential (RMP), action potential amplitude (APA) and overshoot (OS), maximal rate of depolarization (Vmax) and AP duration at 50% and 90% of repolarization (APD50 and APD90 respectively). Equilibration period lasted 2 hours at least.

Experimental protocol and action potential measurements

After stabilization and before the experiment was started, the stimulation frequency was reduced from 60 ppm to 12 ppm for 2 min, then returned to 60 ppm. This maneuver was aimed to examine the influence of a low rate of stimulation on action potential characteristics and to verify the absence of abnormality in repolarization, such as EADs. Then, the studied drug was added to the Tyrode's solution at increasing cumulative concentrations, each concentration being tested for 30 min. The stimulation rate was 60 ppm except between the 20th and the 22nd minute, when the frequency was reduced to 12 ppm then switched back to 60 ppm. Thus the drug effects were evaluated at low stimulation rate which otherwise facilitated the development of EADs and subsequent triggered activities.

Action potential parameters were measured after 15 min and 30 min of each concentration superfusion and at the end of the 2 min-stimulation at 12 ppm. Only the results obtained when the impalement was maintained in the same cell throughout the experiment, have been considered for quantitative evaluation.

Drugs

Stock solutions (10 mM) of ofloxacin, levofloxacin or sparfloxacin were made up daily and later diluted to the desired concentration for superfusion. Ofloxacin and levofloxacin were dissolved in Tyrode's solution. Sparfloxacin was dissolved as followed: 3.92 mg were dissolved in 450 μ L dimethylsulfoxide (DMSO) then 550 μ L Tyrode's solution were added to give a final concentration of 10 mM. This solution was protected from the light. The influence of this vehicle



Fig 1. Representative example of the prolonging effects exerted by sparfloxacin on repolarization in action potentials recorded from a rabbit Purkinje fiber stimulated at 60 and at 12 pulses per min (ppm). Control drug-free action potentials are superimposed in dotted line. See how the low stimulation rate of 12 ppm magnifies the prolonging effect recorded at 60 ppm. The arrows indicate early afterdepolarizations which developed at the end of the plateau and, in the presence of 100 μ M sparfloxacin, appeared as oscillations of increasing amplitude.

on the electrophysiological parameters was tested in three experiments at concentrations corresponding to those used in sparfloxacin experiences.

Evaluation of data

The results have been expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons vs control were performed statistically using an analysis of variance for repeated measures completed by the corrected Dunnett's *t*-test. *P* < 0.05 was considered significant.

RESULTS

A representative example of sparfloxacin effects on the profile of rabbit Purkinje fiber is given in *figure 1*. It clearly shows that sparfloxacin induced a concentration-dependent lengthening in action potential duration which appeared already at plateau level and was strongly more marked at 12 ppm as compared to that observed at 60 ppm. In addition, at the concentrations of 30 μ M and 100 μ M sparfloxacin, the low rate of 12 ppm facilitated the development of single then multiple EADs at the end of the plateau.

The prolonging effect was also observed in six other fibers (*figure 2*). The increase in APD50 and



Fig 2. Concentration-dependent effects induced by sparfloxacin on action potential duration in rabbit Purkinje fibers stimulated at the rate of 60 pulses per min. Measurements have been performed after 15 min (dotted lines) and 30 min (solid lines) of exposure to the drug. APD50 and APD90: action potential duration at 50% and 90% of repolarization, respectively. Data are mean \pm SEM (n = 7);

* P < 0.05 versus drug-free (0) values.

APD90 became significant from the concentration of 10 μ M sparfloxacin. At the stimulation rate of 60 ppm, this concentration of 10 μ M prolonged APD50 and APD90 by about +19%. At the high concentration of 100 μ M, the prolonging effect on APD50 and APD90 reached +103% and +106% from control values, respectively. Furthermore, *figure 2* shows that for each sparfloxacin concentration, the lengthening of action potential duration was already well-developed, nearly the steady state, after 15 min of exposure to the drug. Concomitantly (*table I*), the highest concentration potential amplitude, overshoot and Vmax.

Decreasing stimulation rate from 60 ppm to 12 ppm enhanced the prolonging effect exerted by sparfloxacin (fig 3). Thus 10 μ M sparfloxacin increased APD50 and APD90 by +49% and +45% from control values, respectively. In addition, early afterdepolarizations developed from the concentration of 30 μ M in one of seven fibers (as shown in *figure 1*) and in four of seven other fibers, they occurred at the concentration of 100 μ M.

72

		Concentrations (µM)					
	0	1	3	10	30	100	
Levofloxacin							
<i>n</i> = 7							
RMP (mV)	-90.9 ± 0.5	-90.9 ± 0.3	-90.6 ± 0.3	-91.0 ± 0.3	-90.9 ± 0.5	-90.9 ± 0.3	
APA (mV)	124.0 ± 0.9	124.0 ± 0.9	123.9 ± 0.9	124.4 ± 0.8	124.0 ± 1.1	123.0 ± 1.0	
OS (mV)	33.1 ± 1.0	33.1 ± 0.7	33.3 ± 0.7	33.4 ± 0.6	33.1 ± 0.6	32.1 ± 0.9	
Vmax (V/s)	534.4 ± 29.2	528.4 ± 24.7	524.1 ± 30.9	512.4 ± 28.5	507.1 ± 33.3	496.3 ± 37.8	
Ofloxacin							
n = 7							
RMP (mV)	-91.4 ± 0.65	-91.3 ± 0.75	-91.4 ± 0.69	-91.3 ± 0.57	-91.4 ± 0.57	-91.4 ± 0.48	
APA (mV)	126.1 ± 0.94	126.3 ± 0.75	126.0 ± 1.07	126.0 ± 0.87	126.0 ± 0.76	126.0 ± 0.82	
OS (mV)	34.7 ± 0.36	35.0 ± 0.31	34.6 ± 0.31	34.7 ± 0.57	34.6 ± 0.43	34.6 ± 0.43	
Vmax (V/s)	512.3 ± 53.5	521.0 ± 50.1	516.4 ± 33.8	516.1 ± 43.1	455.6 ± 21.2	447.0 ± 26.7	
Sparfloxacin							
n = 6							
RMP (mV)	-91.8 ± 0.5	-92.2 ± 0.6	-91.8 ± 0.8	-91.8 ± 0.8	-91.7 ± 0.7	-90.8 ± 0.5	
APA (mV)	125.8 ± 1.1	126.2 ± 1.3	125.7 ± 1.6	125.3 ± 1.7	124.2 ± 1.5	$121.2 \pm 1.3^*$	
OS (mV)	34.0 ± 0.7	34.0 ± 0.8	33.8 ± 0.8	33.5 ± 1.0	32.5 ± 0.9	$30.3 \pm 1.0^*$	
Vmax (V/s)	478.3 ± 21.5	483.5 ± 18.2	476.0 ± 19.5	468.5 ± 15.0	441.2 ± 9.9	$416.2 \pm 15.5^*$	
Vehicle							
<i>n</i> = 3							
RMP (mV)	-92.7 ± 0.7	-93.0 ± 0.6	-92.7 ± 0.9	-92.7 ± 0.9	-92.3 ± 1.2	-92.3 ± 0.7	
APA (mV)	127.3 ± 1.5	127.7 ± 1.5	126.7 ± 1.5	125.7 ± 2.4	125.0 ± 2.0	125.3 ± 2.7	
OS (mV)	34.7 ± 0.9	34.7 ± 0.9	34.0 ± 0.6	33.0 ± 1.5	32.7 ± 0.9	33.0 ± 2.1	
Vmax (V/s)	509.3 ± 42.9	507.0 ± 41.4	504.7 ± 48.1	496.0 ± 46.2	493.7 ± 57.2	494.3 ± 55.0	

 Table I. Comparative effects of levofloxacin, ofloxacin, sparfloxacin and its vehicle (diluted at the respective corresponding concentrations) on action potential parameters recorded in rabbit Purkinje fibers stimulated at the frequency of 60 pulses per min.

RMP: resting membrane potential; APA: action potential amplitude; OS: overshoot; Vmax: maximal rate of depolarization. * P < 0.05 vs control (0).

In the three control experiments, concentrations of vehicle corresponding to each sparfloxacin dilutions also induced a decrease in action potential amplitude and overshoot, but Vmax remained unchanged at the highest concentration (*table 1*). Interestingly, action potential duration was not affected at 90% repolarization and was rather slightly decreased at plateau level (*figure 3*). Thus, this indicates that vehicle does not participate to the prolonging effect of sparfloxacin on action potential duration.

By contrast, levofloxacin and ofloxacin were found devoid of significant electrophysiological effect in rabbit Purkinje fibers. Only a slight decrease in Vmax was observed with both levofloxacin and ofloxacin but significance threshold was not reached even at the high concentration of 100 μ M (*table 1*). Interestingly action potential duration was not affected by these drugs as illustrated in *figure 4* which shows graphically the effects of levofloxacin and ofloxacin on APD50 and APD90 in Purkinje fibers stimulated at 12 ppm and 60 ppm respectively. It clearly highlights the contrast between the lack of prolonging effect with levofloxacin and ofloxacin on APD and the prolonging effect induced by sparfloxacin.

DISCUSSION

The present results provide evidence that neither levofloxacin nor ofloxacin did influence the electrical activity recorded from rabbit Purkinje fibers, even at concentrations as high as $100 \,\mu$ M. In contrast, sparfloxacin lengthened dose-dependently the action potential duration without noticeable modification of other parameters except a decrease in action potential amplitude at the highest concentration tested (100 μ M). Thus in our experiments, moderate concentrations (less than 30 μ M) of sparfloxacin exerted typical class III effects (according to the classification of antiarrhythmic drugs from Vaughan-Williams). As currently observed with other drugs which exert pure class III effects, the abrupt decrease in stimulation rate exaggerated the prolonging effect on APD induced by sparfloxacin and favored the development of abnormalities in repolarization such as early afterdepolarizations.



Fig 3. Concentration-dependent effects induced by sparfloxacin and its vehicle on action potential duration in rabbit Purkinje fibers stimulated at the rate of 12 pulses per min. For comparison, sparfloxacin effects collected at 60 ppm are indicated in dotted line. APD50 and APD90: action potential duration at 50% and 90% of repolarization, respectively. Data are mean \pm SEM; n = 7 in sparfloxacin group; n = 3 in vehicle group; * P < 0.05 versus drug-free (0) values.



Fig 4. Concentration-dependent effects induced by levofloxacin and ofloxacin on action potential duration in rabbit Purkinje fibers stimulated at the rate of 60 ppm (solid symbols) and of 12 ppm (open symbols). APD50 and APD90: action potential duration at 50% and 90% of repolarization, respectively. Data are mean \pm SEM (n = 7 fibers in each group); * P < 0.05 versus drug-free (0) values.

Such "pure" class III effect has been widely reported to result from either a reduction in the availability of K⁺ currents that contribute to repolarization, an increase in the availability of inward Ca^{2+} current, a delay in the Na⁺ current inactivation and/or an increase in the contribution of electrogenic current generated by the Na⁺-Ca²⁺ exchanger [4, 32]. The present study does not allow to draw precisely the ionic mechanisms underlying sparfloxacin effects. However the generation of EADs clearly indicates an imbalance between inward and outward currents leading to failure of membrane repolarization and may likely correspond to a reduction of net outward current in the presence of a residual inward current.

These results are in agreement with the study from Nakatsuji et al [24] who found a prolonged repolarization time in intracellular recordings from guinea-pig papillary muscle. In addition they fit well with the observations of QT prolongation after four-week oral sparfloxacin in Beagle dogs [18] and in healthy volunteers receiving a single oral dose of sparfloxacin [11]. In addition, in the latter study, it was indicated that Escande [personal communication] had found K⁺ channel blocking effects in rat cardiac myocytes exposed to high concentrations of sparfloxacin, which altered non specifically the transient outward current, the delayed rectifier and the inward rectifier current.

It is now well-elaborated that EADs constitute the trigger mechanism for the initiation of torsades de pointes. A great number of studies have demonstrated that all conditions known to predispose to torsades de pointes in patients are also known to induce EADs in the experimental settings such as bradycardia, low potassium and/or low magnesium concentrations [8, 12, 9, 31, 16], cardiotropic and noncardiotropic drugs [1, 2, 3, 6]. In a recent report, El-Sherif et al [13] demonstrated in a canine model of polymorphic ventricular arrhythmias that the initiating beats actually originated from EADs presumably arising in subendocardial Purkinje fibers. The conclusion that EADs are responsible for initiation of polymorphic arrhythmias was also provided by Asano et al [5] in a model of optical mapping of isolated rabbit hearts.

The major problem in interpreting such experimental results lies in their clinical relevance. A careful scrutiny of pharmacokinetic properties of the drugs gives useful information to evaluate reliably their arrhythmogenic potential. It should be taken into account not only the plasma concentrations of drugs in man but also the apparent volume of distribution which expresses tissue distribution, the metabolic pathways and the mode of elimination. The threshold concentration for significant prolongation of action potential in vitro may be lower than peak plasma concentrations but tissue concentrations may exceed those in plasma if the drug accumulates in the heart muscle, this rendering relevant the in vitro concentrations. This has been inferred in the arrhythmogenic potential of therapeutic doses of the macrolide antibiotics erythromycin [29] and the antihistamine astemizole that has been found to accumulate (up to 400-fold) in animal cardiac tissues [20]. Because a large volume of distribution may correspond to an important tissue fixation, this pharmacokinetic parameter

74

is meaningful in the clinical assessment of experimental studies. Another essential factor is the interference with the oxidative metabolism of numerous drugs by the hepatic cytochrome P450 isoenzymes. Genetic polymorphism has been described for several isoenzymes (eg, P4502D6) whereas other common isoforms (eg, P4503A4) are not polymorphic but show highly variable expression in man. Genetic defect or inhibition by agents can lead to high plasma levels of the parent compound and may predispose to ventricular tachyarrhythmias. For example concomitant therapy with ketoconazole and erythromycin has been reported to increase the risk of QT prolongation or torsades de pointes in patients receiving the antihistamine terfenadine [7].

The mean plasma concentrations after single [11] or multiple [22], oral doses of sparfloxacin ranged from 1 to 4 μ M, that is somewhat lower than those of 5 to 8 µM reported with levofloxacin and ofloxacin [10]. But sparfloxacin has an apparent volume of distribution 3 to 4 times higher than that of levofloxacin and ofloxacin (4-6 L/kg versus 1.1-1.3 L/kg) but the affinity for cardiac tissue remains unknown [22]. Levofloxacin and ofloxacin undergo limited metabolism and are mainly excreted unchanged in the urine. Sparfloxacin is largely metabolized in glucuronide derivative but no metabolism by oxidative mechanisms dependent on cytochrome P450 enzymes has been detected [22]. The pharmacokinetic parameters for sparfloxacin indicate that the observed effects in vitro at the concentration of 10 μ M can be considered as clinically relevant and that the abnormalities in repolarization which occurred at higher concentration and lower stimulation rate, cannot be entirely ruled out as possible cause of ventricular arrhythmias in patients with other predisposing factors (congenital long QT syndrome, electrolyte imbalance, concomitant medication known to prolong QT interval). Interestingly, the present results lead to quite similar conclusions as those recommended by the Independent International Safety Board for sparfloxacin effects [19].

This study emphasizes how the investigation of the electrophysiological effects of a drug during preclinical development before its first administration in healthy volunteers can advise on a design of relevant clinical trials or future studies.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported in part by a grant from Roussel-Uclaf Laboratory and by a grant NO 93-04 from CH & U Lille.

REFERENCES

1 Adamantidis MM, Kerram P, Caron JF, Dupuis BA. Droperidol exerts dual effects on repolarization and induces early afterdep-

olarizations and triggered activity in rabbit Purkinje fibers. J Pharmacol Exp Ther 1993 ; 266 : 884-93

- 2 Adamantidis MM, Kerram P, Dupuis BA. In vitro electrophysiological detection of iatrogenic arrhythmogenicity. *Fundam Clin Pharmacol* 1994; 8: 391-407
- 3 Adamantidis MM, Lacroix DL, Caron JF, Dupuis BA. Electrophysiological and arrhythmogenic effects of the histamine type I-receptor antagonist astemizole on rabbit Purkinje fibers : clinical relevance. J Cardiovasc Pharmacol 1995; 26: 319-27
- 4 Antzelevitch C, Sicouri S. Clinical relevance of cardiac arrhythmias generated by early afterdepolarizations. Role of M cells in the generation of U waves, triggered activity and torsades de pointes. J Am Coll Cardiol 1994; 23: 259-77
- 5 Asano Y, Davidenko JM, Baxter WT, Gray RA, Jalife J. Optical mapping of drug-induced polymorphic arrhythmias and torsades de pointes in isolated rabbit heart. J Am Coll Cardiol 1997; 29: 831-42
- 6 Benedict CR. The QT interval and drug-associated torsades de pointes. Drug Invest 1993; 5: 69-79
- 7 Botstein P. Is QT interval prolongation harmful? A regulatory perspective. Am J Cardiol 1993; 72; 50B-2B
- 8 Brachmann J, Scherlag BJ, Rosenshtraukh LV, Lazzara R. Bradycardia-dependent triggered activity ; relevance to druginduced multiform ventricular tachycardia. *Circulation* 1983 ; 68 : 846-56
- 9 Davidenko JM, Cohen L, Goodrow R. Quinidine-induced action potential prolongation, early afterdepolarizations, and triggered activity in canine Purkinje fibers. Effects of stimulation rate, potassium, and magnesium. *Circulation* 1989; 79: 674-86
- 10 Davis R, Bryson HM. Levofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy. *Drugs* 1994; 47 Suppl 4: 677-700
- 11 Demolis JL, Charransol A, Funck-Brentano C, Jaillon P. Effects of a single oral dose of sparfloxacin on ventricular repolarization in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1996; 41: 499-503
- 12 El-Sherif N, Zeiler RH, Craelius W, Gough WB, Henkin R. QTU prolongation and polymorphic tachyarrhythmias due to bradycardia-dependent early afterdepolarizations. Afterdepolarizations and ventricular arrhythmias. *Circ Res* 1988; 63: 286-305
- 13 El-Sherif N, Careb EP, 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
- 14 Funck-Brentano C. Rate-dependence of class III actions in the heart. *Fundam Clin Pharmacol* 1993; 7:51-9
- 15 Gilmour RF, Moise SN. Triggered activity as a mechanism for inherited ventricular arrhythmias in German shepherd dogs. J Am Coll Cardiol 1996; 27: 1526-33
- 16 Han HL, Hou CJY, Lauer MR, Sung RJ. Electrophysiologic mechanisms of the long QT interval syndromes and torsades de pointes. Ann Intern Med 1995; 122: 701-14
- 17 Hondeghem LM, Snyders DJ. Class III antiarrhythmic agents have a lot of potential but a long way to go. Reduced effectiveness and dangers of reverse use-dependence. *Circulation* 1990; 81: 686-90
- 18 Iida M, Yasuba M, Nakajima F, Maeda J, Matsuda N, Onishi K. Fóur-week oral subacute toxicity study of sparfloxacin in beagle dogs. *Chemotherapy (Tokyo)* 1991; 39 Suppl 4: 195-202
- 19 Jaillon P, Morganroth J, Brumpt I, Talbot G and The Sparfloxacin Safety Group. Overview of electrocardiographic and cardiovascular safety data for sparfloxacin. J Antimicrob Chemother 1996; 37 Suppl A : 161-7
- 20 Michiels M, Van Peer A, Woestenborghs R, Heykants J. Pharmacokinetics and tissue distribution in the dog. *Drug Dev Res* 1986; 8: 53-62

MM Adamantidis et al

- 21 Mizuki Y, Fujiwara I, Yamaguchi T. Pharmacokinetic interaction related to the chemical structures of fluoroquinolones. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37 Suppl A : 41-55
- 22 Montay G. Pharmacokinetics of sparfloxacin in healthy volunteers and patients: a review. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37 Suppl A : 27-39
- 23 Morganroth J. Relation of QTc prolongation on the electrocardiogram to torsades de pointes: definition and mechanisms. Am J Cardiol 1993; 72: 10-13B
- 24 Nakatsuji K, Kii Y, Miura Y, Ito T. General pharmacology of sparfloxacin, a new quinolone antibacterial agent. 2. Effects on the respiratory, cardiovascular and autonomic nervous system functions. *Pharmacometrics* 1991; 41 Suppl 2: 157-64
- 25 Nattel S, Zeng FD. Frequency-dependent effects of antiarrhythmic drugs on action potential duration and refractoriness of canine cardiac Purkinje fibers. J Pharmacol Exp Ther 1984; 229: 283-91
- 26 Nattel S, Quantz MA. Pharmacological response of quinidineinduced early afterdepolarisations in canine cardiac Purkinje fibres: insights into underlying ionic mechanisms. *Cardiovasc Res* 1988; 22: 808-17

- Puisieux FL, Adamantidis MM, Dumotier BM, Dupuis BA. Cisapride-induced prolongation of cardiac action potential and early afterdepolarizations in rabbit Purkinje fibers. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 1377-9
 Roden DM, Lazzara R, Rosen MR, Schwartz PJ, Towbin J,
- 28 Roden DM, Lazzara R, Rosen MR, Schwartz PJ, Towbin J, Vincent M. Multiple mechanisms in the long QT syndrome. Current knowledge, gaps and future direction. *Circulation* 1996; 94: 1996-2012
- 29 Rubart M, Pressler ML, Pride HP, Zipes DP. Electrophysiological mechanisms in a canine model of erythromycin-associated long QT syndrome. *Circulation* 1993; 88: 1832-44
- 30 Singh BN. When is QT prolongation antiarrhythmic and when is it proarrhythmic? Am J Cardiol 1989; 63: 867-9
- 31 Surawicz B. Electrophysiologic substrate of torsades de pointes: dispersion of repolarization or early afterdepolarizations? J Am Coll Cardiol 1989; 14: 172-84
- 32 Szabo B, Sweidan R, Rajagopalan C, Lazzara R. Role of Na⁺: Ca²⁺ exchange current in Cs⁺-induce early afterdepolarizations in Purkinje fibers. J Cardiovasc Electrophysiol 1994; 5: 933-44

76

EFFETS DE LA SPARFLOXACINE, DE LA LEVOFLOXACINE ET DE L'OFLOXACINE SUR LA PHASE PRECOCE DE REPOLARISATION.

Les effets de concentrations croissantes de sparfloxacine, de lévofloxacine et d'ofloxacine sur l'amplitude de la phase 1 (AP1) sont représentés dans la Figure 27. Les résultats montrent que la sparfloxacine (0-100 μ M, n=7), la lévofloxacine (0-100 μ M, n=7) et l'ofloxacine (0-100 μ M, n=7) ne modifient AP1 de façon significative, même aux plus fortes concentrations.



Figure 27 : Effets de concentrations croissantes de sparfloxacine (S), d'ofloxacine (O) et de lévofloxacine (L) sur l'amplitude de la phase 1 de repolarisation (AP1) de potentiels d'action de fibres de Purkinje de lapin.

Nos résultats montrent que les concentrations croissantes de sparfloxacine, de lévofloxacine et d'ofloxacine ne modifient pas la phase précoce de repolarisation des potentiels d'action. Ils suggèrent que le courant chlore calcium-dépendant I_{to2} et le courant calcique de type lent $I_{Ca(L)}$ ne sont pas modifiés par ces médicaments. En revanche, l'effet d'allongement importants de la phase 2 de repolarisation des potentiels d'action induit par la sparfloxacine, sans modification notable de la phase précoce de repolarisation sont en faveur d'une diminution de la composante rapide I_{Kr} du courant rectifiant retardé I_K par ce médicament.

III - CINETIQUES D'INSTALLATION ET DE RETRAIT DES EFFETS DU CISAPRIDE SUR LA DUREE DES POTENTIELS D'ACTION DE MYOCARDE VENTRICULAIRE DE LAPIN:

L'allongement de la repolarisation induit par le cisapride, plus marqué aux basses fréquences qu'aux hautes fréquences de stimulation (fréquence-dépendance inverse) a favorisé l'apparition d'anomalies de la repolarisation de type EAD dans les fibres de Purkinje de lapin. Pourtant, aux fortes concentrations, l'effet est si puissant que même une stimulation à fréquence rapide ne permet pas de retrouver une réponse 1/1 à la stimulation de 1 Hz ou de 0.2 Hz.

Des études réalisées en patch-clamp ont mis en évidence les effets puissants de blocage du cisapride sur la composante rapide du courant rectifiant retardé I_{Kr} de myocytes ventriculaires de lapin (Carlsson et coll., 1997) et de cobaye (Drolet et coll., 1998) et sur le courant porté par le canal cloné HERG (Mohammad et coll., 1997; Rampe et coll., 1997). Elles ont souligné que l'intensité des effets du cisapride est comparable à celle du dofétilide. Cependant, la littérature ne mentionne pas les effets de blocage du courant rectifiant dans le sens entrant I_{K1} par ce médicament. Par ailleurs, des études expérimentales ont bien mis en évidence le blocage « use-dependent » du canal I_{Kr} exercé par le dofétilide, c'est-à-dire un blocage du canal qui augmente avec les dépolarisations successives (Carmeliet, 1992; 1993). Nous avons tenté de mieux comprendre les cinétiques d'installation des effets du cisapride sur la durée des potentiels d'action en les comparant avec celles des bloqueurs des courants potassiques dont les propriétés sont désormais bien établies. Pour cette étude, nous avons utilisé un protocole, réalisé sur du ventricule de lapin, alternant des périodes de quiescence et des périodes de stimulation régulière. Nous avons également évalué les effets du cisapride sur le courant rectifiant dans le sens entrant I_{K1} . Cette étude a fait l'objet d'un projet de publication, à soumettre au *Br J Pharmacol*

Introduction:

The gastrointestinal prokinetic agent cisapride (Propulsid) is a benzamide derivative that is widely prescribed for the treatment of gastroparesis and gastroesophageal reflux disease (Wiseman and Faulds, 1994). In a few past years, a number of reports have appeared associating cisapride use with QT interval prolongation and development of polymorphic ventricular tachycardia so-called torsades de pointes (Ahmad and Wolfe, 1995; Bran et al., 1995; Lewin et al., 1996; Wisowski and Bacsanyi, 1996) and our laboratory was the first to demonstrate experimentally that clinically relevant concentrations of cisapride induced a prolongation of the action potential duration (APD) and caused the development of early afterdepolarisations (EADs) in isolated rabbit Purkinje fibres (Puisieux et al., 1996). More recently cisapride has been found to concentration-dependently block the rapid component of the delayed rectifier K^+ current (I_{Kr}) measured in single ventricular myocytes isolated from rabbit (Carlsson et al., 1997) or from guinea-pig (Drolet et al., 1998). Furthermore cisapride was shown to display specific, high affinity block of the human ether-a-go-go-related gene (HERG) human cardiac K^+ channel that expresses the delayed rectifier current I_{Kr} in both human atria and ventricle (Mohammad et al., 1997; Rampe et al., 1997). The potency of cisapride effects on the HERG channel was similar to that observed for the class III antiarrhythmic agent dofetilide.

The voltage-dependent transient outward I_{to} and delayed rectifier I_K potassium channels and open during depolarization and close at diastolic potential. If a drug binds preferentially to potassium channel in the closed state, i.e exerts a reverse use-dependent block of the channel, the full APD prolonging effect is expected already on the first action potential elicited after prolonged quiescence at the resumption of regular stimulation. By contrast, if drug binding occurs on the channel in the open state, APD prolonging effect is expected to develop increasingly during repetitive stimulation, as it was demonstrated for dofetilide on I_{Kr} , the rapid component of I_K (Carmeliet, 1992). Thus, in the aim to estimate cisapride interaction with potassium channel, we studied using standard microelectrode, its time course effect on APD after rest and during regular stimulation in rabbit ventricular muscle. Cisapride effects were compared with those of (i) 4-aminopyridine (4-AP), a selective blocker of I_{to1} , the calciumindependent component of I_{to} (Campbell et coll., 1993), (ii) dofetilide, a selective blocker of I_{Kr} (Carmeliet, 1992), (iii) terikalant, which has been demonstrated to block I_{Kr} (Jurkiewicz et coll., 1996) but also the inward rectifier potassium current I_{K1} (Escande et coll., 1992). In addition, the electrophysiologic effects of cisapride on the inward rectifier K⁺ current I_{K1} were evaluated using patch-clamp technique on rabbit ventricular myocytes.

Methods:

Electrophysiologic studies performed on rabbit ventricular muscle strips

Experiments were performed with tissues from New Zealand white rabbits (1.5-2.0 kg) obtained from Charles Rivers (Le Plessis-Robinson, France) in accordance with the official recommendations of the French Ministry of Agriculture. Rabbits were killed by cervical dislocation and exsanguinated. The thorax was opened and the hearts removed rapidly and placed in a Tyrode solution of the following composition (mM) : NaCl 108.2; KCl 4; CaCl₂ 1.8; MgCl₂ 1; NaH₂PO₄ 1.8; NaHCO₃ 25; glucose 11; pH 7.35 \pm 0.05, gassed with carbogen (95% O₂, 5% CO₂). Ventricular strips (3 mm long, 2 mm wide, 0.5 mm thick) were dissected out from the left ventricular free wall and mounted, endocardium upward, in an organ bath maintained at 36.5 \pm 0.5°C. They were superfused at a constant rate (2.5 ml min⁻¹) by the Tyrode solution and paced at 1 Hz with square wave pulses of 1ms duration and 1.5 times threshold voltage delivered through a bipolar Teflon-insulated (except at the tip) stainless-steel electrode using UHS 20 Biotronik stimulator. Preparations were allowed to equilibrate for 2 hours at 1 Hz then the stimulation frequency was reduced from 1 Hz to 0.5 Hz.

Transmembrane action potentials were recorded using conventional glass microelectrodes filled with 3 M KCl and having tip resistances of 10-20 M, coupled with an

Ag-AgCl bath electrode and connected to an impedance amplifier (VF 102 Bio-Logic). Action potentials were viewed on an oscilloscope (Gould DSO 1602), analysed by an external computer system (Datapac, Bio-Logic) and stored on a magnetic digital tape recorder (DTR 1202, Bio-Logic) which, after each experiment, allowed to display on paper recordings (Gould TA 240) action potential profiles and electrical abnormalities (*e.g.* EADs). The following parameters of action potential (AP) were measured ; resting membrane potential (RMP), action potential amplitude (APA), maximal rate of depolarisation (Vmax) and action potential duration at 30 %, 50% and 90% of repolarisation (APD30, APD50, APD90 respectively).

Stimulation protocol

After stabilization, four rest periods of 20 min were intercalated in the regular stimulation at 0.5 Hz. The first pre-drug rest period was followed by 10 min of regular stimulation, this giving the "control" post-rest adaptation of AP duration after quiescence. Then stimulation was interrupted for the second rest period and during this period, the preparations were exposed to the studied drug. The basal stimulation was resumed for 40 min, under drug exposure, this constituting the "wash-in" post-rest period. A third period of quiescence was introduced, the drug being maintained in the superfusate, and was followed by 10 min of regular stimulation at 0.5 Hz considered as a "steady-state" post-rest period. Finally the drug was withdrawn from the superfusate just at the onset of the fourth rest period, followed once more by a"wash-out" post-rest period of 10 min of stimulation.

The time course of the changes in AP duration after resuming stimulation was evaluated by analyzing the 15 first action potentials that followed each post-rest period then the action potentials regularly recorded and identified by their running number, thus the APD values measured during the "wash-in, the "steady-state" and the "wash-out" periods were timematched with the "control" ones.

Drugs /reagents

Stock solutions (10 mM) of cisapride, 4-aminopyridine (4-AP), dofetilide or terikalant were made up daily and later diluted in Tyrode solution for the desired concentration. Cisapride, dofetilide and terikalant were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and 4-AP in Tyrode solution. In three time-matched experiments, it has been verified that the upper concentration of DMSO used in the Tyrode solution (0.1 per 1000 expressed as vol/vol) was without effect on action potential parameters. Cisapride has been gently supplied by Hoechst Marion Roussel (Romainville, France), dofetilide was a gift from Pfizer (Orsay, France) and terikalant was donated by Rhone Poulenc Rorer (Vitry-sur-Seine, France). 4-AP and other reagents were purchased by Sigma (Saint Quentin Fallavier, France).

Voltage clamp studies on isolated rabbit ventricular myocytes:

Cell preparation

Single rabbit ventricular myocytes were enzymatically dissociated according to a modification of the method described by Mitra and Morad (1985). All solutions used during the cell isolation procedure were oxygenated and maintained at 37 °C. Briefly, rabbit heart was rapidly excised and cannulated on a Langendorff perfusion apparatus. The heart was first retroperfused with normal Tyrode solution (containing in mM : 135 NaCl, 27 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgSO₄, 0.33 NaH₂PO₄, 20 glucose, 20 taurine, 10 HEPES, pH 7.15) followed by a Ca-free Tyrode solution for 10 minutes. An enzymatic Ca-free Tyrode solution containing 0.65 mg/ml collagenase B (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) and 0.045 mg/ml protease XIV (Sigma, St Quentin Fallavier, France) was perfused during a 17-20 minutes period. Then the heart was rinsed with Kraftbrühe (KB) solution (in mM : 85 KCl, 30 K₂ HPO₄, 5 MgSO₄, 5 Na₂ATP, 20 taurine, 20 glucose, 0.2 ethylene glycol-bis (ß aminéthyl ether) - N, N, N', N' - tetraacetic acid, 5 phosphocreatine, 5 pyruvic acid, 10 HEPES, pH 7.30). The ventricles were then choped finely. After gentle agitation, the resulting cell suspension was filtered and the cells

settled down for 10 minutes at 37°. The supernatant was discarded and cells resuspended in 1 mM Ca - containing Tyrode solution. Cell preparation was stored at room temperature and used between 2-8 hour after isolation.

Electrophysiological measurements

The whole-cell configuration of the patch-clamp technique was used to record the inward rectifier potassium current IK1 (Hamill et al, 1981). Currents were recorded using a RK 400 amplifier (Bio-Logic, Claix, France) and pClamp software (Axon Instruments Inc, Foster City, CA, USA). The standard voltage clamp protocol consisted of a series of 240 ms - voltage steps from - 140 to 0 mV (10 mV increment) from a holding potential of - 40 mV, delivered every 5 sec. Currents were sampled at 6.65 kHz using a 12-bit analog-to-digital converter (Labmaster, TL-1, Scientific Solutions Inc, Solon, OH, USA), low-pass filtered at 3 kHz. Borosilicate glass pipettes (Clark Electromedical Instruments, Reading, England) had a resistance of 1.5-1.7 M Ω when filled with the pipette solution (in mM : 130 KCl, 2 MgCl₂, 3K₂-ATP, 10 EGTA, 5 creatine phosphate, 10 HEPES, pH 7.3). The superfusion solution had the following composition (in mM) 135 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 0.8 NaH₂PO₄, 10 glucose, 10 HEPES, 0.005 nifedipine, pH 7.4). Cell capacitance was measured by integrating the area of the capacitive transient elicited by a 5 mV hyperpolarizing steps.

Control and drug-containing solutions were applied to the exterior of the cell by placing the cell at the opening of 300 µm inner diameter catheters fixed on the rotating head of a RSC 200 (Rapid solution changer, Bio-Logic, Claix, France). All chemicals (except cisapride as stated beyond) were obtained from Sigma (St Quentin Fallavier, France).

Results:

Drug-induced changes in APD after prolonged quiescence.

In control drug-free conditions, we observed noticeable differences in the plateau amplitude of the action potential recorded from rabbit left ventricular strips which incited us to divide the action potentials into two groups, based essentially upon the shape of early repolarisation, named the "low-plateau" APs (n=24) and the "high-plateau" APs (n=30). As illustrated in Fig 1, the morphology of the initial repolarisation showed a prominent spike and a flattened plateau in the low-plateau APs and a rather small spike and well-developed dome in the high-plateau APs. This results in a significantly shorter APD at any level of repolarisation, in a significantly smaller amplitude and less negative resting membrane potential in low-plateau than in high-plateau APs, whereas maximal rate of rise of phase 0 (Vmax) did not differ significantly between the two groups (table 1). Time courses of the postrest changes in APD30 and APD90 after 20 min of quiescence in control conditions are shown in Figure 1. As compared with the AP recorded under basic stimulation at 0.5 Hz, the first postrest AP was slightly and not significantly longer in the high-plateau group but significantly shorter in the low-plateau group than the APs recorded respectively in each group under basic stimulation at 0.5 Hz. Similarly in both groups, the second and the third postrest APs have increasingly prolonged APD which returned to control values within a few minutes.

Figure 2 represents graphically the changes in APD30 and APD90 measured in the fifteen first postrest APs of each group during the wash-in period and in the following numbered APs, so that the time course of drug action is expressed as a function of successive depolarisations. Clearly the APD changes obtained with cisapride showed time course quite similar to that observed with dofetilide and terikalant but noticeably differed from 4-AP-induced effects. In the presence of cisapride, dofetilide and terikalant, the first three postrest APs did not differ from the pre-drug matched control but a prolonging effect progressively developed with successive depolarisations. As indicated in table 2, this effect became significant (as compared with time-matched control APs) within a few seconds with cisapride and terikalant whereas significance threshold was reached with dofetilide after 2 to 5 min of stimulation. With these three drugs, APD lengthening was well-developed and highly significant after 10 min of stimulation. The intensity of their class III effect was equal in the low-plateau and the high-plateau groups but did not reach a steady state after 40 min of stimulation.

By contrast 4-AP prolonged APD with the highest intensity on the first postrest AP. Rapidly the magnitude of APD lengthening decreased along with the following stimulations and after 10 min of stimulation, reached a relative steady state. Expressed as percentage from the control time-matched values, the intensity of 4-AP effects appeared higher in low-plateau than in high-plateau group. Furthermore, in 3/6 fibres of the low-plateau group, early afterdepolarisations developed in some of the first fifteen postrest APs. At the concentration used, 4-AP effects were always significant as compared to the matched control groups.

As illustrated in Figure 3, the first 30 seconds after steady-state rest period revealed that in both low-plateau and high-plateau APs exposed to cisapride or terikalant, the first postrest AP was not statistically different from the control ones, respectively (table 2), whereas in the two groups exposed to dofetilide, the first postrest AP was still significantly prolonged. Afterwards, the lengthening effect induced by cisapride, dofetilide and terikalant resumed rapidly, so reaching significance level from the third postrest APs (table 2) and caused EADs to develop in the low-plateau groups, in 2/6 fibres exposed to cisapride and in 3/6 fibres to terikalant. It attained steady state within the 10 min of stimulation. Although statistical significance could not be evaluated, due to exaggerated AP prolongation observed in case of EAD appearance, it should be noted that the magnitude of the prolonging effects expressed as a percentage from control time-matched values (table 2) appeared somewhat stronger in the lowplateau versus the high-plateau groups.

Once again, the 4-AP-induced prolonging effects during the third postrest period were conspicuous by its major intensity that occurred on the first postrest AP and its gradually decrease along with stimulation until reaching steady state. EADs appeared irregularly on the 15 first APs in 2/6 fibres in the low-plateau group.

In both low- and high-plateau APs, the wash-out rest period (Fig 4) allowed to partially reverse the 4-AP-induced effects on APD as attested by the first postrest AP that showed less marked lengthening than after the wash-in and the steady-state rest periods. Moreover APD gradually decreased along with stimulations but did not completely recover predrug values after 10 min of regular stimulation but remained significantly prolonged (table 2). In contrast, wash-out of cisapride, dofetilide and terikalant during quiescence did not modify the first postrest APs which did not differ from the postrest steady-state ones. Moreover in the cisapride and terikalant groups, the following APs exhibited drastic APD lengthening so that EADs occurred in 2/6

fibres from the low-plateau group and 1/6 fibres from the high-plateau group previously exposed to cisapride and in 2/6 fibres from the low-plateau group exposed to terikalant. In dofetilide groups, no reversal of prolonging effects was seen during the first 30 seconds of stimulation but partial recovery slowly appeared along with the following 10 min. Surprisingly after the same 10 min of stimulation, APD prolongation by cisapride and terikalant remained further increased as compared with that observed during the steady-state postrest period. This was particularly obvious in the low-plateau groups (table 2).

Voltage-clamp experiments

The effects of cisapride at three concentrations have been tested on the inward rectifier potassium currents I_{K1}. Representative results of a typical voltage-clamp experiment is shown in figure 5. Current amplitudes measured at the end of the voltage pulse are plotted versus potential values in presence of 1, 3 and 10 µM cisapride at two different perfusion times (9 and 15 min) and after 52 min washout. As shown on the successive IV relationships the steady-state I_{K1} amplitude is dose-dependently diminished. The amount of block of IK1 by cisapride whatever the concentration used is evident and statistically significant (p<0.05) at potentials negative to the reversal potential where I_{K1} is a large inward current. At potentials positive to reversal potential where IK1 is a small outward current no significative blocking effect could be observed although a decreased amplitude could be noted at the concentration of 10 µM. Examples of cisapride effects on I_{K1} steady-state amplitude, the current amplitude values obtained at potentials of - 140 mV and $\,$ - 60 mV inducing the maximal inward or outward $I_{\rm K1},$ are reported in table 3. Cisapride similarly decreased the initial peak and the steady-state I_{K1} amplitudes as illustrated by the current traces shown in insets (figure 5) obtained at - 140 mV in control and after 9 min cisapride perfusion. The block effect of cisapride slowly developped throughout the 15 min-perfusion time and is only slightly reversed (12 % recovery in this example) even after 52 min of washout.

Discussion:

Our results evidenced that the time course of APD prolonging effect induced by cisapride were similar to those induced by terikalant. For these compounds, the first APs after rest periods were quite similar and APD prolongation only developed under regular stimulation. The protocol of this study which includes rest periods and stimulation periods, allowed to estimate drug affinity for open K⁺ channels or for closed K⁺ channels. Actually, the time course of APD in the presence of 4-AP, dofetilide, terikalant and cisapride has given indirect evidence for drug-channel interaction.

It can be expected from a reverse use-dependent block of the K⁺ channel (closed channel block), the full APD prolonging effect on the first AP after rest which declines under regular stimulation. Such effects were observed in our study with 4-AP which has been demonstrated to exert a reverse use-dependent block on I_{to1} channel, i.e to exhibit higher affinity for closed channels, lower affinity for open channel and to dissociate from the channel in the closed state (Castle and Slawsky, 1992; Campbell et al., 1993). In our study, the time course of cisapride effect on APD strongly contrasted with this of 4-AP. The duration of the first APs after rest periods in the presence of cisapride were similar to the control one but progressively increased under repetitive stimulation. This finding is strong evidence against closed channel block but on the contrary, suggests a preferential binding of cisapride to the channel in the open state. Actually, it has been demonstrated for dofetilide that progressive increase in APD under repetitive stimulation results from a use-dependent block of I_{Kr} channel (Carmeliet, 1992) with a short time constant for I_{Kr} block development (a rapid drug binding to open channel) in addition to a very slow recovery from I_{Kr} block during rest (no drug unbinding from closed channel) by this compound (Carmeliet 1993; Ohler et al., 1994). Under regular stimulation, cisapride and terikalant effects on APD were very close to those of dofetilide. Thus, it may be hypothesized that I_{kr} block by cisapride (Drolet et al., 1998) and by terikalant (Jurkiewicz et al., 1996) is a use-dependent block of I_{Kr} channel. Moreover, the first APs after steady-state rest period in the presence of cisapride and terikalant were not different to the control one. This finding supports the dissociation of these compounds from the K⁺ channel in the closed state during rest, in contrast to dofetilide which has been shown to remain trapped (or not dissociated) in the I_{Kr} channel during diastole (Carmeliet, 1992, Jurkiewicz et al., 1993). APD further increased under steady-state stimulation period in the presence of cisapride and terikalant. This indicates that, at the concentrations tested in this study (1 µM for cisapride and 0.3 µM for terikalant), the steady state of APD prolonging effects induced by these compounds was not reached after 40 minutes of wash-in and 10 minutes of steady-state stimulation periods.

Surprisingly, APD prolonging effects induced by cisapride under stimulation were reinforced during the wash-out period, as it was observed with terikalant. This finding remains to be elucidated by ionic current studies performed by patch-clamp technique. It may be hypothesized that despite the apparent dissociation of cisapride and terikalant from the K⁺ channel, these compounds exhibiting a high lipophilicity, remained in the tissue, in the immediate vicinity of the K⁺ channels and therefore remained available for the next depolarizations. Thus, in this context, APD prolongation during the wash-out stimulation period may result from the binding of cisapride and terikalant to the channel in the open state allowed by depolarization. Another explanation may be related to the blocking effect of terikalant on the peak amplitude of the inward sodium current I_{Na} (Mac Larnon et al., 1995) and its ability to decrease plateau duration of ventricular AP (Jurkiewicz et al., 1996). Actually, the attenuation of the block of inward currents during the wash-out period may account for APD prolongation. Thus, one may hypothesize cisapride is able to block inward currents, even if to our knowledge, no study reports such blocking effect on calcium or sodium inward currents by this compound. On the other hand, the similarities between cisapride and terikalant effects on APD are supported by the ability of cisapride to block the inward rectifier potassium current demonstrated in this study as it was reported for terikalant (Escande et al., 1992).

On the other hand, it appeared from our results that the intensity of APD prolonging effect differed depending on the shape and especially the plateau height of APs recorded in basal

conditions. APD prolonging effects induced by 4-AP, cisapride and terikalant were particularly marked and favored EAD emergence only in low-plateau APs. In this group, APs exhibited an early phase of repolarization (phase 1) with larger amplitude than that observed in high-plateau APs. Several studies demonstrated that changes in phase 1 amplitude were related to the amplitude of I_{to1} current in rabbit ventricular myocytes (Varro et al., 1991) and that I_{to1} determined the behaviour of the slow inward calcium current $I_{Ca(L)}$ (Zygmunt et al., 1997). Thus, one may hypothesize that in rabbit ventricular myocytes, the plateau height varies depending on the influence of I_{to1} on the $I_{Ca(L)}$ current. Therefore, the range of the plateau membrane potentials allows or not the reactivation of inward currents and the emergence of EAD in the presence of K⁺ channel blockers.

In conclusion, our results showed that great similarities exist between cisapride effects and terikalant effects both on ionic currents and AP duration. They demonstrated that cisapride blocks the inward rectifier K^+ current I_{K1} in a concentration-dependent manner, as it was reported for terikalant (Escande et al., 1992). Moreover, the time courses of APD prolonging effects induced by these compounds were similar in accordance with their common property to block the I_{Kr} channel (Jurkiewicz et al., 1996; Drolet et al., 1998). Furthermore, the proarrhythmic potential of cisapride, i.e its ability to induce EAD which has been demonstrated in APs recorded from rabbit Purkinje fibers in our laboratory (Puisieux et al., 1996), was thus confirmed in rabbit ventricular myocardium.

References:

Ahmad SR, Wolfe SM: Cisapride and torsades de pointes. Lancet 1995; 345: 508.

Bran S, Murray WA, Hirsch AB, Palmer JP: Long QT syndrome during high-dose cisapride. Arch Intern Med 1995; 155: 765-768.

Castle NA, Slawsky MT: Characterization of 4-aminopyridine block of the transient outward current in adult rat ventricular myocytes. J Pharmacol Exp Ther 1992; 264: 1450-1459.

Campbell DL, Qu Y, Rasmusson RL: The calcium-independent transient outward current in isolated ferret right ventricular myocytes. II Close state reverse use-dependent block by 4-aminopyridine. J Gen Physiol 1993; 101: 603-626.

Carlsson L, Amos G, Andersson B, Drews L, Duker G, Wadstedt G: Electrophysiological characterization of the prokinetic agents cisapride and mosapride in vivo and in vitro: Implications for proarrhythmic potential? J Pharmacol Exp Ther 1997; 282: 220-227.

Carmeliet E: Voltage- and time-dependent block of the delayed K⁺ current in cardiac myocytes by dofetilide. J Pharm Exp Ther 1992; 262: 809-817.

Carmeliet E: Use-dependent block of the delayed K^+ current in rabbit ventricular myocytes. Cardiovasc Drug Ther 1993a; 7: 599-604.

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.

Escande D, Mestre M, Cavero I, Brugada J, Kirchhof C: RP58866 and its active enantiomer RP 62719 (terikalant): blockers of the inward rectifier K^+ current acting as pure class III antiarrhythmic agents. J Cardiovasc Pharmacol 1992; 20: S106-S113.

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.

Jurkiewicz NK, Wang J, Fermini B, Sanguinetti MC: Mechanism of action potential prolongation by RP 58866 and its active enantiomer, terikalant. Block of the rapidly activating delayed rectifier K^+ current, I_{Kr} . Circulation 1996; 94: 2938-2946.

Lewin MB: Cisapride-induced long QT interval. J Pediatr 1996; 128: 279-281.

McLarnon JG, Xu R: Actions of the benzopyran compound terikalant on macroscopic currents in rat ventricular myocytes. J Pharmacol Exp Ther 1995; 275: 389-396.

Mohammad S, Zhou Z, Gong Q, January CT: Blockade of the HERG human cardiac K+ channel by the gastrointestinal prokinetic agent cisapride. Am J Physiol 1997; 273: H2534-2538.

Ohler A, Amos GJ, Wettwer E, Ravens U: Frequency-dependent effects of E-4031, almokalant, dofetilide and tedisamil on action potential duration: no evidence for « reverse use-dependent » block. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1994; 349: 602-610.

Puisieux FL, Adamantidis MM, Dumotier BM, Dupuis BA: Cisapride-induced prolongation of cardiac action potential and early afterdepolarizations in rabbit Purkinje fibres. Br J Pharmacol 1996; 117: 1377-1379.

Rampe D, Roy ML, Dennis A, Brown AM: A mechanism for the proarrhythmic effects of cisapride (Propulsid): high affinity blockade of the human cardiac potassium channel HERG. FENS Letter 1997; 417: 28-32.

Varro A, Nanasi PP, Lathrop DA: Voltage-clamp characteristics of ventricular myocyes in rabbit. Cardioscience 1991; 2(4): 233-243.

Wiseman LR, Faulds: Cisapride. An updated review of its pharmacology and therapeutic efficacy as a prokinetic agent in gastrointestinal motility disorders. Drugs 1994; 47: 116-152.

Wisowsky DK, Bacsanyi JB: Cisapride and fatal arrhythmias. N Engl J Med 1996; 335: 290-291.

Zygmunt AC, Robitelle DC, Eddlestone GT: Ito1 dictates behavior of ICl(Ca) during early repolarisation of canine ventricle. Am J Physiol 1997; 273: H1096-H1106.

Table 1 :	Action potential parameters in "low-plateau"
	and in "high-plateau" action potentials recorded
	in rabbit ventricular muscle stimulated at 0.5 Hz

	Low-Plateau $n = 24$	High-Plateau n=30
RMP (mV)	-80.4 ± 0.4 *	-81.6 ± 0.6
APA (mV)	118.9 ± 0.8 *	121.1 ± 0.7
Vmax (V/s)	172.1 ± 8.6	183.6 ± 7.8
	* p < 0.05	

RMP = resting membrane potential ; APA = action potential amplitude Vmax = maximal rate of rise of phase 0 depolarisation Data were analysed using unpaired Student's t test
		Cisapride	(1 µM)	4-AP	(1 mM)	Dofetilide	(0.01 µM)	Terikalant	(0.3 µM)
Action Potential	time (min)	Low-Plateau	High-Plateau	Low-Plateau	High-Plateau	Low-Plateau	High-Plateau	Low-Plateau	High-Plateau
n°									
1		-2.9 ± 2.1	1.2 ± 1.9	323.9 ± 58.6*	179.1 ± 30.9*	-2.5 ± 3.0	-4.1 ± 1.5	-2.4 ± 3.0	-2.3 ± 1.0
3		2.7 ± 1.8	7.05± 2.4*	168.8 ± 28.9*	85.8 ± 8.7*	0.9 ± 4.7	-2.4 ± 0.9	1.8 ± 2.1	1.4 ± 1.7
Wash-in 15	0.5	11.2 ± 1.2*	12.60 ± 2.6*	160.0 ± 19.9*	98.8 ± 10.3*	6.2 ± 4.5	0.0 ± 0.6	13.1 ± 3.0*	9.7 ± 1.7*
300	10	15.7 ± 1.0*	14.3 ± 2.5*	149.8 ± 15.5*	94.6 ± 11.0*	18.3 ± 4.3*	9.5 ± 2.9*	31.3 ± 6.2*	20.7± 2.9*
1		-1.0 ± 3.3	4.2 ± 4.0	455.6 ± 82.1*	250.7 ± 49.9*	13.7 ± 1.7 *	8.6 ± 5.1	12.1 ± 4.9	3.1 ± 2.4
3		19.9 ± 5.0*	23.6 ± 7.2*	235.8 ± 57.0*	127.1 ± 16.7*	24.0 ± 3.3*	13.8 ± 3.5*	26.7 ± 11.2	16.9 ± 5.0*
Steady-state 15	0.5	81.1 ± 25.2*	56.0 ± 21.0*	244.9 ± 41.6*	150.4 ± 16.3*	31.7 ± 3.5*	20.5 ± 4.5*	153.9 ± 36.7*	56.5 ± 9.7*
300	10	53.4 ± 10.0*	39.6 ± 7.6*	165.1 ± 20.9*	118.8 ± 132.8*	50.3 ± 8.7 *	35.4 ± 8.5*	168.2 ± 38.8*	76.6 ± 10.4*
1		-5.1 ± 3.9	1.5 ± 5.1	211.3 ± 23.9*	141.0 ± 30.7*	10.0 ± 1.6 *	7.8 ± 6.6	11.4 ± 6.2	0.1 ± 2.8
3		19.2 ± 7.0*	38.1 ± 17.7*	96.9 ± 11.1*	63.1 ± 9.5*	21.6 ± 1.9*	11.2 ± 4.4	45.7 ± 16.6*	17.8 ± 7.5*
Wash-out 15	0.5	153.2 ± 51.9*	71.5 ± 24.4*	90.4 ± 13.5*	62.3 ± 8.7*	28.4 ± 2.3*	20.2 ± 5.4*	358.1 ± 101.4*	98.2 ± 23.4*
300	10	89.0 ± 29.5*	47.7 ± 8.8*	55.75± 9.1*	40.8 ± 6.3*	33.4 ± 4.1*	24.2 ± 6.3*	251.5 ± 80.7*	110.9 ± 20.5*

Table 2 : Comparative time courses of changes in action potential duration at 90 % repolarization induced by cisapride, 4-AP, dofetilide and terikalant in rabbit ventricular muscle, expressed in percentage from time-matched control action potentials. See text for details.

* p< 0.05

V (mV)	Control (nA)	1µM (nA)	3 µM (nA)	10 µM (nA)
- 140	- 2.77 ± 0.21	- 2.40 ± 0.26*	- 2.06 ± 0.16*	- 1.91 ± 0.15*
- 60	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.04	0.08 ± 0.04

Table 3: Examples of cisapride effects on steady-state amplitude of inward (at -140 mV) and outward (at -60 mV) I_{K1} current recorded in rabbit ventricular myocytes. See text for details.



Figure 1: Time courses of changes in action potential duration at 30% (APD30) and 90% (APD90) of repolarization in the fifteen first action potentials (AP) recorded under 0.5 Hz stimulation rate in rabbit ventricular muscle, after the control rest period. See text for details.



Figure 2: Time courses of changes in action potential duration at 30% (APD30) and 90% (APD90) of repolarization in the fifteen first action potentials (AP) and following APs recorded under 0.5 Hz stimulation rate in rabbit ventricular muscle, after the wash-in rest period in the presence of 4-aminopyridine (4-AP), dofetilide (DOFE), terikalant (TERI) or cisapride (CISA). See text for details.



Figure 3: Time courses of changes in action potential duration at 30% (APD30) and 90% (APD90) of repolarization in the fifteen first action potentials (AP) recorded under 0.5 Hz stimulation rate in rabbit ventricular muscle, after the steady-state rest period in the presence of 4-aminopyridine (4-AP), dofetilide (DOFE), terikalant (TERI) or cisapride (CISA). See text for details.



Figure 4: Time courses of changes in action potential duration at 30% (APD30) and 90% (APD90) of repolarization in the fifteen first action potentials (AP) recorded under 0.5 Hz stimulation rate in rabbit ventricular muscle, after the wash-out rest period in the presence of 4-aminopyridine (4-AP), dofetilide (DOFE), terikalant (TERI) or cisapride (CISA). See text for details.



Figure 5: Effects of cisapride 1, 3, 10 μ M and washout on steady-state component's currentvoltage relationships of IK1. I-V relationships related to the effects of 1, 3, 10 μ M cisapride and washout on IK1 amplitudes measured at the steady-state on the same ventricular myocyte. IK1 amplitudes have been measured at two perfusion times, 9 and 15 min. After the last concentration, myocyte was switched back to control solution. For each solution, representative traces (in insets) of maximal inward current (obtained at -140 mV) was shown before, after 9 min cisapride exposition or after 52 min washout. Horizontal bar is 50 ms; vertical bar is 2 nA.

Discussion générale

La pertinence des résultats expérimentaux obtenus sur des tissus provenant d'espèces animales est toujours l'objet de débats particulièrement animés. Il est bien établi que la densité des courants ioniques cardiaques varie selon le tissu considéré et, à plus forte raison, avec les cellules cardiaques humaines. Les fibres de Purkinje de lapin ont l'avantage de posséder les principaux courants ioniques entrants et sortants qui participent à la repolarisation cellulaire ventriculaire chez l'homme (I_{Na} , I_{Ca} , I_{to} , I_K , I_{K1}). Si leur densité relative est différente chez le lapin par rapport à l'homme, elle est peut-être à l'origine de la grande sensibilité des fibres de Purkinje de lapin aux effets d'allongement de la repolarisation.

Cette grande sensibilité des fibres de Purkinje de lapin a permis de détecter les effets de divers composés à des concentrations inférieures à celles qui ont été trouvées dans d'autres espèces animales (Rosen et coll., 1974; Tande et coll., 1990). Les effets de type antiarythmique de classe III pur du cisapride, de la sparfloxacine et du diphémanil ont été observés à des concentrations qui, lors de l'interprétation des résultats, se sont révélées tout-à-fait pertinentes avec les données cliniques.

La potentialité arythmogène d'un médicament ne peut raisonnablement être basée sur les seuls effets électrophysiologiques détectés *in vitro* sur des préparations multicellulaires. Les résultats de notre travail expérimental ont souligné l'étroite corrélation entre les altérations des paramètres des potentiels d'action de fibres de Purkinje de lapin et les manifestations cliniques observées sur l'ECG. Ils ont montré que les modifications des paramètres des potentiels d'action fournissent des éléments d'orientation pour des études explicatives des effets d'un médicament sur une ou plusieurs population(s) de canaux ioniques, qui peuvent être réalisées ultérieurement par la technique de patch-clamp.

Ainsi, nos résultats ont montré que la diminution de la hauteur du plateau, de l'amplitude du dôme et de la phase précoce de la repolarisation avec ou sans diminution de l'amplitude des potentiels d'action, atténuée à basse fréquence de stimulation, peut être relative à la diminution du courant calcique $I_{Ca(L)}$ et/ou du courant chlore calcium-dépendant, I_{to2} . Une participation du

153

courant sodique à inactivation lente $I_{Na-slow}$ ne peut pas être exclue. La diminution de la Vmax, avec ou sans altération de l'amplitude et du potentiel de repos membranaire des potentiels d'action, est liée à une réduction du courant sodique rapide I_{Na} . Ces modifications du potentiel d'action indiquent un risque proarythmique relatif aux troubles de conduction, accompagnés ou non d'un élargissement du complexe QRS sur l'ECG, bien démontrés pour les médicaments antiarythmiques de classe I (Levine et coll., 1989).

Un allongement concentration-dépendant de la durée des potentiels d'action, sans altération des autres paramètres, renforcé à basse fréquence de stimulation (effet de type antiarythmique de classe III pur), est caractéristique de la diminution d'un ou de plusieurs courants potassiques, dont on connait la potentialité arythmogène. Dans notre travail, nous avons mis en évidence les effets de type antiarythmique de classe III purs du cisapride, du diphémanil méthylsulfate et de la sparfloxacine et leur capacité à induire des EAD permettant ainsi d'expliquer les effets d'allongement de l'intervalle QT et la survenue de Torsades de Pointes en clinique. D'un point de vue explicatif, les effets du cisapride sur la repolarisation ont été élucidés par des études mettant en évidence un effet de blocage sur le courant I_K (I_{Kr} et I_{Ks}) chez le cobaye (Drolet et coll., 1998) et sur le courant I_{K1} chez le lapin (Bastide et coll., 1998), ainsi qu'un effet de blocage du canal cloné HERG aussi puissant que celui exercé par le dofétilide (Mohammad et coll., 1997; Rampe et coll., 1997). Compte tenu des effets observés avec le diphémanil méthylsulfate et avec la sparfloxacine, il serait intéressant d'étudier leurs effets sur le courant I_{K1} (I_{Kr} et I_{Ks})

Plus généralement, la mise en évidence d'un effet de type antiarythmique de classe III pur sur les fibres de Purkinje doit inciter la recherche des effets de blocage sur les courants I_{to1} , I_K et I_{K1} . Lorsque des EAD de faible amplitude surviennent uniquement en fin de plateau, on pourra suspecter un effet prédominant sur I_{to1} alors que des EAD survenant pendant la phase 3 du potentiel d'action, générant des activités répétitives, indiquent plutôt un blocage prédominant de I_K . Par contre, (et ceci constitue une limite de notre protocole expérimental qui utilise des fréquences de stimulation relativement basses) le blocage de I_{Ks} ne peut être détecté et nécessite des explorations complémentaires utilisant des fréquences de stimulation rapides.

L'interprétation d'une étude électrophysiologique de base, comme celle que nous avons réalisée, est relativement peu complexe lorsqu'un seul paramètre des potentiels d'action est modifié de façon concentration-dépendante. En revanche, elle est beaucoup plus difficile lorsque la relation dose/effet sur la durée des potentiels d'action montre un aspect de courbe en cloche, l'obtention d'une courbe en cloche n'étant possible que lorsque l'étude utilise une gamme élargie de concentrations, même si elles sortent des concentrations dites « thérapeutiques ».

La courbe en cloche suggère que plusieurs courants ioniques entrants et sortants sont altérés. Des études antérieures réalisées sur des fibres de Purkinje de lapin ont montré la capacité de fortes concentrations de dropéridol (Adamantidis et coll., 1993) ou d'astémizole (Adamantidis et coll., 1995) à réverser totalement ou partiellement les effets d'allongement de la repolarisation observés avec de plus faibles concentrations. La réversion d'un effet d'allongement s'amorce de façon concomitante avec une diminution de la Vmax et/ou de la hauteur du plateau. Ceci indique que les courants entrants sodiques et/ou calciques sont diminués, contrecarrant les effets d'allongement de la repolarisation consécutifs à la diminution du courant net sortant. Les effets dépresseurs exercés sur des courants entrants sont généralement fréquence-dépendants et donc minimisés aux fréquences lentes qui, au contraire, majorent les effets d'allongement. L'application d'une basse fréquence de stimulation, même pendant un temps limité, aura pour conséquence d'allèger ou de réduire la dépression des courants entrants au profit de celle des courants sortants, et permettra de démasquer un effet d'allongement modeste voire imperceptible à fréquence de stimulation normale.

Un effet d'allongement peu marqué n'est peut-être pas en soi porteur d'une potentialité arythmogène mais peut (en cas d'association médicamenteuse) renforcer les effets induits par d'autres médicaments. Une fréquence de stimulation aussi basse que 0,2 Hz n'est pas physiologique mais elle s'est révélée particulièrement efficace dans la détection d'un effet d'allongement de la repolarisation cellulaire et bien sûr, dans la détection d'un pouvoir arythmogène. Lorsque les effets d'allongement exercés par un composé décrivent une courbe en

155

cloche, les études explicatives doivent s'orienter vers la recherche d'un effet aussi bien sur les courants sortants que sur les courants entrants, en utilisant une large gamme de concentrations. La chronologie inverse des études, consistant à étudier en première intention les effets d'un produit sur tous les types de courants ioniques, ne pourra fournir pour autant la résultante des effets combinés, qui n'est accessible à l'heure actuelle que par le recueil du potentiel d'action.

L'extrapolation des résultats expérimentaux aux situations cliniques est une étape délicate. Elle doit tenir compte des données de pharmacocinétique, lorsqu'elles sont disponibles, car elles fournissent des renseignements très précieux et permettent ainsi une évaluation plus précise de la potentialité arythmogène des médicaments. En effet, un des problèmes qui se posent est la pertinence des concentrations expérimentales auxquelles un effet est observé. Les concentrations expérimentales effectives in vitro correspondent-elles aux concentrations plasmatiques thérapeutiques ou sont-elles représentatives d'une situation clinique particulière?.

Dans notre étude, les effets de type antiarythmique de classe III purs exercés par le cisapride et la sparfloxacine sont apparus à des concentrations compatibles avec les taux plasmatiques retrouvés chez des patients traités par voie orale avec des doses thérapeutiques de ces médicaments (McCallum et coll., 1995; Demolis et coll., 1996). Les anomalies de la repolarisation sont apparues à des concentrations supérieures. Cependant, des concentrations expérimentales relativement élevées peuvent être rencontrées, après administration de fortes doses ou dans des situations cliniques particulières. Ainsi, un allongement de l'intervalle QT et des cas de Torsades de Pointes ont été rapportés chez des patients traités par de fortes doses de cisapride (Bran et coll., 1995) ou de diphémanil (Villain et coll., 1990) ou après administration intraveineuse d'érythromycine (McComb et coll., 1984).

L'interprétation des résultats doit également tenir compte du mode d'administration du médicament. Le pic de concentration plasmatique d'un médicament administré par voie intraveineuse sera plus élevé que si ce médicament est administré par voie orale. Sa concentration plasmatique dépend en partie de la distribution tissulaire et des voies d'élimination. Le volume de distribution rend compte de la diffusion tissulaire du médicament.

156

Si le volume de distribution et l'affinité du médicament pour le tissu cardiaque (lorsqu'elle est connue) sont importants, ils indiquent une concentration tissulaire (voire myocardique) élevée. Si l'on prend l'exemple de l'astémizole, médicament antagoniste sélectif des récepteurs histaminiques de type H1 de seconde génération, dont l'utilisation a été associée à un certain nombre de cas de Torsades de Pointes, les concentrations expérimentales trouvées arythmogènes *in vitro* (Adamantidis et coll., 1995) apparaissaient supérieures (de 10 à 20 fois) aux concentrations plasmatiques trouvées chez l'homme. Mais une étude réalisée chez le chien (Michiels et coll., 1986) indique que la concentration du médicament dans le tissu cardiaque est 400 fois supérieure à la concentration plasmatique. Un tel rapport appliqué aux concentrations expérimentales trouvées arythmogènes *in vitro* rend ces concentrations tout-à-fait pertinentes. A cette forte affinité tissulaire de l'astémizole, correspond un volume de distribution élevé (250 l/kg). A l'inverse, la cétirizine, autre médicament antagoniste des récepteurs histaminiques de type H1, présente un volume de distribution de 0.5 l/kg indiquant une absence totale d'affinité tissulaire. Bien qu'elle exerce *in vitro* des effets d'allongement de la repolarisation, l'utilisation de la cétirizine n'est pas associée à des troubles du rythme.

Dans notre travail, la forte affinité du cisapride et du diphémanil pour le tissu cardiaque a pu être estimée sur les fibres de Purkinje par des essais mettant en évidence l'influence du temps d'exposition au médicament sur les effets d'allongement et la difficulté d'obtention d'une réversion des effets par le lavage prolongé des préparations. Cette absence de réversion, qui n'est pas toujours observée lors des études réalisées sur des myocytes isolés, indique une fixation forte non seulement au niveau du (des) canal (canaux) considéré(s) mais vraisemblablement, de façon non spécifique, sur la membrane cellulaire et sur la matrice extracellulaire. Ce type de données expérimentales est intéressant dans la mesure où il peut être mis en parallèle avec des paramètres pharmacocinétiques comme le volume de distribution ou la demi-vie d'élimination et peut compléter utilement une étude électrophysiologique de base.

De plus, le développement progressif avec le temps d'un effet d'allongement et ses modifications selon l'état (repos ou stimulé) des préparations tels que nous les avons observés sur le myocarde ventriculaire de lapin (qui, comme la myocarde humain et contrairement à celui du cobaye, est doté d'un courant transitoire sortant de petite amplitude) indiquent que les effets du cisapride montraient une « use-dependence » comparable à celle du dofétilide et du térikalant. Ces hypothèses demandent à être confirmées par des études en patch-clamp mais ces observations peuvent être interprétées comme un facteur favorisant, en terme de potentialité arythmogène.

D'autres paramètres pharmacocinétiques doivent être pris en considération. Il faut tenir compte des voies d'élimination (hépatique et/ou urinaire) des médicaments qui, en cas d'insuffisance hépatique ou rénale, voient leurs taux plasmatiques augmenter, conduisant à des valeurs élevées susceptibles d'entraîner des effets indésirables cardiaques et rendant pertinentes les concentrations effectives expérimentales. Les médicaments éliminés par voie biliaire subissent une étape métabolique dépendante de l'activité des systèmes enzymatiques hépatiques dont le plus important est l'isoenzyme CYP3A4 du cytochrome P450. Si le métabolite possède les mêmes propriétés électrophysiologiques que la molécule mère, le risque d'altération de l'électrogénèse ne sera pas modifié. Si le métabolite en est dépourvu ou si ses effets sont moins puissants, une diminution de l'activité du CYP3A4 peut entraîner des effets toxiques liés à la molécule mère. Cette diminution peut être liée à l'expression génétique du CYP3A4, qui est sujette à de grandes variations interindividuelles. Par ailleurs, elle peut être induite par compétition au niveau du site catalytique de l'enzyme, lorsque deux médicaments sont métabolisés par cette même voie du CYP3A4. Le médicament ayant la plus faible affinité pour l'enzyme est alors métabolisé plus lentement, ce qui entraîne une augmentation de ses taux plasmatiques.

Le rôle de la voie métabolique du CYP3A4 a été mieux compris grâce aux travaux visant à élucider la potentialité arythmogène de la terfénadine, médicament antihistaminique de type H1 de seconde génération. La terfénadine, qui *in vitro* modifie l'activité électrique cellulaire, est un « promédicament » rapidement métabolisé par le CYP3A4 en un métabolite jusqu'à maintenant trouvé inactif sur l'électrogénèse cardiaque mais conservant les propriétés antihistaminiques. L'administration concomitante de médicaments antifongiques azolés, comme le kétoconazole ou antibiotiques macrolides comme l'érythromycine, bloquent le métabolisme de la terfénadine et entraînent l'apparition de troubles du rythme cardiaque. Ce type d'interaction a conduit au retrait du marché (dans un grand nombre de pays) de la terfénadine et a été rapporté avec un certain

158

nombre de médicaments appartenant à des familles thérapeutiques différentes comme l'astémizole (Tsaï et coll., 1997) et le cisapride (Bedford et Rowbotham, 1996; Piquette, 1999).

Il convient cependant de souligner que l'incidence des Torsade de Pointes associées à l'utilisation des médicaments non cardiotropes reste faible et s'explique par l'origine multifactorielle des Torsades de Pointes. Il n'est pas inutile de rappeler que le risque proarythmique sera plus important si l'utilisation de médicaments allongeant la repolarisation est associée à des facteurs prédisposants comme la bradycardie ou des désordres électrolytiques telles que l'hypomagnésémie, l'hypokaliémie (induite par exemple, par les diurétiques), les interactions médicamenteuses et certaines anomalies génétiques, exprimées ou non phénotypiquement.

En conclusion,

L'évaluation de la potentialité arythmogène des médicaments reste actuellement difficile. Elle nécessite la combinaison de plusieurs modèles expérimentaux animaux, en l'absence de modèle expérimental fiable et comparable aux propriétés électrophysiologiques des cellules cardiaques humaines et en raison des limites de chaque modèle animal. Cependant, les résultats obtenus dans ce travail expérimental montrent que les fibres de Purkinje de lapin constituent un modèle expérimental *in vitro* particulièrement bien adapté à l'évaluation de la potentialité arythmogène des médicaments.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adamantidis MM, Kerram P, Caron JF: 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.

Adamantidis MM, Kerram P, Dupuis BA: Electrophysiological detection of iatrogenic arrhythmogenicity. Fundam Clin Pharmacol 1994; 8: 391-407.

Adamantidis MM, Lacroix D, J Caron, Dupuis BA: Electrophysiological and arrhythmogenic effects of the histamine type 1-receptor antagonist astemizole on rabbit Purkinje fibers: clinical relevance. J Cardiovasc Pharmacol 1995; 26: 319-327.

Ahmad SR, Wolfe SM: Cisapride and torsades de pointes. Lancet 1995; 345: 508.

Antzelevitch C, Sicouri S, Litovsky SH, Lukas A, Krishnan SC, Di Diego JM, Gintant GA, Liu DW: Heterogeneity within the ventricular wall: electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial and M cells. Circ Res 1991; 69: 1427-1449.

Antzelevitch C, Sicouri S: Clinical relevance of cardiac arrhythmias generated by afterdepolarizations. Role of M cells in generation of U waves, triggered activity and torsade de pointes. J Am Coll Cardiol 1994; 23: 259-277.

Antzelevitch C, Sun ZQ, Zhang ZQ, Yan GX: Cellular and ionic mechanisms underlying erythromycin-induced long QT intervals and Torsade de Pointes. J Am Coll Cardiol 1996; 28: 1836-1848.

Asano Y, Davidenko JM, Baxter WT, Gray RA, Jalife J: Optical mapping of druginduced polymorphic arythmias and torsade de pointes in the isolated rabbit heart. J Am Coll Cardiol 1997; 29: 831-842.

Attwell D, Cohen I, Eisner D, Ohba M, Ojeda C: The steady state TTX-sensitive ("window") sodium current in cardiac Purkinje fibres. Pflügers Arch 1979; 379: 137-142.

Backx PH, Marban E: Background potassium current active during the plateau of the action potential in guinea pig ventricular myocytes. Circulation 1993; 72: 890-900.

Bailie DS, Inoue H, Kaseda S, Ben-David J, Zipes DP: Magnesium suppression of early afterdepolarizations and ventricular tachyarrhythmias induced by cesium in dogs. Circulation 1988; 77: 1395-1402.

Balati B, Varro A, Papp JG: Comparison of the cellular electrophysiological characteristics of canine left ventricular epicardium, M cells, endocardium and Purkinje fibres. Acta Physiol Scand 1998; 164: 181-190.

Balser JR, Bennett PB, Roden DM: Time-dependent outward current in guinea-pig ventricular myocytes: gating kinetics of the delayed rectifier. J Gen Physiol 1990; 96: 835-863.

Balser JR, Bennett PB, Hondeghem LM, Roden DM: Suppression of time-dependent outward current in guinea pig ventricular myocytes: action of quinidine and amiodarone. Circ Res 1991; 69: 519-529.

Barhanin J; Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G: KvLQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the IKs cardiac potassium current. Nature 1996; 384: 78-80.

Bastide M, Adamantidis M, Dumotier B, Bordet R, Dupuis B: Block of the inward rectifier potassium current, IK1, by cisapride in rabbit ventricular myocytes. Fundam Clin Pharmacol 1998; 12: A313.

Bauman JL, Bauernfeind RA, Hoff JV, Strasberg B, Swiryn S, Rosen KM: Torsades de pointes due to quinidine: observations in 31 patients. Am Heart J 1984; 107: 425.

Bean BP: Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity and pharmacology. J Gen Physiol 1985; 86: 1-30.

Bean BP, Cohen CJ, Tsien RW: Lidocaine block of cardiac sodium channels. J Gen Physiol 1983; 81: 613-642.

Bedford TA, Rowbotham DJ: Cisapride. Drug interactions of clinical significance. Drug Saf 1996; 15: 167-175.

Ben-David J, Zipes DP: Differential response to right and left ansae subclaviae stimulation of early afterdepolarizations and ventricular tachycardia induced by cesium in dogs. Circulation 1988; 78: 1241-1250.

Benedict C: The QT interval and drug-associated Torsades de pointes. Drug Invest 1993; 5: 69-79.

Benson DW, MacRae CA, Vesely MR, Walsh EP, Seidman JG, Seidman CE, Salter CA: Missense mutation in the pore region of HERG causes familial long QT syndrome. Circulation 1996; 93: 1791-1795.

Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E: Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. Circ Res 1993; 73: 379-385.

Biermans G, Vereecke J, Carmeliet E: The mechanism of the inactivation of the inwardrectifying K current during hyperpolarizing steps in guinea pig ventricular myocytes. Pflügers Arch 1987; 410: 604-613.

Boyett MR: Effect of rate-dependent changes in the transient outward current on the action potential in sheep Purkinje fibres. J Physiol (Lond) 1981; 319: 23-41.

Boyle WA, Nerbonne JM: A novel type of depolarization-activated K⁺ current in isolated adult rat atrial myocytes. Am J Physiol 1991; 260: H1236-H1247.

Brachmann J, Scherlag BJ, Rosenshtraukh LV, Lazzara R: Bradycardia-dependent triggered activity: relevance to drug-induced multiform ventricular tachycardia. Circulation 1983; 68: 846-856.

Bril DM, Fozzard HA, Makielski JC, Wasserstorm JA: Effect of prolonged depolarizations on twitch tension and intracellular sodium activity in sheep cardiac Purkinje fibres. J Physiol (Lond) 1987; 384: 355-375.

Buchanan LV, Kabell G, Brunden MN, Gibson JK: Comparative assessment of ibutilide, d-sotalol, clofilium, E-4031, and UK-68,798 in a rabbit model of proarrhythmia. J Cardiovasc Pharmacol 1993; 220: 540-549.

Bush AE, Malloy KJ, Varnum MD, Adelman JP, North RA, Maylie J: A slowlyactivating potassium current I_{Ks} is the target for the class III antiarrhythmic drug NE-10064. Circulation 1993; 88: I231. Callewaert G, Carmeliet E, Vereecke J: Single cardiac Purkinje cells: general electrophysiology and voltage-clamp analysis of the pace-maker current. J Physiol (Lond) 1984; 349: 643-661.

Campbell T: Kinetics of onset of rate-dependent effects of class I antiarrhythmic drugs are important in determining their effects on refractoriness in guinea-pig ventricle, and provide a theorical basis for their subclassification. Cardiovasc Res 1983; 17: 344-352.

Campbell DL, Qu Y, Rasmusson RL, Strauss HC: The calcium-independent transient outward current in isolated ferret right ventricular myocytes. II Close state reverse use-dependent block by 4-aminopyridine. J Gen Physiol 1993; 101: 603-626.

Cannel MB, Lederer Wj: The arrhythmogenic current iTI in the absence of electrogenic sodium-calcium exchange in sheep cardiac Purkinje fibers. J Physiol (Lond) 1986; 374: 201-219.

Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) Investigators. Preliminary report: effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmia suppression after myocardial infarction. N Engl J Med 1989; 321: 406-412.

Carlsson L, Almgren O, Duker G: QTU-prolongation and torsades de pointes induced by putative class III antiarrhythmic agents in the rabbit: etiology and interventions. J Cardiovasc Pharmacol 1990; 16: 276-285.

Carlsson L, Abrahamsson C, Drews L, Duker G: Antiarrhythmic effects of potassium channel openers in rythm abnormalities related to delayed repolarization. Circulation 1992; 85: 1491-1500.

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 afterdepolarisations. Cardiovasc Res 1993; 27: 2186-2193.

Carlsson L, Amos G, Andersson B, Drews L, Duker G, Wadstedt G: Electrophysiological characterization of the prokinetic agents cisapride and mosapride in vivo and in vitro: Implications for proarrhythmic potential? J Pharmacol Exp Ther 1997; 282: 220-227.

Carmeliet E: Repolarisation and frequency in cardiac cells. J Physiol (Lond) 1977; 73: 903-923.

Carmeliet E: Electrophysiologic and voltage clamp analysis of the effects of sotalol on isolated cardiac muscle and Purkinje fibers. J Pharmacol Exp Ther 1985; 232(3): 817-825.

Carmeliet E: Slow inactivation of the sodium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. Pflügers Arch 1987; 408: 18-26.

Carmeliet E: K^+ channels in cardiac cells: mechanisms of activation, inactivation, rectification and K^+_{e} sensitivity. Pflügers Arch 1989; 414 (Suppl I): S88-S92.

Carmeliet E: Fonction et pharmacologie des canaux potassiques dans le coeur et les vaisseaux. Arch Mal Coeur 1992a; 85: 465-471.

Carmeliet E: Voltage- and time-dependent block of the delayed K⁺ current in cardiac myocytes by dofetilide. J Pharm Exp Ther 1992b; 262: 809-817.

Carmeliet E: Use-dependent block of the delayed K⁺ current in rabbit ventricular myocytes. Cardiovasc Drug Ther 1993a; 7: 599-604.

Carmeliet E: Use-dependent block and use-dependent unblock of the delayed rectifier K^+ current by almokalant in rabbit ventricular myocytes. Circ res 1993b; 73: 857-868.

Carmeliet E, Coraboeuf E: Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibres. Pflügers Arch 1982; 392: 352-359.

Carmeliet E, Saikawa T: Slow recovery of the maximal rate of rise (Vmax) of the action potential in sheep cardiac Purkinje fibers. Pflügers Arch 1982; 394 (1): 90-93.

Castle NA, Slawsky MT: Characterization of 4-aminopyridine block of the transient outward current in adult rat ventricular myocytes. J Pharmacol Exp Ther 1992; 264: 1450-1459.

Cavalie A, Ochi R, Pelzer D, Trautwein W: Elementary currents through Ca²⁺ channels in guinea pig myocytes. Pflügers Arch 1983; 398: 284-297.

Chadwick CC, Ezrin AM, O'Connor B: Identification of a specific radioligand for the cardiac rapidly activating delayed rectifier K^+ channel. Circ Res 1993; 72: 707-714.

Chen L, El-Sherif N, Boutjdir M: α_1 -adrenergic activation inhibits β -adrenergicstimulated unitary Ca²⁺ currents in cardiac ventricular myocytes. Circ Res 1996; 79: 184-193.

Chinn K: Two delayed rectifiers in guinea pig ventricular myocytes distinguished by tail current kinetics. J Pharmacol Exp Ther 1993; 264: 553-560.

Chouabe C, Neyroud N, Guicheney P, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J: Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. EMBO J 1997; 16: 5472-5479.

Clapham DE, Logothetis DE: Delayed rectifier K^+ current in embryonic chick heart ventricle. Am J Physiol 1988; 254: H192-H197.

Claremon DA, Baldwin JJ, Elliott JM, Butcher JW, Remy DC, Ponticello GS, Selnick HG, Lynch JJ, Sanguinetti MC: Selective I_{Kr} potassium channel blockers as class III antiarrhythmic agents. Perspect Med Chem 1993: 389-404.

Clay JR, Ogbaghebriel A, Paquette T, Sasyniuk BI, Shrier A: A quantitative description of the E-4031-sensitive repolarisation current in rabbit ventricular myocytes. Biophys J 1995; 69: 1830-1837.

Colatsky TJ: Voltage clamp measurements of sodium channel properties in rabbit cardiac Purkinje fibres. J Physiol (Lond) 1980; 305: 215-234.

Colatsky TJ: Quinidine block of cardiac sodium channels is rate- and voltage-dependent. Biophys J 1982; 37: 343a.

Colatsky TJ, Follmer CH, Starmer CF: Channel specificity in antiarrhyth drug action. Mechanism of potassium channel block and its role in suppressing and aggravating cardiac arrhythmias. Circulation 1990; 82: 2235-2242.

Coraboeuf E, Weidmann S: Potentiel de repos et potentiels d'action du muscle cardiaque, mesurés à l'aide d'électrodes internes. Comptes rendus des scéances de la société de Biologie 1949; 143: 1329-1333.

Coraboeuf E, Deroubaix E, Coulombe A: Effect of tetrodotoxin on action potentials of the conducting system in the dog heart. Am J Physiol 1979; 236: H561-H567.

Coraboeuf E, Carmeliet E: Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibers. Pflügers Arch 1982; 392: 352-359.

Coulombe A, Coraboeuf E, Malecot C, Deroubaix E: Role of the "Na window" current and other ionic currents in triggering early-afterdepolarizations and resulting reexcitations in Purkinje fibers. In Zipes DP, Jalife J, eds. *Cardiac electrophysiology and arrhythmias*. Grune & Stratton, Inc., New York, 1985, pp. 43-49.

Courtney KR: Quantifying antiarrhythmic drug blocking during action potentials in guinea pig pappilary muscle. J Mol Cell Cardiol 1983; 15: 749-757.

Courtney KR: Review: Quantitative structure/activity relations based on use-dependent block and repriming kinetics in myocardium. J Mol Cell Cardiol 1987; 19: 319-330.

Cranefield PF: Action potentials, afterpotentials, and arrhythmias. Circ Res 1977; 41: 415-423.

Cranefield PF, Aronson RS: Initiation of sustained rythmic activity by single propagated action potentials in canine Purkinje fibers exposed to sodium free solution or to ouabain. Circ Res 1974; 34: 477-484.

Cranefield PF, Aronson RS: In: Cardiac arrhythmias: The role of triggered activity and other mechanisms. Futura Publishing Co, Mount Kisco, NY, 1988a.

Cranefield PF, Aronson RS: Torsades de pointes and other pause-induced ventricular tachycardias: the short-long-short sequence and early afterdepolarizations. PACE 1988b; 11:670-678.

Dae M, Ursell P, Lee RJ: Heterogeneous sympathetic innervation in German shepherd dogs with inherited ventricular arrhythmias and sudden death. J Am Coll Cardiol 1995; 25: 20A.

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.

Damiano BP, Rosen MR: Effects of pacing on triggered activity induced by early afterdepolarizations. Circulation 1984; 69: 1013-1025.

Davidenko J, Cohen L, Goodrow R, Antzelevitch CH: Quinidine-induced action potential prolongation, early afterdepolarization and triggered activity in canine Purkinje fibers. Effects of stimulation rate, potassium and magnesium. Circulation 1989; 79: 674-686.

Davis LD: Effects of changes in cycle length on diastolic depolarization produced by ouabain in canine Purkinje fibers. Circ Res 1973; 32: 206-214.

Davy JM, Weissenburger J, Ertzbishoff O, Lainée P, Chezalviel F, Poirier JM, Cheymol G, Motte G: Sotalol-induced torsades de pointe in conscious dogs with atrioventricular: role of hypokalaemia. Arch Mal Coeur Vaiss 1988; 81 (9): 1117-1124.

Davy JM, Weissenburger J, Chezalviel F, Ertzbishoff O: Les modèles expérimentaux de torsades de pointes. Arch Mal Coeur 1992; 85(IV): 15-21.

Demolis JL, Charransol A, Funk-Brentano C, Jaillon P: Effects of single oral dose of sparfloxacin on ventricular repolarization in healthy volunteers. Br J Clin Pharmacol 1996; 41: 499-503.

Dessertenne F: La tachycardie ventriculaire à deux foyers opposés variables. Arch Mal Coeur 1966; 59: 263-272.

Di Diego JM, Sun ZQ, Antzelevitch C: I(to) and action potential notch are smaller in left vs. right canine ventricular epicardium. Am J Physiol 1996; 271: H548-H561.

Donger C, Denjoy I, Berthet M, Neyroud N, Cruaud C, Bennaceur M, Chivoret G, Schwartz K, Coumel P, Guicheney P: KvLQT1 C-terminal missense mutation causes a form fruste long-QT syndrome. Circulation 1997; 96: 2778-2781.

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.

Droogmans G, Nilius B: Kinetics properties of the cardiac T-type calcium- channel in the guinea pig. J Physiol (Lond) 1989; 419: 627-650.

Drouin E, Charpentier F, Gauthier C, Laurent K, Le Marec H: Electrophysiologic characteristics of cells spanning the left ventricular wall of human heart: evidence for presence of M cells. J Am Coll Cardiol 1995; 26: 185-192.

Dukes ID, Cleeman L, Morad M: Tedisamil blocks the transient and delayed rectifier K⁺ currents in mammalian cardiac and glial cells. J Pharmacol Exp Ther 1990; 254(2): 560-569.

Eckardt L, Haverkamp W, Borggrefe M, Breithardt G: Experimental models of torsade de pointes. Cardiovasc Res 1998a; 39: 178-193.

Eckardt L, Haverkamp W, Borggrefe M, Breithardt G: Drug-related Torsade de Pointes in the isolated rabbit heart: comparison of clofilium, d,l-sotalol, and erythromycin. J Cardiovasc Pharmacol 1998b; 32: 425-434.

Egan TM, Noble D, Noble SJ, Powell T, Spindler AJ, Twist VW: Sodium-calcium exchange during the action potential in guinea-pig ventricular cells. J Physiol(Lond) 1989; 411: 639-661.

Einthoven W: Über die deutung des electrokardiogramms. Plügers Arch 1912; 149: 65-86.

El-Sherif N, Zeiler RH, Craelius W, Gough WB, Henkin R: QTU prolongation and polymorphic ventricular tachyarrhythmias due to bradycardia-dependent early afterdepolarizations. Circ Res 1988; 63: 286-305.

El-Sherif N, Craelius W, Boutjdir M, Gough WB: Early afterdepolarizations and arrhythmogenesis. J Cardiovasc Electrophysiol 1990; 1: 145-160.

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.

Ertel SI, Ertel EA: Low-voltage-activated T-type Ca²⁺ channels. TiPS 1997; 18: 37-42.

Escande D, Coulombe A, Faivre JF, Deroubaix E, Coraboeuf E: Two types of transient outward currents in adult human atrial cells. Am J Physiol 1987; 252: H142-H148.

Escande D, Mestre M, Cavero I, Brugada J, Kirchhof C: RP58866 and its active enantiomer RP 62719 (terikalant): blockers of the inward rectifier K^+ current acting as pure class III antiarrhythmic agents. J Cardiovasc Pharmacol 1992; 20: S106-S113.

Fabiato A: Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. Am J Physiol 1983; 245: C1-C14.

Fedida D, Giles WR: Regional variations in action potentials and transient outward current in myocytes isolated from rabbit left ventricle. J Physiol (Lond) 1991; 442: 191-209.

Feng J, Wang Z, Li G-R, Nattel S: Effects of class III antiarrhythmic drugs on transient and ultra-rapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. J Pharmacol Exp Ther 1997; 281: 384-392.

Fermini B, Jurkiewicz NK, Jow B, Guinosso PJ Jr, Baskin EP, Lynch JJ Jr, Salata JJ: Use-dependent effects of the class III antiarrhythmic agent NE-10064 (azimilide) on cardiac repolarization: block of delayed rectifier potassium and L-type calcium currents. J Cardiovasc Pharmacol 1995; 26: 259-271.

Ferrier GR: Digitalis arrhythmias: role of oscillatory afterpotentials. Prog Cardiovasc Dis 1977; 19: 459-474.

Ferrier GR: Digitalis toxicity. In: Dangman KH, Miura DS, eds. Basic and clinical electrophysiology and pharmacology of the heart. Marcel Dekker Inc. NY, 1991; pp: 277-299.

Ferrier GR, Moe GK: Effect of calcium on acetylstrophanthidin-induced transient depolarizations in canine Purkinje tissue. Circ Res 1973; 33: 508-515.

Ficker E, Taglialatela M, Wible BA, Henley CM, Brown AM: Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K channels. Science 1994; 266: 1068-1072.

Fleckenstein A: Pharmacology and electrophysiology of calcium antagonists. *Calcium antagonism in cardiovascular therapy*. In Zanchetti A, Kriller DM, eds: Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton, 1981, pp 10-29.

Follmer CH, Colatsky TJ: Block of delayed rectifier potassium current, I_K , by flecainide and E-4031 in cat ventricular myocytes. Circulation 1990; 82: 289-293.

Fozzard HA, Friedlander I, January CT, Makielsky JC: Second-order kinetics of Na⁺ channel inactivation in internally dialysed canine cardiac Purkinje cells. J Physiol (Lond) 1984; 353: 72P.

Freeman LC, Pacioretty LM, Moise S, Kass R, Gilmour RF: Decreased density of Ito in left ventricular myocytes from german Shepherd dogs with inherited arrhythmias. J Cardiovasc Electrophysiol 1997; 8: 872-883.

Funck-Brentano C: Rate-dependence of class III action in the heart. Fundam Clin Pharmacol 1993; 7: 51-59.

Furukawa T, Myerburg RJ, Furukawa N, Bassett AL, Sinichi K: Differences in transient outward currents of feline endocardial and epicardial myocytes. Circ Res 1990; 67: 1287-1291.

Gadsby D, Cranefield PF: Two levels of resting potential in cardiac Purkinje fiber. J Gen Physiol 1977; 70: 725-746.

Giles WR, Imaizumi Y: Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. J Physiol (Lond) 1988; 405: 123-145.

Gilmour RF, Moïse NS: Triggered activity as a mechanism for inherited ventricular arrhythmias in German shepherd dogs. J Am Coll Cardiol 1996; 27: 1526-1533.

Gilmour RF, Zipes DP: Different electrophysiological responses of canine endocardium to combined hyperkaliemia, hypoxia and acidosis. Circ Res 1980; 46: 814-825.

Gintant GA: Regional differences in IK density in canine left ventricle: role of IK,s in electrical heterogeneity. Am J Physiol 1995; 268: H604-H613.

Gintant GA: Two components of delayed rectifier current in canine atrium and ventricle. Does I_{K_s} play a role in the reverse rate-dependence of class III agents? Circ Res 1996; 78: 26-37.

Gintant GA: Azimilide causes reverse rate-dependent block while reducing both components of delayed-rectifier current in canine ventricular myocytes. J Cardiovasc Pharmacol 1998; 31: 945-953.

Gintant GA, Datyner NB, Cohen IS: Slow inactivation of tetrodotoxin-sensitive current in canine cardiac Purkinje fibers. Biophys J 1984; 45: 509-512.

Gintant GA, Datyner NB, Cohen IS: Gating of delayed rectification in acutely isolated canine cardiac Purkinje myocytes: evidence for a single voltage-gated conductance. Biophys J 1985; 48: 1059-1064.

Grant AO, Starmer CF: Mechanism of closure of cardiac sodium channels in rabbit ventricular myocytes: Single channel analysis. Circ Res 1987; 60: 897-913.

Gray VS: Syncopal episodes associated with cisapride and concurrent drugs. Ann Pharmacother 1998; 32: 648-651.

Guinechey P, Barhanin J, Le Marec H: Bases moléculaires des arythmies héréditaires. Sciences 1998; 14: 1025-1035.

Guy JM, André-Fouet X, Porte J, Bertrand M, Lamaud M, Verneyre H: Torsades de Pointes et allongement de l'intervalle QT après injection de dropéridol. Ann Cardiol Angéiol 1991; 40: 541-545.

Habbab MA, El-Sherif N: Drug-induced Torsades de Pointes: Role of early afterdepolarizations and dispersion of repolarization. Am J Med 1990; 89: 241-246.

Han X, Ferrrier GR: Ionic mechanisms of transient inward current in the absence of Na+-Ca2+ exchange in rabbit cardiac Purkinje fibres. J Physiol (Lond) 1992; 456: 19-38.

Han X, Ferrrier GR: Transient inward current is conducted through two types of channels in cardiac Purkinje fibres. J Mol Cell Cardiol 1996; 28: 2069-2084.

Hauswirth O, Noble P, Tsien RW: The mechanism of oscillatory activity at low membrane potentials in cardiac Purkinje fibers. J Physiol (Lond) 1969; 200: 255-265.

Heidbücher H, Vereecke J, Carmeliet E: Three different potassium channels in human atrium. Contribution to the basal potassium conductance. Circ Res 1990; 66: 1277-1286.

Hess P, Lansman JB, Tsien RW: Different modes of Ca channel gating behavior favored by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. Nature 1984; 311: 538-544.

Hiraoka M, Hiraoka M: The role of the positive dynamic current on the action potential of cardiac Purkinje fibers. Japa Heart J 1975; 25: 705-717.

Hiraoka M, Kawano S: Mechanism of increased amplitude and duration of the plateau with sudden shortening of diastolic intervals in rabbit ventricular cells. Circ Res 1987; 60: 14-26.

Hiraoka M, Kawano S: Calcium-sensitive and -insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. J Physiol (Lond) 1989; 410: 187-212.

Hirano Y, Fozzard HA, January CT: Characteristics of L- and T-type Ca²⁺ currents in canine cardiac Purkinje cells. Am J Physiol 1989; 256: H1478-H1492.

Hirano Y, Moscucci A, January CT: Direct measurement of L-type Ca²⁺ window current in heart cells. Circ Res 1992; 70: 445-455.

Hoffman BF, Rosen MR, Wit AL: Electrophysiology and pharmacology of cardiac arrhythmias. VII Cardiac effects of quinidine and procaine amide. Am Heart J 1975; 89 (part A): 804-808; Am Heart J 1975; 90 (part B): 1117-122.

Hoffman BF, Rosen MR: Cellular mechanisms for cardiac arrhythmias. Circ Res 1981; 49: 1-15.

Hogan PM, Wittenberg SM, Klocke FJ: Relationship of stimulation frequency to automaticity in the canine Purkinje fiber during ouabain administration. Circ Res 1973; 32: 377-384.

Hohnloser SH, van de Loo A, Kalusche D, Arendts W, Quart B: Does sotalolinduced alteration of QT-dispersion predict effectiveness or proarrhythmic hazards ?. Circilation 1993; 88 (4, Pt 2): 1397.

Hondeghem LM: Development of class III antiarrhythmic agents. J Cardiovasc Pharmacol 1995; 20 (suppl.): 17-22.

Hondeghem LM, Katzung BG: Time and voltage dependent interaction of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. Biochim Biophys Acta 1977; 472: 377-398.

Hondeghem LM, Katzung BG: Antiarrhythmic agents. The modulated receptor mechanism of action of sodium and calcium channel-blocking drugs. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1984; 24: 387-423.

Hondeghem LM, Snyders DJ: Class III antiarrhythmic agents have a lot of potential but a long way to go. Reduced effectiveness and dangers of reverse use-dependence. Circulation 1990; 81: 687-690.

Hordof A, Spotnitz H, Mary-Rabine L, Edie R, Rosen M: The cellular electrophysiologic effects of digitalis on human atrial fibers. Circulation 1978; 57: 223-229.

Hume JR, Uehara A: Ionic basis of the different action potential configurations of single guinea-pig atrial and ventricular myocytes. J Physiol (Lond) 1985; 368: 525-544.

Ishihara K, Mitsuiye T, Noma A, Takano M: The Mg^{2+} block and intrinsic gating underlying inward rectification of the K⁺ current in guinea pig cardiac myocytes. J Physiol (Lond) 1989; 419: 297-320.

Janse MJ, Wit AL: Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. Physiol Rev 1989; 69: 1049-1169.

January CT, Riddle JM, Salata JJ: A model for early afterdepolarizations: Induction with the Ca²⁺ channel agonist Bay K8644. Circ Res 1988; 62: 563-571.

January CT, Riddle JM: Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type Ca^{2+} calcium current. Circ Res 1989; 64: 977-990.

Jenzer HR, Hagemeijer F: Quinidine syncope: torsade de pointes with low quinidine plasma concentrations. Eur J Cardiol 1976; 4: 447.

Jervell A, Lange-Nielsen F: Congenital deaf mutism, functional heart disease with prolongation of the QT interval and sudden death. Am Heart J 1956; 54: 59-68.

Jewitt DE, Singh BN: The role of beta-adrenergic blockade during and after myocardial infarction. Prog Cardiovasc Dis 1974; 16: 421-440.

Josephson IR, Sanchez-Chapula J, Brown AM: Early outward current in rat single ventricular cells. Circ Res 1984; 54: 157-162.

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.

Jurkiewicz NK, Wang J, Fermini B, Sanguinetti MC: Mechanism of action potential prolongation by RP 58866 and its active enantiomer, terikalant. Block of the rapidly activating delayed rectifier K^+ current, I_{Kr} . Circulation 1996; 94: 2938-2946.

Kameyama M, Hescheler J, Hoffmann F, Trautwein W: Modulation of Ca current during the phosphorylation cycle in the guinea pig heart. Pflügers Arch 1986; 407: 123-128.

Kass RS, Lederer WJ, Tsien RW, Weingart R: Role of calcium ions in transient inward currents and aftercontractions induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibres J Physiol (Lond) 1978a; 281: 187-208.

Kass RS, Tsien RW, Weingart R: Ionic basis of transient inward current induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibres. J Physiol (Lond) 1978b; 281: 209-226.

Kass RS, Sanguinetti MC: Calcium channel inactivation in the calf cardiac Purkinje fiber: evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. J Gen Physiol 1984; 84: 705-726.

Kass RS, Freeman LC: Potassium channels in the heart: cellular, molecular and clinical implications. Trends Cardiovasc Med 1993; 3: 149-159.

Katzung BO, Morgenstern JA: Effects of extracellular potassium on ventricular automaticity and evidence for a pacemaker current in mammalian ventricular myocardium. Circ Res 1977; 40: 105-111.

Kawano S, Hirayama Y, Hiraoka M: Activation mechanism of Ca²⁺-sensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. J Physiol (Lond) 1995; 486: 593-604.

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.

Kemper AJ, Dunlap R, Pietro DA: Thioridazine-induced Torsades de Pointes. Successful therapy with isoproterenol. JAMA 1983; 249: 2931-2934.

Kenyon JL, Gibbons WR: Effects of low chloride solutions on action potentials of sheep cardiac Purkinje fibers. J Gen Physiol 1977; 70: 635-660;

Kenyon JL, Gibbons WR: Influence of chloride, potassium and tetraethylammonium on the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. J Gen Physiol 1979; 73: 117-138.

Kenyon JL, Sutko JL: Calcium- and voltage-activated plateau currents of cardiac Purkinje fibers. J Gen Physiol 1987; 89: 921-958.

Kii Y, Ito T: Effects of 5-HT4-receptor agonists, cisapride, mosapride citrate, and zacopride, on cardiac action potentials in guinea pig isolated papillary muscles. J Cardiovasc Pharmacol 1997; 29: 670-675.

Kimura J, Miyamae S, Noma A: Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea pig. J Physiol 1987; 384: 199-222.

Kishida H, Cole JS, Surawicz B: Negative U wave. A highly specific but poorly understood sign of heart disease. Am J Cardiol 1982; 49: 2030-2036.

Kiyosue T, Arita M: Late sodium current and its contribution to action potential configuration in guinea pig ventricular myocytes. Circ Res 1989; 64: 389-397.

Konarzewska H, Peeters GA, Sanguinetti MC: Repolarizing K⁺ currents in nonfailing human hearts. Circulation 1995; 92: 1179-1187.

Kriwiski M, Perry GY, Tarchitsky D, Gutman Y, Kishon Y: Haloperidol-induced Torsades de Pointes. Chest 1990; 98: 482-484.

Kukushkin NI, Gainullin RZ, Sosunov EA: Transient outward current and rate dependence of action potentiel duration in rabbit cardiac ventricular muscle. Plügers Arch 1983; 399: 87-92.

Kurachi Y: Voltage-dependent activation of the inward rectifier potassium channel in the ventricular membrane of guinea pig. J Physiol (Lond) 1985; 366: 365-385.

Kurachi Y: G-protein control of cardiac potassium channels. Trends Cardiovasc Med 1994; 4: 64-69.

Laflamme MA, Becker P: Ca²⁺-induced current oscillations in rabbit ventricular myocytes. Circ Res 1996; 78: 707-716.

Lansman JB, Hess P, Tsien RW: Blockade of current through single Ca channels by Cd^{2+} , Mg^{2+} and Ca^{2+} . Voltage and concentration dependence of Ca entry into the pore. J Gen Physiol 1986; 88: 321-347.

Lederer Wj, Tsien RW: Transient inward current underlying arrhythmogenic effects of cardiotonic steroids in Purkinje fibres. J Physiol 1976; 263: 73-100.

Lee CO, Dagostino M: Effect of strophanthidin on intracellular Na ion activity and twitch tension on constantly driven canine cardiac Purkinje fibers. Biophys J 1982; 40: 185-198.

Lee KS, Marban E, Tsien RW: Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. J Physiol 1985; 364: 395-411.

Lepeschkin E: The U wave of the electrocardiogram. Arch Inter Med 1955; 96: 600-617.

Levi AJ, Dalton GR Hancox JC, Mitcheson JS, Issberner J, Bates JA, Evans SJ, Howarth FC, Hobai IA, Vones JV: Role of intracellular sodium overload in the genesis of cardiac arrhythmias. J Cardiovasc Electrophysiol 1997; 8: 700-721.

Levine JH, Spear JF, Guarnieri T, Weisfeldt ML, de Langen CD, Becker LC, Moore EN: Cesium chloride-induced long QT syndrome: demonstration of afterdepolarizations and triggered activity in vivo. Circulation 1985; 72: 1092-1103.

Levine JH, Morganroth J, Kadish AH: Mechanisms and risk factors for proarrhythmia with type Ia compared with Ic antiarrhythmic drug therapy. Circulation 1989; 80:, 1063-1069.

Li ZY, Maldonado C, Zee-Cheng C, Hiromasa S, Kupersmith J: Purkinje fibrepapillary muscle interaction in the genesis of triggered activity in a guinea pig model. Cardiovasc Res 1992; 26: 543-548.

Li G-R, Feng J, Wang Z, Fermini B, Nattel S: Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in human atrial myocytes. Circ Res 1996a; 78: 903-915.

Li G-R, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S: Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. Circ Res 1996b; 78: 689-696.

Li G-R, Feng J, Yue L, Carrier M: Transmural heterogeneity of action potentials and I_{to1} in myocytes isolated from the human right ventricle. Am J Physiol 1998; 275: H369-H377.

Li G-R, Yang B, Feng J, Bosh RF, Carrier M, Nattel S: Transmembrane I_{Ca} contributes to rate-dependent changes of action potentials in human ventricular myocytes. Am J Physiol 1999; 276: H98-H106.

Lipicky RJ: A view point on drugs that prolong the QTc interval. Am J Cardiol 1993; 72: 53B-59B.

Litovsky SH, Antzelevitch C: Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. Circ Res 1988; 62: 116-126.

Litovsky SH, Antzelevitch C: Rate-dependence of action potential duration and refractoriness in canine ventricular endocardium differs from that of epicardium: role of the transient outward current. J Am Coll Cardiol 1989; 14: 1053-1066.

Liu D-W, Gintant GA, Antzelevitch C: Ionic bases for electrophysiological distinction among epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes from the free wall of the canine left ventricle. Circ Res 1993; 72: 671-687.

Liu D-W, Antzelevitch C: Characteristics of the delayed rectifier current (I_{Kr} and I_{Ks}) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker I_{Ks} contributes to the longer action potential of the M cell. Circ Res 1995; 76: 351-365.

Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG: Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. Nature 1994; 372: 366-369.

Lu Y, Yue L, Wang Z, Nattel S: Effects of the diuretic agent indapamide on Na⁺, transient outward, and delayed rectifier currents in canine atrial myocytes. Circ Res 1998; 83: 158-166.

Luo C-H, Rudy Y: A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. Circ Res 1994a; 74: 1071-1096.

Luo C-H, Rudy Y: A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. II. Afterdepolarizations, triggered activity, and potentiation. Circ Res 1994b; 74: 1097-1113.

McComb JM, Campbell NP, Cleland JG: Recurrent ventricular tachycardia associated with QT prolongation after mitral valve replacement and its association with intravenous administration of erythromycin. Am J Cardiol 1984; 54: 922-923.

McDonald TF, Trautwein W: The potassium current underlying delayed rectification in cat ventricular muscle. J Physiol (Lond) 1978; 274: 217-246.

McDonald TF, Pelzer S, Trautwein W, Pelzer DJ: Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. Physiol Rev 1994; 74: 365-507.

Marban E, Robinson SW, Wier WG: Mechanisms of arrhythmogenic delayed and early afterdepolarizations in ferret ventricular muscle. J Clin Invest 1986; 78: 1185-1192.

Martin BCL, Chinn K: Contribution of delayed rectifier and inward rectifier to repolarization of the action potential: pharmacologic separation. J Cardiovasc Pharmacol 1992; 19: 830-837.

Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H: Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg²⁺. Nature 1987; 325: 156-159.

Matsuda H, Cruz JDS: Voltage-dependent block by internal Ca^{2+} ions of inwardly rectifying K⁺ channels in guinea pig ventricular cells. J Physiol (Lond) 1993; 470: 295-311.

Matsuura H, Ehara T, Imoto Y: An analysis of the delayed outward current in single ventricular cells of the guinea-pig. Pflügers Arch 1987; 410: 596-603.

Members of Sicilian Gambit: A novel approach to the classification of antiarrhythmic drugs based on their actions on arrhythmogenic mechanisms. Circulation 1991; 84: 1831-1851.

Members of Sicilian Gambit: The search for novel antiarrhythmic strategies. Eur Heart J 1998; 19: 1178-1196.

Mehtonen OP, Aranko K, Malkonen L, Vapaatalo H: A survey of 49 cases of sudden death associated with the use of antipsychotic or antidepressant drugs. Acta Psychiatr Scand 1991; 84: 58-64.

Mishra SK, Hermsmeyer K: Selective inhibition of T-type Ca²⁺ channels by Ro 40-5967. Circ Res 1994; 75: 144-148.

Mitra R, Morad M: Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. Procc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 5340-5344.

Mohammad S, Zhou Z, Gong Q, January CT: Blockade of the HERG human cardiac K+ channel by the gastrointestinal prokinetic agent cisapride. Am J Physiol 1997; 273: H2534-2538.

Moir DC, Crooks J, Sawyer P: Cardiotoxicity of tricyclic antidepressants. Br J Pharmacol 1972; 44: 371P.

Moïse NS, Meyers-Wallen V, Flahive WJ, Valentine BA, Scarlett JM, Brown CA, Chavkin MJ, Dugger DA, Renaud-Farrell S, Kornreich B, Schoenborn WC, Sparks JR, Gilmour RF: Inherited ventricular arrythmias and sudden death in German Shepherd Dogs. J Am Coll Cardiol 1994; 24: 233-243.

Moïse NS, Moon PF, Flahive WJ, Brittain D, Pride HP, Lewis BA, Zipes DP, Lee RJ, Gilmour RF Jr: Phenylephrine induced ventricular arrhythmias in German shepherd dogs with inherited sudden death. J Cardiovasc Electrophysiol 1996; 7: 217-230.

Moïse NS, Gilmour RF, Riccio ML: An animal model of spontaneous arrhythmic death. J Cardiovasc Electrophysiol 1997; 8: 98-103.

Monohan BP, Fergusson CL, Killeavy ES, Lloyd BK, Troy J, Cantilena LR: Torsade de Pointes occuring in association with terfenadine use. JAMA 1990; 264: 2788-2790.

Morady F, DiCarlo LA, Baerman JM, Krol RB: Lidocaine, procainamide and amiodarone on intraventricular conduction. Am J Cardiol 1985; 6: 170-185.

Moss AJ, Robinson JL: Clinical features of the idiopathic long QT syndrome. Circulation 1992; 85(suppl I): I-140-I-144.

Näbauer M: Electrical heterogeneity in the ventricular wall - and the M cell. Cardiovasc Res 1998; 40: 248-250.

Näbauer M, Beuckelmann DJ, Überfuhr P, Steinbeck G: Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. Circulation 1996; 93: 168-177.

Nair LA, Grant AO: Emerging class III antiarrhythmic agents: mechanism of action and proarrhythmic potential. Cardiovasc Drug Ther 1997; 11: 149-167.

Nakayama T, Kurachi Y, Noma A, Irisawa H: Action potential and membrane currents of single pacemaker cells of the rabbit heart. Pflügers Arch 1984; 402: 248-257.

Nakayama T, Fozzard HA: Adrenergic modulation of the transient outward current in isolated canine Purkinje cells. Circ Res 1988; 62: 162-172.

Nattel S, Quantz M: Pharmacological response of quinidine induced early afterdepolarizations in canine cardiac Purkinje fibres: insights into underlying ionic mechanism. Cardiovasc Res 1988; 22: 808-817.

Nattel S, Ranger S, Talajic M, Lemery R, Roy D: Erythromycin induced long QT syndrome: concordance with quinidine and underlying cellular electrophysiologic mechanism. Am J Med 1990; 89: 235-238.

Neto FR: Electropharmacological effects of berberine on canine cardiac Purkinje fibers and ventricular muscle and atrial muscle of the rabbit. Br J Pharmacol 1993; 108: 534-537.

Nilius B, Hess P, Lansman JB, Tsien RW: A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. Nature 1985; 316: 443-446.

Noble D, Tsien RW: Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in cardiac Purkinje fibers. J Physiol (Lond) 1969; 200: 205-231.

Noble D, Noble SJ, Bett GCL, Earm YE, Ho WK, So IK: The role of sodiumcalcium exchange during the cardiac action potential. Ann N Y Acac Sci 1991; 639: 334-353.

Nordin C, Ming Z: Computer model of current-induced early afterdepolarizations in guinea pig ventricular myocytes. Am J Physiol 1995; 268: H2440-H2459.

Nygren A, Fiset C, Firek L, Clark JW, Lindblad DS, Clark RB, Giles WR: Mathematical mdel of an adult human atrial cell. The role of K⁺ currents in repolarization. Circ Res 1998; 82: 63-81.

Ono K, Fozzard HA, Hanck DA: Mechanism of cAMP-dependent modulation of cardiac sodium channel current kinetics. Circ Res 1993; 72: 807-815.

Papp Z, Sipido KR, Callewaert G, Carmeliet E: Two components of [Ca²⁺]i-activated Cl current during large transients in single rabbit heart Purkinje cells. J Physiol (Lond) 1995; 483: 319-330.

Patterson E, Scherlag BJ, Lazzara R: Early afterdepolarizations produced by d,l-sotalol and clofilium. J Cardiovasc Electrophysiol 1997; 8: 667-678.

Piquette RK: Torsade de Pointes induced by cisapride/clarithromycin interaction. Ann Pharmacother 1999; 33: 22-26.

Pohjola-Sintonen S, Viitasalo M, Toivonen L, Neuvonen P: Torsades de Pointes after terfenadine-itraconazole interaction. BMJ 1993; 306: 186.

Priori SG, Barhanin J, Hauer RN, Haverkamp W, Jongsma HJ, Kleber AG, McKenna WJ, Roden DM, Rudy Y, Schwartz K, Schwartz PJ, Tobin JA, Wilde A: Genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias. Eur Heart J 1999a; 20: 174-195.

Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ: Low penetrance of the long-QT syndrome: clinical impact. Circulation 1999b; 99: 529-533.

Puisieux FL, Adamantidis MM, Dumotier BM, Dupuis BA: Cisapride-induced prolongation of cardiac action potential and early afterdepolarizations in rabbit Purkinje fibres. Br J Pharmacol 1996; 117: 1377-1379.

Puri TS, Gerhardstein BL, Zhao XL, Ladner MB, Hosey MM: Differential effects of subunit interactions on protein kinase A- and C-mediated phosphorylation of L-type calcium channels. Biochemistry 1997; 36: 9605-9615.

Rangers S, Talajic M, Lemery R, Roy D, Willemaire C, Nattel S: Kinetics of usedependent ventricular conduction slowing of by antiarrhythmic drugs in humans. Circulation 1991; 83: 1987-1994.

Reuter H, Seitz N: The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. J Physiol 1968; 195: 451-470.

Reuter H, Stevens CF, Tsien RW, Yellen G: Properties of single calcium channels in cultured cardiac cells. Nature 1982; 297: 501-504.

Roberds SL, Tamkun MM: Cloning and tissue-specific expression of five voltage-gated potassium channel cDNAs expressed in rat heart. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 1798-1802.

Roden DM, Hoffman BF: Action potential prolongation and induction of abnormal automaticity by low quinidine concentrations in canine Purkinje fibers. Relationship to potassium and cycle length. Circ Res 1985; 56: 857-867.

Romano C, Gemme G, Pongiglione R: Aritmie cardiache rare dell'eta pediatra. Clin Pediatr 1963; 45: 656-683.

Rosen MR, Hordof AJ, Ilvento JP, Hoffman BF: Effects of adrenergic amines on electrophysiologic properties and automaticity of neonatal and adult canine Purkinje fibers. Circ Res 1977; 40: 390-400.

Rosen MR, Danilo P: Digitalis-induced delayed afterdepolarizations. In: Zipes DP, Bailey JC, Elharrar V (eds.) *The slow inward current and cardiac arrhythmias*. The Hague, Nijhoff, 1980, pp. 417-435.

Rosen MR: The concept of afterdepolarizations. In: Rosen MR, Janse MJ, Wit AL (eds) Cardiac electrophysiology: a textbook. Futura, Mount Kisco, New York, 1990, pp 267-271.

Rubart M, Pressler ML, Pride HP, Zipes DP: Electrophysiological mechanisms in a canine model of erythromycin-associated long QT syndrome. Circulation 1993; 88: 1832-1844.

Salata JJ, Jurkiewicz NK, Wallace AA, Stupienski RF, Guinosso PJJr, Lynch JJ Jr: Cardiac electrophysiological actions of the histamine H1-receptor antagonists astemizole and terfenadine compared with chlorpheniramine and pyrilamine. Circ Res 1995; 76: 110-119.

Salata JJ, Jurkiewicz NK, Jow B, Folander K, Guinosso PJ, Raynor B, Swanson R, Fermini B: I_K of rabbit ventricle is composed of two currents: evidence for I_{Ks} . Am J Physiol 1996; 271: H2477-H2489.

Sanguinetti MC, Kass RS: Voltage-dependent block of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber by dihydropyridine calcium channel antagonists. Circ Res 1984; 55: 336-348.

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.

Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK: Delayed rectifier outward K⁺ current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. Am J Physiol 1991; 260: H393-H399.

Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK, Scott A, Siegl PKS: Isoproterenol antagonizes prolongation of refractory period by the class III antiarrhythmic agent E-4031 in guinea pig myocytes. Circ Res 1991; 68: 77-84.

Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK: Role of external Ca^{2+} and K^{+} in gating of cardiac delayed rectifier K^{+} currents. Pflügers Arch 1992; 420: 180-186.

Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT: A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. Cell 1995; 81: 299-307.

Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spectror PS, Atkinson DL, Keating MT: Coassembly of KvLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac IKs potassium channel. Nature 1996; 384: 80-83.

Sato R, Koumi S, Singer DH: Amiodarone blocks the inward rectifier channel in isolated guinea-pig ventricular cells. J Pharmacol Exp Ther 1994; 269: 1213-1219.

Scamps F, Carmeliet E: Delayed K⁺ current and external K⁺ in single cardiac Purkinje cells. Am J Physiol 1989; 257: C1086-C1092, 1989.

Schoenenberger RA, Haefeli WE, Weiss P: Association in intraveneous erythromycin and potentially fatal tachycardia with Q-T prolongation. Br Med J 1990; 300: 1375-1376.

Schwartz PJ, Priori SG, Locati EH, Napolitano C, Cantu F, Towbin JA, Keating MT, Hammoude H, Brown AM, L-S Chen, Colatsky TJ: Long QT syndrome patients with mutations of the SCN5A and HERG genes have differential responses to Na+ channel blockade and to increase in heart rate. Circulation 1995; 92: 3381-3386.

Shibata EF, Drury T, Refsum H, Aldrete V, Giles W: Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium. Am J Physiol 1989; 257: H1773-H1781.

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.

Shimizu W, Antzelevitch C: Cellular basis for the ECG features of the LQT1 form of the long-QT syndrome. Circulation 1998; 98: 2314-2322.

Shimoni Y, Clarck RB, Giles WR: Role of an inwardly rectifying potassium current in rabbit ventricular action potential. J Physiol (Lond) 1992; 448: 709-727.

Shorofsky SR, January CT: L- and T-type Ca^{2+} channels in canine cardiac Purkinje cells. Single-channel demonstration of L-type Ca^{2+} window current. Circ Res 1992; 70: 456-464.

Sicouri S, Antzelevitch C: A subpopulation of cells with unique electrophysiological properties in the deep subepicardium of the canine ventricle. The M cell. Circ`Res 1991; 68: 1729-1741.

Sicouri S, Antzelevitch C: Drug-induced afterdepolarizations and triggered activity occur in a discrete subpopulation of ventricular muscle cells (M cells) in the canine heart: quinidine and digitalis. J Cardiovasc Electrophysiol 1993; 4: 48-58.

Sicouri S, Fish J, Antzelevitch C: Distribution of M cells in the canine ventricle. J Cardiovasc Electrophysiol 1994; 5: 824-837.

Sicouri S, Quist M, Antzelevitch C: Evidence for the presence of M cells in the guinea pig ventricle. J Cardiovasc Electrophysiol 1996; 7: 503-511.

Sieglebaum SA, Tsien RW: Calcium-activated transient outward current in calf cardiac Purkinje fibres. J Physiol (Lond) 1980; 299: 485-506.

Simons FR, Kesselman MS, Giddins NG, Pelech AN, Simons KJ: Astemizoleinduced torsade de Pointes. Lancet 1988; 2: 624.

Singh BN, Jewitt DE: Beta-adrenergic receptor blocking drugs in cardiac arrhythmias. Drugs 1974; 7: 426-461.

Sipido K, Callewaert G, Carmeliet E: $[Ca^{2+}]i$ transients and $[Ca^{2+}]i$ -dependent chloride current in single Purkinje cells from rabbit heart. J Physiol (Lond) 1993; 468: 641-667.

Spectror PS, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti MC: Class III antiarrhythmic drugs block HERG, a human cardiac delayed rectifier K^+ channel. Open-channel block by Methanesulfonanilides. Circ Res 1996a; 78: 499-503.

Spectror PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC: Fast inactivation causes rectification of the I_{Kr} channel. J Gen Physiol 1996b; 107: 611-619.

Stratmann HG, Kennedy HL: Torsades de pointes associated with drugs and toxins: Recognition and magnagement. Am Heart J 1987; 113: 1470-1482.

Surawicz B: Electrophysiological substrate of torsade de pointes: dispersion of repolarization or earlyafterdepolarizations?. J Am Coll Cardiol 1989; 14: 172-182.

Surawicz B: U wave: Facts, hypothesis, misconceptions, and misnomers. J Cardiovasc Electrophysiol 1998; 9: 1117-1128.

Symansky JD, Gettes LS: Drug effects on electrocardiogram. A review of their clinical importance. Drugs 1993; 46(2): 219-248.

Szabo B, Sweidan R, Rajagopalan CV, Lazzara R: Role of Na⁺:Ca²⁺ exchange current in Cs⁺-induced early afterdepolarizations in Purkinje fibers. J Cardiovasc Electrophysiol 1994; 5: 933-945.

Tande PM, Bjornstad H, Yang T, Refsum H: Rate-dependent class III antiarrhythmic action, negative chronotropy, and positive inotropy of a novel iK blocking drug, UK-68,798: potent in guinea pig but no effect in rat myocardium. J Cardiovasc Pharmacol 1990; 16: 401-410.

Tande PM, Mortensen E, Refsum H: Rate-dependent differences in dog epi- and endocardial monophasic action potential configuration in vivo. Am J Physiol 1991; 261: H1387-H1391.

Tohse N, Kameyama M, Sekiguchi K, Shearman ME, Kanno M: Protein kinase C activation enhances the delayed rectifier potassium current in guinea pig heart cells. J Mol Cell Cardiol 1990a; 22: 725-734.

Tohse N, Nakaya H, Hattori Y, Endou M, Kanno M: Inhibitory effect mediated by alpha1-adrenoceptors on transient outward current in isolated rat ventricular cells. Pfügers Arch 1990b; 415: 575-581.

The Sicilian Gambit. A new approach to the classification of antiarrhythmic drugs based on their actions on arrhythmogenic mechanisms. Circulation 1991; 84: 1831-1851.

Thomas SHL: Drugs, QT interval abnormalities and ventricular arrhythmias. Adv Drug Reac Toxicol Rev 1994; 13: 77-102.

Tsai WC, Tsai LM, Chen JH: Combined use of astemizole and ketoconazole resulting in torsades de pointes. J For Med Ass 1997; 96: 144-146.

Tseng GN, Boyden PA: Multiples types of Ca^{2+} currents in single canine Purkinje cells. Circ Res 1989; 65: 1735-1750.

Tseng GN, Hoffman BF: Two components of transient outward current in canine ventricular myocytes. Circ Res 1989; 64: 633-647.

Tsien RW, Hess P, Nilius B: Cardiac calcium currents at the level of single channels. Experientia 1987; 43: 1169-1172.

Tzivoni D, Keren A, Cohen AM, Loebel H, Zahavi I, Chenzbraun A, Stern S: Magnesium therapy for Torsades de Pointes. Am J Cardiol 1984; 53: 528-530.

Vandenberg CA, Horn R: Inactivation viewed through single sodium channels. J Gen Physiol 1984; 84: 535-564.

Varro A, Elharrar V, Surawicz B: Frequency-dependent effects of several class I antiarrhythmic drugs on Vmax of action potential upstroke in canine cardiac Purkinje fibers. J Cardiovasc Pharmacol 1985; 7: 482-492.

Varro A, Nanasi PP, Lathrop DA: Voltage-clamp characteristics of ventricular myocyes in rabbit. Cardioscience 1991; 2: 233-243.

Vassalle M, Mugelli A: An oscillatory current in sheep cardiac Purkinje fibers. Circ Res 1981; 48: 618-631.

Vassort G, Alvarez J: Cardiac T-type calcium currents: Pharmacology and roles in cardiac tissues. J Cardiovasc Electrophysiol 1994; 5: 376-393.

Vaughan-Williams EM: Classification of antiarrhythmic drugs. In Sandoe E, Flenstedjensen E, Olsen K, eds: Cardiac arrhythmias. Sodertalje. Sweden. Astra; 1970: 449-473.

Vaughan-Williams EM: Classification of antidysrhythmic drugs. Pharmacol Ther 1975; 1: 115-138.

Veldkamp MW, van Ginneken AC, Bouman LN: Single delayed rectifier channels in the membrane of rabbit ventricular myocytes. Circ Res 1993; 72: 865-878.

Verduyn SC, Vos MA, Van Der Zande J, Kulcsar A, Wellens HJ: Further observations to elucidate the role of interventricular dispersion of repolarization and early afterdepolarizations in the genesis of acquired Torsades de Pointes arrhythmias. J Am Coll Cardiol 1997a; 30: 1575-1584.

Verduyn SC, Vos MA, van Der Zande J, van der Hulst FF, Wellens HJ: Role of interventricular dispersion of repolarization in acquired torsade-de-pointes arrhythmias: reversal by magnesium. Cardiovasc Res 1997b; 34: 453-463.

Villain E, Kanacher J, Le Bidois J, Guyon P, Bonnet D, Granier M, Grevisse C, Lucet P: Partial atriventricular block and prolonged QT interval in 4 premature infants receiving diphemanil. Arch Fr Pediatr 1990; 47: 33-35.

Vos MA, Verduyn SC, Gorgels APM, Lipcsei GC, Wellens HJJ: Reproductible induction of early afterdepolarizations and torsade de pointes arrhythmias by d-sotalol and pacing in dogs with chronic atrioventricular block. Circulation 1995; 91: 864-872.

Waldo AL, Camm AJ, deRuyter H, Friedman PL, Mac Neil DJ, Pauls JF, Pitt B, Pratt CM, Schwartz PJ, Veltri EP: Effects of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. Lancet 1996; 348: 7-12.

Walsh KB, Kass RS: Distinct voltage-dependent regulation of a heart-delayed I_K by protein kinases A and C. Am J Physiol 1991; 261: C1081-C1090.

Wang Z, Fermini B, Nattel S: Delayed rectifier outward current and repolarization in human atrial myocytes. Circ Res 1993a; 73: 276-285.

Wang Z, Fermini B, Nattel S: Sustained depolarisation-induced outward current in human atrial myocytes: evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. Circ Res 1993b; 73: 1061-1076.

Wang Z, Fermini B, Nattel S: Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. Cardiovasc Res 1994a; 28: 1540-1546.

Wang Z, Feng J, Nattel S: Class III antiarrhythmic drug action in experimental atrial fibrillation. Differences in reverse use-dependence and effectiveness between *d*-sotalol and the new antiarrhythmic drug ambasilide. Circulation 1994b; 90: 2032-2040.

Wang Z, Fermini B, Feng J, Nattel S: Role of chloride currents in repolarizing rabbit atrial myocytes. Am J Physiol 1995b; 268: H1992-H2005.

Wang Q, Shen J, Splanski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT: SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. Cell 1995c; 80: 805-811.

Wang Q, Curran ME, Splawski I: Positional cloning of a novel potassium channel gene: KvLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. Nat Genet 1996; 12: 17-23.

Wang DW, Yazawa K, Makita N, George AL. Jr, Bennett PB:Pharmacological targeting of long QT mutant sodium channels. J Clin Invest 1997; 99: 1714-1720.

Ward OC: A new familial cardiac syndrome in children. J Irish Med Ass 1964; 54: 103-106.

Warmke JW, Ganetzki B: A family of potassium channel genes related to eag in drosophila and mammals. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 3438-3442.

Watanabe Y, Toda H: The U wave and aberrant intraventricular conduction: further evidence for the Purkinje repolarization theory on the genesis of the U wave. Am J Cardiol 1978; 41: 23-31.

Weirich J, Bernhardt R, Loewen N, Wenzel W, Antoni H: Regional- and species dependent effects of K+ channel blocking agents on subedocardium and mid-wall slices of human, rabbit, and guine pig myocardium. (abstract). Pflugers Arch 1996; 431: R130.

Weissenburger J, Davy JM, Chezalviel F, Ertzbischoff O, Poirier JM, Engel F, Lainée P, Penin E, Motté G, Cheymol G: Arrhythmogenic activities of antiarrhythmic drugs in conscious hypokalemic dogs with atrioventricular block: comparison between quinidine, lidocaine, flecainide, propranolol and sotalol. J Pharmacol Exp Ther 1991; 259: 871-883.

Wettwer E, Grundke M, Ravens U: Differential effects of the new class III antiarrhythmic agents almokalant, E-4031 and d-sotalol, and of quinidine, on delayed rectifier currents in guinea pig ventricular myocytes. Cardiovasc Res 1992; 26: 1145-1152.

Wit AL: Cardiac arrhythmias: Electrophysiologic mechanism. In Reiser HJ, Horowitz LN, eds: *Mechanism and treatment of cardiac arrhythmias; relevance of basic studies to clinical management*. Urban & Schwarzenberg, Inc., Baltimore, MD, 1985, pp. 11-37.

Wit AL, Rosen MR: Afterdepolarizations and triggered activity. In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, eds. The heart and the cardiovascular system. New York: Raven Press, 1986: 1449-1490.

Yang T, Snyders DJ, Roden DM: Rapid inactivation determines the rectification and $[K^+]_o$ dependence of the rapid component of the delayed rectifier K^+ current in cardiac cells. Circ Res 1997; 80: 782-789.

Yue DT, Marban E: A novel cardiac potassium channel that is active and conductive at depolarized potentials. Pflügers Arch 1988; 413: 127-133.

Zabel M, Hohnloser SH, Behrens S, Li Y-G, Woosley RL, Franz MD: Electrophysiologic features of Torsades de Pointes: Insights from a new isolated rabbit heart model. J Cardiovasc Electrophysiol 1997; 8: 1148-1158.

Zehender M, Hohnloser S, Just H: QT-interval prolonging drugs: mechanisms and clinical relevance of their arrhythmogenic hazards. Cardiovasc Drugs and Ther 1991; 5: 515-530.

Zhang Z, Follmer CH, Sarma JSM, Chen F, Singh BN: Effects of ambasilide, a new class III agent, on plateau currents in isolated guinea pig ventricular myocytes: Block of delayed outward potassium current. J Pharmacol Exp Ther 1992; 263: 40-48.

Zipes DP: Proarrhythmic effects of antiarrhythmic drugs. Am J Cardiol 1987; 59: 26E-31E.

Zipes DP, Jalife J (Eds): Cardiac electrophysiology: from cell to bedside, W.B. Saunders, Philadelphia, 1991.

Zygmunt AC, Gibbons WR: Calcium-activated chloride current in rabbit ventricular myocytes. Circ Res 1991; 68: 424-437.

Zygmunt AC, Gibbons WR: Properties of the calcium-activated chloride current in heart. J Gen Physiol 1992; 99: 391-414.

Zygmunt AC, Robitelle DC, Eddlestone GT: Ito1 dictates behavior of ICl(Ca) during early repolarisation of canine ventricle. Am J Physiol 1997; 273: H1096-H1106.

