

Université de Montréal

**Étude des œstrogènes sur la repolarisation cardiaque et
de la grossesse sur l'électrocardiographie chez la souris**

par

Gracia El Gebeily

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en Sciences Pharmaceutiques
option Pharmacologie

Juin, 2013

© Gracia El Gebeily, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Étude des oestrogènes sur la repolarisation cardiaque et
de la grossesse sur l'électrocardiographie chez la souris

présentée par :
Gracia El Gebeily

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Daniel Lévesque, président-rapporteur
Dr. Céline Fiset, directrice de recherche
Dr. Lucie Parent, membre du jury
Dr. Eric Rousseau, examinateur externe
Dr. Michèle Brochu, représentante du doyen de la FES

Résumé

Le tamoxifène, un modulateur sélectif des récepteurs oestrogéniques, est un médicament largement utilisé depuis plus de vingt ans pour le traitement et la prévention du cancer du sein. Plusieurs études ont rapporté que l'administration aiguë du tamoxifène pouvait réduire certains courants K^+ cardiaques. Cette observation suggère que les femmes traitées de façon chronique avec le tamoxifène risquent d'avoir une prolongation de leur intervalle QT, favorisant ainsi le développement de torsades de pointes. Puisque *in vivo*, le tamoxifène est largement métabolisé et son effet est attribué à celui du 4hydroxy-tamoxifène (4OH-tamoxifène), nous avons d'abord vérifié si les effets du tamoxifène sur la repolarisation pouvaient être dus au 4OH-tamoxifène. À l'aide de la méthode de patch-clamp, nous avons étudié l'effet aigu du 4OH-tamoxifène sur les courants K^+ présents au niveau ventriculaire chez la souris femelle. En premier lieu, nous avons démontré que les souris traitées avec le 4OH-tamoxifène présentaient une diminution des courants K^+ comparativement aux souris intactes. Fait intéressant, le prétraitement des myocytes avec l'antagoniste des récepteurs oestrogéniques, le ICI 182,780, ou l'inhibiteur de la synthèse protéique, l'actinomycine D, n'a pas modifié les effets du 4OH-tamoxifène. Ces résultats suggèrent que les effets du 4OH-tamoxifène sur les courants potassiques ne soient pas liés à la transcription génomique et n'implique pas les récepteurs aux œstrogènes.

Bien que l'administration aiguë du 4OH-tamoxifène diminue les courants K^+ cardiaques, l'absence de troubles au niveau du rythme cardiaque chez les femmes traitées à long terme exclu la possibilité de conclure que le traitement chronique avec le tamoxifène augmente la durée de l'intervalle QT. L'accès à des souris femelles et des cobayes nous a permis de démontrer que contrairement au traitement en aigu, les courants et les canaux K^+ cardiaques sont augmentés en chronique. Les oestrogènes associés à une diminution des courants K^+ d'une part et nos résultats obtenus avec le tamoxifène d'autre part suggèrent qu'en bloquant les récepteurs oestrogéniques, le tamoxifène puisse prévenir les effets inhibiteurs des oestrogènes sur les courants K^+ . Cette association œstrogènes- tamoxifène- récepteurs oestrogéniques et courants K^+ nous a encouragées à approfondir encore nos études et vérifier l'influence des hormones sexuelles féminines sur la repolarisation ventriculaire.

Une troisième étude a été ainsi réalisée chez des souris femelles ovariectomisées et des souris déficientes en récepteurs oestrogéniques α ou β afin de vérifier le rôle des oestrogènes et des récepteurs oestrogéniques sur la repolarisation ventriculaire. Nos résultats ont révélé clairement que l'absence des oestrogènes entraîne une augmentation de la densité du courant K^+ transitoire indépendant du Ca^{2+} (I_{to}) et de l'expression du canal $Kv4.3$ et ces effets sont médiés par les $RE\alpha$. Ces données soutiennent davantage notre conclusion que l'inhibition des récepteurs oestrogéniques est responsable de l'augmentation des courants/canaux K^+ et suggèrent fortement qu'ils jouent un rôle dans la régulation de la repolarisation ventriculaire. Elles soulignent aussi l'importance de vérifier le statut hormonal des animaux utilisés pour des études touchant l'électrophysiologie cardiaque.

Dans la dernière partie de cette thèse nous avons vérifié les effets de la grossesse et du système nerveux autonome sur les différents paramètres électrocardiographiques et plus particulièrement sur le rythme cardiaque chez la souris. Nos données ont montré que, comme chez la femme enceinte, la grossesse est associée à une augmentation du rythme cardiaque. De plus, l'augmentation des niveaux des hormones féminines pourrait affecter l'automatisme et l'activité électrique cardiaque. Ces différentes études ont augmenté les connaissances sur la régulation hormonale de l'électrophysiologie cardiaque et aideront aux avancements des recherches chez les femmes.

Mots clés: tamoxifène, œstrogène, récepteurs aux estrogènes, électrophysiologie, repolarisation, grossesse, arythmie.

Abstract

Tamoxifen is a selective estrogen receptor modulator widely used in the treatment and prevention of breast cancer from more than 20 years. Other studies have reported that acute exposure to tamoxifen can reduce cardiac K^+ currents. However, in vivo tamoxifen is largely metabolized and most of its activity is attributable to its major metabolite, 4-hydroxytamoxifen (4OH-tamoxifen). In our first study, we investigated the acute effects of 4OH-tamoxifen on cardiac K^+ currents in mice. Using the patch-clamp technique, we found that, as with tamoxifen, short-term exposure to 4OH-tamoxifen reduced K^+ currents in the mouse ventricle even in the presence of the selective oestrogen receptor antagonist, ICI-182,780, or the inhibitor of RNA synthesis, actinomycin D. These results suggest an inhibition independent of the intracellular oestrogen receptor and the protein synthesis.

However, women receiving long-term tamoxifen therapy do not experience cardiac arrhythmias although acute perfusion of tamoxifen has been shown to inhibit cardiac K^+ currents. This observation suggests that chronic tamoxifen treatment does not negatively modulate cardiac K^+ currents. Therefore, in order to investigate the absence of cardiac arrhythmias in women, we examined the effects of long term tamoxifen therapy associated with low level of estrogen on ventricular K^+ currents and channels expressed in mouse and guinea pig heart. Female mice and guinea pigs were treated with placebo or tamoxifen pellets for 60 days. Our results show an increase of the densities of K^+ currents and the expression of their channels. Conditions with high oestrogen levels are associated with reduced K^+ currents both in the heart and the uterus. Thus, conceivably, tamoxifen might prevent the inhibitory effects of oestrogen on K^+ channels by blocking the oestrogen receptors, which would explain the reported increase in K^+ currents. These findings could contribute to explain the absence of cardiac arrhythmia with long-term tamoxifen therapy. These association estrogen- tamoxifen and estrogen receptor lead us to study the influence of estrogens and estrogen receptors on ventricular repolarization. Accordingly, we assessed the involvement of estrogens and ER on K^+ currents in mouse using ovariectomised (OVX), ER α -knockout (ERKO α) or ER β -knockout (ERKO β) female mice. These experiments show that the absence of estrogen is associated with an increase of the density of the Ca^{2+} -independent transient outward, I_{to} , the mRNA and protein expression of Kv4.3. These results

obtained with ERKO mice suggest that estrogens regulate ventricular repolarization and ER α mediates this effect.

The last part of this thesis was to determine whether pregnancy elicits a change in the heart rate in mice and whether pregnancy-related changes are due to the cardiac conduction system rather than a change in autonomic tone. Our results revealed that pregnancy accelerates the resting heart rate and the AV node conduction time in the presence and absence of autonomic nervous system input suggesting an intrinsic mechanism. Moreover, Hormonal changes that occur during pregnancy are likely to be involved in these adaptations of the heart to pregnancy. These studies provide a new insight to understand the hormonal regulation of cardiac electrophysiology.

Key words: tamoxifen, estrogen, estrogen receptor, electrophysiology, repolarization, pregnancy, arrhythmia.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xv
Remerciements.....	xix
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Fonctionnement électrique.....	1
1.2 L'électrocardiographie.....	1
1.2.1 L'intérêt de l'ECG.....	4
1.3 Les phases du potentiel d'action ventriculaire humain.....	5
1.3.1 Rôle du potentiel d'action.....	6
1.3.2 Modifications pathologiques du potentiel d'action.....	7
1.3.3 Relation entre l'ECG, le potentiel d'action et les courants ioniques.....	11
1.4 Syndrome du LQT.....	11
1.4.1 Définitions des torsades de pointes.....	12
1.4.2 Les paramètres électrophysiologiques caractéristiques des torsades de pointes...	12
1.4.3 Facteurs de risque des torsades de pointes.....	13
1.5 Les courants potassiques.....	14
1.5.1 Courants potassiques et repolarisation.....	14
1.5.2 Canaux K^+ voltage-dépendants.....	15
1.6 Profil cardiovasculaire distinct de la femme.....	21
1.7 Les oestrogènes.....	21
1.7.1 Synthèse et sécrétion.....	21
1.7.2 Rôle des oestrogènes.....	23
1.7.3 Récepteurs oestrogéniques.....	24
1.7.4 Mécanisme d'action des oestrogènes.....	28

1.7.5 Mécanisme des effets induits par les oestrogènes.....	30
1.8 Importance des hormones sexuelles dans la régulation de l'électrophysiologie cardiaque.....	32
1.8.1 Historique.....	32
1.8.2 Différence reliée au sexe au niveau de l'ECG.....	34
1.8.3 Rôle des hormones sexuelles dans l'électrophysiologie cardiaque : études cliniques et expérimentales.....	34
1.9 Choix des différents modèles de souris pour étudier les effets des oestrogènes au niveau cardiaque.....	44
1.9.1 Les souris ovariectomisées (OVX).....	44
1.9.2 Le tamoxifène.....	44
1.9.3 Le modèle ERKO.....	44
1.9.4 La grossesse.....	45
1.10 Justification de l'étude.....	46
1.10.1 Œstrogène et repolarisation.....	46
1.10.2 Œstrogène et rythme cardiaque.....	48
Chapitre 2 Étude des effets aigus du 4OH-tamoxifène sur les courants K^+ chez la souris...	50
2.1 Avant-propos.....	51
2.1.1 Introduction.....	51
2.1.2 Contribution des auteurs.....	51
2.2 Article.....	52
2.2.1 Résumé / Abstract.....	53
2.2.2 Introduction.....	55
2.2.3 Material and methods.....	56
2.2.4 Results.....	59
2.2.5 Discussion.....	62
2.2.6 References.....	66
2.2.7 Figures/Figures legends.....	71
3.1 Avant-Propos.....	86
3.1.1 Introduction.....	86
3.1.2 Contribution des auteurs.....	86

3.2 Article.....	87
3.2.1 Résumé / Abstract.....	88
3.2.3 Methods.....	91
3.2.4 Results.....	92
3.2.5 Discussion.....	96
3.2.6 References.....	100
3.2.7 Figures / Figures legend.....	106
Chapitre 4 La régulation de la repolarisation ventriculaire par les oestrogènes et les récepteurs oestrogéniques chez la souris.....	118
4.1 Avant propos.....	119
4.1.1 Introduction.....	119
4.1.2 Contribution des auteurs.....	119
4.2 Article.....	120
4.2.1 Résumé / Abstract.....	121
4.2.2 Introduction.....	123
4.2.3 Material and methods.....	124
4.2.4 Results.....	125
4.2.5 Discussion.....	128
4.2.6 References.....	132
4.2.7 Figures/ Figures Legends.....	136
Chapitre 5 Modifications des paramètres électrocardiographiques chez la souris gestante	148
5.1 Avant-Propos.....	149
5.1.1 Introduction.....	149
5.1.2 Contribution des auteurs.....	149
5.2 Article.....	150
5.2.1 Résumé / Abstract.....	151
5.2.3 Methods.....	154
5.2.4 Results.....	156
5.2.5 Discussion.....	159
5.2.6 References.....	164
5.2.7 Figures / Figures legend.....	168

Chapitre 6	180
Discussion	180
6.1 Résumé des principaux résultats	180
6.1.1 Caractérisation de la repolarisation ventriculaire chez la souris après un traitement aigu au 4OH-tamoxifène	182
6.1.2 Caractérisation de la repolarisation ventriculaire chez la souris après un traitement chronique au tamoxifène	183
6.1.3 Caractérisation de la repolarisation ventriculaire chez les souris ovariectomisées	185
6.1.4 Caractérisation de la repolarisation ventriculaire chez les souris ERK α et ERK β	186
6.1.5 Étude des paramètres électrocardiographiques chez la souris gestante	190
6.2 Mise en lien de nos résultats dans un contexte physiologique	191
6.2.1 Les effets des oestrogènes	191
6.2.2 Les différences mâle-femelle	193
6.2.3 Oestrogènes, I _{to} et repolarisation	194
6.3 Impact de ces travaux	198
6.3.1 La ménopause	198
6.3.2 Importance de l'étude de la régulation de la repolarisation auriculaire	199
6.4 Perspectives	199
6.4.1 Suite des travaux sur l'effet aigu du 4OH-tamoxifène sur la repolarisation ventriculaire	200
6.4.2 Suite des travaux sur l'effet chronique du tamoxifène sur la repolarisation ventriculaire	200
6.4.3 Suite des travaux sur l'effet des récepteurs oestrogéniques sur la repolarisation ventriculaire	201
6.4.4 Suite des travaux sur la grossesse	204
6.5 Mécanisme d'action des œstrogènes aigu versus chronique	205
6.6 Commentaire final	207
Références	208

Liste des tableaux

Tableau I	Liste des médicaments associés à un risque élevé de torsades de pointes.....	9
Tableau II	Caractéristiques des différents types du syndrome du LQT congénital et des gènes associés	11
Tableau III	Facteurs de risque des torsades de pointes	14
Tableau IV	Les sous-unités α et β des canaux K^+ cardiaques.....	16
Tableau V	Les concentrations plasmatiques des oestrogènes.....	23

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1 La propagation de l'influx électrique dans le cœur	2
Figure 1.2 Terminologie de l'électrocardiographie chez l'humain.....	3
Figure 1.3 Les composantes du cycle cardiaque	4
Figure 1.4 Caractéristiques des différents types du syndrome du LQT congénital et des gènes associés	6
Figure 1.5 Relation entre l'intervalle QT, le potentiel d'action et les courants ioniques	11
Figure 1.6 Exemples d'enregistrement d'ECG d'un patient qui avait récemment commencé à recevoir le sotalol.....	13
Figure 1.7 Une représentation schématique du RE α	26
Figure 1.8 Représentation schématique des différentes voies de signalisation induites par les oestrogènes	33

Chapitre 2

Figure 2.2 Separation of K ⁺ currents adult mouse ventricular myocytes.....	72
Figure 2.2 Effects of 10 μ M of 4OH-tamoxifen on the total K ⁺ current (I _{peak}).....	74
Figure 2.3 Effects of 10 μ M of 4OH-tamoxifen on I _{Kslow}	76
Figure 2.4 Effects of 10 μ M of 4OH-tamoxifen on I _{to}	78
Figure 2.5 Effects of 10 μ M of 4OH-tamoxifen on I _{Kur} and I _{ss}	80
Figure 2.6 Comparison of steady state inactivation and recovery from inactivation of I _{to} and I _{Kur} between Ctl and 4OH-tamoxifen treated ventricular myocytes.....	82
Figure 2.7 Effects of 10 μ M of 4OH-tamoxifen on total K ⁺ currents in mouse ventricular myocytes in the presence of ICI 182,780 and actinomycin D	84

Chapitre 3

Figure 3.3 A-B. Total K^+ currents (I_{peak}) are markedly increased in tamoxifen treated mouse ventricular myocytes	107
C-D. The density of the calcium-independent transient outward current (I_{to}) is increased in tamoxifen treated mouse myocytes.....	107
Figure 3.2 A-B. Steady-state outward K^+ current (I_{ss}) in mouse ventricular myocytes is significantly increased with tamoxifen treatment	109
C-D. The ultrapid delayed rectifier K^+ current (I_{Kur}) increased in tamoxifen treated mouse myocytes	109
Figure 3.3 Steady-state inactivation of I_{to} and I_{Kur} in control and tamoxifen treated ventricular myocytes	111
Figure 3.4 Reactivation of I_{to} and I_{Kur} in control and tamoxifen treated ventricular myocytes	113
Figure 3.5 A-B. Ventricular protein expression of K^+ channels in control and tamoxifen treated mice	115
C. Shortening of APD with chronic tamoxifen treatment.....	115
Figure 3.6 K^+ channel protein expression in control and tamoxifen treated guinea pig ventricles	117

Chapitre 4

Figure 4.1 Effects of ovariectomy on I_{peak}	137
Figure 4.2 Effects of ovariectomy on I_{to}	139
Figure 4.3 Effects of ovariectomy on I_{Kur} and I_{ss}	141
Figure 4.4 Ventricular protein expression of K^+ channels in control and ovariectomized mice	143
Figure 4.5 Effects of ovariectomy on mRNA expression of K^+ channels	145
Figure 4.6 A. Ventricular mRNA expression of K^+ channels in control and ERKO α mice. B. Ventricular mRNA expression of K^+ channels in control and ERKO β mice.....	147

Chapitre 5

Figure 5.1 Surface ECGs on anesthetized mice reveal increased heart rate and shortening of PR interval during pregnancy	169
Figure 5.2 Pregnancy is associated with accelerated heart rate and reduced PR interval on Langendorff-perfused mouse hearts.....	171
Figure 5.3 Effect of isoproterenol on heart rate and PR interval is not affected by pregnancy	173
Figure 5.4 Effect of propranolol on heart rate and PR interval is not affected by pregnancy	175
Figure 5.5 Pregnancy increased the response of the heart rate to carbachol.....	177
Figure 5.6 The atropine sensitivity of the heart rate and PR interval is reduced during pregnancy.....	179

Liste des abréviations

α_1 -AR	: Le récepteur α_1 -adrénergique
α_{1B} -AR	: La souris transgénique surexprimant le récepteur α_{1B} -adrénergique au niveau cardiaque
AC	: Adénylate cyclase
ACT D	: Actinomycine D
AD	: Autosomique dominante
AF1	: Activation fonction 1
AMP	: Adénosine monophosphate
AKT	: Protéine kinase sérine/thréonine
AMPC	: AMP cyclique
APD	: Durée du potentiel d'action
AR	: Autosomique récessive
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: ARN messenger
ATP	: Adénosine triphosphate
AT1	: Récepteur de type 1 de l'angiotensine II
AT1R	: Souris transgénique surexprimant le récepteur de type 1 de l'angiotensine II au niveau cardiaque
BSA	: Albumine de sérum bovine
Ca ²⁺	: Calcique, calcium
Calm	: Calmoduline
Ca _v	: Canaux calciques dépendants du voltage
GMP	: Guanosine monophosphate
GMPc	: GMP cyclique
CTL	: Conditions contrôles
c-Src	: «Cellular Sarcoma»
DAG	: Diacylglycérol
DBD	: «DNA binding domain»
DHT	: Dihydrotestostérone
DPP6 ou DPPX	: «Diaminopeptidyl transferase-like protein 6»
E1	: Oestrone
E3	: Oestriol
EAD	: Trouble du rythme, dépolarisation secondaire précoce (Early after depolarization)
ECG	: Électrocardiogramme
eNOS	: Oxyde nitrique synthase endothéliale
ERE	: Éléments de réponse aux oestrogènes
ERG	: «Ether-à-go-go Related Gene » (sous-unité α du courant I _{Kr}) Aussi, hERG pour l'isoforme humaine
ERK	: «extracellular signal-related kinase»
ERKO	: Souris déficientes en RE
ERKO α	: Souris déficientes en RE α

ERKO β	: Souris déficientes en RE β
FC	: Fréquence cardiaque
GPR30/GPER-1	: Récepteurs couplés aux protéines G 30
GPCR	: Récepteurs couplés aux protéines G
HSP	: Protéines du choc thermique
I _{CaL}	: Le courant calcique lent de type L
ICI	: ICI 182,780
I _{Kr}	: Composante rapide des courants K ⁺ à rectification retardée (I _K)
I _{Ks}	: La composante lente des courants K ⁺ à rectification retardée (I _K)
I _{Kur}	: Le courant K ⁺ à rectification retardée ultra rapide (« ultra rapid delayed rectifier »)
I _{K1}	: Le courant K ⁺ à rectification entrante (« inward rectifier»)
I _{ss}	: Le courant K ⁺ sortant à l'équilibre (« steady-state »)
I _{to}	: Le courant K ⁺ transitoire sortant indépendant du Ca ²⁺ (« transient outward »)
I _{peak}	: Le courant K ⁺ total
IP ₃	: Inositol 1,4,5-triphosphate
ISO	: Isoprotérénol
JNK	: JN Kinase
JNL	: Syndromes de Jervell-Lange-Nielsen
K ⁺	: Potassique, potassium
KB	: Solution Kraft-Brühe
KChIP2	: K ⁺ channel-interacting proteins
Kir	: Canaux potassiques à rectification entrante
Kv	: Canaux potassiques dépendants du voltage
KvLQT1	: Sous-unité α du canal responsable du courant I _{Ks}
LBD	: Domaine de liaison au ligand
LQT	: Syndrome du long QT
MAPK	: Protéine kinase activée par facteur mitogène « Mitogen-activated protein kinase »
MeK	: Protéines kinase activées par le mitogène
MinK	: « minimal K ⁺ channel », sous-unité β du courant I _{Ks}
MirP-1	: « minimal K ⁺ channel related gene », sous-unité β du courant I _{Kr}
mM	: Millimolaire
ms	: Milliseconde
mV	: Millivolt
Na ⁺	: Sodique, sodium
NAV	: Noeud auriculo-ventriculaire
NaV	: Canaux sodiques dépendants du voltage
NFAT	: «Nuclear factor of activated T cell»
NO	: Oxyde nitrique
NS	: Nœud sinusal
O	: Oreillette
OVX	: Ovariectomie ou ovariectomisées
pA	: Picoampère
PI3	: Phosphatidylinositol 3

pF	: Picofarade
PKA	: Protéine kinase A
PKC	: Protéine kinase C
PLC	: Phospholipase C
P	: Purkinje
QT	: Intervalle QT
QTc	: Intervalle QT corrigé en fonction du rythme cardiaque
Raf-1	: MAPK, activée par voie des RAS
Ras	: Superfamille de petites protéine G, comprend plusieurs sousfamilles
RE	: Récepteurs aux œstrogènes
RE α	: Récepteurs aux œstrogènes alpha
RE β	: Récepteurs aux œstrogènes bêta
SERM	: Modulateurs sélectifs aux récepteurs aux œstrogènes
SNA	: Système nerveux autonome
TdP	: Torsades de pointes
V	: Ventricule
μ M	: Micromolaire
4-AP	: 4-aminopyridine
4OH-tamoxifen	: 4 hydroxytamoxifen
17 β -E2	: 17 β -oestradiol

*À celle qui m'a aidée et encouragée tout au long
de ce chemin, à Céline...*

Remerciements

Tout d'abord, mes chaleureux remerciements s'adressent à la personne qui m'a encadrée pendant toutes ces années d'étude : ma directrice de recherche, Dr Céline Fiset. Un grand merci pour sa disponibilité exceptionnelle et sa confiance en moi. Ses grandes qualités professionnelles, mais aussi humaines, son excellent esprit formateur, ses capacités à gérer toute situation m'ont permis d'aller de l'avant avec énergie et finir ce travail dans la reconnaissance et le courage.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Dr. Lucie Parent et Dr. Michèle Brochu, qui m'ont fait l'honneur d'être toujours présentes sur mes rencontres scientifiques ainsi que pour l'intérêt, les discussions et les commentaires dont elles ont toujours fait preuve.

Ma gratitude s'adresse à mes collègues du laboratoire avec lesquels j'ai travaillé, appris et qui m'ont aidé à répondre à beaucoup de questions pratiques, techniques, ou scientifiques, que je me suis posées. Plus particulièrement, merci à Katy, Scott, Sophie, Annie, Nathalie, Laurine et Nabil qui ont participé activement à mon doctorat par leur aide et leur soutien. Merci pour leur amitié précieuse!

Merci à toutes les personnes que j'ai eu la chance de connaître à l'Institut de cardiologie de Montréal. Merci à Marc-Antoine. G. et à Maya. M. pour leur aide, leur recommandation et leurs conseils toujours pertinents.

Mes chaleureux remerciements à mes parents, à mon mari et à ma petite Serena qui m'ont soutenu et m'ont encouragé tout au long de ces années de travail.

Chapitre 1 : Introduction

Cette section présente le fonctionnement électrique du cœur, puis, de manière plus détaillée, le principe de l'électrocardiogramme (ECG).

1.1 Fonctionnement électrique

La contraction du cœur est déclenchée par la propagation de l'influx électrique le long des fibres musculaires cardiaques et ceci suite à la dépolarisation des cellules du myocarde. Au niveau cardiaque, la dépolarisation prend naissance dans le nœud sinusal de Keith et Flack ou nœud sino-auriculaire situé dans l'oreillette droite. L'impulsion se propage ensuite dans les deux oreillettes induisant la dépolarisation auriculaire et la contraction qui s'en suit (Figure 1.1). L'influx électrique atteint par la suite le nœud d'Aschoff-Tawara ou nœud auriculo-ventriculaire (NAV), situé entre les oreillettes et les ventricules. Ce nœud de tissu spécialisé constitue le seul point de passage entre ces deux structures. C'est ici que l'onde de dépolarisation va subir un court retard de 0,07 seconde, ce qui laisse le temps nécessaire pour que la contraction des oreillettes s'achève et permet au sang de s'écouler dans les ventricules. L'impulsion électrique passe ensuite dans le faisceau de His, qui se divise en deux branches principales puis se ramifie pour former le réseau de Purkinje. Grâce à leur conduction rapide, le faisceau de His et les fibres de Purkinje, transmettent l'impulsion électrique aux cellules ventriculaires, et permettent ainsi une dépolarisation quasi instantanée de l'ensemble du muscle ventriculaire et la propulsion du sang.¹ Une fois la contraction terminée, les cellules retournent au repos et se repolarisent.

1.2 L'électrocardiographie

L'électrocardiogramme (ECG) enregistre l'activité électrique cardiaque générée lors de chacun des battements cardiaques. Cet enregistrement est effectué à l'aide des électrodes

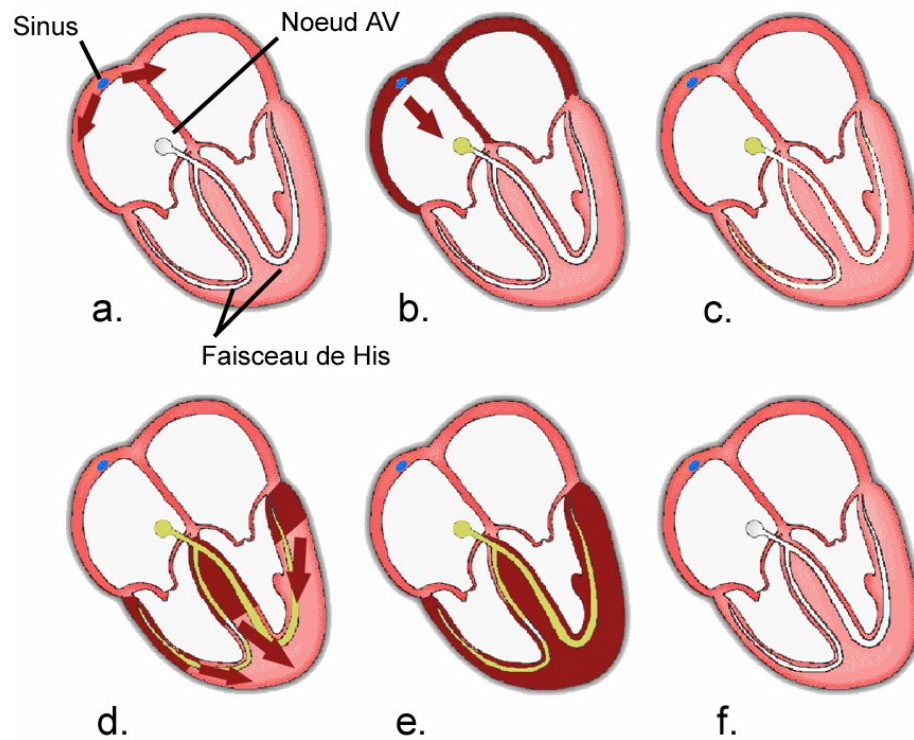


Figure 1.1: La propagation de l'influx électrique dans le cœur. Elle prend naissance dans le nœud sinusal (a) passe dans les oreillettes (b) puis dans le nœud auriculo-ventriculaire. Un court délai se passe (c) juste avant la propagation de l'impulsion électrique dans le faisceau de His et enfin dans (d) les ventricules (e) entraînant la dépolarisation et la repolarisation ventriculaire (f). Le cycle cardiaque est alors complété et le cœur est prêt pour un nouveau battement. Adapté de: <http://hal.archives-ouvertes.fr/docs/00/50/33/24/PDF/Chapitre1.pdf>

placés sur la peau, généralement sur chaque bras et chaque jambe ainsi que sur la poitrine. Cette technique permet d'enregistrer l'onde électrique qui traverse le cœur et d'étudier le fonctionnement des différentes cellules cardiaques: les cellules du nœud sinusal et du nœud atrio-ventriculaire, des oreillettes et des ventricules. Ces cellules qui, une fois excitées, sont capables d'engendrer des événements électriques appelés potentiels d'action. C'est en fait la différence de voltage induite par les potentiels d'action qui est captée par l'ECG. Ce dernier est formé par la succession de plusieurs cycles cardiaques. Chaque cycle cardiaque, ou battement, est formé par la succession de plusieurs ondes électriques et correspond à la période de temps compris entre le début d'un battement cardiaque et le début du battement

suisant (Figure 1.2). Le nombre de cycle cardiaque par minute correspond à la fréquence cardiaque.

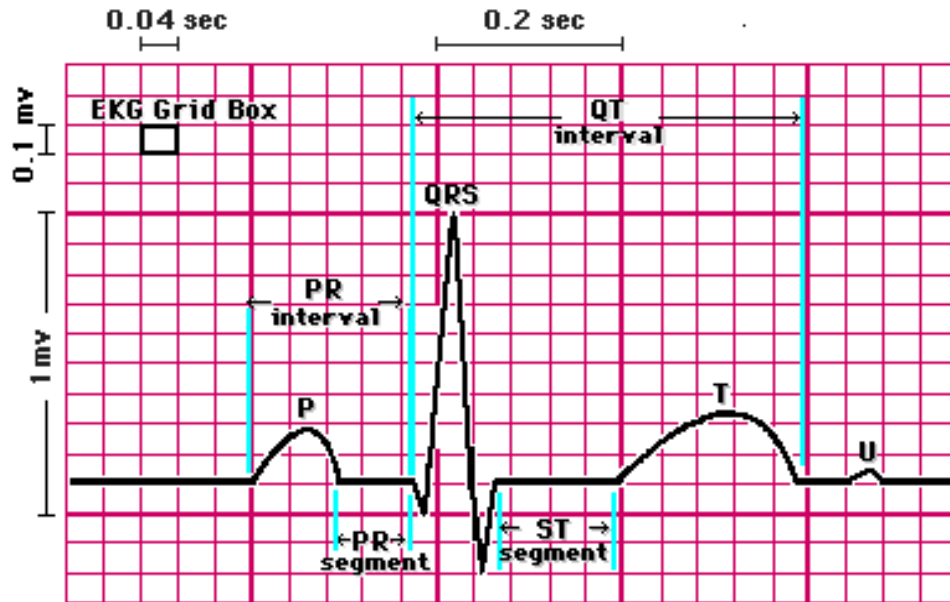


Figure 1.2: Terminologie de l'électrocardiographie chez l'humain. Tiré de: http://cal.vet.upenn.edu/lgcardiac/ecg_tutorial/qrsinterval.htm

Pour qu'il y ait contraction ou relâchement, les cellules cardiaques doivent subir des modifications électriques. Comme on vient de le décrire, l'influx électrique commence au niveau du nœud sinusal mais l'onde correspondante n'est pas visible sur l'ECG. L'onde électrique arrive ensuite aux oreillettes entraînant leurs dépolarisations et trace une onde positive sur l'ECG de 0.08 seconde: l'onde P qui marque le début de chaque cycle cardiaque (Figure 1.3a). L'impulsion arrive après au nœud auriculo-ventriculaire où se produit une courte pause formant le segment PR. Ce segment correspond au temps que met l'influx d'origine sinusale qui a dépolarisé les oreillettes à franchir le nœud AV et le faisceau de His. L'intervalle PR est le temps nécessaire à l'influx pour dépolariser les oreillettes puis franchir le nœud auriculo-ventriculaire et le faisceau de His. Il correspond au temps de conduction auriculo-ventriculaire et il est de 0.12 à 0.23 seconde. Arrivant au niveau des ventricules, cette onde va entraîner la dépolarisation ou la contraction des ventricules et tracer sur l'ECG une succession de trois ondes (Q, R et S) constituant le

complexe QRS (Figure 1.3b). L'onde Q est la première: c'est une onde négative, le second est l'onde R: elle est de grande amplitude et positive; la dernière est négative: c'est l'onde S. Ce complexe dure normalement 0.08 seconde. Après, vient l'onde T qui correspond à la phase de repolarisation des cellules ventriculaires (Figure 1.3c). Sa durée moyenne est de 0.16 seconde. Enfin, l'intervalle QT (0.36 seconde) qui correspond au temps nécessaire à la repolarisation ventriculaire et reflète la durée des potentiels d'actions ventriculaires. C'est l'indice de la repolarisation ventriculaire.²⁻⁴

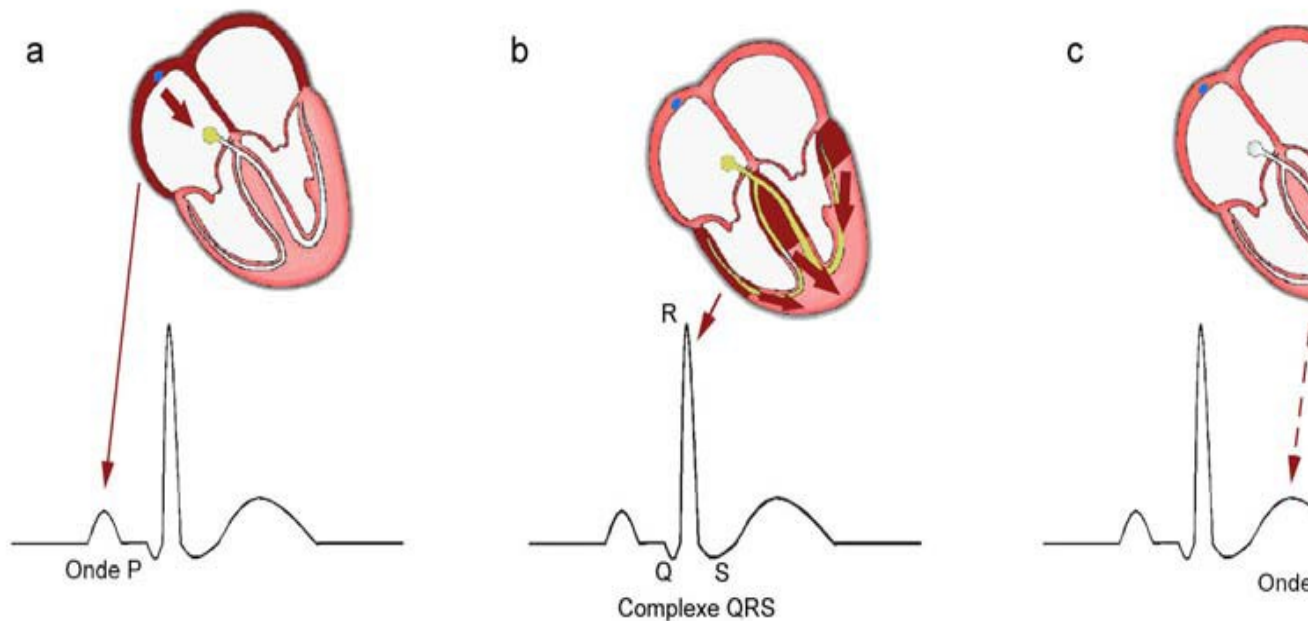


Figure 1.3: Les composantes du cycle cardiaque. La dépolarisation des oreillettes correspond à une onde positive: l'onde P (a). Elle est suivie d'un court délai au niveau du NAV. La dépolarisation ventriculaire est représentée par le complexe QRS (b). L'onde T correspond à la repolarisation ventriculaire (c). Adapté de: <http://hal.archives-ouvertes.fr/docs/00/50/33/24/PDF/Chapitre1.pdf>

1.2.1 L'intérêt de l'ECG

La mesure des amplitudes et des durées des ondes électriques permet de vérifier que l'influx électrique prend naissance dans le nœud sinusal et que l'impulsion électrique se fait sans aucun ralentissement, ni retard ou accélération et de déterminer si l'activité électrique est normale, rapide, lente ou irrégulière. Il permet aussi de dépister des problèmes

cardiaques, comme un infarctus du myocarde, des arythmies, une obstruction des artères coronaires et de diagnostiquer l'hypertrophie cardiaque, les cardiomyopathies, l'inflammation du péricarde (péricardite) ou même l'absence de dépolarisation dans certaines zones suite à une nécrose. Les accélérations (tachycardies) ou les ralentissements (bradycardies) anormales du rythme cardiaque sont aussi détectées par l'ECG.

1.3 Les phases du potentiel d'action ventriculaire humain

Au repos, le potentiel membranaire de la cellule cardiaque est de -90 millivolts (mV). C'est l'état de polarisation de la cellule. Une fois la membrane cellulaire excitée, elle va engendrer un potentiel d'action. Par définition, le potentiel d'action est une modification dans la distribution des charges ioniques entre l'extérieur et l'intérieur de la membrane cellulaire. Cette modification correspond à l'enchaînement de la dépolarisation puis la repolarisation cellulaire. Sur le tracé d'enregistrement d'un potentiel d'action, on peut distinguer cinq phases de la phase 0 à la phase 4 (figure 1.4).

La phase 0: C'est la phase de dépolarisation rapide. Le potentiel intracellulaire de la membrane passe de sa valeur négative de repos (-90 mV) à une valeur positive (+30 mV). Dans les cellules myocardiques ventriculaires, la phase 0 est très accentuée: Elle est due à l'ouverture des canaux Na^+ qui laissent entrer massivement du Na^+ dans la cellule, ce qui la dépolarise.¹ Cette période est très brève car l'inactivation des canaux sodiques est très rapide et s'effectue en moins de 20 ms.

La phase 1: C'est la phase de repolarisation rapide précoce. C'est une courte période de repolarisation qui suit la dépolarisation et l'inversion du potentiel intracellulaire qui est devenu positif. Après l'inactivation du courant entrant sodique rapide, cette phase 1 résulte de l'activation du courant K^+ transitoire sortant indépendant du Ca^{2+} (I_{to}).¹

La phase 2: C'est la phase du plateau du potentiel d'action. Elle correspond à une repolarisation lente qui peut durer plusieurs centaines de millisecondes. Les courants Ca^{2+} lents de type L (I_{CaL}) et la composante rapide du courant K^+ à rectification retardée (I_{Kr}) s'activent, ce qui résulte en un équilibre entre l'entrée d'ions Ca^{2+} et la sortie d'ions K^+ . C'est l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire qui est responsable du couplage contraction-

excitation au niveau du myocarde.^{5;6} La concentration calcique intracellulaire au repos qui est de 100 nM augmente jusqu'à une valeur approximative de 1 μ M.

La phase 3: C'est la phase de repolarisation finale rapide comparativement à la phase 2. Cette repolarisation résulte de l'activation de courants potassiques sortants (I_{Kr} , la composante lente du courant K^+ à rectification retardée (I_{Ks}) ainsi que le courant K^+ à rectification entrante (I_{K1})) combinée à l'inactivation des courants calciques entrants.⁷

La phase 4: Cette phase correspond au retour du potentiel transmembranaire de repos pour les cellules myocardiques. La pompe Na^+/K^+ -ATPase et l'échangeur Na^+/Ca^{2+} restaurent les gradients ioniques afin de permettre la génération du prochain potentiel d'action et le courant I_{K1} maintient le potentiel de repos stable.¹

A. Potentiel d'action

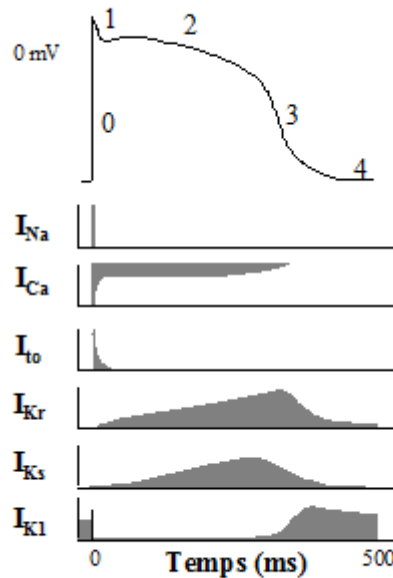


Figure 1.4: Les courants ioniques qui sous-tendent les potentiels d'actions ventriculaires humains. Adapté de.⁸

1.3.1 Rôle du potentiel d'action

La durée du potentiel d'action règle deux grands paramètres. *Premièrement*, la durée du potentiel d'action détermine la période réfractaire du cœur. La période réfractaire correspond à la dépolarisation et au début de la repolarisation. Pendant la période réfractaire le déclenchement d'un nouveau potentiel d'action est impossible. En fait, c'est une période durant laquelle le cœur est au repos et ne peut pas se contracter quel que soit

l'intensité du stimulus électrique. La période réfractaire est relativement longue et dure environ 250 ms. Ceci est presque aussi long que la contraction des cellules du myocarde qui dure environ 300 ms. Pour cette raison, le muscle cardiaque ne peut pas être stimulé à nouveau avant que la contraction ne soit achevée ce qui évite l'apparition des spasmes et la téτανisation du cœur qui, une fois survenus, provoqueraient la mort cardiaque subite. C'est l'activité électrique qui coordonne l'activité mécanique du cœur. Ceci est une propriété bénéfique car pendant ce temps, le ventricule peut se remplir et accumuler le sang nécessaire pour la prochaine contraction. *Deuxièmement*, la durée du potentiel d'action détermine la quantité de calcium qui entre dans la cellule et par la suite, la force de contraction. Pendant la phase 2 du potentiel d'action, il y a une ouverture des canaux Ca^{2+} lents de type L (I_{CaL}). Cette entrée calcique dans la cellule via les I_{CaL} va activer les récepteurs à la ryanodine du réticulum sarcoplasmique causant par la suite la libération de beaucoup plus de Ca^{2+} à partir des stocks intracellulaires. C'est ce qu'on appelle le *calcium-induced calcium-release*. C'est ainsi que l'augmentation transitoire de la concentration intracellulaire du Ca^{2+} va activer la contraction. La libération rapide du Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique est responsable de la longue durée de la contraction du myocarde (300 ms). Cet évènement est crucial parce qu'il donne le temps nécessaire à l'éjection du sang.

1.3.2 Modifications pathologiques du potentiel d'action

Ainsi, le potentiel d'action est le résultat d'un équilibre délicat entre les courants ioniques entrants (Na^+ et Ca^{2+}) et les courants ioniques K^+ sortants. Le moindre déséquilibre entre ces courants perturbe l'activité électrique cellulaire, et le cœur devient alors plus susceptible de développer des arythmies cardiaques.

Raccourcissement du potentiel d'action

Le raccourcissement de la durée du potentiel d'action cardiaque permet la réexcitation d'une cellule déjà stimulée et la déviation de l'influx électrique favorisant ainsi les phénomènes de réentrée. Les réentrées sont responsables de nombreux troubles du rythme cardiaque et surtout de la fibrillation auriculaire.

Allongement du potentiel d'action

Tous les facteurs qui tendent à prolonger la durée du potentiel d'action par diminution des canaux potassiques sortants ou par augmentation des canaux sodiques et calciques entrants, favorisent l'incidence des dépolarisations précoces (EAD; "early afterdepolarization").^{3,9} Ces EADs peuvent dégénérer en arythmies mortelles telles que les torsades de pointes. Ce type d'arythmies peut être:

-Le syndrome du long QT (LQT) acquis : Il est attribué, d'une part, à la prise des médicaments qui prolongent d'une façon excessive la repolarisation cardiaque et, d'autre part, suite à des pathologies cardiaques par exemple l'hypertrophie ou l'insuffisance cardiaque. Le syndrome du LQT acquis peut se produire suite à la prise des médicaments cardiovasculaires ou non cardiovasculaires. Les médicaments utilisés pour des indications cardiovasculaires et qui sont impliqués dans la survenue des TdP sont principalement les anti-arythmiques.^{10;11} Alors que, les antipsychotiques (les thioridazines)^{12;13} et les antihistaminiques (la terfénaire)¹⁴ sont des médicaments utilisés pour des indications non cardiovasculaires et qui sont impliqués dans la prolongation de l'intervalle QT et l'occurrence des TdP. Une liste des médicaments appartenant à différentes classes thérapeutiques et associées à un risque élevé de torsades de pointes est disponible sur <http://www.torsades.org> et présentée dans le tableau I.

Le mécanisme par lequel un médicament cause le syndrome du LQT acquis est presque toujours le blocage du courant I_{Kr} .¹⁵ Cette composante rapide est bloquée par des médicaments appartenant à différentes classes thérapeutiques, y compris les anti-arythmiques, les antipsychotiques, les antibiotiques, les antihistaminiques, etc. Malgré le rôle important des autres courants potassiques et sodiques dans le syndrome du LQT congénital, ces courants sont beaucoup moins susceptibles d'être bloqués par des médicaments.

Classe thérapeutique	Nom générique
Anti-arythmique	Amiodarone, disopyramide, dofétilide, ibutilide, procaïnamide, quinidine, sotalol
Anti-cancéreux	Trioxide arsénique
Antihistaminique	Astémizole, terfénadine
Anti-angineux	Bépridil
Anti-malaria	Chloroquine, halofantrine
Anti-psychotique	Chlorpromazine, halopéridol, mésoridazine, pimozide, thioridazine
Antibiotique	Clarithromycine, érythromycine, sparfloxacine, quinolones
Anti-nausée	Dompéridone, dropéridol
Hypolipidémiant	Probucol
Opiacés	Méthadone, levométhadyl

Tableau I: Liste des médicaments associés à un risque élevé de torsades de pointes. Adapté de: <http://www.torsades.org> (2011).

- le syndrome du long QT congénital: c'est une maladie héréditaire qui résulte d'une mutation génétique. Jusqu'à présent, des mutations de 13 gènes sont reconnus comme causes du LQT congénital.^{16,17} Six de ces gènes codent pour un canal ionique voltage-dépendant (K^+ , Na^+ ou Ca^{2+}) et les sept autres codent pour des protéines qui modulent la fonction des canaux ioniques et qui sont impliquées dans le potentiel d'action ventriculaire (ankyrine, cavéoline, yotiao ou syntrophine).¹⁶ L'identification de ces gènes a conduit à améliorer largement les connaissances sur le rôle des courants ioniques individuels dans le contrôle du potentiel d'action cardiaque et de l'intervalle QT sur l'ECG. Les différents types de syndrome du LQT congénital sont divisés en deux groupes et ceci selon leur mode de transmission génétique: les syndromes de Romano-Ward sont nommés selon la chronologie de leur découverte (LQT1 à LQT13), transmis d'une façon autosomique dominante et sont beaucoup plus communs que les syndromes de Jervell-Lange-Nielsen (JNL1 et JNL2) dont la transmission est autosomique récessive et sont généralement associés à une surdité (voir tableau II). La fréquence des LQT est différente d'un type à autre: elle est plus élevée pour les LQT1 et LQT2 alors qu'elle est moins fréquente pour les autres types de LQT.¹⁶

Type	Transmission	Canal/Protéine	Gène/Chromosome	Fréquence
LQT1	AD	sous-unité α d' I_{Ks} (KvLQT1)	<i>KCNQ1</i> 11	40–55%
LQT2	AD	sous-unité α d' I_{Kr} (HERG)	<i>KCNH2</i> 7	35–45%
LQT3	AD	sous-unité α d' I_{Na}	<i>SCN5A</i> 3	2–8%
LQT4	AD	Ankyrine B	<i>ANK2</i> 4	<1
LQT5	AD	sous-unité β d' I_{Ks} (minK)	<i>KCNE1</i> 21	<1
LQT6	AD	sous-unité β d' I_{Kr} (miRP1)	<i>KCNE2</i> 21	<1
LQT7	AD	sous-unité α d' I_{K1} (Kir2.1)	<i>KCNJ2</i> 17	<1
LQT8	AD	sous-unité α d' I_{CaL} (Cav 1.2)	<i>CACNA1C</i> 12	<1
LQT9	AD	Cavéoline-3	<i>CAV3</i> 3	<1
LQT10	AD	sous-unité β d' I_{Na} (NaV _{1.5} β 4)	<i>SCN4B</i> 11	<0.1
LQT11	AD	Yotiao	<i>AKAP9</i> 7	<0.1
LQT12	AD	A1-syntrophine	<i>SNTA1</i> 20	<0.1
LQT13	AD	I_{K-ACh}	<i>KCNJ5</i> 11	<0.1
JLN1	AR	I_{Ks}	<i>KCNQ1</i> 11	?
JLN2	AR	I_{Kr}	<i>KCNE1</i> 21	?

Tableau II: Caractéristiques des différents types du syndrome du LQT congénital et des gènes associés. AD, autosomique dominante; AR, autosomique récessive. Adapté de.^{16,17}

1.3.3 Relation entre l'ECG, le potentiel d'action et les courants ioniques

L'intervalle QT, la durée du potentiel d'action et les mouvements ioniques transmembranaires sont des phénomènes électriques intimement liés (figure 1.5). Le moindre déséquilibre entre ces différents courants ioniques perturbe le potentiel d'action et le cœur devient plus susceptible de développer des problèmes d'arythmie cardiaque. Ceci pourrait expliquer pourquoi une diminution de la densité ou une inhibition des courants K^+ ou des canaux correspondants mène à une prolongation du potentiel d'action et de l'intervalle QT de l'ECG (figure 1.5). Quelle que soit la cause de la prolongation de l'intervalle QT congénitale ou acquise, la longueur de l'intervalle QT est directement liée au risque de développer des tachycardies ventriculaires et particulièrement des torsades de pointes.¹⁸

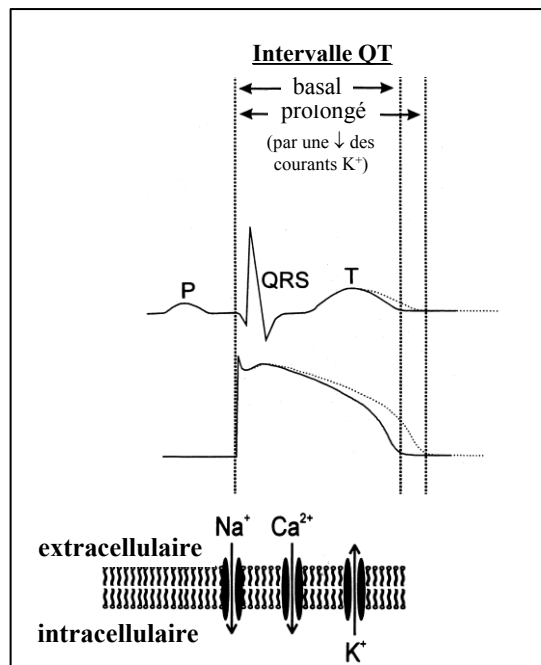


Figure 1.5: Relation entre l'intervalle QT, le potentiel d'action et les courants ioniques. Adapté de.¹⁹

1.4 Syndrome du LQT

Le syndrome du long QT ('Long QT Syndrome') est une anomalie de la fonction électrique cardiaque; la fonction mécanique cardiaque étant toujours normale. La problématique est

due aux défauts congénitaux des canaux ioniques, des protéines impliquées dans la fonction de ces canaux ou suite à l'administration de certains médicaments. Ces défauts prédisposent les personnes affectées à une repolarisation prolongée, à une prolongation de l'intervalle QTc et à un risque accru d'arythmie cardiaque, nommée "torsade de pointes" (TdP).

1.4.1 Définitions des torsades de pointes

Les torsades de pointes ont été décrites pour la première fois en 1966 par F. Dessertenne.²⁰ C'est une tachycardie ventriculaire polymorphe se distinguant des autres tachycardies ventriculaires par son aspect électrocardiographique polymorphe et oscillatoire autour de la ligne de base. Ce désordre électrique est nommé polymorphe car il fait alterner des complexes QRS qui ont tantôt la pointe en haut et tantôt la pointe en bas.²⁰ Les TdP peuvent passer inaperçues lorsqu'elles sont brèves, mais peuvent aussi entraîner l'évanouissement et la syncope lorsqu'elles se prolongent.² Dans certains cas, elles peuvent dégénérer en fibrillation ventriculaire et causer la mort subite.² Elles surviennent dans un contexte d'allongement de l'intervalle QT d'origine acquise ou congénitale.

1.4.2 Les paramètres électrophysiologiques caractéristiques des torsades de pointes

Afin de tenir compte des variations de l'intervalle QT avec la fréquence cardiaque, celui-ci est corrigé en fonction de la fréquence cardiaque. La valeur ainsi obtenue correspond au QT corrigé (QTc). À titre d'information, les valeurs normales du QTc ne doivent pas excéder les 440 ms chez l'homme et les 450 ms chez la femme. Le syndrome du LQT est caractérisé par une durée de repolarisation plus longue que la normale. Ainsi, l'intervalle QT est prolongé. Les TdP sont caractérisées généralement par une fréquence des complexes QRS de 150 et 240/min.² Dans la plupart des cas, le début de l'arythmie est précédé d'une séquence d'intervalles RR court-long-court (Figure 1.6).²¹ Il existe deux types du syndrome de LQT qui sont décrits dans la section 1.3.2.



Figure 1.6: Exemples d'enregistrement d'ECG d'un patient qui avait récemment commencé à recevoir le sotalol (médicament associé à un risque élevé de TdP). Une irrégularité de la réponse ventriculaire, une création d'intervalles RR court-long-court associées à des changements minimes de l'intervalle QT est illustrée en haut. Après une cardioversion électrique, l'intervalle QT a augmenté de façon spectaculaire à 640 ms (au milieu), et un épisode de torsade de pointes est déclenché (en bas). Adapté de.²²

1.4.3 Facteurs de risque des torsades de pointes

Les torsades de pointes surviennent dans un contexte d'allongement de l'intervalle QT d'origine acquise ou congénitale. Les formes acquises sont le plus souvent une combinaison plus ou moins complexe de plusieurs facteurs. Plusieurs facteurs de risques ont été mis en évidence et une liste de ces facteurs est dressée dans le tableau ci-dessous (Tableau III).

Facteurs de risque des torsades de pointes	Amplitude du risque
LQTS congénital	
LQTS acquis	
Sexe féminin	Plus important chez les femelles. Prédominance de 2-3: 1 femelles vs mâles.
Bradycardie	Généralement avec une fréquence cardiaque < 60 bpm.
Hypokaliémie	K ⁺ sérique < 3,5 mg/dl
Hypomagnésémie	Magnésium < 1,5 mg/dl
Hypocalcémie	Concentration sérique < 6 mg/dl
Digitalique	Rare et seulement lors d'une toxicité extrême
Cardiopathies	Lors d'insuffisance cardiaque congestive
Des concentrations élevées et une perfusion rapide des médicaments qui prolonge le QT	Peut augmenter le QT de 50 ms à des doses thérapeutiques
Récente conversion de la fibrillation auriculaire avec des médicaments allongeant le QT	Incidence de 1-3 % avec des médicaments qui prolonge le QT

Tableau III: Facteurs de risque des torsades de pointes. Adapté de.^{16,23,24}

1.5 Les courants potassiques

1.5.1 Courants potassiques et repolarisation

Les courants K⁺ sont les courants déterminants de la repolarisation ventriculaire, du potentiel membranaire de repos et de la durée du potentiel d'action. Ces canaux sont composés de protéines transmembranaires qui transportent spécifiquement les ions potassium (K⁺). Ce sont des cibles importantes pour certains hormones et médicaments. Parmi ces médicaments se trouvent les anti-arythmiques de classe III connus par leur capacité à bloquer les canaux K⁺, prolonger la durée de potentiel d'action et de retarder la repolarisation. D'où une grande incidence de prolongation de l'intervalle QT et un risque accru de développer un syndrome du LQT acquis. Les courants K⁺ peuvent être classés en trois catégories: les courants K⁺ voltage-dépendants (K_v), les courants K⁺ ligand-dépendants et les courants K⁺ voltage- et ligand-dépendants.^{25,26}

1.5.2 Canaux K^+ voltage-dépendants

Les canaux K^+ dépendants du voltage sont appelés ainsi car ils sont activés par le voltage. C'est le niveau de la dépolarisation membranaire qui va déterminer leur activation et leur ouverture. Ce sont des courants caractérisés par une diversité considérable des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques. Les courants K^+ activés par le voltage comprennent: le courant K^+ à rectification retardée ultrarapide (I_{Kur}), rapide (I_{Kr}), et lent (I_{Ks}), le courant K^+ transitoire sortant (I_{to}), le courant K^+ sortant à l'équilibre (I_{ss}) et le courant K^+ à rectification entrante (I_{K1}). Comme les courants K^+ sont les déterminants de la durée du potentiel d'action, la diversité de la distribution de ces différents types de courants ou de l'expression des canaux K^+ influence directement la configuration et la durée des potentiels d'action cardiaque.²⁵ Ces derniers varient amplement entre les espèces (ex: homme versus lapin) et les différentes régions cardiaques (ex: oreillettes versus ventricule) et les zones spécifiques de ces régions (ex: épicarde versus endocarde du ventricule). Par exemple, le courant I_{to} est exprimé de façon hétérogène à travers les diverses parties du cœur: même au niveau des ventricules, il est plus exprimé au niveau de l'épicarde que l'endocarde. Par ailleurs, ce phénomène explique qu'une faible expression de I_{to} au niveau de l'endocarde engendre un potentiel d'action endocardique plus long que celui de l'épicarde. Il est aussi important de préciser que les canaux K^+ sont composés par les sous-unités α qui forment le pore et par les sous-unités accessoires β qui modulent leurs fonctions et leurs expressions. Dans cette thèse, nous nous intéressons aux courants K^+ voltage-dépendants et à leurs canaux sous-jacents. Les sous-unités α et β des canaux K^+ cardiaques et leur distribution sont indiqués dans le tableau IV présenté ci-dessous.

Courant K^+	Sous-unité α	Sous-unité β	Tissus	Espèces
I_{Ks}	Kv7.1 (KVLQT1)	minK	O, V, P, NS	cobaye, chien, humain, lapin
I_{Kr}	Kv11.1 (HERG)	minK MiRP1	O, V, P, NS, NAV	cobaye, chien, humain, lapin, rat, chat
I_{Kur}	Kv1.5 (HK2)	Kv β 1 (Kv β 3) Kv β 2	O	chien, humain
			O, V	souris
I_{K1}	Kir 2.1 (IRK1)		O, V, P	chien, lapin, rat, chat, furet, souris
	Kir 2.2 (IRK2)			souris
I_{to}	Kv4.3/Kv4.2	KChIP2	O, V, P	chien, humain, rat, chat, furet, souris
	Kv1.4		V, (A, NAV, NS) ‡	humain, lapin, rat, furet, souris
I_{ss}	Kv2.1	KChAP	O, V, NAV	chien, humain, lapin, rat, souris
	Kv1.2		V	rat

Tableau IV: Les sous-unités α et β des canaux K^+ cardiaques. O, oreillette; P, Purkinje; V, ventricule; NS, nœud sinusal; NAV, nœud auriculo-ventriculaire. ‡ Juste au niveau des cellules non ventriculaires chez le lapin. Adapté de.^{1,27}

1.5.2.1. Le courant K^+ transitoire sortant (I_{to})

Structure de I_{to}

Le courant I_{to} est spécifique aux neurones et au muscle cardiaque. C'est un courant qui s'active et s'inactive rapidement suite à la dépolarisation membranaire. Comme tous les canaux Kv, I_{to} est formé par les sous-unités α et β . Les sous-unités α qui forment I_{to} appartiennent à la famille Kv4, Kv4.2 (KCND2) et Kv4.3 (KCND3), qui code pour les canaux I_{to} rapides ($I_{to,f}$) et Kv1.4 (KCNA4) qui code pour les canaux I_{to} lents ($I_{to,s}$).^{8,28} En plus des sous-unités α qui forment le pore des canaux ioniques, I_{to} est formé des sous-unités β et des protéines impliquées dans la modulation de ses propriétés biophysiques et de son expression à la surface. En effet, il a été démontré qu'un certain nombre de sous-unités accessoires peuvent moduler la cinétique et l'expression membranaire des canaux Kv4. Les sous-unités qui ont été rapportées jusqu'à présent sont: KChIP2 ("K⁺ channel-interacting proteins"), DPP6 ou DPPX (diaminopeptidyl transferase-like protein 6), MiRP (MinK et MinK-related peptide), et les sous-unités Kv β 1, Kv β 2 and Kv β 3. Parmi toutes ces sous-unités accessoires ou chaperones, il a été rapporté que la protéine cytoplasmique cardiaque,

KChIP2, a un rôle essentiel comme élément régulateur des propriétés biophysiques du canal au niveau cardiaque.²⁹ Ce rôle a été mis en évidence dans plusieurs études qui ont montré que KChIP2 augmente l'expression du canal à la membrane cellulaire, ralentit l'inactivation et accélère le recouvrement de l'inactivation. De plus, KChIP2 semble être le principal déterminant du gradient transmural de I_{to} chez les grands mammifères et sa délétion élimine le courant I_{to} dans les myocytes ventriculaires de souris.³⁰

Les différentes bases moléculaires de I_{to}

Le canal sous-jacent à I_{to} se compose de Kv4.3 chez l'humain et le chien alors qu'il est la combinaison des canaux Kv4.2/Kv4.3 chez les rongeurs adultes avec une moindre contribution de Kv1.4.^{25;31} Chez le lapin, Kv1.4 est la base moléculaire dominante de I_{to} alors que chez le cobaye, I_{to} est totalement absent, un fait qui peut contribuer à la durée plus longue du potentiel d'action chez ces espèces (tableau IV). Le rythme cardiaque est d'environ 76 battements par minute (bpm) chez l'humain, 87 bpm chez le chien, 190 bpm chez le lapin, 240-250 bpm chez le cobaye et de 380 bpm chez la souris.

Rôle physiologique de I_{to}

Le courant potassique transitoire sortant, I_{to} , est un courant ionique repolarisant chez l'humain et les autres mammifères.¹ L'activation rapide du courant I_{to} contribue à sa grande participation à la phase initiale de la repolarisation (phase 1). De plus, l'activation de I_{to} va influencer l'activation des I_{CaL} et l'équilibre entre les courants entrants et sortants jouant ainsi un rôle important dans la morphologie et l'amplitude de la phase plateau du potentiel d'action (phase 2).

1.5.2.2 Modèles animaux utilisés pour étudier l'effet des hormones sur l'électrophysiologie cardiaque

1.5.2.2.1 Introduction

Afin de mieux comprendre les fonctions physiologiques et les pathologies humaines, les êtres humains constituent le meilleur modèle à utiliser. Ceci étant difficile

dans le domaine de l'électrophysiologie cardiaque puisque la méthode de patch-clamp est la méthode essentiellement utilisée pour mesurer les courants et ceci à partir des cellules cardiaques fraîchement isolées. La rareté d'accès à des cœurs humains sains et la difficulté d'isoler des myocytes de bonne qualité sont aussi des facteurs limitants de l'étude directe de l'humain. De plus, plusieurs informations cruciales concernant les critères de choix des cœurs humains vont être difficile à répertorier. Est-ce que ces humains ont atteint leur maturité sexuelle? Est-ce qu'ils ont le même âge lors de l'étude? Fumeurs ou non? Si ce sont des mâles, est-ce qu'ils ont dépassé l'andropause? Si ce sont des femmes, est-ce qu'elles sont en ménopause, post-ménopause, sous hormonothérapie? Est-ce qu'ils souffrent des maladies associées à des modifications d'expression des canaux K^+ tel que l'hypertrophie ventriculaire ou l'insuffisance cardiaque? Pour toutes ces raisons, la plupart des études fondamentales utilisent des animaux de laboratoire.

1.5.2.2.2 La souris : un bon modèle expérimental

Depuis longtemps, les animaux ont été utilisés dans le domaine de la recherche. Durant une dizaine d'années, les scientifiques ont choisi principalement la souris et la drosophile comme des organismes modèles. Grâce aux progrès de la technologie, il nous est maintenant possible de générer des modèles animaux génétiquement modifiés de façon ciblée et ceci afin d'étudier des fonctions ou des maladies précises.^{32;33} En effet, il existe plusieurs types de souris transgéniques parmi lesquelles les souris dont les récepteurs aux hormones sexuelles ou les niveaux d'hormones sexuelles ont été altérées.^{34;35} La disponibilité de souris déficientes en certains récepteurs aux hormones sexuelles permet d'étudier spécifiquement le rôle de ces récepteurs au niveau du cœur. Plusieurs considérations nous poussent aussi à choisir la souris comme modèle expérimental.

1. La souris peut vivre en laboratoire et être bien gérée en ce qui concerne la nourriture et les conditions extérieures.
2. La recherche sur la souris peut se faire par modification du génie génétique et aussi par d'autres expériences. Par exemple, on peut utiliser un antagoniste des récepteurs oestrogéniques α pour bloquer son activité comme on peut utiliser la souris transgénique dont le gène fonctionnel du $RE\alpha$ (ERKO α : Estrogen Receptor Knock-Out mice α) est inactivé.

3. La gestation de la souris est de courte durée (19 jours) ce qui donne naissance à un grand nombre d'animaux de même âge et de même descendance et accélère la durée des expériences.
4. Dû à sa petite taille, il est possible d'enregistrer chez la souris des données d'électrophysiologie, de pression sanguine et d'ECG et un grand nombre d'animaux peuvent être utilisés pour l'étude. Alors que ceci constitue une limite lors des études des vaisseaux qui sont petits.

Il est donc logique que la souris soit un modèle de choix des laboratoires. En fait, les modèles de souris transgéniques nous fournissent des outils considérables pour l'étude de la physiologie cellulaire et moléculaire des maladies cardiovasculaires. Certains de ces modèles animaux sont utilisés, dans les études d'hypertrophie cardiaque, d'insuffisance cardiaque, de cardiomyopathie dilatée, et de désordres cardiaques congénitaux.^{32;33} Les techniques d'électrophysiologie combinées avec les études biochimiques et les modèles de souris transgéniques offrent de nouvelles possibilités afin d'explorer le rôle et la régulation des protéines et récemment l'ARNm qui contrôlent l'activité électrique cardiaque en conditions physiologiques et pathologiques. L'ARNm est utilisé comme intermédiaire par les cellules pour la synthèse des protéines. Les microARN sont des régulateurs post-transcriptionnels: leur assemblage à une séquence complémentaire de l'ARNm du gène cible conduit à la répression transcriptionnelle ou à la dégradation de cet ARNm. La récente découverte des microARN constitue une nouvelle piste à explorer.

1.5.2.2.3 Justification du modèle utilisé

Jusqu'à maintenant et même avec tous les avantages cités ci-dessus, il n'y a pas un modèle parfait. Tous les modèles animaux utilisés ont des limites. Dans le cas d'études visant à comprendre la physiologie humaine, il est important que le modèle choisi ressemble à l'humain du point de vue du système biologique étudié. En consultant le tableau IV, on peut constater que les bases moléculaires d' I_{Kr} et I_{K1} chez le lapin sont similaires à l'humain. Alors que la limite majeure de ce modèle réside dans le fait que chez le lapin femelle, qui ne possède pas un cycle œstrus, les niveaux d'œstrogènes sont continuellement bas. Dans cette situation, l'utilisation de ce modèle animal rend l'extrapolation des résultats à l'humain et surtout chez les femmes très difficile. Le cobaye partage les mêmes sous-unités moléculaires de I_{Kr} (ERG), I_{Ks} (KvLQT1, minK) et I_{K1} (Kir2.1) que l'humain. L'élément manquant, I_{to} , est présent chez le lapin, le rat et la souris alors que sa base moléculaire (Kv4.3) n'est présente que chez le rat, la souris et le chien. Ces trois espèces ont la même durée du PA. qui est de 300-350 ms.

La souris reste notre modèle de choix pour étudier l'électrophysiologie puisque plusieurs courants ioniques présents chez la souris ainsi que leurs bases moléculaires sont aussi présents chez l'homme. Comme chez l'humain, le ventricule de la souris possède I_{to} et I_{K1} . Donc la présence de I_{to} chez la souris peut servir de modèle intéressant pour caractériser ce courant. Par contre, I_{Kur} présent au niveau du ventricule de la souris n'est pas présent au niveau ventriculaire de l'homme mais il est très important au niveau des oreillettes humaines.³⁶ De plus, les souris femelles ont un cycle œstral moyen de 4-5 jours se divisant, comme chez la femme, en 3 phases. La phase pro-œstrus (folliculaire chez la femme), la phase œstrus (ovulatoire chez la femme) et la phase post-œstrus (lutéale chez la femme).³⁷ Les souris possèdent aussi au niveau cardiaque des récepteurs aux hormones stéroïdiennes soit les androgènes, les œstrogènes et la progestérone.³⁸ D'autre part, l'enregistrement ainsi que l'étude de la densité et de la cinétique des courants et canaux K^+ présents chez la souris sont rendues possibles grâce aux méthodes développées dans notre laboratoire.³⁹

1.6 Profil cardiovasculaire distinct de la femme

Comme nous venons de le mentionner dans la section précédente, le sexe féminin constitue un facteur de risque des torsades de pointes. En effet, dans le cas de LQT acquis les torsades de pointes sont plus fréquentes chez les femmes avec une prédominance de 2-3:1 par rapport à l'homme. La prédominance féminine est encore présente dans le cas du syndrome de LQT congénital à l'âge adulte. En effet, une étude a montré que les femmes qui souffrent du LQT2 sont beaucoup plus nombreuses que les hommes et qu'elles sont quatre fois plus à risque que les hommes de développer une torsade de pointes avant la quarantaine.⁴⁰ Cette prépondérance féminine peut résulter aussi du fait que leur intervalle QTc basal après la puberté est de 10 à 20 ms plus long que celui des hommes.⁴¹ Ces deux observations suggèrent que les hormones sexuelles peuvent moduler la repolarisation. Une étude réalisée par Arya et al., a montré que la testostérone, augmente les courants I_{Kr} et I_{Ks} , raccourcit l'intervalle QTc et joue un rôle important dans la réduction du risque de torsade de pointes chez les hommes.⁴² Malgré que les études montrent que les androgènes ont un effet protecteur contre la prolongation de la repolarisation induite par les médicaments, l'effet des œstrogènes n'est pas pour autant exclu. Cependant, s'il existe, il est bien plus complexe et encore mal élucidé. À titre d'exemple, une étude a montré que des femmes exposées au sotalol, connu par ses effets allongeant le QT, ont un risque plus élevé (4,1% versus 1,9%) de développer des épisodes de TdP que les hommes et ceci indépendamment de l'âge.⁴³ D'un autre côté, le traitement de substitution de la ménopause n'a pas de conséquence sur la durée de l'intervalle QT et les perturbations hormonales de la grossesse n'exposent pas les femmes à un risque plus important de torsade de pointes. La grossesse n'est cependant pas anodine car c'est lors du post-partum que les femmes présentant un syndrome du LQT congénital sont les plus vulnérables aux arythmies.⁴⁴

1.7 Les oestrogènes

1.7.1 Synthèse et sécrétion

Les œstrogènes sont des hormones sexuelles femelles appartenant à la famille des hormones stéroïdiennes. Chez les femmes en préménopause et chez les hommes, les ovaires

et les testicules sont les deux sources principales de synthèse des œstrogènes respectivement. Chez les femmes en post-ménopause, certains œstrogènes sont produits en petites quantités par des sources secondaires telles que les seins, les glandes surrénales, le foie et le tissu adipeux.

Les œstrogènes naturels ou endogènes sont l'œstrone (E1), le 17β -œstradiol (17β -E2) et l'œstriol (E3).⁴⁵ Dans le corps, ils sont tous synthétisés à partir du cholestérol.⁴⁵ L'aromatase catalysée par l'aromatase est la dernière étape pour l'obtention de E1 et E2 à partir de leurs précurseurs respectifs, l'androstènedione et la testostérone.⁴⁵ En pré-ménopause, le 17β -œstradiol ou E2 est la forme prédominante, la plus puissante et la plus bioactive des œstrogènes dans l'organisme.⁴⁵ Son taux qui est relativement bas au cours des premières années de la vie d'une femme augmente à la puberté avec la présence du cycle menstruel. Au cours du cycle menstruel, une fluctuation de son taux plasmatique est observée: il croît pendant la phase folliculaire, atteint son maximum lors de la phase d'ovulation et chute pendant la phase lutéale pour être à ses plus bas niveaux au cours des menstruations.⁴⁵ En post-ménopause, la synthèse des œstrogènes diminue, s'arrête au niveau des ovaires mais elle est produite en petites quantités par aromatisation périphérique des androgènes.

L'œstrone est sécrétée par les parois folliculaires et il n'est détecté que durant la phase lutéale du cycle menstruel. De même que le 17β -œstradiol, son taux plasmatique est bas pendant la première phase du cycle et élevé pendant la seconde moitié. En ménopause, l'œstrone devient biologiquement la forme la plus importante des œstrogènes.⁴⁵ Sa synthèse s'effectue dans le tissu adipeux à partir des androgènes sécrétés par les glandes corticosurrénales.

Enfin, l'œstriol est sécrété par le placenta lors de la gestation. C'est aussi le produit de dégradation de l'œstradiol et de l'œstrone au niveau du foie. Son activité biologique est faible.

Concentrations physiologiques des œstrogènes

Bien que les œstrogènes soient présents chez les deux sexes, la concentration oestrogénique est beaucoup plus importante chez les femmes que chez les hommes. Chez la femme, ces

concentrations varient selon la phase du cycle menstruel (tableau V). Le cycle menstruel qui dure en moyenne 28 jours se divise en trois phases:

a) La phase folliculaire (jour 1- jour 13): c'est la période qui suit directement les règles. Les œstrogènes qui étaient à leurs niveaux les plus bas au début des menstruations augmentent progressivement du jour 5 du cycle jusqu'au moment de l'ovulation.

b) La phase ovulatoire (jour 14): correspond au milieu du cycle et elle est caractérisée par le plus haut niveau en œstrogènes.

c) La phase lutéale (jour 15 -jour 28): correspond à la dernière phase du cycle. Les œstrogènes diminuent lentement au cours de cette phase avec un second pic, au milieu de cette phase, résultant de la sécrétion des œstrogènes par le corps jaune. Finalement, le taux des œstrogènes chute jusqu'aux menstruations et un nouveau cycle recommence.

Lors de la grossesse, les œstrogènes augmentent d'une façon importante alors qu'elles sont à de très bas niveaux lors de la ménopause.

Phase du cycle	Concentrations en 17β-œstradiol (pg/ml)
Première semaine de la phase folliculaire	20-94
Deuxième semaine de la phase folliculaire	57-260
Pic ovulatoire	100-420
Phase lutéale	60-230
La grossesse	2000
La ménopause	0 à 50
Les hommes	5 à 20

Tableau V: Les concentrations plasmatiques des oestrogènes. Adapté de: <http://www.unilabs.fr/Infos-Patients/Fiches-Infos-Analyses-courantes/LH/> et de. ⁴⁵

1.7.2 Rôle des oestrogènes

Chez les mammifères, les œstrogènes sont impliqués dans le développement et la différenciation sexuelle. Ils sont responsables du développement des caractères sexuels secondaires tels que le tissu adipeux et les organes génitaux, du contrôle du cycle menstruel et de la reproduction féminine et masculine.⁴⁶ De plus, les œstrogènes jouent un rôle dans le système cardiovasculaire: ils peuvent altérer la concentration lipidique, la coagulation et la

production de certaines molécules cardiovasculaires comme le monoxyde d'azote et les prostaglandines.^{47;48} Les œstrogènes sont aussi impliqués dans le développement du système nerveux central en contrôlant les effets dopaminergiques, cholinergiques et noradrénergiques.⁴⁹ Finalement, les œstrogènes solidifient les os et diminuent la perte osseuse chez les femmes ainsi que chez les hommes.⁵⁰ On croit aussi que les œstrogènes ont un effet sur le tractus gastro-intestinal et le système immunitaire.

1.7.3 Récepteurs oestrogéniques

1.7.3.1 Récepteurs oestrogéniques nucléaires

Les récepteurs aux œstrogènes (RE) sont des protéines intracellulaires appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires et plus particulièrement à la famille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes. Les RE existent sous deux formes: les RE alpha ($RE\alpha$) et bêta ($RE\beta$).⁵¹ Un troisième récepteur, appartenant à la famille des récepteurs membranaires, soient les récepteurs couplés aux protéines G, et codé par un gène appelé GPR30 ou GPER-1 a été récemment découvert.⁵²⁻⁵⁴

a) $RE\alpha$ et $RE\beta$:

Les $RE\alpha$ et $RE\beta$ sont des protéines formées de cinq régions A/B, C, D, E et F (figure 1.7).⁵⁵ Ces différentes régions sont communes à toute la superfamille des récepteurs nucléaires et forment les domaines fonctionnels du récepteur : le domaine N-terminal de transactivation, le domaine de liaison à l'ADN, le domaine de dimérisation, le domaine de localisation nucléaire et le domaine de liaison du ligand.

- Le domaine N-terminal

Ce domaine correspond à la région A et la région B. Il est impliqué dans les interactions avec les protéines nécessaires pour la transcription et l'activation des gènes cibles par les œstrogènes. Elle contient le domaine de transactivation AF1 (*Activation function 1*) dont l'activation associée à celle de la fonction de transactivation AF2, situé dans la région C-terminale, assure la stimulation de la transcription par les $RE\alpha$ et $RE\beta$.^{53;56}

- Le domaine de liaison à l'ADN ou DBD (DNA binding domain)

Ce domaine correspond à la région C. Cette région est caractérisée par la présence des éléments de réponse des REs appelés "*estrogen responsive elements*" ou ERE et elle est responsable de l'interaction directe et la fixation à l'ADN. Pour les RE, l'ERE est composé de 13 paires de bases et il est une répétition de la séquence 5'-GGTCAnnnTGACC-3' ("n" correspond à n'importe quelle nucléotide et constitue la portion variable). La composition de cette portion influence le choix des coactivateurs qui vont interagir avec le complexe ligand-récepteur.⁵⁷ La région C joue aussi un rôle important dans la dimérisation du récepteur.⁵³

- La région charnière

Ce domaine correspond à la région D. Elle constitue le lien entre le domaine C et le domaine E/F. Elle joue un rôle dans la spécificité de la fixation du récepteur à l'ADN. La région D est responsable de la localisation nucléaire du complexe ligand-récepteur et des modifications post-traductionnelles.⁵⁶

- La région C-terminale

Ce domaine correspond à la région E et F. Le domaine E contient le domaine de liaison au ligand (LBD) et une deuxième fonction de transactivation AF2. Au contraire d'AF1, l'activité de l'AF2 est responsable de l'activation transcriptionnelle dépendante du ligand et de la liaison du récepteur au ligand.^{55;56} En plus, elle est identique entre les deux récepteurs suggérant qu'ils lient les coactivateurs d'une façon similaire.⁵⁶

Enfin, la région F assure la dimérisation des récepteurs, influence l'activité co-régulatrice ainsi que la spécificité de la liaison du récepteur à un agoniste ou à un antagoniste. En absence du 17 β -œstradiol, le LBD fixe des corépresseurs, qui maintiennent le RE dans un état transcriptionnellement inactif. La liaison du 17 β -œstradiol au LBD va entraîner des modifications structurales et le relargage des corépresseurs.

b) Comparaison entre RE α et RE β

Les RE sont codés par deux gènes distincts: ESR1 code pour RE α et ESR2 pour RE β .^{53;59} Le RE α possède une séquence d'acides aminés (595 acides aminés) plus longue que celle du RE β (530 acides aminés) mais les deux possèdent une similitude de structure dans différents domaines.⁵¹ En comparant la séquence protéique du RE α et du RE β , on remarque une conservation presque parfaite du domaine C (95% d'homologie)⁵¹ et une faible homologie dans les autres domaines : E (55%), D (30%), A/B (20%) et F (20%). Malgré que l'homologie soit faiblement conservée les fonctions de ces domaines restent analogues.^{51;56} Toutefois, il faut noter des différences dans la répartition des RE, de leur expression tissulaire, leurs emplacements, leurs concentrations dans l'organisme et de la réponse du RE après la fixation du ligand. À titre d'exemple, une fois que les œstrogènes se lient aux RE α ou RE β , une activation ou une inhibition de la transcription des gènes se produit respectivement.

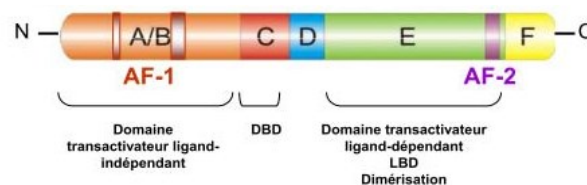


Figure 1.7: Représentation très schématique du RE α . Adapté de.⁵⁸

1.7.3.2 Récepteurs œstrogéniques membranaires

Suite aux évidences qui mettent en relief l'effet rapide des œstrogènes et par la suite la présence des RE membranaires, l'identité de ces récepteurs a été le sujet de différentes études. Plusieurs études ont cherché à déterminer si ces récepteurs sont les RE classiques ou s'ils représentent une forme modifiée de ces derniers.

La transfection des ovocytes du hamster chinois (OHC : une lignée cellulaire stable utilisée pour l'expression de gènes recombinants) avec le cDNA du RE α ou RE β montre dans les deux cas la présence de deux types de récepteurs: les RE nucléaires et les RE membranaires

prouvant ainsi que la forme nucléaire et membranaire proviennent du même transcript; la densité des récepteurs nucléaires étant 40 fois plus importante que les récepteurs membranaires. De plus, ces récepteurs ont une affinité similaire aux œstrogènes, activent des protéines G et stimulent la prolifération cellulaire.⁶⁰ Ce même groupe a été aussi capable de montrer que les RE α et les RE β membranaires et nucléaires sont absents dans les cellules endothéliales des souris déficientes en RE α et RE β (DERKO). Ce qui prouve que les RE membranaires α et β sont codés par les mêmes gènes qui codent pour les RE nucléaires α et β .⁶¹ Donc, si le même gène code pour des récepteurs nucléaires et membranaires, il est fort probable que des modifications post-traductionnelles soient responsables du ciblage du récepteur soit à la membrane nucléaire ou cytoplasmique.⁶⁰ Des études récentes ont montré que la palmitoylation du RE α est la modification post-traductionnelle essentielle à sa localisation membranaire,^{62,63} alors que la méthylation est indispensable à sa localisation au niveau cytoplasmique.⁶⁴ En raison de sa récente découverte en 1996⁵¹, le RE β a été moins étudié que le RE α . Toutefois, il a été aussi démontré que la palmitoylation est nécessaire à sa localisation au niveau de la membrane plasmique.⁶⁵

Un nouveau RE: GPR30/GPER-1

Un nouveau récepteur responsable des effets rapides des œstrogènes et similaires aux effets des RE α et RE β nommé “récepteurs couplés aux protéines G 30” (GPR30/GPER-1) a été récemment découvert.^{52;54} Ce récepteur œstrogénique non génomique qui est totalement indépendant des RE α et RE β est formé de 375 acides aminés et de sept domaines transmembranaires comme toute la famille des récepteurs couplés aux protéines G.⁶⁶ Le GPR30 est localisé au niveau de la membrane plasmique, au niveau du réticulum endoplasmique⁵² et il est aussi présent au niveau des cellules neuronales du rat.⁶⁶ Bien qu'il y ait certaines régions du cerveau qui ont montré une co-localisation du RE α et de GPR30⁶⁷, la localisation du GPR30 semble être distincte de celle des RE traditionnels.⁶⁸ Le GPR30 lie les œstrogènes avec une affinité très élevée et il peut être activé par des antagonistes des RE comme l'ICI 182,780 et le tamoxifène ce qui suggère fortement que cette molécule est un troisième récepteur aux œstrogènes.

1.7.4 Mécanisme d'action des œstrogènes

Les effets des œstrogènes sur les cellules/tissus cibles par l'intermédiaire des récepteurs peuvent être classés en deux catégories: les effets génomiques qui nécessitent un temps de synthèse protéique et correspondent aux effets " retardés " des œstrogènes; et les effets non génomiques qui correspondent aux effets " rapides " des œstrogènes.

1.7.4.1 Mode d'action classique 'génomique' :

Le RE n'interagit qu'avec les œstrogènes ou les molécules à potentiel œstrogéniques comme les modulateurs sélectifs aux récepteurs aux œstrogènes (SERM). En absence des œstrogènes, le RE est maintenu dans un état inactif dans le cytosol suite à sa liaison à des protéines du choc thermique (HSP90 et HSP70). La diffusion du ligand à travers la membrane et sa liaison au récepteur induit la dissociation des HSP et le changement conformationnel du récepteur dont la conséquence est la dimérisation du RE, la translocation nucléaire et une liaison de haute affinité avec, un site spécifique de l'ADN aux œstrogènes qui active la transcription, l'ERE.⁶⁹⁻⁷¹ L'ERE spécifique aux récepteurs aux œstrogènes correspond à la séquence: 5'-AGGTCAnnnTCACT-3' alors que le récepteur aux androgènes reconnaît la séquence: 5'-GGTACAnnnTGTTCT-3'.⁷¹ Cette liaison à l'ERE est la première étape par laquelle le complexe associé au RE module l'expression des gènes spécifiques hormono-régulés. Grâce aux AF-1 et AF-2, cette liaison va entraîner le recrutement des coactivateurs essentiels à la transcription et selon le tissu et les gènes ciblés elle va conduire soit à l'activation ou à la répression de la transcription de ces gènes et ainsi à la régulation de la production de l'ARN et des protéines.^{53;70;71}

En résumé, l'action génomique des œstrogènes prend des heures. Elle commence par la liaison œstrogènes-RE qui va induire une modification conformationnelle du récepteur, sa dimérisation et une liaison du complexe aux ERE. Ce qui va activé la synthèse d'ARN et des protéines et ainsi la régulation de la transcription des gènes cibles.

1.7.4.2 Mode d'action non classique 'non génomique' :

Des études récentes ont révélé que le mode d'action des œstrogènes ne se restreint pas au contrôle transcriptionnel. En fait, les hormones stéroïdiennes peuvent aussi affecter

les canaux ioniques via des voies non génomiques (liaison directe au canal ou modification post-transcriptionnelle) et induire des effets aigus. Vu la rapidité de ces effets (de quelques secondes à 5-15 minutes), ceci ne peut pas résulter de l'activation de la machinerie transcriptionnelle et de la synthèse protéique.^{48;70} Au lieu de se lier aux RE nucléaires, les œstrogènes vont se lier à des RE localisés au niveau de la membrane plasmique. La présence de ces RE membranaires est bien montrée au niveau des cellules endothéliales par Russel et coll., qui ont utilisé le complexe imperméable à la membrane: le E2-BSA (albumine de sérum bovine).⁷² L'association E2-membrane a été capable d'engendrer une réponse cellulaire rapide, approximativement de 15 minutes, qui n'est pas observée suite à l'activation nucléaire.⁷²

Au contraire des modifications transcriptionnelles, les récepteurs membranaires utilisent la voie des seconds messagers pour aboutir à un changement physiologique. L'action non-génomique des œstrogènes est mise en évidence dans plusieurs tissus dont l'endothélium⁷², les seins, les cellules osseuses^{73;74} et le système nerveux central.⁷⁵ Ces effets non génomiques utilisent des voies classiques de transduction mettant en jeu des seconds messagers (comme la phospholipase C, la protéine kinase C, l'AMPc, le pH intracellulaire, le Ca²⁺, etc) et elle est souvent associée à l'activation des cascades protéiques (les phosphoinositides, les MAP kinases, le NO, etc). Ces différentes voies activées par les œstrogènes permettent d'expliquer les différentes actions de ces hormones au niveau tissulaire.

En résumé, l'action non-translationnelle des œstrogènes correspond à une réponse non génomique, très rapide et de l'ordre de quelques secondes à 5-15 minutes. Elle utilise la voie des seconds messagers, active des cascades protéiques et ne régule pas la synthèse d'ARN et des protéines.

Mécanisme d'action du GPR30

La récente découverte du GPR30 peut contribuer à expliquer les effets rapides des œstrogènes liés à la membrane dans des modèles déficients en RE. Comme dans le cas des effets non génomiques des RE α et RE β , le GPR30 cause des changements sans une régulation transcriptionnelle. En fait, la modulation des effets membranaires des œstrogènes par le GPR30 met en jeu la voie des seconds messagers et des protéines kinases

généralement stimulés par les récepteurs à sept domaines transmembranaires. La liaison des œstrogènes au GPR30 active l'adénylate cyclase et produit des seconds messagers comme l'AMPc, l'inositol triphosphate, le calcium et les MAPK.^{52;53;70} Cette liaison induit aussi l'activation des ERK-1 et 2 et provoquerait la modulation des cascades de signalisation notamment celle de la PKA.⁵⁴ GPR30 serait aussi impliqué dans certains effets non-génomiques surtout au niveau du système nerveux central.^{68;76}

Ces différentes études laissent supposer que le GPR30 joue un rôle important dans la modulation des effets rapides des œstrogènes et d'autres études s'avèrent nécessaires afin d'élucider son implication dans les effets oestrogéniques non-génomiques.

1.7.5 Mécanisme des effets induits par les oestrogènes

Contrairement aux données claires et bien documentées sur les effets induits par les hormones stéroïdiennes et leurs cibles, les détails sur les mécanismes d'action sont encore peu disponibles. Les différentes études qui ont examiné les effets d'administration aiguë des œstrogènes sur les courants membranaires et l'APD des cardiomyocytes ventriculaires ont suggéré que les hormones stéroïdiennes peuvent affecter les canaux K^+ par des voies non-génomiques (liaison directe d'un canal) ou aussi induire un effet génomique (des régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles). En tenant compte que le principal mode d'action des hormones sexuelles est la régulation de la transcription suite à une liaison à leurs récepteurs, l'effet génomique des oestrogènes est tout à fait logique grâce à la présence des récepteurs stéroïdiens aux œstrogènes dans des tissus qui expriment les canaux K^+ (le cœur par exemple).⁷⁷⁻⁷⁹

Plusieurs voies de signalisation influencent le RE et modulent son activité. La phosphorylation contrôle son affinité pour le ligand, sa dimérisation ainsi que son activité transcriptionnelle. Les différentes voies de signalisation induites par les œstrogènes sont décrites ci-dessous et présenté dans la figure 1.8. Ces voies sont généralement activées par la "cellular Sarcoma" (c-Src).

Les voies via c-Src :

L'effet répresseur des œstrogènes sur les courants K^+ voltage dépendant (K_v) pourrait résulter d'une action non-génomique des œstrogènes sur le canal lui-même ou d'une

régulation génomique directe ou indirecte (via les différentes voies décrites ci-dessous) du gène Kv, conduisant ainsi à la diminution de sa transcription. Il est fort probable que les niveaux d'activité de la tyrosine kinase, c-Src, jouent un rôle dans la répression des courants K^+ et ceci suite à la modulation de la fonction des RE et la régulation des différentes voies de signalisation des œstrogènes. En général, c'est l'augmentation de l'activité de c-Src par les œstrogènes qui pourrait conduire à la régulation génomique des canaux Kv.⁸⁰ Cette relation entre les RE et les niveaux de c-Src a été confirmée dans un modèle de souris déficiente en c-Src.⁸⁰ Dans cette étude, les auteurs ont été capables de démontrer que la réponse aux œstrogènes chez les souris déficientes en c-Src corrèle avec la perturbation de plusieurs voies de signalisation normalement œstrogéno-régulées d'une manière efficace.

La voie de PI3K/AKT

Une fois que l'œstrogène se lie à son récepteur, le complexe œstrogène-RE va se lier à la c-Src. Le tout va activer la PI3-kinase dont la forme active va former un complexe avec AKT et eNOS. Ainsi, l'activation de c-Src par les œstrogènes pourrait induire la traduction des protéines par la voie PI3K/Akt qui régule la survie des cellules et la synthèse protéique.⁸¹

La voie de GMPc: cascade NO-NOS

La voie de PI3K active aussi la eNOS et la stimule à produire et relâcher le NO. Le relâchement de NO induit par eNOS inhibe I_{CaL} via la GMPc. Comme les œstrogènes sont connues pour augmenter l'expression/l'activité de la eNOS ventriculaire, la stimulation de cette voie par les œstrogènes va contribuer à réduire l'apoptose des cardiomyocytes et à favoriser la survie cellulaire. Ces différentes cascades sont alors impliquées dans l'effet cardioprotecteur œstrogénique.⁸²⁻⁸⁴

La Voie de Ras/Mek/MAPK/Erk

Outre la voie de PI3K/AKT, l'activité de c-Src pourrait également stimuler la GTPase, Ras. Une fois activée, Ras active la famille des protéines kinase activées par le mitogène (MeK). À son tour, MeK va conduire à l'activation des MAP kinases qui sont généralement activées par le signal provenant de la surface cellulaire. Les MAP kinases existent sous

trois types principaux: les kinases ERK, les kinases JNK et les kinases p38 dont le principal rôle est de réguler les facteurs de transcription dans la cellule.⁸⁵ La voie de MAPK contribue à l'activation de plusieurs gènes parmi lesquels les gènes qui peuvent influencer la transcription des canaux Kv.

La Voie de "nuclear factor of activated T cell" (NFAT)

La voie de c-Src-Ras-MAPK peut avoir un croisement avec la voie de la calcineurine-NFAT. L'ouverture des canaux calciques et l'augmentation du calcium à l'intérieur de la cellule conduit à l'activation d'une famille de facteurs de transcription, les NFAT, qui sont retenues dans le cytoplasme sous leur forme phosphorylée inactive. Le calcium en liant une protéine, la calmoduline, active la phosphatase calcineurine, qui déphosphoryle les NFAT, permettant ainsi leur translocation dans le noyau et la régulation de la transcription.^{85;86} Les NFAT contribuent à l'activation de plusieurs gènes parmi lesquels les gènes qui peuvent influencer la transcription des canaux Kv.

1.8 Importance des hormones sexuelles dans la régulation de l'électrophysiologie cardiaque

1.8.1 Historique

En 1919, Lombard et Cope ont rapporté pour la première fois des différences reliées au sexe dans l'électrophysiologie cardiaque. Cette différence reliée au sexe a été documentée par la suite en 1920 par Bazett qui a montré que l'intervalle QTc des femmes est plus long que celui des hommes.⁸⁷ Ceci a été reconfirmée par plusieurs chercheurs qui ont rapporté que comparés aux hommes, les femmes ont des intervalles QTc plus longs et sont plus susceptibles de développer des torsades de pointes.⁸⁸ La différence homme-femme au niveau de l'intervalle QTc, qui est absente à la naissance et durant l'enfance, se manifeste par un raccourcissement de l'intervalle QTc chez les garçons à l'adolescence.

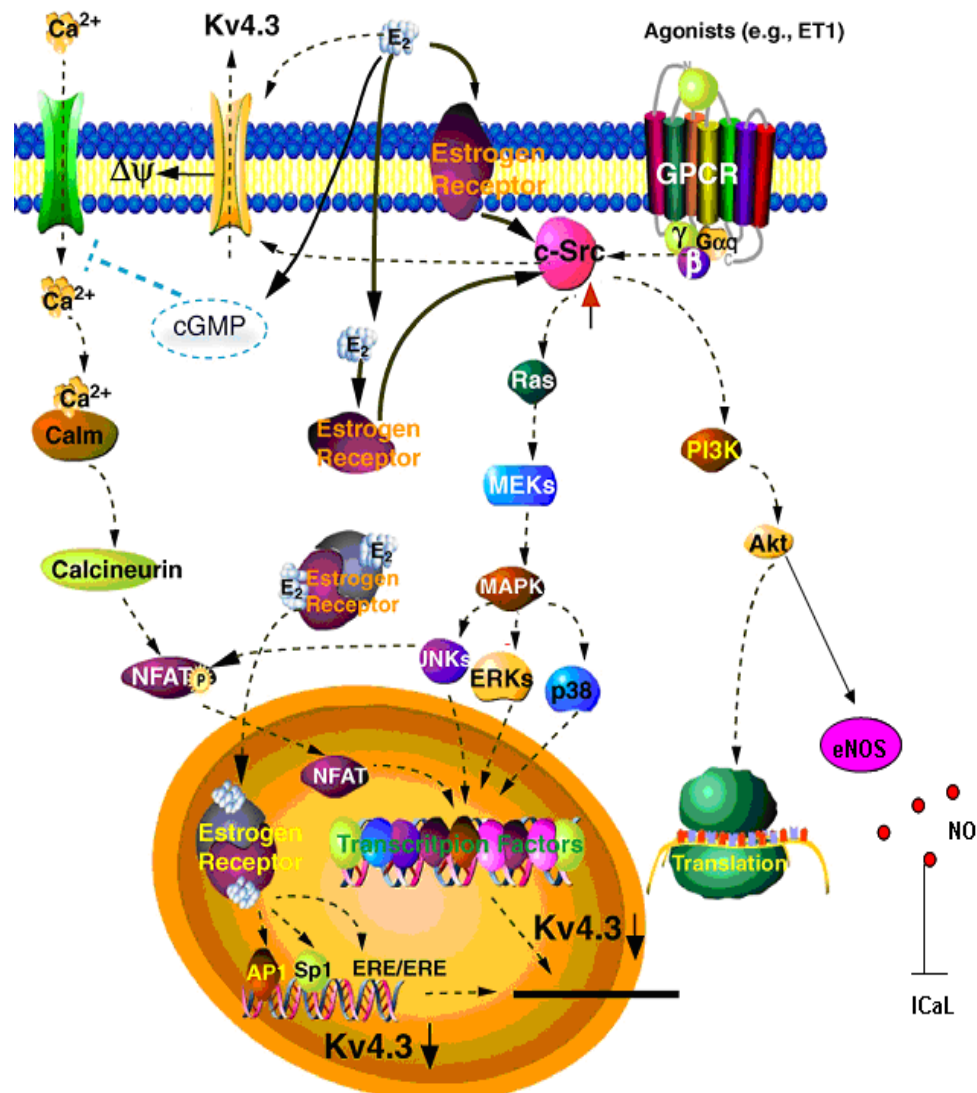


Figure 1.8: Représentation schématique des différentes voies de signalisation induites par les œstrogènes. Adapté de.⁸⁹

L'augmentation importante des hormones sexuelles mâles qui caractérise cette période et la présence des récepteurs fonctionnels aux hormones sexuelles au niveau ventriculaire suggèrent que les androgènes pourraient jouer un éventuel rôle dans la différence liée au sexe.^{3;77;90} Cependant, on ignore encore le mécanisme d'action détaillé des hormones sexuelles au niveau de l'intervalle QT et de la repolarisation cardiaque. Contrairement à ces études qui se sont penchées sur les effets des androgènes au niveau de la repolarisation, les effets des œstrogènes sont encore moins étudiés. Les études faites sur

les oestrogènes ont montré que leur mode d'action implique des récepteurs membranaires qui induisent des effets non-génomiques et des récepteurs nucléaires qui induisent des effets génomiques au niveau de la modulation de l'expression des gènes cibles.

1.8.2 Différence reliée au sexe au niveau de l'ECG

Le sexe est considéré depuis de nombreuses années comme un facteur qui peut influencer l'ECG. En fait, plusieurs études cliniques ont rapporté des différences mâles-femelles au niveau des paramètres électrocardiographiques. Ces études ont montré que les femmes ont une fréquence cardiaque plus rapide que les hommes et un intervalle QTc plus long après la puberté.^{41;87;91-94} Des études plus approfondies ont montré aussi que l'intervalle et le segment PR sont plus courts chez la femme. Ces études suggèrent que c'est probablement le petit volume du cœur qui est responsable de ces différences électrophysiologiques alors que d'autres rapportent que c'est suite aux effets hormonaux sur l'expression et la fonction des courants ioniques membranaires.

1.8.3 Rôle des hormones sexuelles dans l'électrophysiologie cardiaque : études cliniques et expérimentales

1.8.3.1 Hommes

Plusieurs études cliniques suggèrent que les hormones sexuelles mâles modulent la repolarisation ventriculaire. En fait, les résultats d'une étude faite chez des hommes castrés supportent cette hypothèse. L'absence des androgènes chez les hommes castrés est associée à un intervalle QT plus long alors que celui des femmes exposées à de hauts niveaux des androgènes est plus court. De plus, le traitement des hommes castrés ou hypogonadiques avec différentes doses de testostérone montre que la durée de l'intervalle QT est inversement proportionnelle à la dose de testostérone.⁹⁵ Une autre étude a aussi rapporté que des athlètes qui prennent de doses élevées de stéroïdes anabolisants présentent des intervalles QT plus courts.^{96;97} De plus, chez les femmes dont les concentrations de testostérone sont élevées, comme dans le cas des femmes affectées par le syndrome des ovaires polykystiques ou atteintes d'une hyperandrogénie ou du syndrome de virilisation, l'intervalle QTc est plus court que celui des femmes témoins ou hommes castrés.⁹⁸ Ces

différents résultats suggèrent un rôle principal des androgènes dans les différences homme-femme observées dans la repolarisation ventriculaire dont l'intervalle QT est le principal indice.^{99;100}

1.8.3.2 Femmes

Il est maintenant bien documenté que le sexe féminin constituait un facteur de risque pour le développement des torsades de pointes.

Ménopause:

Le risque de développer une torsades de pointes après un traitement au d,l sotalol était trois fois plus élevé chez les femmes que chez les hommes et ceci sans aucune différence entre les femmes pré-et post-ménopausées.⁴³ Une étude plus récente a montré que les femmes ménopausées traitées aux œstrogènes présentent une prolongation de l'intervalle QTc comparativement aux femmes non-traitées suggérant un rôle des œstrogènes dans la modulation de QT.¹⁰¹ Ces deux résultats différents font que les données sur les effets des oestrogènes lors de la ménopause sont loins d'être complets et nécessitent plus d'études.

Cycle menstruel:

Des études examinant le QT durant le cycle menstruel ont rapporté des données contradictoires quant à l'implication des hormones sexuelles féminines. Rodriguez et coll., ont montré, qu'en conditions contrôles, la durée de l'intervalle QT est similaire durant les différentes phases du cycle menstruel.¹⁰² Ceci étant l'opposé des résultats de Nakagawa et coll., qui ont montré un raccourcissement de l'intervalle QT durant la phase lutéale par rapport à la phase folliculaire.⁹⁹ De plus, après le blocage du système nerveux autonome par l'atropine et le propranolol, l'intervalle QTc était plus court lors de la phase lutéale par rapport à la phase folliculaire et ovulatoire.¹⁰³ Ceci est aussi supporté par les travaux de Rodriguez et coll. qui ont montré que comparativement à la phase lutéale ou aux hommes, la concentration élevée en oestrogènes lors de la phase ovulatoire est accompagnée d'un QT plus long chez les femmes recevant des médicaments prolongeant la durée de l'intervalle QT. Ce qui suggère un rôle œstrogénique dans ce phénomène. En conclusion, les changements de concentrations des hormones sexuelles féminines lors du cycle menstruel ne sont pas suffisants et les études réalisées ne permettent pas d'expliquer les

différences reliées au sexe au niveau de l'intervalle QTc ainsi que l'incidence plus élevée des dépolarisations précoces et des torsades de pointes chez les femmes.

1.8.3.3 Modèles animaux

1.8.3.3.1 Les androgènes

a) Effets aigus

Il a été rapporté que la testostérone peut avoir un effet direct sur les courants K^+ voltages-dépendants. En fait, une étude réalisée chez le cobaye a montré que l'administration aiguë de la testostérone induit une augmentation d' I_{Ks} et un raccourcissement de la durée du potentiel d'action et de l'intervalle QTc dans les cardiomyocytes ventriculaires.¹⁰⁴ De plus, il a été documenté que l'effet de la testostérone est dépendant de la dose. L'administration aiguë des doses physiologiques de testostérone (10 nM) augmente I_{Kr} alors qu'un traitement avec des concentrations supra-physiologiques de testostérone (1 μ M) réduit I_{Kr} dans un modèle de lignée cellulaire.¹⁰⁵ Ceci étant confirmé par les travaux de Shuba et coll., qui ont rapporté une diminution du courant généré par HERG dans les ovocytes des grenouilles suite au traitement avec des concentrations supra-physiologiques de testostérone.¹⁰⁶ En conclusion, la régulation de la repolarisation cardiaque par la testostérone est dépendante de la dose. L'administration aiguë des doses physiologiques de testostérone est associée à une augmentation des courants K^+ , un raccourcissement de l'intervalle QTc et de la durée du potentiel d'action.

b) Effets chroniques

Plusieurs études réalisées chez les animaux supportent le rôle des hormones sexuelles mâles dans les différences mâle-femelle au niveau de la repolarisation cardiaque. Une étude faite chez le lapin a montré que la durée du potentiel d'action chez les mâles est plus courte que celle des femelles. Elle est aussi plus courte chez les mâles orchietomisés que chez les femelles ovariectomisées.¹⁰⁷ De plus, le traitement *in vivo* des lapins mâles orchietomisés avec la dihydrotestostérone (DHT) raccourcit la durée de l'intervalle QT et augmente la densité des courants K^+ .¹⁰⁸ Ceci a été confirmé par une étude faite chez des chiens qui a montré que la durée du potentiel d'action des chiens mâles traités avec le 17 β -œstradiol est significativement plus longue que celle du groupe traité avec la DHT.¹⁰⁹ De

même, un traitement chronique avec la testostérone induit un raccourcissement de l'intervalle QTc des chiens femelles ovariectomisées et témoins alors que l'intervalle QTc était similaire entre ces deux groupes.¹¹⁰ En conclusion, la durée du potentiel d'action est inversement proportionnelle au niveau de la testostérone en condition aigue comme en condition chronique.

Contribution de notre laboratoire dans ce domaine

Des études menées dans notre laboratoire ont révélé l'existence de différences mâles-femelles au niveau de la repolarisation cardiaque chez la souris adulte. Ces études ont contribué d'une façon importante à éclaircir le rôle des androgènes dans la différence reliée au sexe dans la repolarisation ventriculaire et ceci à l'aide de divers modèles de souris. En utilisant des souris CD1, nous avons montré que comme chez l'humain, les souris femelles présentaient un retard de repolarisation et une prolongation de la durée du potentiel d'action. Cette prolongation était due à une diminution de la densité du courant K^+ , I_{Kur} , ainsi que de l'expression de son canal sous-jacent, Kv1.5. De plus, la castration des souris mâles entraînait un ralentissement de la repolarisation et le traitement de ces derniers avec les androgènes a montré une accélération de la repolarisation ventriculaire. Ces données suggèrent fortement que les différences liées au sexe au niveau de la repolarisation ventriculaire sont principalement dues aux hormones sexuelles mâles et que les androgènes étaient des facteurs clés dans la différence mâle-femelle.^{111;112} Ce résultat a été confirmé en utilisant un modèle naturel de déficience en androgènes, les souris C57BL/6.¹¹² Cette étude a révélé que cette lignée de souris, dont les mâles avaient des taux très faibles de testostérone et de la DHT, ne présentaient pas de différence de repolarisation entre les sexes et que lorsque traités avec la DHT, la repolarisation est plus courte. En conclusion, les hormones sexuelles mâles sont essentielles à l'apparition de la différence mâle-femelle. Toutefois, une régulation de l'électrophysiologie cardiaque par les androgènes n'exclut pas la possibilité que les hormones sexuelles femelles soient aussi impliquées dans ce phénomène.

1.8.3.3.2 Les oestrogènes

a) Effets aigus

Les oestrogènes et la testostérone altèrent la modulation et la densité des courants K^+ . La testostérone augmente la densité des courants potassiques alors que les œstrogènes produisent l'effet opposé. Une augmentation de l'incidence des torsades de pointes indépendante du sexe chez les lapins après administration du 17β -œstradiol a été aussi rapportée.¹¹³ L'administration aiguë de 17β -œstradiol inhibe le courant généré par HERG chez le cobaye¹¹⁴, supprime I_{to} dans les cardiomyocytes ventriculaires des rats¹¹⁵, prolonge la durée du potentiel d'action et de l'intervalle QTc. Bien que ces différentes études suggèrent un effet pro-arythmique des œstrogènes et ceci en diminuant la densité du courant potassique, l'extrapolation de ces données à l'humain est difficile et limitée étant donné que ces observations sont obtenues *in vitro* et les concentrations utilisées étaient supra-physiologiques (30 μ M).

Outre les courants K^+ , l'effet des hormones sexuelles féminines sur les courants Ca^{2+} a été aussi étudié. Les résultats de plusieurs études montrent une régulation hormonale de ce courant. Contrairement à l'effet pro-arythmique des œstrogènes suggéré ci-haut, les résultats obtenus sur les courants calciques proposent un mécanisme anti-arythmique. Dans la majorité de ces études, l'effet inotrope négatif des œstrogènes est une conséquence d'une inhibition des courants calciques^{116;117} qui est plus importante chez les rats femelles que les mâles.¹¹⁸ En inhibant l' I_{CaL} , le 17β -œstradiol raccourcit la durée du potentiel d'action des cellules atriales des cobayes. Cet effet anti-arythmique pourrait contribuer à expliquer les actions cardioprotectives des œstrogènes.¹¹⁸ Comme dans le cas des effets sur les courants K^+ , les effets oestrogéniques aigus sur les courants calciques sont obtenus avec des concentrations de 1–30 μ M qui excèdent énormément les concentrations physiologiques des œstrogènes. Les conditions contradictoires de ces études font que l'influence des hormones féminines sur l'activité électrique cardiaque est encore moins claire et nécessite des études plus avancées.

b) Effets chroniques

Malgré que plusieurs études aient étudié l'effet de l'application aiguë des œstrogènes dans la régulation de la repolarisation et l'induction des arythmies, il y a juste quelques études qui ont tenté de comprendre les effets chroniques de ces hormones sur la repolarisation cardiaque. Ce rôle à long terme a été étudié dans des modèles des animaux témoins, castrés, ovariectomisées, gestantes, de différentes espèces animales et traités chroniquement par les hormones.^{119;120} Des études précédentes ont montré que les œstrogènes agissent au niveau des canaux K^+ des artères coronariennes et des muscles lisses de l'utérus. Chez le rat, le 17β -œstradiol diminue l'expression du courants K^+ sortant I_{to} au niveau des cellules du myomètre et cause une induction de KCNE1 au niveau de l'utérus.¹²⁰ D'autres études ont aussi mis en évidence le rôle des oestrogènes dans ce phénomène. Des chiens mâles et femelles castrés répondent d'une manière différente à la testostérone et aux œstrogènes: la testostérone accélère la repolarisation ventriculaire et diminue la prolongation de la repolarisation induite par le dofétilide tandis que les œstrogènes ont un faible effet ou même pas d'effet sur ces paramètres.¹¹⁰ Ces résultats sont en contradiction avec ceux de deux autres études qui ont testé l'effet chronique des œstrogènes sur la repolarisation ventriculaire chez le lapin. Drici et coll. ont observé que les niveaux d'ARNm du canal $Kv1.5$ (I_{Kur}) et de minK (sous unité du canal I_{Ks}), étaient diminués chez les lapines ovariectomisées suite au traitement au 17β -œstradiol. Ils ont aussi rapporté que les lapines ovariectomisées recevant du 17β -œstradiol présentaient une repolarisation plus lente que les ovariectomisées non traités.¹²¹ Ces résultats sont en accord avec ceux de Hara et coll. qui ont aussi observé une prolongation de la durée du potentiel d'action et une augmentation de l'incidence des dépolarisations précoces chez les lapines ovariectomisées traitées au 17β -œstradiol.¹⁰⁹ Ces données supportent l'hypothèse que les œstrogènes sont associés à une repolarisation retardée et sont capables d'altérer l'activité électrique chez le lapin.

Plusieurs études qui suggèrent que les œstrogènes peuvent moduler l'activité électrique cardiaque proviennent des études faites chez des animaux gestantes. À ce jour, deux études expérimentales visant à comprendre les effets de la grossesse sur l'activité électrique ont été réalisées. Une de ces études a étudié l'effet de la grossesse sur les courants K^+ au niveau

utérin et l'autre au niveau ventriculaire. Dans les deux cas, des femelles gestantes, non-gestantes et ovariectomisées ont été utilisées. Song et coll. ont reporté que le courant I_{to} utérin était régulé par des variations hormonales chez le rat. En effet, les niveaux d'ARNm et la densité protéique du canal Kv4.3 étaient réduits pendant la grossesse.⁷⁹ Cette diminution d'ARNm était associée à une réduction du courant I_{to} , une prolongation de la durée du potentiel d'action et de l'intervalle QT. Dans cette même étude, les auteurs ont été capables de montrer que les rates ovariectomisées traitées avec des niveaux d'œstrogène mimant ceux atteints durant la grossesse étaient capables de reproduire ce phénotype. Ces résultats suggèrent fortement que les hauts niveaux des œstrogènes atteints lors de la grossesse étaient impliqués dans les changements transcriptionnels observés au niveau du muscle utérin chez le rat. De plus, ces données proposent fortement que les hormones peuvent moduler la transcription des canaux K^+ ainsi que la densité de ces courants. Ce même groupe a aussi étudié l'effet de la grossesse sur la repolarisation ventriculaire chez la souris.¹²² Les auteurs ont observé que les courants K^+ sortants, les niveaux d'ARNm et protéique du canal Kv4.3 étaient diminués chez les souris gestantes. Parallèlement à cette diminution, ils ont aussi rapporté que les souris gestantes avaient une repolarisation plus lente que les souris non gestantes et les souris en post-partum. Les mêmes changements ont été rapportés chez les souris ovariectomisées traitées aux œstrogènes et étaient absentes suite à l'administration de l'antagoniste spécifique des récepteurs œstrogéniques, l'ICI 182,780. Comme dans le cas de l'étude de Song et coll., les auteurs proposent que l'augmentation des œstrogènes à la fin de la gestation est à l'origine de la diminution de l'expression de Kv4.3 et de la prolongation de la durée du potentiel d'action et de l'intervalle QT.¹²² De plus, l'application d'un antagoniste des récepteurs aux œstrogènes prévenait la diminution de l'ARNm du canal Kv4.3 suggérant un rôle des récepteurs œstrogéniques dans ce changement.

Tout récemment, ce même groupe a étudié le rôle de la fluctuation hormonale en œstrogènes observée durant le cycle menstruel dans la régulation de la repolarisation ventriculaire chez la souris.¹²³ Dans cette étude, les auteurs ont montré que la densité de $I_{K_{slow}}$ et de I_{to} varie selon la phase du cycle menstruel. Elle est plus basse chez les souris durant l'œstrus (hautes concentrations plasmatiques en œstrogènes) comparativement aux animaux en diestrus (basses concentrations plasmatiques en œstrogènes) et aux mâles. Cette

diminution est associée à une prolongation de la durée du potentiel d'action et de l'intervalle QT. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Burke et coll. qui ont montré qu'en absence des médicaments qui altèrent la repolarisation cardiaque, l'intervalle QTc est similaire pendant les différentes phases du cycle menstruel et que les fluctuations hormonales n'affectent pas la repolarisation chez la femme.¹⁰³ Contrairement à ces travaux, Brunet et coll. et notre laboratoire, n'ont pas vu de différence mâle-femelle au niveau de la repolarisation chez les souris C57BL6.¹¹² Ces derniers étant caractérisés par la présence de faibles concentrations en testostérone.

D'autre part, deux études se sont attardées sur le rôle des RE dans les effets chroniques des œstrogènes au niveau cardiaque. Johnson et coll. ont rapporté que l'expression de I_{CaL} est significativement augmentée chez les souris déficientes en RE α (ERKO α). Cette augmentation de la densité du courant calcique est associée à une augmentation de la durée du potentiel d'action et une prolongation de l'intervalle QT.¹²⁴ Ceci suggère que cet effet est régulé par les RE et que la diminution de l'effet des œstrogènes par absence des RE peut conduire à une augmentation de la densité de I_{CaL} cardiaque et à un risque accru d'arythmie et des maladies cardiovasculaires. Par contre, un second groupe a montré que la densité de I_{CaL} obtenus des myocytes ventriculaires des souris témoins, des souris ERKO α et des souris ERKO β était similaire entre les trois groupes suggérant que l'effet oestrogénique n'est pas régulé par les RE.¹²⁵

En tenant compte des discordances de toutes ces études portant sur l'effet des œstrogènes au niveau de la repolarisation ventriculaire et au niveau des courants calciques, d'autres études sur ce sujet sont fortement justifiées.

Résumé:

Comparativement aux mâles témoins, les femmes présentent un intervalle QT plus long et sont plus susceptibles de développer des torsades de pointes. En effet, la durée de leurs potentiels d'action est prolongée et l'intervalle QT est plus long. Des études précédentes faites dans notre laboratoire ont démontré qu'il existe des différences mâle-femelle au niveau de la repolarisation chez la souris et que les androgènes contribuent de façon importante à ce phénomène. Les résultats des différentes études présentées ci-haut montrent

qu'une forte présence d'œstrogènes (ex. fin de grossesse) ou une absence en œstrogènes (ovariectomie) induisent des changements au niveau des courants de repolarisation supportant ainsi le rôle des œstrogènes et des récepteurs œstrogéniques et fournissant des évidences que les œstrogènes sont un facteur majeur dans la régulation de la repolarisation cardiaque. Ainsi, toutes ces observations nous ont poussés à déterminer si le rôle des récepteurs œstrogéniques et des changements hormonaux importants en concentrations œstrogéniques (ovariectomie, gestation, etc) peuvent affecter la repolarisation cardiaque chez la souris.

1.8.3.3.3 Les modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes (SERM)

a) Effets aigus

Les modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes, un groupe de médicaments de structure chimique non stéroïdienne, sont des ligands des récepteurs œstrogéniques. Dans certains tissus, ces médicaments ont un effet antagoniste des œstrogènes, tandis que dans d'autres tissus, ces médicaments peuvent avoir un effet agoniste.^{126;127} Grâce à ses propriétés anti-œstrogéniques au niveau du sein, le tamoxifène est le SERM le plus utilisé dans la prévention et le traitement du cancer de sein chez les femmes pré- et post-ménopausées.¹²⁸⁻¹³⁰

Des études réalisées chez l'humain ont permis de montrer que le premier passage hépatique du tamoxifène augmente significativement son activité. Cet effet serait dû à la présence du 4-hydroxytamoxifène (4OH-tamoxifène), métabolite principal du tamoxifène, qui a une affinité et une sélectivité beaucoup plus élevée que le tamoxifène pour le RE.^{126;131;132} Par conséquent, le tamoxifène est considéré comme un pro-médicament qui nécessite d'être activé pour exercer ses effets.^{133;134} Pour toutes ces raisons, il est plus intéressant d'utiliser le 4OH-tamoxifène pour les études in vitro examinant les effets du tamoxifène.

Comme on vient de mentionner ci-haut, le tamoxifène est classé parmi les médicaments qui peuvent causer le syndrome du LQT et induire des arythmies ventriculaires. En fait, bien que des études aient montré que la mortalité due au cancer est diminuée suite à l'administration du tamoxifène, deux études cliniques ont montré que l'administration des doses élevées de tamoxifène est associée à une prolongation de l'intervalle QT.^{135;136} La

prolongation excessive de l'intervalle QT est un facteur de risque important des torsades de pointes et elle est souvent associée à une inhibition ou une diminution des courants K^+ . Des études précédentes ont montré que l'administration aiguë du tamoxifène est associée à une diminution des courants K^+ . Bien que ces études aient rapporté l'effet direct du tamoxifène, il n'y avait aucune étude jusqu'à présent qui s'était intéressée à étudier le rôle du 4OH-tamoxifène sur les courants de repolarisation et en particulier sur les courants K^+ cardiaques. En conclusion, l'étude des effets aigus du 4OH-tamoxifène permet de vérifier d'une part les effets du 4OH-tamoxifène sur les courants K^+ cardiaques et d'autre part l'implication des RE dans cet effet.

b) Effets chroniques

L'inhibition de certains courants K^+ suite à l'administration aiguë du tamoxifène, permet d'élaborer l'hypothèse que le tamoxifène peut retarder la repolarisation cardiaque, prolonger la durée du potentiel d'action et induire une augmentation de l'intervalle QT. D'où un risque potentiellement accru de développer des torsades de pointes et une augmentation de l'incidence des morts subites. Bien que les deux études rapportées ci-dessus montrent une augmentation de QT et que son application en aiguë in vitro est associée à une inhibition des courants K^+ , aucun cas d'arythmie n'a été rapporté chez les femmes traitées à long terme avec le tamoxifène jusqu'à maintenant. Ceci suggère qu'administré chroniquement, le tamoxifène ne module pas à la baisse les courants K^+ cardiaques. En conclusion, étant donné que tous les effets du tamoxifène sur les courants ioniques cardiaques ont été rapportés seulement après une exposition aiguë et que ceci ne reflète pas les conditions d'un traitement chronique, il est nécessaire de vérifier si les effets à long terme du tamoxifène sur les courants K^+ cardiaques peuvent différer de ceux observés à court terme. Ces études permettraient de voir si le tamoxifène diminue les courants K^+ , de vérifier pourquoi les femmes traitées pendant plusieurs années avec un antagoniste non sélectif des RE, (i.e. le tamoxifène) ne développent pas de torsades de pointes et d'établir si l'inhibition à long terme des RE peut affecter la repolarisation ventriculaire.

1.9 Choix des différents modèles de souris pour étudier les effets des oestrogènes au niveau cardiaque

Dans cette thèse, différents modèles de souris ont été utilisés afin de déterminer si des changements importants des niveaux des œstrogènes, par exemple une absence d'œstrogènes (ovariectomie) ainsi qu'une forte présence d'œstrogènes (fin de grossesse), induisent des changements pouvant affecter la repolarisation ventriculaire.

1.9.1 Les souris ovariectomisées (OVX)

L'objectif de ce modèle était de définir quel pouvait être l'impact d'une absence de la source principale des œstrogènes, soit l'ovaire, sur la repolarisation ventriculaire chez la souris. Nous avons démontré dans notre laboratoire que le récepteur ER α était surexprimé chez des souris OVX, ce qui suggère que les myocytes ventriculaires répondent aux changements de concentration d'hormones sexuelles féminines.

1.9.2 Le tamoxifène

En utilisant une approche pharmacologique, soit un antagoniste non sélectif des RE, le tamoxifène, nous avons établi que si l'inhibition à long terme des deux RE (RE α et RE β) pouvait reproduire les effets de l'ovariectomie sur la repolarisation ventriculaire. Les souris témoins et Ovx étaient traitées avec des implants sous-cutanés de tamoxifène. Chaque implant contenait 5 mg de tamoxifène qui se libère d'une façon continue pendant 60 jours.

1.9.3 Le modèle ERKO

Tel que mentionné ci-haut, les deux récepteurs oestrogéniques, RE α et RE β , peuvent jouer un rôle important dans les effets cardiovasculaires médiés par les œstrogènes. Grâce aux progrès de la technologie, l'accès à des souris transgéniques dont le gène fonctionnel du RE α (ERKO α : Estrogen Receptor Knock-Out mice α) ou RE β (ERKO β : Estrogen Receptor Knock-Out mice β) a été inactivé, est rendu possible. L'accès à ces souris a rendu possible l'étude in vivo les fonctions physiologiques des récepteurs RE α et RE β et d'approfondir encore davantage nos études pour éclaircir le rôle exact des œstrogènes au niveau cardiaque en présence de l'un ou l'autre des deux RE.

1.9.4 La grossesse

Tous les modèles utilisés ci-haut sont des modèles caractérisés par une absence d'œstrogène ou une inhibition de son effet. Un modèle physiologique intéressant pour voir l'effet des changements majeurs des niveaux d'œstrogènes sur la repolarisation cardiaque mais cette fois-ci en présence d'une très forte concentration en œstrogènes est la grossesse. Étant donné que ce modèle n'a pas été caractérisé auparavant, la vérification que la souris est un bon modèle pour étudier les effets de la gestation sur les paramètres électrocardiographiques est crucial avant d'entamer les études d'électrophysiologiques cellulaires.

Mise en contexte du modèle:

Chez la femme, la grossesse est associée à une augmentation de la fréquence cardiaque qui est connue comme un facteur de risque de développement des arythmies cardiaques.^{137;138} En fait, une augmentation de l'incidence et une exacerbation des tachycardies supraventriculaires a été rapportée chez les femmes enceintes.¹³⁸ Par contre, il n'est pas clair comment et par quel mécanisme la grossesse peut altérer le rythme cardiaque. Notons que le rythme cardiaque est régulé par le nœud sinusal responsable de l'automatisme cardiaque et par le système nerveux autonome. La grossesse constitue alors un modèle intéressant afin de caractériser l'effet de l'augmentation des œstrogènes sur l'accélération du rythme cardiaque qui est un facteur de risque d'arythmie. C'est un autre trouble du rythme relié aux œstrogènes sans changement dans la repolarisation. Ainsi, vérifier si ces altérations sont dues à des variations du système nerveux autonome et/ou de l'automatisme cardiaque serait d'une extrême importance.

L'accès à des souris gestantes est alors fort intéressant afin de vérifier si elle présente le même profil électrocardiographique que la femme enceinte i.e si la souris gestante présente une accélération du rythme cardiaque comme la femme ou, en d'autres termes, si les changements physiologiques qui surviennent lors de la grossesse entraînent des modifications au niveau de la fréquence et de l'activité électrique cardiaque chez la souris. Ce modèle permet aussi de vérifier les effets de la gestation sur les paramètres de l'ECG autres que la fréquence cardiaque, de déterminer si cette dernière est influencée ou

non par le système nerveux autonome et de vérifier si la réponse à des agonistes/antagonistes du système nerveux autonome est différente ou non entre les souris gestantes, non gestantes et post-partum. En d'autres termes, si la sensibilité du cœur à des agents sympathiques et parasympathiques était affectée par la grossesse. Une fois le profil électrocardiographique de ce modèle complété, des études d'électrophysiologie cellulaire pourront constituer la suite de ces travaux afin de mieux caractériser ce modèle.

1.10 Justification de l'étude

1.10.1 Œstrogène et repolarisation

Trois raisons principales nous ont motivées à étudier l'effet à court et à long terme du tamoxifène sur la repolarisation cardiaque:

- Certains médicaments inhibant les courants K^+ cardiaques et prolongeant la durée du potentiel d'action peuvent causer le syndrome du LQT et induire des arythmies ventriculaires.
- La capacité du tamoxifène à inhiber certains types de courants ioniques (K^+ et Na^+).
- L'absence des troubles du rythme cardiaque lors d'un traitement à long terme avec le tamoxifène.

Les résultats des études du tamoxifène ainsi que le rôle des androgènes dans les différences mâle-femelle au niveau de la repolarisation cardiaque dévoilées dans des études antérieures du laboratoire¹¹² nous a poussées à étudier les effets des hormones sexuelles féminines. Comme dans le cas des androgènes, les œstrogènes se lient aux RE et agissent comme facteurs de transcription. La présence des récepteurs aux œstrogènes dans le muscle cardiaque et les cardiomyocytes isolés a été établie dans les cœurs de mammifères tels la souris, le rat et l'humain et soutient un rôle possible des hormones sexuelles dans le système cardiovasculaire.^{38;77;78} Cependant, il reste à élucider si les œstrogènes peuvent agir sur le système cardiovasculaire par les récepteurs cytoplasmiques et nucléaires ou non.

Des études précédentes ont étudié les effets des œstrogènes sur les courants K^+ au niveau des artères coronariennes et des muscles lisses de l'utérus. Ces études ont montré qu'au

niveau du muscle utérin les œstrogènes affectent spécifiquement le courant I_{to} .^{79;119;120} Ce dernier est aussi présent au niveau cardiaque de plusieurs espèces dont la souris et l'humain. Une autre étude faite par Eghbali et coll. a montré que les variations importantes des œstrogènes affectent I_{to} . En fait, ils ont rapporté que les souris enceintes et les souris ovariectomisées traitées aux œstrogènes et non à la progestérone présentent une diminution de la densité de I_{to} et de l'expression de sa composante $Kv4.3$. Cet effet étant annulé après l'application de l'antagoniste spécifique des récepteurs aux œstrogènes, l'ICI 182,780 prouvant ainsi l'implication des œstrogènes et de leurs récepteurs dans ce phénomène.

En résumé,

- Plusieurs études suggèrent qu'à court terme le tamoxifène affecte les courants K^+ et ainsi la repolarisation.
- Des études expérimentales ont montré que les hormones sexuelles régulent l'expression des canaux Kv et que le 17β -œstradiol régule les courants K^+ dans les tissus non cardiaques.
- Les RE sont présents au niveau cardiaque et il a été démontré que les œstrogènes ont des effets au niveau cardiovasculaire.
- La souris possède des courants K^+ cardiaques présent chez l'humain.

Ces différentes études nous ont poussées à éclaircir et expliquer le rôle des œstrogènes et des RE sur la repolarisation cardiaque. Tous les modèles de souris utilisés pour étudier les effets œstrogéniques sur la repolarisation cardiaque sont des souris caractérisées par l'absence des œstrogènes (ovariectomisées ou traitées avec du tamoxifène) ou déficientes en RE (souris ERKO) et alors des modèles qui traitent un défaut en œstrogènes.

Ainsi, les deux premiers objectifs de cette thèse de doctorat furent de:

- Étudier les effets aigus et chroniques du tamoxifène sur la repolarisation ventriculaire chez la souris.
- Vérifier le rôle des œstrogènes et des récepteurs œstrogéniques dans la repolarisation cardiaque chez souris.

1.10.2 Œstrogène et rythme cardiaque

Un autre aspect intéressant des œstrogènes non relié à la repolarisation est l'effet des œstrogènes sur le rythme cardiaque. Chez la femme, une augmentation du rythme cardiaque de 10-15 battements par minute a été rapportée pendant la grossesse.¹³⁷⁻¹³⁹ Cette accélération du rythme cardiaque est aussi associée à une augmentation de l'incidence et de l'exacerbation des arythmies.^{92;140-142} Les enregistrements d'ECG obtenus dans les études cliniques n'ont montré aucune différence au niveau de l'intervalle QT et de l'onde P suggérant ainsi que cette modification n'affecte ni la repolarisation ventriculaire ni la conduction auriculaire.¹³⁷ L'augmentation importante des hormones féminines lors de la grossesse (1), l'association des œstrogènes à l'augmentation du rythme cardiaque et au raccourcissement de la conduction auriculo-ventriculaire chez la souris (2) et la réversibilité de tous ces changements en post-partum qui corrèle avec la chute hormonale (3) suggèrent que les hormones féminines jouent un rôle important dans l'automatisme cardiaque.¹⁴³⁻¹⁴⁵

Le cœur est un muscle doté d'un automatisme assuré par le nœud sinusal : ses contractions surviennent de façon spontanée et régulière. C'est son automatisme qui lui assure une autonomie de fonctionnement. Le cœur est aussi innervé par le système nerveux sympathique (responsable de l'accélération du rythme cardiaque) et parasympathique (responsable du ralentissement du rythme cardiaque) qui agissent à titre de régulateurs afin de faire varier le rythme cardiaque et adapter le travail cardiaque au besoin de l'organisme à chaque instant. La grossesse, par exemple, est caractérisée par des modifications importantes dans la modulation cardiaque autonome qui joue un rôle majeur dans l'adaptation du système cardiovasculaire à divers changements hémodynamiques requis pour une grossesse normale.^{146;147}

En résumé,

- La grossesse est associée à une accélération du rythme cardiaque, facteur de risque des arythmies.
- Le SNA régule le rythme cardiaque.

Ces études nous ont poussées à déterminer si la souris gestante présente, comme la femme, une accélération du rythme cardiaque et si le cœur est régulé différemment par le SNA lors

de la grossesse. Ainsi, le dernier objectif de cette thèse de doctorat fut d'étudier les effets de la gestation et l'implication du système nerveux autonome sur les différents paramètres de l'ECG.

**Chapitre 2 Étude des effets aigus du 4OH-tamoxifène sur les courants K^+
chez la souris**

2.1 Avant-propos

2.1.1 Introduction

Une première étude a été réalisée chez les souris femelles pour voir l'effet à court terme du 4OH-tamoxifène sur les courants K^+ .

Tel que mentionné dans l'introduction, les résultats de plusieurs études suggèrent que l'administration aiguë du tamoxifène pouvait réduire certains courants K^+ cardiaques, suggérant que chez les patientes prenant ce dernier risquerait d'entraîner une prolongation de l'intervalle QT et ainsi favoriser le développement d'arythmies. Cependant, aucune de ces études n'a regardé les effets de son métabolite principal, le 4 OH-tamoxifène, sur la repolarisation cardiaque. Étant donné que *in vivo*, le tamoxifène est largement métabolisé et son effet est attribué à celui du 4OH-tamoxifène, l'objectif de cette étude était de vérifier l'effet aigu de ce dernier sur les courants K^+ . Ainsi, nous avons isolé des cardiomyocytes ventriculaires des souris femelles pour enregistrer et mesurer les courants K^+ présents au niveau ventriculaire chez la souris (soient I_{to} , I_{Kur} , I_{ss} et I_{K1}) par des techniques de patch-clamp en configuration « cellule entière ». L'article suivant traite l'effet à court terme du 4OH-tamoxifène sur la repolarisation cardiaque de souris. Cette étude a été publiée en 2010 dans le journal *European Journal of Pharmacology* et elle est l'objectif de ce chapitre.

2.1.2 Contribution des auteurs

Gracia El Gebeily : Expérimentation, analyse, rédaction

Céline Fiset : Conceptualisation du projet, supervision, rédaction finale

2.2 Article

European Journal of Pharmacology **629** (2010) 96–103

4-HYDROXYTAMOXIFEN INHIBITS K⁺ CURRENTS IN VENTRICULAR MOUSE MYOCYTES

Gracia El Gebeily^{1,2} and Céline Fiset^{1,2†}

¹ Research Center, Montreal Heart Institute
5000 Bélanger, Montréal, Québec, Canada, H1T 1C8

² Faculty of Pharmacy, Université de Montréal
Montréal, Québec, Canada

Running title: Effect of 4OH-tamoxifen on ventricular K⁺ currents

Corresponding author: Dr. Céline Fiset
Research Center, Montreal Heart Institute
5000 Bélanger, Montréal, Québec, Canada, H1T 1C8
Phone : (514) 376-3330 (ext. 3025)
Fax : (514) 376-1355

2.2.1 Résumé / Abstract

2.2.1.1 Résumé :

Le tamoxifène est un agent chimiothérapeutique largement utilisé, qui a été associé à une prolongation de l'intervalle QT. Des études précédentes ont rapporté que l'exposition aiguë au tamoxifène peut réduire des courants K^+ cardiaques. Cependant, *in vivo*, le tamoxifène est largement métabolisé et la plupart de son activité est attribuable à son métabolite principal, le 4-hydroxytamoxifène (4OH-tamoxifène). En conséquence, dans la présente étude, nous avons effectué des expériences de voltage-clamp pour vérifier directement les effets du 4OH-tamoxifène sur les courants K^+ dans des myocytes ventriculaires de souris et ceci afin de déterminer si les effets du tamoxifène sur la repolarisation pouvaient être attribués au 4OH-tamoxifène. Les courants K^+ ont été enregistrés avant et après exposition aiguë au 4OH-tamoxifène (0,5, 1 et 10 μ M). Nous avons montré que le 4OH-tamoxifène réduit le courant K^+ (1) transitoire sortant indépendant du Ca^{2+} (I_{to}), (2) à rectification retardée ultrarapide (I_{Kur}) et (3) à rectification entrante (I_{K1}) (jusqu'à 43%, 41% et 26%, respectivement), mais qu'il est sans effet significatif sur le courant sortant à l'équilibre (I_{ss}). Le recouvrement de l'inactivation et l'inactivation à l'équilibre de I_{to} et I_{Kur} n'a pas été affecté par le 4OH-tamoxifène. Des expériences utilisant l'antagoniste des récepteurs aux œstrogènes, le ICI 182,780 et l'inhibiteur de la transcription, l'actinomycine D, ont été réalisées pour évaluer l'implication des récepteurs œstrogéniques. Administré seul, ces composés n'ont pas affecté la densité des courants K^+ . En outre, le prétraitement des myocytes avec le ICI 182,780 ou l'actinomycine D, n'a pas empêché la réponse inhibitrice au 4OH-tamoxifène. En conclusion, le 4OH-tamoxifène réduit les courants K^+ des myocytes ventriculaires de souris et cet effet n'est pas lié à la transcription génomique et n'implique pas une interaction entre le 4OH-tamoxifène et les récepteurs aux œstrogènes.

Mots clés: 4OH-tamoxifène, ventricule, souris, courants K^+ , récepteurs œstrogéniques.

2.2.1.2 Abstract:

Tamoxifen is a widely used chemotherapeutic agent, which has been associated with prolongation of the QT interval. Other studies have reported that acute exposure to tamoxifen can reduce cardiac K^+ currents. However, in vivo tamoxifen is largely metabolized and most of its activity is attributable to its major metabolite, 4-hydroxytamoxifen (4OH-tamoxifen). Accordingly, in the present study, we performed voltage-clamp experiments to directly investigate the effects of 4OH-tamoxifen on the repolarizing K^+ currents in adult mouse ventricular myocytes in order to determine whether the effects of tamoxifen on repolarization could be ascribed to 4OH-tamoxifen. K^+ currents were recorded before and after acute exposure to 4OH-tamoxifen (0.5, 1 and 10 μ M). 4OH-tamoxifen reduced the density of the Ca^{2+} -independent transient outward (I_{to}), the ultrarapid delayed rectifier (I_{Kur}) and the inward rectifier (I_{K1}) K^+ currents (by up to 43%, 41% and 26%, respectively) but had no significant effect on the steady-state outward K^+ current (I_{ss}). Voltage dependence of steady-state inactivation and reactivation time of I_{to} and I_{Kur} were not affected by 4OH-tamoxifen. Experiments using the pure estrogen receptor antagonist, ICI 182,780 and the inhibitor of gene transcription, actinomycin D, were undertaken to assess the involvement of estrogen receptor. Administered alone, these compound did not affect the density of K^+ currents. Moreover, pretreatment of the cells with ICI 182,780 or actinomycin D did not prevent the inhibitory response to 4OH-tamoxifen. Overall, 4OH-tamoxifen reduced K^+ currents in mouse ventricle and this effect is unrelated to gene transcription and does not involve interaction of the drug with estrogen receptor.

Key words: 4OH-tamoxifen, ventricle, mouse, K^+ currents, estrogen receptor.

2.2.2 Introduction

Tamoxifen is a non steroidal compound that can act as an estrogen receptor agonist or antagonist depending on the target tissues. Tamoxifen is a selective estrogen receptor modulator which is the most widely used for the treatment of breast cancer and for the prevention of tumor for women at high risk (Jordan, 1992; Park and Jordan, 2002; Winer et al., 2002). The pharmacological effects of tamoxifen in breast cancer have been ascribed to the antiestrogenic activity of the drug (Johnson et al., 2004; Lim et al., 2005). In some clinical trials, the administration of high doses of tamoxifen has been associated with prolonged QT interval (Pollack et al., 1997; Trump et al., 1992). Prolongation of QT interval reflects repolarization defects which is often associated with a reduction of K^+ currents. Experimental in vitro studies have reported that acute exposure to tamoxifen reduced some cardiac K^+ currents (Best, 2002; Diaz, 2002; He et al., 2003; Liu et al., 1998). In all the studies that examined the effects of tamoxifen on ion currents, cells were perfused directly with tamoxifen. However, tamoxifen undergoes important hepatic metabolism and most of its pharmacological effects are thought to be related to its major metabolite 4-hydroxytamoxifen (4OH-tamoxifen), which has a much higher affinity and selectivity for the estrogen receptor than tamoxifen (Coezy et al., 1982; Katzenellenbogen et al., 1984; Lim et al., 2005). As a result, tamoxifen has been viewed as a pro-drug that needs to be metabolized to produce its effects (Furr and Jordan, 1984). For this reason, 4OH-tamoxifen is more suitable than tamoxifen as a model compound for in vitro studies that examine the effects of tamoxifen. Even though 4OH-tamoxifen has been shown to block the volume-regulated chloride channels (Monaghan et al., 1997; Zhang et al., 1994) and to activate BK channels (Dick and Sanders, 2001), to our knowledge, there are no reports on the effects of 4OH-tamoxifen on other ion channel function, specifically on cardiac K^+ currents. Accordingly, in the work reported here we directly examined the effects of 4OH-tamoxifen on ventricular K^+ currents expressed in mouse heart. We then explored the mechanisms of action of the effects of 4OH-tamoxifen on cardiac K^+ currents. We undertook voltage-clamp studies to compare K^+ current densities under control

conditions and after superfusion of the cells with 4OH-tamoxifen. Experiments were also designed to examine the involvement of estrogen receptor and gene transcription in the response to 4OH-tamoxifen.

2.2.3 Material and methods

2.2.3.1 Ventricular myocytes isolation

Ventricular myocytes were isolated from adult female CD-1 mice (2–3 months) by enzymatic dissociation as previously described. (Fiset et al., 1997; Trépanier-Boulay et al., 2001). All experiments were conducted in accordance with the Canadian Council Animal Care guidelines. The animals were heparinized (1 U/kg; i.p.) 20 min prior to sacrifice, anaesthetized by inhalation of isoflurane and then killed by cervical dislocation. The heart was rapidly excised and retrogradely perfused on a modified Langendorff apparatus through the aorta (2 ml/min) with the following solutions: (1) 5 min with Tyrode solution containing (in mM): 130 NaCl; 5.4 KCl; 1 CaCl₂; 1 MgCl₂; 0.33 Na₂HPO₄; 10 HEPES, 5.5 glucose (pH adjusted to 7.4 with NaOH); (2) 10 min with Tyrode solution with zero Ca²⁺; (3) 20 min with Tyrode solution containing 0.03 mM Ca²⁺, 20 mM taurine, 0.1% bovine serum albumin (BSA; Fraction V, Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA) and 73.7 U/ml type II collagenase (Worthington Co. Ltd., Freehold, NJ, USA); and (4) 5.5 min with Kraftbrühe (KB) solution containing (in mM) 100 K⁺-glutamate; 10 K⁺-aspartate; 25 KCl; 10 KH₂PO₄, 2 MgSO₄; 20 creatine base; 0.5 EGTA; 5 HEPES; 0.1% BSA, 20 glucose (pH to 7.4 with KOH) (Isenberg and Klockner, 1982). During cell isolation solutions were maintained at 37±1 °C and were equilibrated with 100% O₂. At the end of the perfusion the right ventricular free wall was dissected from the heart and placed in “KB” solution. The ventricular tissue was triturated gently with a Pasteur pipette for 10–15 min to free individual ventricular myocytes. Rod-shape single myocytes were then collected and stored in “KB” solution at 4 °C until use.

2.2.3.2 Cellular electrophysiology

Isolated cells were placed in a recording chamber (volume 200 µl) on the stage of an inverted microscope, and continuously superfused with oxygenated HEPES-buffered Tyrode solution at 1–2 ml/min. Whole-cell voltage-clamp recordings were made using the

ruptured patch-clamp technique with a patch-clamp amplifier, Axopatch 200 B (Axon Instruments, Foster City, USA). Pipettes were made from borosilicate glass (World Precision Instrument, Sarasota, FL, USA, OD: 1 mm; ID: 0.75 mm; length: 6") and had resistances in the range of 1.5–4M Ω when filled with pipette solution. The pipette solution was composed of (mmol/l): 110 K⁺-aspartate, 20 KCl, 8 NaCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 BAPTA, 4 K₂ATP and 10 HEPES (pH adjusted to 7.2 KOH). Series resistance in the whole-cell mode was in the range of 4–8 M Ω ; 80–90% series resistance compensation was always used. Voltage-clamp currents were low-pass filtered at 1–3 kHz (4-pole Bessel), digitized at 4–10 kHz. The data were recorded using pClamp 8.0 and analyzed with Clampfit (Axon Instruments, Foster City, USA). Current amplitudes were normalized to the cell capacitance and expressed as pApF⁻¹. Capacitive transients elicited by a 10 mV depolarizing step from a holding potential of –80 mV were recorded at 25 Hz (filtered at 10 kHz). Cell capacitance was measured by integrating the surface area of the capacitive transient. A correction of –10 mV was applied to compensate for the patch pipette-bath liquid junction potential (K⁺-aspartate). All experiments were carried out at room temperature (20–22 °C).

2.2.3.3 K⁺ currents recordings and analysis

We previously reported a biophysical and pharmacological approach for separating the three main time- and voltage-dependent components of the outward K⁺ current expressed in ventricular myocytes isolated from the heart of adult mice (Brouillette et al., 2004). The Ca²⁺-independent transient outward K⁺ current, I_{to}, can be separated from total outward current using an “inactivating prepulse” (100 ms at –40 mV before the main depolarizing step). The ultrarapid delayed rectifier K⁺ current, I_{Kur}, can be isolated using micromolar concentrations of 4-aminopyridine (i.e., 100 μ M 4-AP). The remaining 4-AP resistant K⁺ current, or the steady-state outward K⁺ current, I_{ss}, can be obtained by combining these two procedures (inactivating I_{to} and eliminating I_{Kur} by application of low concentration of 4-AP). We previously confirmed that this approach provides an accurate description of densities and kinetic properties of these K⁺ conductances (Brouillette et al., 2004). However, in a study such as the present one where we need to superfuse voltage-clamped cells with pharmacological agents, the time-course of the experiment are

substantially prolonged. To deal with this problem, here we applied the same approach as the one described above but instead of 500-ms voltageclamp steps we used depolarizing steps of 5 s, which completely inactivated I_{Kur} without the need to use 4-AP to block this current. These protocols were also validated in our previous report (Brouillette et al., 2004) where we showed that I_{ss} was very similar whether I_{Kur} was removed either by inactivation (5 s steps), or block by 4-AP. In summary, current–voltage relationships for the total K^+ current (I_{peak}) was constructed from the current elicited by a series of 5 s test potentials at 10 mV increment from -110 mV to $+50$ mV from a holding potential of -80 mV at a frequency rate of 0.1 Hz. This voltage protocol was repeated with a 100-ms depolarizing step to -40 mV applied immediately before the 5 s test pulses to voltage inactivates I_{to} (Fig. 1A). The current obtained with the inactivating prepulse protocol was denoted as I_{Kslow} , and is composed of I_{Kur} and I_{ss} (Fig. 1B). By subtracting the current traces recorded with and without the inactivating prepulse (e.g., by subtracting I_{Kslow} from I_{peak}), we obtained I_{to} (Fig. 1C). With these long voltage protocols, I_{ss} as well as the inward rectifier K^+ current (I_{K1}) can be directly measured at the end of the 5 s voltage steps (between -40 and $+50$ mV for I_{ss} and between -110 mV and -40 mV for I_{K1}). Moreover, I_{ss} and I_{K1} could be obtained either from the voltage protocols including (e.g., I_{Kslow}) or not (e.g., I_{peak}) the I_{to} inactivating prepulse. I_{Kur} was obtained by subtracting current traces of I_{ss} from those of I_{Kslow} . The amplitudes of I_{peak} , I_{to} and I_{Kur} were measured at the peak current amplitude. Fig. 1 illustrates how the different K^+ currents present in adult mouse ventricular myocytes were obtained using this approach.

2.2.3.4 Drugs

4OH-tamoxifen and actinomycin D were obtained from Sigma. ICI 182,780 (7a,17b-[9-[(4,4,5,5,5-pentafluoropentyl)sulfinyl]nonyl]estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol) was purchased from Tocris (UK). 4OH-tamoxifen, actinomycin D and ICI 182,780 were dissolved in ethanol as stock solution of 1 mM. Aliquots of the stock solution were stored at -20 °C until use. 4OH-tamoxifen was used at final concentrations of 0.5, 1 and 10 μ M. ICI 182, 780 and actinomycin D final concentration was 10 μ M for both compounds. The final concentrations of ethanol (0.01%) had no significant effects on the current traces.

2.2.3.5 Statistical analysis

K^+ currents were normalized for cell capacitance and expressed as current density (in pApF^{-1}). Data are reported as mean \pm standard error (S.E.M). Paired Student's t test or analyses of variance (ANOVA) were used when appropriate. P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

2.2.4 Results

2.2.4.1 Effect of 4OH-tamoxifen on total K^+ currents (I_{peak})

We examined the effects of three concentrations of 4OH-tamoxifen (0.5, 1 and 10 μM) on the major K^+ currents present in adult mouse ventricle. Fig. 2A illustrates typical examples of a family of total K^+ currents (I_{peak}) obtained in the same voltage-clamped mouse ventricular myocyte before and after 30 min exposure to 10 μM of 4OH-tamoxifen. Fig. 2B summarizes the corresponding current–voltage (I–V) relationships of I_{peak} . At this concentration, 4OH-tamoxifen significantly decreased the density of both the inward and outward portions of I_{peak} . For instance, the current density of I_{K1} measured at -110 mV was reduced to -11.8 ± 1.5 pApF^{-1} with 10 μM of 4OH-tamoxifen compared to the control values (-15.7 ± 1.1 pApF^{-1} , $n=12$, $P<0.05$). The bar graphs illustrated in Fig. 2C show mean values of the percentage of I_{K1} recorded under control conditions and in the presence of 0.5, 1 and 10 μM of 4OH-tamoxifen. These data show that I_{K1} was also decreased by 1 μM of 4OH-tamoxifen (-13.5 ± 1.2 pApF^{-1}) compared to control (-17.2 ± 1.4 pApF^{-1} , $n=10$, $P<0.05$), but was not significantly affected by the lower concentration of the drug tested (control: -16.9 ± 1.7 pApF^{-1} ; 0.5 μM 4OH-tamoxifen: -15.1 ± 2.4 pApF^{-1} ; $n=9$; $P=\text{N.S.}$). Data presented in Fig. 2B also shows that 10 μM of 4OH-tamoxifen significantly decreased the density of the outward portion of the total K^+ current for voltages ranging between -30 and $+50$ mV (at $+30$ mV, control: 61.3 ± 5.1 pApF^{-1} ; 4OH-tamoxifen: 38.2 ± 4.1 pApF^{-1} , $n=12$, $P<0.01$). The density of I_{peak} measured at $+30$ mV was reduced when the cells were perfused with 0.5 μM of 4OH-tamoxifen from 63.7 ± 4.4 pApF^{-1} to 49.4 ± 5.4 pApF^{-1} ($n=9$; $P<0.05$). Similarly, 1 μM 4OH-tamoxifen reduced I_{peak} from 62.9 ± 7.0 pApF^{-1} to 45.8 ± 5.5

pApF⁻¹ (n=10; P<0.01). Data presented in this figure were obtained from ventricular myocytes isolated from 7 different female mice.

2.2.4.2 Effect of 4OH-tamoxifen on I_{Kslow}

Fig. 3A shows superimposed current records that correspond to I_{Kslow} before and after application of 10 μM 4OH-tamoxifen. I_{Kslow} was significantly reduced by the application of 10 μM of 4OH-tamoxifen. This is also illustrated in Fig. 3B which compares the corresponding I–V plots for I_{Kslow} before and after addition of 10 μM of the drug (at +30 mV; control: 34.1±2.6 pApF⁻¹; 4OH-tamoxifen: 21.3±2.1 pApF⁻¹, n=12, P<0.05). Fig. 3C shows that 4OH-tamoxifen also inhibited I_{Kslow} at lower concentrations. At +30 mV, I_{Kslow} was reduced from 31.8±3.9 to 26.1±4.7 pApF⁻¹ (n=10; P<0.05) in the presence of 1 μM 4OH-tamoxifen and from 32.7±2.6 to 25.8±1.9 pApF⁻¹ (n=9; P<0.01) with 0.5 μM of the drug.

2.2.4.3 Effect of 4OH-tamoxifen on I_{to}

Fig. 4 illustrates that short term superfusion of myocytes with 0.5, 1, and 10 μM of 4OH-tamoxifen had significant effects on I_{to}. Fig. 4A shows that representative current traces of I_{to} were significantly smaller after exposure to 10 μM 4OH-tamoxifen compared to baseline. Pooled data in Fig. 4B plotted as I–V relationships indicate that I_{to} in cells from 4OH-tamoxifen treated myocytes was significantly attenuated from all voltages positive to –40 mV. For example, I_{to} current density measured at +30 mV was 43% smaller with 10 μM 4OH-tamoxifen (18.6±2.3 pApF⁻¹) compared to the controls (30.3± 3.4 pApF⁻¹, n=12; P<0.01). Even at lower concentrations, 4OH-tamoxifen also reduced I_{to} as illustrated in Fig. 4C (at+30 mV, control: 34.9±3.1 pApF⁻¹; 0.5 μM 4OH-tamoxifen: 26.5±4.3 pApF⁻¹, n=9, P<0.05) and (at +30mV, control: 35.4±3.6 pApF⁻¹; 1 μM 4OH-tamoxifen: 21.3±3.1 pApF⁻¹, n=10; P<0.01).

2.2.4.4 Effect of 4OH-tamoxifen on I_{ss}

As previously mentioned in Materials and methods, the current density of I_{ss} was similar whether I_{ss} was obtained from I_{peak} or I_{Kslow} current traces (Fig. 2 or 3, respectively). Fig. 5A compares the I–V relationships of I_{ss} in the absence and presence of 10 μM of

4OH-tamoxifen. The current density of I_{ss} was similar between both groups (at +30 mV; control: 5.8 ± 0.9 pApF⁻¹; 4OH-tamoxifen: 4.7 ± 0.5 pApF⁻¹, $n=12$, $P=N.S.$) over the entire activation range of I_{ss} . Fig. 5B illustrates that none of the 4OH-tamoxifen concentrations (0.5, 1 and 10 μ M 4OH-tamoxifen) significantly attenuate I_{ss} density.

2.2.4.5 Effect of 4OH-tamoxifen on I_{Kur}

The mean current–voltage relationships presented in Fig. 5C depict the mean data of I_{Kur} recorded before and after the superfusion with 10 μ M 4OH-tamoxifen. I_{Kur} was significantly reduced by 10 μ M of 4OH-tamoxifen at all voltages where it is active. For instance, there was a 41% reduction in the density of I_{Kur} when the current was measured at +30 mV (control: 28.8 ± 3.5 pApF⁻¹, 10 μ M 4OH-tamoxifen: 16.1 ± 2.6 pApF⁻¹; $n=12$, $P<0.05$). Fig. 5D summarizes the changes of I_{Kur} density measured at +30 mV following exposure to 0.5, 1 and 10 μ M 4OH-tamoxifen. A reduction of 29% of the mean current density of I_{Kur} was obtained with 1 μ M of 4OH-tamoxifen (at +30 mV, control: 26.2 ± 3.2 pApF⁻¹; 4OH-tamoxifen: 18.9 ± 2.3 pApF⁻¹, $n=10$; $P<0.05$). At 0.5 μ M, 4OH-tamoxifen depressed I_{Kur} density by 21% (at +30 mV; control: 27.1 ± 2.3 pApF⁻¹; 4OH-tamoxifen: 21.4 ± 2.2 pApF⁻¹, $n=9$, $P<0.05$). Taken together, these results demonstrate that 4OH-tamoxifen significantly reduced I_{K1} , I_{to} and I_{Kur} but had no significant effect on I_{ss} .

2.2.4.6 Inactivation kinetics of I_{to} and I_{Kur}

In the next series of experiments we examined the effects of 10 μ M of 4OH-tamoxifen on the voltage dependence of steady-state inactivation as well as on the time-course of recovery from inactivation of both I_{to} and I_{Kur} . The voltage-clamp protocols and the analysis methods used to measure the steady-state inactivation and recovery from inactivation of these currents have been described previously (Brouillette et al., 2004). Fig. 6 summarized the results obtained in these experiments. Fig. 6A compares the steady-state inactivation of I_{to} under control conditions and in the presence of 10 μ M 4OH-tamoxifen. The normalized current data were fitted to a Boltzmann function. Neither the half-inactivation potentials ($V_{1/2}$) nor the mid-point slope factors (k) were significantly affected by the application of 4OH-tamoxifen ($V_{1/2}$, control: -54.2 ± 0.7 mV, 4OH-tamoxifen: -57.0 ± 0.5 mV) (k , control: 5.8 ± 0.6 , 4OH-tamoxifen: 6.0 ± 0.4) ($n=5$, $P=N.S.$). Fig. 6B

shows that the recovery from inactivation of I_{to} was similar between control (47.3 ± 1.5 ms) and 4OH-tamoxifen treated cells (47.2 ± 1.2 ms, $n=4$, $P=N.S.$). Fig. 6C shows that the voltage dependence of steady-state inactivation of I_{Kur} was also comparable between the control ($V_{1/2}$: -55.0 ± 0.8 mV; k : 7.0 ± 0.7) and 4OH-tamoxifen ($V_{1/2}$: -57.0 ± 1.4 mV; k : 8.2 ± 1.3 , $n=4$, $P=N.S.$) groups. Similarly, the recovery from inactivation of I_{Kur} was also comparable in control (1041 ± 111 ms) and 4OH-tamoxifen (1464 ± 121 ms, $n=5$, $P=N.S.$) cells as illustrated in Fig. 6D.

2.2.4.7 Effect of ICI 182,780 and actinomycin D on K^+ currents

4OH-tamoxifen acts as an estrogen receptor partial agonist/ antagonist. Thus, to rule out the involvement of the nuclear estrogen receptor and gene transcription in the response obtained with 4OH-tamoxifen, cells were pre-treated for 30 min with the pure estrogen receptor antagonist ICI 182,780 ($10 \mu\text{M}$) or the gene transcription inhibitor actinomycin D ($10 \mu\text{M}$). Fig. 7A shows that when administered alone ICI 182,780 did not reduce the density of I_{peak} . Moreover, the presence of ICI 182,780 did not prevent the inhibitory effects of 4OH-tamoxifen ($10 \mu\text{M}$) on I_{peak} , suggesting that the effects of 4OH-tamoxifen on K^+ currents were produced by a direct action on the ion channel without involving binding to the intracellular estrogen receptor. Similar findings were also obtained with actinomycin D as illustrated in Fig. 7B. Preincubation of the cells with actinomycin D ($10 \mu\text{M}$) did not affect the current density of I_{peak} . Furthermore, 4OH-tamoxifen ($10 \mu\text{M}$) reduced I_{peak} density by approximately 37% whether the drug was administered alone or in the presence of actinomycin D. These data further confirm that the inhibitory effect of 4OH-tamoxifen is due to a direct interaction with the K^+ channels without involvement of gene transcription and estrogen receptor.

2.2.5 Discussion

The selective estrogen receptor modulator, tamoxifen is commonly used for treatment and prevention of breast cancer. It is believed that the effects of tamoxifen on K^+ channels may be responsible for the QT interval prolongation since experimental studies have reported that acute exposure to tamoxifen can reduce cardiac K^+ currents. However, in vivo, tamoxifen is extensively metabolized and most of its effects are thought to be related

to its major metabolites. Among these metabolites, 4OH-tamoxifen has an affinity for the estrogen receptor that has been reported to be more than 100-fold greater than that of tamoxifen (Coezy et al., 1982; Lim et al., 2005; Ruenitz et al., 1983). Therefore, it is probably not appropriate to directly link a prolongation of QT interval to a reduction of cardiac K^+ currents produced by acute application of tamoxifen. Accordingly, to determine whether the QT prolongation reported with clinical use of tamoxifen could be associated with an effect of 4OH-tamoxifen on K^+ currents, we directly examined the effects of 4OH-tamoxifen on ventricular K^+ currents expressed in mouse heart. Using whole-cell voltage-clamp technique, we recorded K^+ currents under control conditions and after acute exposure to 4OH-tamoxifen. Under these conditions, 4OH-tamoxifen significantly decreased the density of I_{to} , I_{Kur} and I_{K1} , but had no significant effect on I_{ss} . Thus, these results indicate that similar to its parent compound, 4OH-tamoxifen reduced cardiac K^+ currents. This effect could contribute to alter cardiac repolarization and QT interval. A number of studies have examined the effects of acute exposure to tamoxifen on cardiac K^+ currents. However, to the best of our knowledge, the present study is the first to characterize the effects of 4OH-tamoxifen on K^+ currents in the heart. Interestingly, the inhibition of mouse ventricular K^+ currents by micromolar concentrations of 4OH-tamoxifen is similar to what has been previously reported with tamoxifen in rat heart. In fact, He et al. have shown that the three K^+ currents present in rat ventricle (I_{K1} , I_{to} and the sustained outward delayed rectifier K^+ current; I_{sus}) were significantly depressed by superfusion of 3 and 10 μ M of tamoxifen (He et al., 2003). In addition, Liu et al. reported that although tamoxifen (1–10 μ M) had little effect on I_{to} and I_{K1} , the drug significantly blocked the rapid component of the delayed rectifier K^+ current (I_{Kr}) in rabbit ventricular myocytes (Liu et al., 1998). Of note, these tamoxifen concentrations fall within the plasma concentration range measured during chemotherapy (0.1–10 μ M) (Bergan et al., 1999). Moreover, the amounts of metabolites have been shown to be higher than the parent drug in most tissues (MacCallum et al., 1996, 1997). Furthermore, in humans, levels of tamoxifen metabolites have been reported to be 10- to 60-fold higher in tissues than in serum (Lien et al., 1991). Thus, it is expected that acute exposure to the major active tamoxifen metabolite, 4OH-tamoxifen, blocks ventricular K^+ currents in mouse heart at pharmacologically relevant concentrations. Taken together these data suggest that 4OH-tamoxifen also could

contribute to explain the QT interval prolongation reported with tamoxifen in some clinical studies (Pollack et al., 1997; Trump et al., 1992). In addition to the similar effects of tamoxifen and 4OH-tamoxifen on K^+ currents, it has been shown that micromolar concentrations of both drugs markedly reduced voltage-sensitive Ca^{2+} currents in rat (Best, 2002). Tamoxifen and 4OH-tamoxifen have also been shown to be potent inhibitors of the Ca^{2+} -induced contraction in mice (Diaz, 2002) as well as being able to produce a similar increase in BK current density in *Xenopus* oocytes (Dick et al., 2001). We reported that the inhibitory effects of 4OH-tamoxifen are still observed in the presence of the selective estrogen receptor antagonist, ICI 182,780, or the inhibitor of RNA synthesis, actinomycin D. These data indicate that 4OH-tamoxifen directly affects K^+ currents in mouse ventricle without involvement of the nuclear estrogen receptor and gene transcription. In line with this, previous clinical studies reported that some tamoxifen-induced effects are present in different cell types that lack estrogen receptor (Zhang et al., 1994; Lien et al., 1991), suggesting that some pharmacological effects of tamoxifen that are possibly mediated by 4OH-tamoxifen are nuclear estrogen receptor independent (Report from the Breast Cancer Trials Committee, Scottish Cancer Trials Office (MRC), Edinburgh, 1987; Analysis at six years by Nolvadex Adjuvant Trial Organisation, 1985). Furthermore, similar concentrations of 4OH-tamoxifen have been shown to inhibit chloride channels in different tissues as well as Ca^{2+} uptake into sarcoplasmic reticulum vesicles isolated from canine cardiac ventricular tissue through mechanisms unrelated to their interaction with the nuclear estrogen receptor (Zhang et al., 1994; Dick et al., 2001; Kargacin et al., 2000). Then overall, 4OH-tamoxifen produced non genomic effects independent of the nuclear estrogen receptor. 4OH-tamoxifen inhibits the current densities of I_{to} and I_{Kur} without affecting the steady-state voltage-dependent inactivation or the time course of recovery from inactivation of both I_{to} and I_{Kur} . These data indicate that the reduction of I_{to} and I_{Kur} density is not explained by alterations of their inactivation kinetics properties and appears to be mediated by a direct effect of 4OH-tamoxifen on K^+ channels. Potential mechanisms could contribute to explain a direct interaction of the drug with the K^+ channels such as inhibition of the maximal channel conductance or reduction of the opening probability of the channels. Further studies are warranted to explore these mechanisms. Altogether, the data presented in this study indicate that 4OH-tamoxifen reduced K^+ currents in mouse ventricle through a direct

action of the drug on the channels without involvement of the nuclear estrogen receptor and without affecting the inactivation kinetics properties of the currents. It is well recognized that a reduction of cardiac K^+ currents is associated with a prolongation of ventricular action potential duration; therefore, in the present study we tried to investigate the effects of 4OH-tamoxifen on the action potential duration. However, in the presence of the three concentrations of 4OH-tamoxifen examined here, we were unable to elicit action potentials. Interestingly, He et al. reported that tamoxifen reduced Na^+ currents in rat ventricular myocytes (He et al., 2003) and they were also unable to record action potentials. These observations suggest that similar to tamoxifen, 4OH-tamoxifen may also inhibit Na^+ currents. Furthermore, Best reported that 4OH-tamoxifen markedly inhibits voltage sensitive calcium currents and abolished the generation of action potentials (Best, 2002). These data suggest that 4OH-tamoxifen alters ion currents responsible for the generation of the action potential waveform. Thus, in addition to its effects on K^+ currents, it is possible that 4OH-tamoxifen also reduced sodium and/or calcium currents. This could explain why in this study we were unable to record action potential in the presence of 4OH-tamoxifen in mouse ventricles.

2.2.5.1 Conclusions

Although we clearly showed here that acute exposure to 4OH-tamoxifen depresses ventricular K^+ currents, it is not possible to conclude that tamoxifen or 4OH-tamoxifen increases the risk of QT prolongation during chronic treatment with tamoxifen. Additional studies are required in order to clearly determine whether long-term exposure to tamoxifen and its active metabolite, 4OH-tamoxifen, could alter K^+ currents, QT interval and increase the risk of ventricular arrhythmias. Overall, findings presented here show that 4OH-tamoxifen reduced K^+ currents in mouse ventricle and that this effect is not mediated by a genomic mechanism involving intracellular estrogen receptor. Thus the site of action of 4OH-tamoxifen is probably the K^+ channels themselves.

Acknowledgements

This study was supported by operating grants to C. Fiset. This work was supported by the the Canadian Institutes of Health Research (CIHR MOP-64344), the Quebec Heart

and Stroke Foundation (QHSF) and the Foundation of the Montreal Heart Institute. C. Fiset is a Research Scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

2.2.6 References

1. Analysis at six years by Nolvadex Adjuvant Trial Organisation, 1985. Controlled trial of tamoxifen as single adjuvant agent in management of early breast cancer. *LANCET* **1**, 836–840.
2. Bergan, R.C., Reed, E., Myers, C.E., Headlee, D., Brawley, O., Cho, H.K., Figg, W.D., Tompkins, A., Linehan, W.M., Kohler, D., Steinberg, S.M., Blagosklonny, M.V., 1999. A phase II study of high-dose tamoxifen in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **5**, 2366–2373.
3. Best, L., 2002. Inhibition of glucose-induced electrical activity by 4-hydroxytamoxifen in rat pancreatic beta-cells. *Cell. Signal.* **14**, 69–73.
4. Brouillette, J., Clark, R.B., Giles, W.R., Fiset, C., 2004. Functional properties of K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J. Physiol.* **559**, 777–798.
5. Coezy, E., Borgna, J.L., Rochefort, H., 1982. Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. *Cancer Res.* **42**, 317–323.
6. Diaz, M., 2002. Triphenylethylene antiestrogen-induced acute relaxation of mouse duodenal muscle. Possible involvement of Ca²⁺ channels. *Eur. J. Pharmacol.* **445**, 257–266.
7. Dick, G.M., Sanders, K.M., 2001. (Xeno)estrogen sensitivity of smooth muscle BK channels conferred by the regulatory beta1 subunit: a study of beta1 knockout mice. *J. Biol. Chem.* **276**, 44835–44840.

8. Dick, G.M., Rossow, C.F., Smirnov, S., Horowitz, B., Sanders, K.M., 2001. Tamoxifen activates smooth muscle BK channels through the regulatory beta 1 subunit. *J. Biol.Chem.* **276**, 34594–34599.
9. Fiset, C., Clark, R.B., Larsen, T.S., Giles, W.R., 1997. A rapidly activating sustained K⁺ current modulates repolarization and excitation–contraction coupling in adult mouse ventricle. *J. Physiol.* **504**, 557–563.
10. Furr, B.J., Jordan, V.C., 1984. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacol. Ther.* **25**, 127–205.
11. He, J., Kargacin, M.E., Kargacin, G.J., Ward, C.A., 2003. Tamoxifen inhibits Na⁺ and K⁺ currents in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H661–H668.
12. Isenberg, G., Klockner, U., 1982. Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a “KB medium”. *Pflug. Arch.* **395**, 6–18.
13. Johnson, M.D., Zuo, H., Lee, K.H., Trebley, J.P., Rae, J.M., Weatherman, R.V., Desta, Z., Flockhart, D.A., Skaar, T.C., 2004. Pharmacological characterization of 4-hydroxy Ndesmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res. Treat.* **85**, 151–159.
14. Jordan, V.C., 1992. Overview from the International Conference on Long-Term Tamoxifen Therapy for Breast Cancer. *J Natl. Cancer Inst.* **84**, 231–234.
15. Kargacin, M.E., Ali, Z., Ward, C.A., Pollock, N.S., Kargacin, G.J., 2000. Tamoxifen inhibits Ca²⁺ uptake by the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Pflug. Arch.* **440**, 573–579.

16. Katzenellenbogen, B.S., Norman, M.J., Eckert, R.L., Peltz, S.W., Mangel, W.F., 1984. Bioactivities, estrogen receptor interactions, and plasminogen activator-inducing activities of tamoxifen and hydroxy-tamoxifen isomers in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.* **44**, 112–119.
17. Lien, E.A., Solheim, E., Ueland, P.M., 1991. Distribution of tamoxifen and its metabolites in rat and human tissues during steady-state treatment. *Cancer Res.* **51**, 4837–4844.
18. Lim, Y.C., Desta, Z., Flockhart, D.A., Skaar, T.C., 2005. Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **55**, 471–478.
19. Liu, X.K., Katchman, A., Ebert, S.N., Woosley, R.L., 1998. The antiestrogen tamoxifen blocks the delayed rectifier potassium current, I_{Kr} , in rabbit ventricular myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **287**, 877–883.
20. MacCallum, J., Cummings, J., Dixon, J.M., Miller, W.R., 1996. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of tamoxifen and its major metabolites in plasma. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **678**, 317–323.
21. MacCallum, J., Cummings, J., Dixon, J.M., Miller, W.R., 1997. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of tamoxifen and its major metabolites in breast tumour tissues. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **698**, 269–275.
22. Monaghan, A.S., Mintenig, G.M., Sepulveda, F.V., 1997. Outwardly rectifying Cl^- channel in guinea pig small intestinal villus enterocytes: effect of inhibitors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **273**, G1141–G1152.

23. Park, W.C., Jordan, V.C., 2002. Selective estrogen receptor modulators (SERMS) and their roles in breast cancer prevention. *Trends Mol. Med.* **8**, 82–88.
24. Pollack, I.F., DaRosso, R.C., Robertson, P.L., Jakacki, R.L., Mirro Jr., J.R., Blatt, J., Nicholson, S., Packer, R.J., Allen, J.C., Cisneros, A., Jordan, V.C., 1997. A phase I study of highdose tamoxifen for the treatment of refractory malignant gliomas of childhood. *Clin. Cancer Res.* **3**, 1109–1115.
25. Report from the Breast Cancer Trials Committee, Scottish Cancer Trials Office (MRC), Edinburgh, 1987. Adjuvant tamoxifen in the management of operable breast cancer: the Scottish Trial. *LANCET* **2**, 171–175.
26. Ruenitz, P.C., Bagley, J.R., Mokler, C.M., 1983. Estrogen receptor binding and estrogenic/antiestrogenic effects of two new metabolites of nitromiphenone, 2-[p-[2-nitro-1-(4-methoxyphenyl)-2-phenylvinyl]phenoxy]-N-ethylpyrrolidine. *J. Med. Chem.* **26**, 1701–1705.
27. Trépanier-Boulay, V., St-Michel, C., Tremblay, A., Fiset, C., 2001. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ. Res.* **89**, 437–444.
28. Trump, D.L., Smith, D.C., Ellis, P.G., Rogers, M.P., Schold, S.C., Winer, E.P., Panella, T.J., Jordan, V.C., Fine, R.L., 1992. High-dose oral tamoxifen, a potential multidrugresistance-reversal agent: phase I trial in combination with vinblastine. *J. Natl. Cancer Inst.* **84**, 1811–1816.
29. Winer, E.P., Hudis, C., Burstein, H.J., Chlebowski, R.T., Ingle, J.N., Edge, S.B., Mamounas, E.P., Gralow, J., Goldstein, L.J., Pritchard, K.I., Braun, S., Cobleigh, M.A., Langer, A.S., Perotti, J., Powles, T.J., Whelan, T.J., Browman, G.P., 2002. American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2002. *J. Clin. Oncol.* **20**, 3317–3327.

30. Zhang, J.J., Jacob, T.J., Valverde, M.A., Hardy, S.P., Mintenig, G.M., Sepulveda, F.V., Gill, D.R., Hyde, S.C., Trezise, A.E., Higgins, C.F., 1994. Tamoxifen blocks chloride channels. A possible mechanism for cataract formation. *J. Clin. Invest.* **94**, 1690–1697.

2.2.7 Figures/Figures legends

Figure 1. Separation of K^+ currents adult mouse ventricular myocytes.

A. Representative current traces illustrate the protocol used in this study to record the total K^+ current (I_{peak}) in adult mouse ventricular myocytes. These records were obtained using the protocol shown in the inset. **B.** I_{Kslow} was obtained by using the same protocol as described in A with the addition of a 100-ms inactivating prepulse to -40 mV immediately before the main activation steps. This prepulse was used to inactivate I_{to} . I_{ss} and I_{K1} could also be measured with this protocol at the end of the 5 s voltage steps. Measurements of I_{ss} and I_{K1} could be obtained either from the voltage protocols presented in A or in B. I_{ss} and I_{K1} were calculated at the end of the 5 s voltage steps (between -40 and $+50$ mV for I_{ss} and between -110 mV and -40 mV for I_{K1}). I_{Kur} was obtained by subtracting current traces of I_{ss} from those of I_{Kslow} . **C.** I_{to} was obtained by subtracting the current recorded with (B— I_{Kslow}) and without (A— I_{peak}) the inactivating prepulse. The amplitudes of I_{peak} , I_{to} and I_{Kur} were measured at the peak current amplitude.

Figure 1. Separation of K^+ currents adult mouse ventricular myocytes

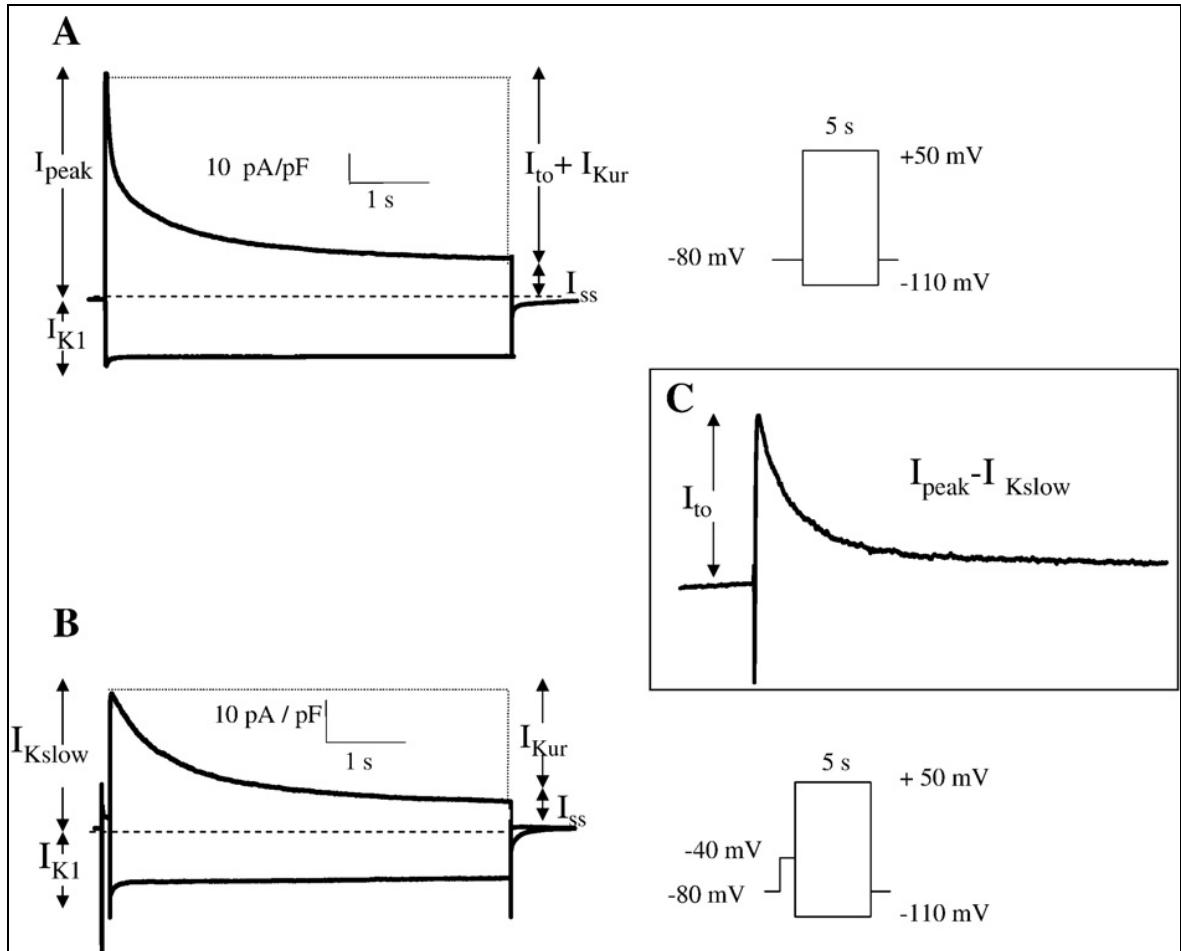


Figure 2. Effects of 10 μM of 4OH-tamoxifen on the total K^+ current (I_{peak})

A. Family of K^+ currents recorded from adult female ventricular myocytes before (CTL) and after exposure to 10 μM of 4OH-tamoxifen. Membrane currents were activated using the voltage protocol shown in the inset (see Materials and methods for details). **B.** Mean current–voltage (I–V) relationships for I_{peak} in CTL and 4OH-tamoxifen ventricular myocytes. **C.** Bar graphs presenting the cumulative data of I_{K1} measured at -110 mV before and after application of 0.5 (n=9), 1 (n=10) and 10 μM (n=12) of 4OH-tamoxifen. **D.** Bar graphs presenting the cumulative data of I_{peak} measured at $+30$ mV before and after application 0.5 (n=9), 1 (n=10) and 10 μM (n=12) of 4OH-tamoxifen. Results are expressed as percentage of control. *P<0.05 compared to control.

Figure 2. Effects of 10 μM of 4OH-tamoxifen on the total K^+ current (I_{peak})

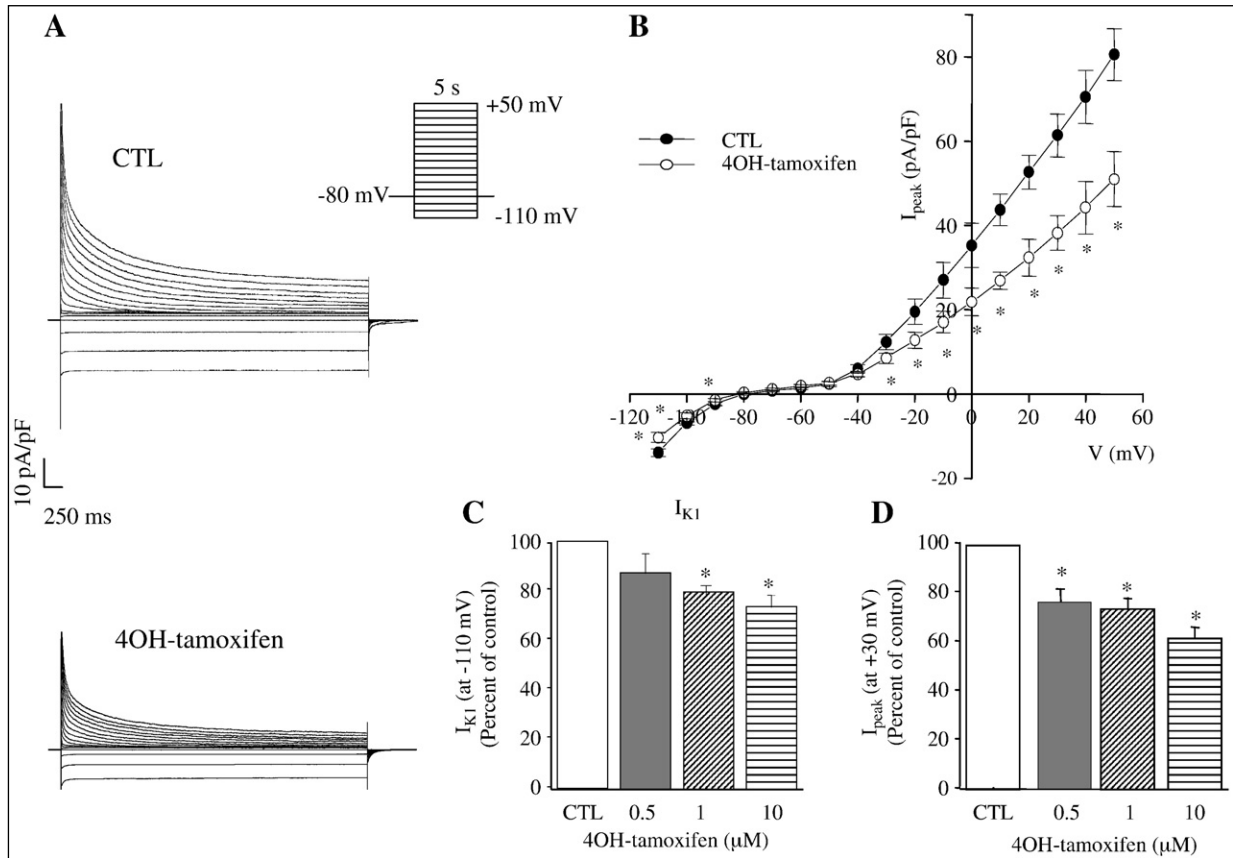


Figure 3. Effects of 10 μ M of 4OH-tamoxifen on I_{Kslow}

A. Typical examples of I_{Kslow} recorded under control conditions (CTL) and after exposure to 10 μ M of 4OH-tamoxifen in female ventricular mouse myocytes. **B.** Mean I–V relationships for I_{Kslow} obtained before and after addition of 10 μ M of 4OH-tamoxifen (* P <0.05). **C.** Bar graphs presenting the cumulative data of I_{Kslow} obtained at +30 mV before and after application of 0.5 (n=9), 1 (n=10) and 10 μ M (n=12) of 4OH-tamoxifen. Results are expressed as percent of control. * P <0.05 compared to CTL.

Figure 3. Effects of 10 μ M of 4OH-tamoxifen on I_{Kslow}

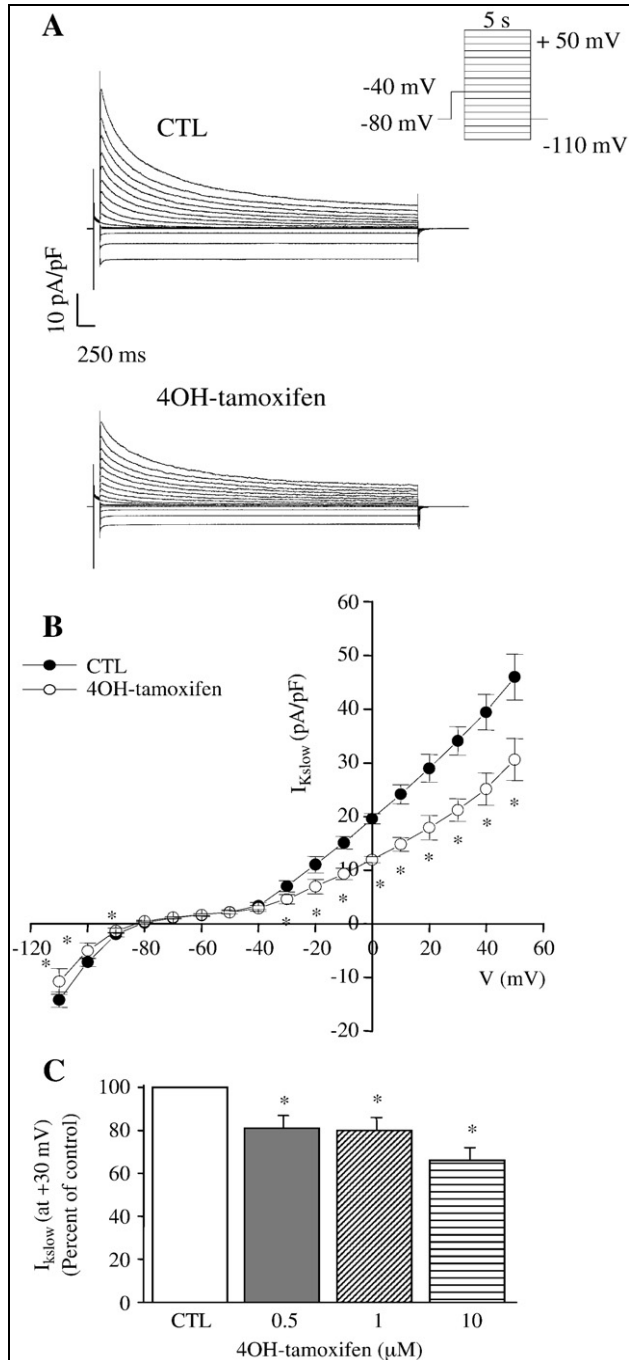


Figure 4. Effects of 10 μ M of 4OH-tamoxifen on I_{to}

A. Superimposed current records illustrating I_{to} under control conditions (CTL) and in the presence of 10 μ M of 4OH-tamoxifen in ventricular myocytes. Current recordings were obtained by subtracting the corresponding current traces recorded with (Fig. 2A) and without (Fig. 3A) the inactivating prepulse. **B.** Mean (\pm S.E.M) I–V relationships for I_{to} under control conditions and with 10 μ M of 4OH-tamoxifen (* P <0.05). **C.** Bar graphs presenting the cumulative data of I_{to} obtained at +30 mV before and after application of 0.5 (n=9), 1 (n=10) and 10 μ M (n=12) of 4OH-tamoxifen. Results are expressed as percent of control (* P <0.05 compared to controls).

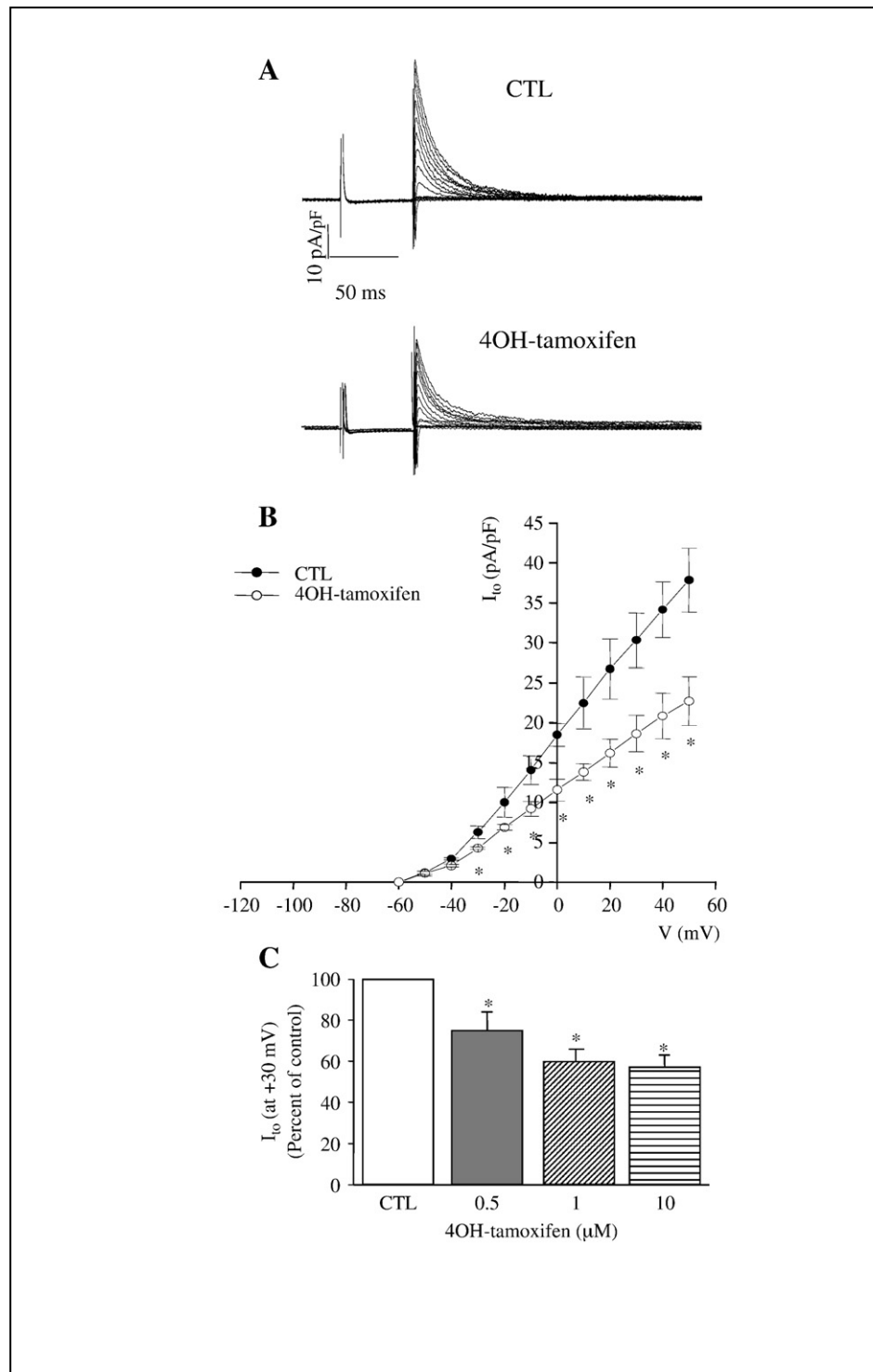
Figure 4. Effects of 10 μM of 4OH-tamoxifen on I_{to} 

Figure 5. Effects of 10 μ M of 4OH-tamoxifen on I_{Kur} and I_{ss}

A. Mean I–V relationships for I_{ss} and I_{K1} recorded under control conditions (CTL) and after superfusion with 10 μ M of 4OH-tamoxifen. **B.** Bar graphs presenting the cumulative data of I_{ss} obtained at +30 mV before and after application of 0.5 (n=9), 1 (n=10) and 10 μ M (n=12) of 4OH-tamoxifen. Results are expressed as percentage of control. Bar graphs summarizing I_{K1} data are reported on Fig. 2 **C.** Graph comparing the mean I–V curves for I_{Kur} under control conditions (CTL) and in the presence of 10 μ M of 4OH-tamoxifen (*P<0.05). **D.** Bar graphs presenting the cumulative data of I_{Kur} obtained at +30 mV before and after application of 0.5, 1 and 10 μ M of 4OH-tamoxifen. Results are expressed as percentage of control (*P<0.05).

Figure 5. Effects of 10 μM of 4OH-tamoxifen on I_{Kur} and I_{ss}

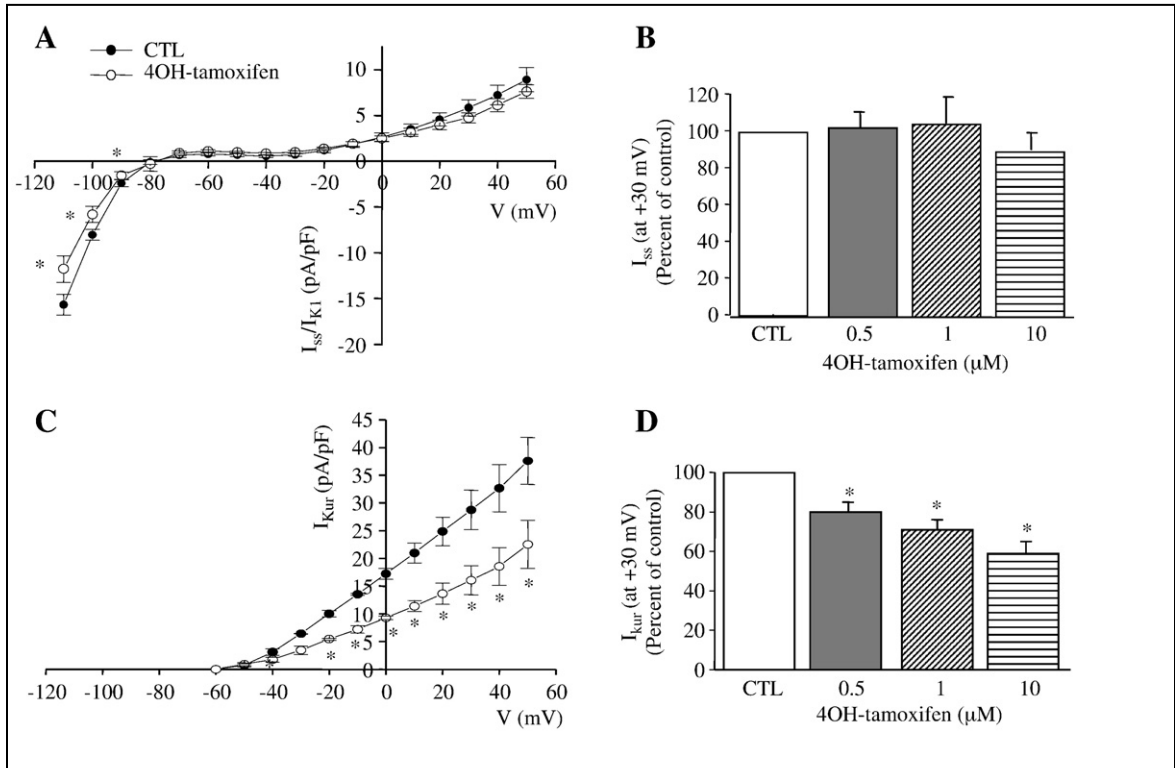


Figure 6. Comparison of steady-state inactivation and recovery from inactivation of I_{to} and I_{Kur} between CTL and 4OH-tamoxifen treated ventricular myocytes.

A. Left-voltage dependence of steady-state inactivation of I_{to} . The plots on the graph presents Boltzmann functions fitted to mean data recorded under control conditions and in the presence of 10 μ M of 4OH-tamoxifen. The voltage dependence of steady-state inactivation of I_{to} was identical in both groups. Data were pooled from 5 cells. Right-recovery from inactivation of I_{to} . The smooth lines are best-fit single exponential functions obtained before and after the addition of 10 μ M of 4OH-tamoxifen. The recovery from inactivation was similar between 4OH-tamoxifen treated cells and CTL cells. Data were pooled from 4 different cells. **B.** Left-voltage dependence of steady-state inactivation of I_{Kur} . The plots on the graph present the Boltzmann functions fitted to mean data recorded under control conditions and in the presence of 10 μ M of 4OH-tamoxifen. The steady-state inactivation of I_{Kur} was similar in both groups. Data were pooled from 4 cells. Right-recovery from inactivation of I_{Kur} . This panel shows the result of a voltage-clamp experiment comparing the rate of recovery from inactivation in CTL and 4OH-tamoxifen. The smooth lines are best-fit single exponential functions to mean data obtained from both groups. As shown in this panel, CTL and 4OH-tamoxifen myocytes recovered from inactivation in a similar fashion. Data were pooled from 5 cells.

Figure 6. Comparison of steady-state inactivation and recovery from inactivation of I_{to} and I_{Kur} between CTL and 4OH-tamoxifen treated ventricular myocytes.

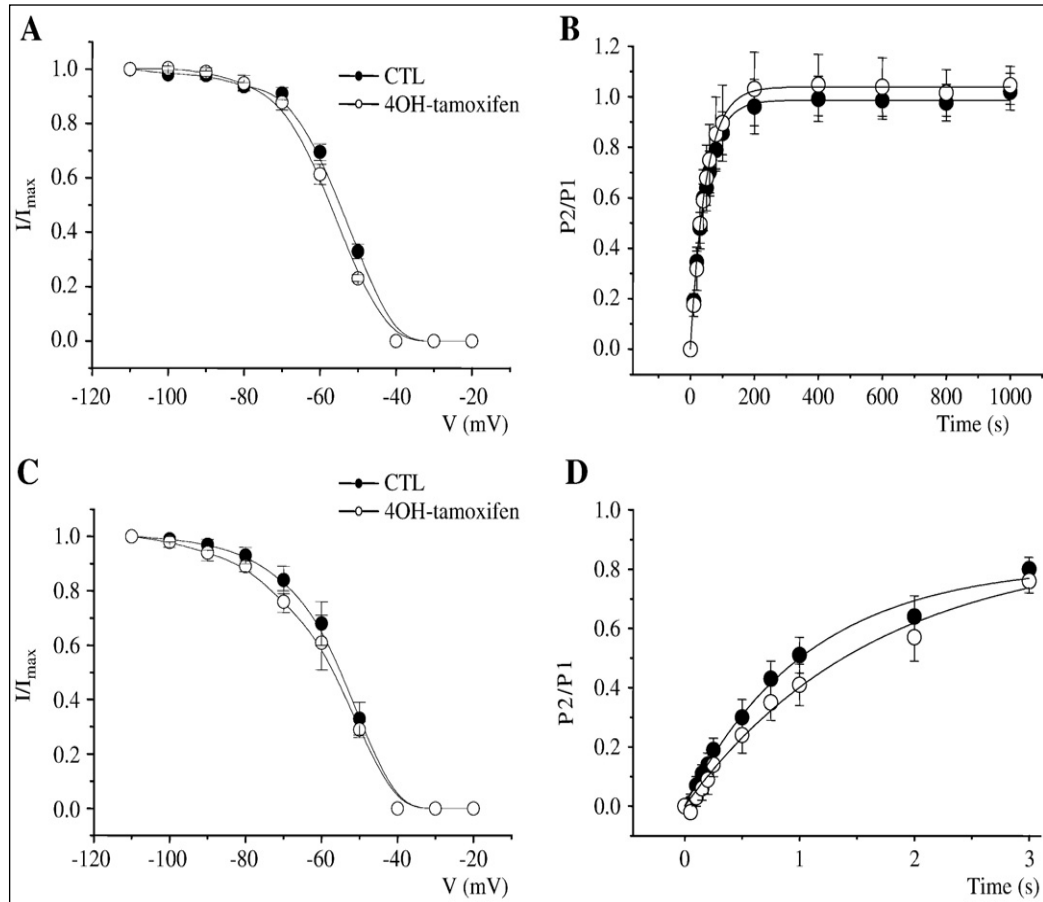
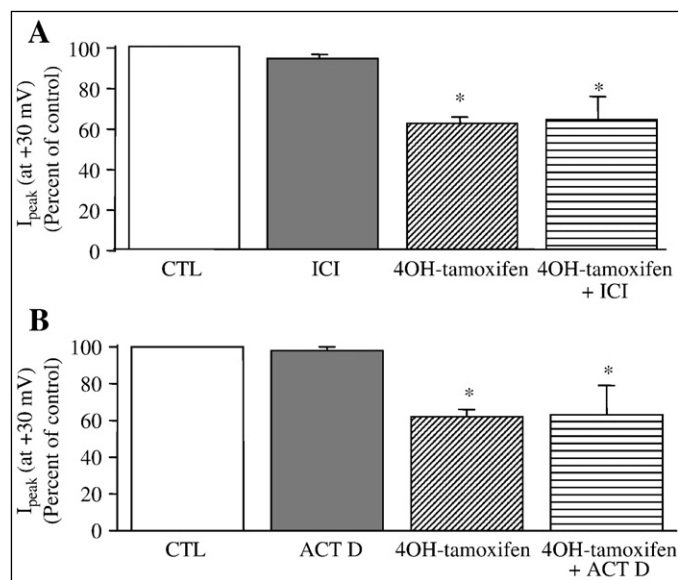


Figure 7. Effects of 10 μ M of 4OH-tamoxifen on total K^+ currents in mouse ventricular myocytes in the presence of ICI 182,780 and actinomycin D

A. Bar graphs comparing I_{peak} measured at +30 mV under control conditions (CTL) and after preincubation of the cells with 10 μ M of ICI 182,780 alone (ICI), in the presence of 4OH-tamoxifen alone (4OH-tamoxifen), and after addition of 10 μ M of 4OH-tamoxifen to ICI 182,780 pretreated myocytes (4OH-tamoxifen+ICI). 4OH-tamoxifen reduced significantly I_{peak} whether it was administered alone or in the presence of ICI 182,780. * $P < 0.05$ compared to control and ICI. **B.** Bar graphs comparing I_{peak} measured at +30 mV under control conditions (CTL) and after preincubation of the cells with 10 μ M of actinomycin D alone (ACT D), in the presence of 4OH-tamoxifen alone (4OH-tamoxifen), and after addition of 10 μ M of 4OH-tamoxifen to actinomycin D pre-treated myocytes (4OH-tamoxifen+ ACT D). 4OH-tamoxifen reduced significantly I_{peak} whether it was administered alone or in the presence of actinomycin D. * $P < 0.05$ compared to control and ACT D.

Figure 7. Effects of 10 μ M of 4OH-tamoxifen on total K^+ currents in mouse ventricular myocytes in the presence of ICI 182,780 and actinomycin D



**Chapitre 3 Étude des effets chroniques du tamoxifène sur les courants
potassiques ventriculaires chez la souris et le cobaye**

3.1 Avant-Propos

3.1.1 Introduction

Bien que nous ayons clairement démontré que l'application aiguë du 4OH-tamoxifène diminue les courants K^+ , il n'est pas possible de conclure que le traitement chronique avec le tamoxifène augmente la durée de l'intervalle QT. D'autres études étaient donc nécessaires afin de déterminer l'effet à long terme du tamoxifène sur les courants K^+ . Une deuxième étude a été menée chez des souris femelles et des cobayes pour voir l'effet chronique du tamoxifène sur la repolarisation ventriculaire chez la souris. Ainsi, nous avons isolé des cardiomyocytes ventriculaires des souris femelles traitées ou non pendant 60 jours avec des implants sous-cutanés du tamoxifène. Nous avons enregistré et mesuré les courants K^+ présents au niveau ventriculaire chez la souris (soient I_{to} , I_{Kur} , I_{ss} et I_{K1}) par des techniques de patch-clamp en configuration « cellule entière ». Les niveaux d'expression protéique des canaux K^+ des souris et des cobayes responsables ont été mesurés par immunobuvardage de type Western Blot. Cette étude a été publiée dans le journal *Cardiovascular Research* en 2011 et elle est décrite dans le présent chapitre.

3.1.2 Contribution des auteurs

Gracia El Gebeily: Expériences, analyse, rédaction.

Céline Fiset: Conceptualisation du projet, supervision, rédaction finale

3.2 Article

Cardiovascular Research (2011) **90** 68-76

Upregulation of ventricular potassium channels by chronic tamoxifen treatment

Gracia El Gebeily,^{1,2} and Céline Fiset^{1,2†}

¹ Research Center, Montreal Heart Institute

5000 Bélanger, Montréal, Québec, Canada, H1T 1C8

² Faculty of Pharmacy, Université de Montréal

Montréal, Québec, Canada

Running title: Chronic tamoxifen increases cardiac K⁺ channels

3.2.1 Résumé / Abstract

3.2.1.1 Résumé

Le tamoxifène est un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes largement utilisé dans la prévention et le traitement du cancer du sein. Les femmes traitées à long terme au tamoxifène ne présentent pas d'anomalies au niveau du rythme cardiaque bien que l'administration aiguë du tamoxifène inhibe les courants K^+ cardiaques. Ces données suggèrent que le traitement chronique au tamoxifène ne module pas à la baisse les courants K^+ . Par conséquent, nous avons étudié les effets chroniques du tamoxifène sur les courants et les canaux K^+ au niveau des myocytes ventriculaires de souris et de cobayes. Des souris et des cobayes femelles ont été traitées avec des implants de placebo ou du tamoxifène pendant 60 jours. Nos études de patch-clamp en mode voltage imposé ont montré que le tamoxifène augmente le courant K^+ transitoire sortant indépendant du Ca^{2+} (I_{to}), le courant K^+ à rectification retardée ultrarapide (I_{Kur}) et le courant K^+ à rectification entrante (I_{K1}) et le courant sortant à l'équilibre (I_{ss}) chez la souris. Les analyses de Western Blot ont montré que l'expression des canaux K^+ sous-jacents aux courants K^+ étudiés soit, Kv4.3 (I_{to}), Kv1.5 (I_{Kur}), Kv2.1 (I_{ss}) et Kir2.1 (I_{K1}) était significativement plus élevée au niveau des ventricules de souris traitées au tamoxifène. De plus, l'expression des protéines des sous-unités codant pour I_{Kr} et I_{Ks} (ERG1, KCNQ1 et KCNE1) a été aussi augmentée chez les cobayes traités au tamoxifène. Les niveaux élevés en œstrogènes sont associés à une réduction des courants K^+ . Ainsi, on pourrait suggérer qu'en bloquant les récepteurs œstrogéniques, le tamoxifène pourrait prévenir les effets inhibiteurs des œstrogènes sur les courants K^+ , ce qui expliquerait l'augmentation des courants K^+ rapportée dans notre étude.

Mots clés : Tamoxifène, souris, cobaye, courants K^+ , œstrogène.

3.2.1.2 Abstract

Tamoxifen is a selective oestrogen receptor modulator widely used in the prevention and treatment of breast cancer. Women receiving long-term tamoxifen therapy do not experience cardiac arrhythmias although acute perfusion of tamoxifen has been shown to inhibit cardiac K^+ currents. This observation suggests that chronic tamoxifen treatment does not negatively modulate cardiac K^+ currents. Therefore, we investigated the chronic effects of tamoxifen on K^+ currents and channels in mouse and guinea pig ventricles. Female mice and guinea pigs were treated with placebo or tamoxifen pellets for 60 days. Voltage-clamp experiments showed that the density of the Ca^{2+} independent transient outward (I_{to}), the ultrarapid delayed rectifier (I_{Kur}), the steady-state (I_{ss}), and the inward rectifier (I_{K1}) K^+ currents were increased in tamoxifen-treated mice ventricle. Western blot analysis revealed that protein expression of the underlying K^+ channels Kv4.3 (I_{to}), Kv1.5 (I_{Kur}), Kv2.1 (I_{ss}), and Kir2.1 (I_{K1}) were significantly higher in the ventricle of tamoxifen-treated mice. Protein expression of the K^+ channel subunits encoding I_{Kr} and I_{Ks} (ERG1, KCNQ1, and KCNE1) was also increased in tamoxifen treated guinea pig ventricle. Conditions with high oestrogen levels are associated with reduced K^+ currents. Thus, conceivably, tamoxifen might prevent the inhibitory effects of oestrogen on K^+ channels by blocking the oestrogen receptors, which would explain the reported increase in K^+ currents. These findings could contribute to explain the absence of cardiac arrhythmia with long-term tamoxifen therapy.

Key Words: Tamoxifen, Mouse, Guinea pig, K^+ currents, Estrogen.

3.2.2 Introduction

The selective oestrogen receptor modulator (SERM), tamoxifen, is commonly used in early and advanced hormone-responsive breast cancer.^{1,2} It is well established that 5-year tamoxifen therapy is effective at reducing the death rate in pre- and post-menopausal breast cancer patients.^{1,2} In addition, long-term tamoxifen treatment is also successfully used to reduce the incidence of breast cancer in high-risk women.^{1,3-7} In large-scale clinical trials, reduction in cardiac morbidity was associated with long-term tamoxifen treatment.^{8,9} However, concerns, regarding QT interval prolongation with tamoxifen treatment, have been raised by some clinical reports.^{10,11} Lengthening of QT interval is the electrocardiographic manifestation of a prolongation of the cardiac action potential duration (APD), which is largely attributable to a reduction in K⁺ channels. Excessive QT prolongation represents a significant risk factor for torsades de pointes and sudden cardiac death. Drug-induced torsades de pointes is a specific type of ventricular polymorphic tachycardia associated with prolongation of the QT interval. Experimental studies have reported that acute exposure to tamoxifen could inhibit cardiac K⁺ currents,¹²⁻¹⁸ which would be consistent with QT prolongation. Based on these observations, tamoxifen has been classified as a drug that may prolong the QT interval although it lacks substantial evidence for causing torsades de pointes. Indeed, although tamoxifen acutely inhibits cardiac K⁺ currents and may be related to QT prolongation, the drug has never been associated with the development of any type of cardiac arrhythmias. The *in vivo* effects of tamoxifen are, at least in part, due to its active metabolite, 4-hydroxytamoxifen. In a recent study, we investigated the acute effects of 4-hydroxytamoxifen on cardiac K⁺ currents in mice.¹⁹ We found that, as with tamoxifen, short-term exposure to 4-hydroxytamoxifen reduced K⁺ currents in the mouse ventricle independently of the intracellular oestrogen receptor. Therefore, in this study, in order to investigate the absence of cardiac arrhythmias in women, we examined the effects of long term tamoxifen therapy associated with low level of estrogen on ventricular K⁺ currents and channels expressed in mouse and guinea pig heart.

3.2.3 Methods

All experiments were performed in accordance to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Experiments were also approved by the Montreal Heart Institute animal care committee (approval reference number 2009-8002).

3.2.3.1 Tamoxifen treatment

Adult female CD-1 mice (2-3 months) and adult female guinea pigs (13-17 weeks) were anesthetized by inhalation of isoflurane. A 2- to 3-mm incision was made over the skin in the interscapular region. Control animals received a placebo pellet whereas the tamoxifen treated animals received a tamoxifen pellet (5 mg/pellet, 60-day sustained release, SE-351, Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA) implanted subcutaneously. This dosage regimen has been shown to inhibit both estrogen receptor subtypes and evoke clinically relevant pharmacological concentrations of tamoxifen.²⁰⁻²²

3.2.3.2 Mouse ventricular myocytes isolation

Ventricular myocytes were isolated as previously described.²³ After being heparinized and anaesthetized with isoflurane, mice were sacrificed by cervical dislocation. Their hearts were rapidly removed and perfused retrogradely through the aorta using a modified Langendorff perfusion system. Single myocytes were isolated from the right ventricular free wall after enzymatic dissociation using Worthington collagenase type 2 (73.7 U mL⁻¹). A detailed description of this and all the following methods can be found in the Supplementary material online.

3.2.3.3 Cellular electrophysiology

Patch pipettes (2–4 MV) were filled with the following solution (mM): 110 K⁺-aspartate, 20 KCl, 8 NaCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 BAPTA, 4 K₂ATP, and 10 HEPES (pH 7.2 with KOH). Series resistance compensation was set at 80–90%. All patch-clamp experiments were carried out at room temperature (20–22 °C). The whole-cell voltage and current-clamp protocols and analysis have been described previously.²⁴ A detailed description of all

these methods can be found in the Supplementary material online. The current densities for each of the three K^+ currents underlying total outward K^+ current in the mouse ventricle were measured at the peak current, whereas the inward K^+ current (I_{K1}) was measured at the end of the 500 ms voltage step.

3.2.3.4 Western blots analysis

The protocols used for isolation of sarcolemmal-enriched protein and western blot analysis have been previously described.^{23,25,26} In brief, proteins were prepared from mouse and guinea pig ventricles, separated by electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were then incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal primary antibodies directed against the K^+ channels studied. Ponceau S was used to confirm uniformity of the protein loading and transfer. Bands were quantified by densitometry using Multi-Analyst program (Bio-Rad, CA, USA).

3.2.3.5 Statistical analysis

Data are reported as mean \pm standard error (SEM) and ‘n’ refers to the number of different cells. An unpaired Student’s t-test was used to compare mean data. P-values <0.05 were considered to be statistically significant.

3.2.4 Results

3.2.4.1 Chronic tamoxifen treatment increased the density of ventricular K^+ currents

Adult female mice were treated with tamoxifen for 60 days to determine whether chronic tamoxifen treatment alters ventricular K^+ currents. K^+ currents were recorded from freshly isolated ventricular myocytes. To account for differences in cell size, all current amplitudes were normalized to the cell capacitance, and expressed as densities (pA/pF). Cell capacitances of ventricular myocytes isolated from control and tamoxifen mice was similar (control: 155 ± 7 pF, $n = 11$; tamoxifen: 137 ± 5 pF, $n = 12$). Figure 1A presents typical examples of a family of total K^+ current (I_{peak}) recorded from control and tamoxifen-treated ventricular myocytes. Figure 1B summarizes the current–voltage (I–V) relationships of the peak currents for the two groups. This figure shows that the current density of I_{K1} measured at -110 mV was increased in tamoxifen-treated cells (-28.2 ± 7.8 pA/pF) compared

with controls (-18.3 ± 7.4 pA/pF, $P < 0.05$). In addition, chronic tamoxifen treatment leads to an increase in the current density of the peak outward K^+ current. As shown on Figure 1B, at +30 mV, there was a 38% increase in I_{peak} density in tamoxifen-treated cells (98.3 ± 5.3 pA/pF) when compared with controls (61.3 ± 4.5 pA/pF, $P < 0.05$).

3.2.4.1.1 Effect of tamoxifen on individual outward K^+ currents

We then examined the effects of chronic tamoxifen treatment on the individual outward K^+ currents contributing to I_{peak} . These K^+ currents correspond to (i) the Ca^{2+} independent transient outward (I_{to}), (ii) the ultrarapid delayed rectifier (I_{Kur}), and (iii) the steady-state outward (I_{ss}) K^+ currents.²⁴

3.2.4.1.1.1 The Ca^{2+} -independent outward K^+ current: I_{to}

Figure 1C shows representative I_{to} recordings from a control and a tamoxifen-treated myocytes. Figure 1D presents the corresponding mean I–V curves and illustrates that I_{to} was significantly larger in myocytes from tamoxifen-treated mice compared with control animals (at +30 mV, control: 30.8 ± 2.2 pA/pF, tamoxifen: 51.3 ± 1.9 pA/pF; $P < 0.05$).

3.2.4.1.1.2 The steady-state outward K^+ current: I_{ss}

Figure 2A and B compares the density of I_{ss} in myocytes from control and tamoxifen-treated mice. As illustrated by the representative current traces (Figure 2A) and the mean I–V plots presented in Figure 2B, the density of I_{ss} was significantly increased following chronic treatment with tamoxifen (at +30 mV, control: 15.0 ± 1.9 pA/pF, tamoxifen: 21.8 ± 2.3 pA/pF; $P < 0.05$). The increased density of I_{K1} in the tamoxifen-treated group can also be appreciated in Figure 2A and B.

3.2.4.1.1.2 The ultrarapid delayed rectifier: I_{Kur}

Figure 2C presents superimposed current traces of I_{Kur} obtained in control and tamoxifen-treated cells. As illustrated in Figure 2D, which presents the mean I–V relationships for I_{Kur} , there was also a significant increase in I_{Kur} density in ventricular myocytes from the tamoxifen-treated group (at +30 mV, control: 25.0 ± 2.6 ; tamoxifen: 39.8 ± 3.3 pA/pF, $P < 0.05$).

3.2.4.2 Inactivation kinetics properties of the outward K^+ currents are not affected by chronic tamoxifen treatment

Currents produced by voltage-gated K^+ channels can often be described qualitatively by their kinetics of inactivation as well as their current–voltage relationships.²⁷ Thus, understanding the inactivation parameters of repolarizing K^+ currents is crucial to establish the implication of these channels in repolarization.

3.2.4.2.1 Voltage-dependence of steady-state inactivation of I_{to} and I_{Kur}

Figure 3 shows the voltage-dependence of steady-state inactivation of I_{to} and I_{Kur} in control and tamoxifen-treated mouse ventricular myocytes. The steady-state inactivation of I_{to} and I_{Kur} was obtained using two-pulse protocols.²⁴ The data were fitted to a Boltzman equation. The voltage dependence of steady-state inactivation of I_{to} was similar in control and tamoxifen-treated myocytes ($V_{1/2}$, Control: -54.1 ± 0.7 mV and Tamoxifen: -57.2 ± 0.5 mV, $P = 0.4$; slope factor (k), Control: 6.5 ± 0.7 mV and Tamoxifen: 6.8 ± 0.5 mV; $P = 0.5$) as illustrated in Figure 3A. Similarly, the voltage dependence of steady-state inactivation of I_{Kur} was comparable in control ($V_{1/2}$: -48.1 ± 2 mV and k: 7.0 ± 0.3 mV) and tamoxifen myocytes (-50.8 ± 2 mV, $P = 0.9$ and k: 7.2 ± 0.4 mV, $P = 0.9$) (Figure 3B).

3.2.4.1.2 Recovery from steady-state of I_{to} and I_{Kur}

Data describing the reactivation kinetics of I_{to} and I_{Kur} in control and tamoxifen-treated mouse myocytes are summarized in Figure 4. Data were fitted with a single exponential function. Figure 4A shows that the time course of I_{to} recovery from inactivation was comparable in myocytes isolated from tamoxifen-treated mice (52 ± 3 ms) and control mice (58 ± 4 ms, $P = 0.8$). Data presented in Figure 4B indicate that I_{Kur} recovered from inactivation at a similar rate in control and tamoxifen-treated myocyte with a time constant of 803 ± 66 ms in control and 932 ± 52 ms, respectively ($P = 0.8$). Altogether, this suggests that the inactivation kinetics properties of both I_{to} and I_{Kur} were unaffected by chronic tamoxifen treatment.

3.2.4.3 Ventricular K^+ channel protein expression in tamoxifen-teated mice

The next set of experiments examined the protein expression of the K^+ channels corresponding to the mouse ventricular K^+ currents; Kv1.5 (I_{Kur}), Kv2.1 (I_{ss}), Kv4.2/ Kv4.3

(I_{to}), and Kir2.1 (I_{K1}). Since the accessory subunit, KChIP2b, can associate with Kv4.2 and Kv4.3 to increase the density of I_{to} , we also included KChIP2b in these western blot studies. Results of western blot analysis are presented in Figure 5A and B and show that Kv1.5, Kv4.3, Kv2.1, and Kir2.1 protein expression was significantly increased in the ventricles of tamoxifen-treated mice compared with the control animals. However, Kv4.2 and KChIP2b were unaffected by tamoxifen treatment.

3.2.4.4 Ventricular action potential duration in tamoxifen-treated mice

Since alterations in K^+ currents/channels can alter repolarization, we then compared APD in ventricular myocytes from control and tamoxifen-treated mice. Figure 5C presents mean APD measured at 90% of repolarization (APD_{90}) in control and tamoxifen-treated myocytes. Consistent with the increase in the density of the ventricular K^+ currents, the APD_{90} was significantly shorter in tamoxifen-treated myocytes (12.0 ± 1.0 ms) than that observed in controls (24.4 ± 0.6 ms, $P = 1.8 \times 10^{-9}$).

3.2.4.5 Ventricular K^+ channel protein expression in tamoxifen-treated guinea-pigs

Although cardiac ion channels are highly conserved in mice and humans, significant differences are present in the repolarizing K^+ currents between the two species.²⁸ Specifically, human ventricular repolarization is strongly dependent on the rapid and slow components of the delayed rectifier potassium currents, I_{Kr} (carried by ERG1) and I_{Ks} (encoded by KCNQ1 α subunits and KCNE1 β subunits).²⁹⁻³¹ However, these currents do not play an important role in the adult mouse ventricle. Therefore to gain additional information on I_{Kr} and I_{Ks} potassium channel expression, in the last series of experiments we also examined the chronic effects of tamoxifen in guinea pig ventricle, which express functional I_{Kr} and I_{Ks} channels.^{26,32} Using western blot analysis, we compared the protein expression of ERG1, KCNQ1, and KCNE1 in ventricular tissues isolated from adult female guinea pigs chronically treated with either subcutaneous placebo or tamoxifen pellets. Figure 6A and B shows that ERG1 and KCNQ1 channels which correspond, respectively, to I_{Kr} and I_{Ks} α -subunits were both significantly increased in the tamoxifen-treated guinea pig ventricles. In addition, KCNE1, the accessory protein of I_{Ks} , was also significantly increased by tamoxifen.

3.2.5 Discussion

Summary of main findings

In this study, we demonstrated that chronic tamoxifen treatment significantly increases the density of I_{to} , I_{Kur} , I_{ss} , and I_{K1} in adult female mouse ventricular myocytes. This increased K^+ current density was accompanied by higher protein expression of underlying K^+ channels (Kv4.3, Kv1.5, Kv2.1, and Kir2.1, respectively). Voltage dependence and inactivation kinetics properties of the currents were unaffected by long-term tamoxifen exposure. These findings provide convincing evidence that long-term tamoxifen treatment does not negatively modulate K^+ currents but, in the contrary, increases the current density and protein expression of several ventricular K^+ channels in the mouse heart. In addition, data obtained in guinea pig ventricles showed that the upregulation of the cardiac K^+ channels produced by chronic tamoxifen treatment is not specific to the mouse heart but also applies to I_{Kr} and I_{Ks} K^+ channel isoforms (ERG1 and KCNQ1-KCNE1), which also play a major role in human ventricular repolarization. Altogether this study demonstrates that long-term exposure to tamoxifen, a SERM, increases the expression of several cardiac K^+ channel proteins. These findings strongly suggest that tamoxifen action is mediated by blockade of nuclear oestrogen receptors.

Previous experimental studies have shown that acute exposure to tamoxifen and its active metabolite 4-hydroxytamoxifen decreased cardiac ion currents by direct effects to the channels.^{14,19} For instance, we previously reported that the inhibition of cardiac K^+ currents by 4-hydroxytamoxifen was observed even in the presence of the selective oestrogen receptor antagonist, ICI-182,780, or the inhibitor of RNA synthesis, actinomycin D.¹⁹ Similarly, the inhibitory effects of another SERM raloxifene on I_{to} and I_{Kur} in human atrial myocytes were unaffected by the oestrogen receptor antagonist ICI 182,780.³³ These data indicate that the reduction in the repolarizing potassium currents following acute exposure to 4-hydroxytamoxifen or raloxifene was not mediated by the oestrogen receptors.

Thus, although acute exposure to tamoxifen or 4-hydroxytamoxifen inhibits cardiac K^+ currents, it appears that other mechanisms take place with long-term tamoxifen treatment. Indeed, unlike the results obtained in acute studies, here we show that long-term tamoxifen treatment significantly increases the density of several cardiac K^+ current paralleled with an upregulation of the protein expression of corresponding K^+ channel isoforms. These differences may be explained by the fact that multiple sites of action are probably involved in the effects of tamoxifen on cardiac K^+ channels, with an acute inhibitory effect mediated by direct and rapid actions on the K^+ channels and a slower effect mediated through interactions with the oestrogen receptors that would be responsible for the increased density of the currents reported here.

Conditions with high level of oestrogens such as late pregnancy have been associated with reduced K^+ currents both in the heart and the uterus. Eghbali et al.³⁴ reported that at the end of pregnancy, cardiac I_{to} as well as Kv4.3 channel gene expression was downregulated. In addition, they showed that downregulation of cardiac Kv4.3 transcripts was mimicked by oestrogen treatment in ovariectomized mice, and was prevented by the oestrogen receptor antagonist ICI 182,780. Similar findings have also been reported in rat myometrium where Kv4.3 expression was downregulated during pregnancy and following oestrogen treatment.³⁵ In line with these findings, recently Saito et al.³⁶ reported that ovariectomy increased whereas oestrogen decreased the density of K^+ currents/channels ($I_{to}/Kv4.3$ and $I_{Kur}/Kv1.5$) in the mouse ventricle. Altogether, these studies are consistent with the results reported here where we show that inhibition of the oestrogen receptors following long-term exposure to tamoxifen leads to a significant increase in cardiac K^+ current associated with upregulation of the underlying K^+ channel gene expression. Thus, it is conceivable that tamoxifen prevents the oestrogen inhibitory effects on K^+ channels by blocking the oestrogen receptors. This would explain the increased density of the cardiac K^+ currents and channels observed in this study. Furthermore, we also examined that effects of tamoxifen on ovariectomized mice and found comparable results as those obtained in the intact females (data not shown). These findings suggest that the tamoxifen effects on oestrogen receptors are mediated independently of the oestrogen level.

The K⁺ channel isoforms Kv4.2 and Kv4.3 correspond to the murine ventricular I_{to}.^{24,37-41} We previously reported that overexpression of the α 1 β -adrenergic receptor⁴² or the human type 1 angiotensin II receptor⁴³ in the mouse heart is associated with a parallel reduction in ventricular Kv4.2 and I_{to} density without any difference in Kv4.3 expression. In contrast, here we show a corresponding increase in I_{to} and Kv4.3 with chronic tamoxifen treatment while Kv4.2 protein expression was unaffected. Interestingly, similar to what is reported here, work realized using pregnant or oestrogen treated animals also showed that a specific reduction in Kv4.3 was responsible for the lower density of I_{to}.³⁴ It is noteworthy that a specific reduction in Kv4.2 or Kv4.3 produces a parallel effect on the density of I_{to}. However, the reason why under different pathological or physiological conditions only Kv4.2 or Kv4.3 isoform is affected is intriguing and warrants further investigations.

Thus far, the inhibition of cardiac K⁺ current has been reported only after acute exposure to tamoxifen. Furthermore, even though clinical trials have documented QT prolongation with the use of the drug, it is important to note that tamoxifen has never been associated with the development of torsades de pointes. Therefore, it is reasonable to think that the QT prolongation reported in some clinical studies might not be directly associated with tamoxifen and that other factors could have been at the origin of the ECG abnormalities. Results presented here are in support of this view.

Limitations of the study

Although the data reported here strongly support the hypothesis that the observed effects of chronic tamoxifen are mediated by the blockade of oestrogen receptor, we cannot exclude the possibility that our findings could also be due to other unknown actions of tamoxifen. However, in the course of a separate study, oestrogen receptor deficient mice α (ERKO α) and β (ERKO β) were used to investigate the roles of oestrogen receptors on repolarization. Preliminary data show that Kv4.3 protein expression was increased in ERKO α and ERKO β mice compared with wild-type mice.⁴⁴ Thus, these data further support our conclusion that inhibition of oestrogen receptor is responsible for the increased K⁺ current densities and their corresponding channel proteins during chronic tamoxifen

treatment. Taken together, our findings strongly suggest that oestrogen receptors are involved in regulation of ventricular repolarization.

Because of the differences in repolarizing K^+ currents between mouse and human ventricles, direct extrapolation of our findings to human repolarization remains uncertain. However, our studies reveal that long-term tamoxifen treatment also upregulates K^+ channels in guinea pig, which expressed functional I_{Kr} and I_{Ks} K^+ channels (ERG1 and KCNQ1-KCNE1). These K^+ channels are critical in human repolarization.

Conclusion

This study clearly establishes that long-term tamoxifen treatment significantly increases the density of several cardiac K^+ currents paralleled with an upregulation of the protein expression of their corresponding K^+ channel isoforms. This work provides new insight into the basic mechanisms of action of tamoxifen on cardiac electrophysiology and strongly suggests that there is an association between oestrogen, oestrogen receptors and the density of K^+ channels in ventricular myocytes. Findings reported here could contribute to explain the absence of cardiac arrhythmias with the long-term use of tamoxifen therapy in breast cancer patients.

Supplementary material

Supplementary material is available at Cardiovascular Research online.

Funding

This work was supported by operating grants to C.F. from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP-64344).

3.2.6 References

1. Osipo C, Liu H, Meeke K, Jordan VC. The consequences of exhaustive antiestrogen therapy in breast cancer: estrogen-induced tumor cell death. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004;**229**:722-731.
2. Jordan VC. Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nat Rev Drug Discov* 2003;**2**:205-213.
3. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM *et al*. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 1998;**90**:1371-1388.
4. Jordan VC, Morrow M. Tamoxifen, raloxifene, and the prevention of breast cancer. *Endocr Rev* 1999;**20**:253-278.
5. Jordan VC. Overview from the International Conference on Long-Term Tamoxifen Therapy for Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992;**84**:231-234.
6. Park WC, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators (SERMS) and their roles in breast cancer prevention. *Trends Mol Med* 2002;**8**:82-88.
7. Winer EP, Hudis C, Burstein HJ, Chlebowski RT, Ingle JN, Edge SB *et al*. American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2002. *J Clin Oncol* 2002;**20**:3317-3327.
8. McDonald CC, Alexander FE, Whyte BW, Forrest AP, Stewart HJ. Cardiac and vascular morbidity in women receiving adjuvant tamoxifen for breast cancer in a randomised trial. The Scottish Cancer Trials Breast Group. *BMJ* 1995;**311**:977-980.

9. Rutqvist LE, Mattsson A. Cardiac and thromboembolic morbidity among postmenopausal women with early-stage breast cancer in a randomized trial of adjuvant tamoxifen. The Stockholm Breast Cancer Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1993;**85**:1398-1406.
10. Pollack IF, DaRosso RC, Robertson PL, Jakacki RL, Mirro JR, Jr., Blatt J *et al.* A phase I study of high-dose tamoxifen for the treatment of refractory malignant gliomas of childhood. *Clin Cancer Res* 1997;**3**:1109-1115.
11. Trump DL, Smith DC, Ellis PG, Rogers MP, Schold SC, Winer EP *et al.* High-dose oral tamoxifen, a potential multidrug-resistance-reversal agent: phase I trial in combination with vinblastine. *J Natl Cancer Inst* 1992;**84**:1811-1816.
12. Best L. Inhibition of glucose-induced electrical activity by 4-hydroxytamoxifen in rat pancreatic beta-cells. *Cell Signal* 2002;**14**:69-73.
13. Diaz M. Triphenylethylene antiestrogen-induced acute relaxation of mouse duodenal muscle. Possible involvement of Ca^{2+} channels. *Eur J Pharmacol* 2002;**445**:257-266.
14. He J, Kargacin ME, Kargacin GJ, Ward CA. Tamoxifen inhibits Na^+ and K^+ currents in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;**285**:H661-H668.
15. Liu XK, Katchman A, Ebert SN, Woosley RL. The antiestrogen tamoxifen blocks the delayed rectifier potassium current, I_{Kr} , in rabbit ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;**287**:877-883.
16. Thomas D, Gut B, Karsai S, Wimmer AB, Wu K, Wendt-Nordahl G *et al.* Inhibition of cloned HERG potassium channels by the antiestrogen tamoxifen. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003;**368**:41-48.
17. Song J, Standley PR, Zhang F, Joshi D, Gappy S, Sowers JR *et al.* Tamoxifen (estrogen antagonist) inhibits voltage-gated calcium current and contractility

in vascular smooth muscle from rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;**277**:1444-1453.

18. Dick GM, Rossow CF, Smirnov S, Horowitz B, Sanders KM. Tamoxifen Activates Smooth Muscle BK Channels through the Regulatory beta 1 Subunit. *J Biol Chem* 2001;**276**:34594-34599.
19. El Gebeily G, Fiset C. 4-Hydroxytamoxifen inhibits K⁺ currents in mouse ventricular myocytes. *European Journal of Pharmacology* 2010;**629**:96-103.
20. Chen J, Power KA, Mann J, Cheng A, Thompson LU. Flaxseed Alone or in Combination with Tamoxifen Inhibits MCF-7 Breast Tumor Growth in Ovariectomized Athymic Mice with High Circulating Levels of Estrogen. *Experimental Biology and Medicine* 2007;**232**:1071-1080.
21. Tsang SY, Yao X, Wong CM, Chan FL, Chen ZY, Huang Y. Differential regulation of K⁺ and Ca²⁺ channel gene expression by chronic treatment with estrogen and tamoxifen in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 2004;**483**:155-162.
22. Liu B, Edgerton S, Yang X, Kim A, Ordonez-Ercan D, Mason T *et al.* Low-Dose Dietary Phytoestrogen Abrogates Tamoxifen-Associated Mammary Tumor Prevention. *Cancer Res* 2005;**65**:879-886.
23. Trépanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res* 2001;**89**:437-444.
24. Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C. Functional properties of K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 2004;**559**:777-798.
25. Lizotte E, Tremblay A, Allen BG, Fiset C. Isolation and characterization of subcellular protein fractions from mouse heart. *Analytical Biochemistry* 2005;**345**:47-54.

26. Brouillette J, Lupien MA, St Michel C, Fiset C. Characterization of ventricular repolarization in male and female guinea pigs. *J Mol Cell Cardiol* 2007;**42**:357-366.
27. Rasmusson RL, Morales MJ, Wang S, Liu S, Campbell DL, Brahmajothi MV *et al.* Inactivation of Voltage-Gated Cardiac K⁺ Channels. *Circ Res* 1998;**82**:739-750.
28. Salama G, London B. Mouse models of long QT syndrome. *J Physiol* 2007;**578**:43-53.
29. Sanguinetti MC. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* 1995;**81**:299-307.
30. Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL *et al.* Coassembly of KvLQT1 and minK (I_{sK}) proteins to form cardiac I_{Ks} potassium channel. *Nature* 1996;**384**:80-83.
31. Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. K_vLQT1 and I_{sK} (minK) proteins associate to form the I_{Ks} cardiac potassium current. *Nature* 1996;**384**:78-80.
32. 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.
33. Liu H, Jin MW, Xiang JZ, Huang Y, Sun HY, Chiu SW *et al.* Raloxifene inhibits transient outward and ultra-rapid delayed rectifier potassium currents in human atrial myocytes. *Eur J Pharmacol* 2007;**563**:61-68.
34. Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan TY, Ruan H, Wang Y *et al.* Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res* 2005;**96**:1208-1216.

35. Song M, Helguera G, Eghbali M, Zhu N, Zarei MM, Olcese R *et al.* Remodeling of Kv4.3 Potassium Channel Gene Expression under the Control of Sex Hormones. *J Biol Chem* 2001;**276**:31883-31890.
36. Saito T, Ciobotaru A, Bopassa JC, Toro L, Stefani E, Eghbali M. Estrogen Contributes to Gender Differences in Mouse Ventricular Repolarization. *Circ Res* 2009;**105**:343-352.
37. Fiset C, Clark RB, Shimoni Y, Giles WR. *Shal*-type channels contribute to the Ca²⁺-independent transient outward K⁺ current in rat ventricle. *J Physiol* 1997;**500.1**:51-64.
38. Shimoni Y, Fiset C, Clark RB, Dixon JE, McKinnon D, Giles WR. Thyroid hormone regulates postnatal expression of transient K⁺ channel isoforms in rat ventricle. *J Physiol* 1997;**500.1**:65-73.
39. Guo W, Xu H, London B, Nerbonne JM. Molecular basis of transient outward K⁺ current diversity in mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 1999;**521**:587-599.
40. Wickenden AD, Lee P, Sah R, Huang Q, Fishman GI, Backx PH. Targeted expression of a dominant-negative Kv4.2 K⁺ channel subunit in the mouse heart. *Circ Res* 1999;**85**:1067-1076.
41. Barry DM, Xu H, Schuessler RB, Nerbonne JM. Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodelling in mice expressing a dominant-negative Kv4 α -subunit. *Circ Res* 1998;**83**:560-567.
42. Rivard K, Grandy SA, Douillette A, Paradis P, Nemer M, Allen BG *et al.* Ventricular Ca²⁺ handling is altered in transgenic mice with cardiac specific overexpression of the human type I angiotensin II receptor. *Am J Physiol* 2010 (**Accepted**).

43. Rivard K, Paradis P, Nemer M, Fiset C. Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor causes delayed repolarization. *Cardiovasc Res* 2008;**78**:53-62.
44. El Gebeily G, Brouillette J, Fiset C. Regulation of ventricular repolarization by estrogen and estrogen receptors in mouse. *International Society for Heart Research Cell to Bedside - Meeting processing* 2008;**30th North American Section Meeting**:53.

3.2.7 Figures / Figures legend

Figure 1 A-B. Total K^+ currents (I_{peak}) are markedly increased in tamoxifen treated mouse ventricular myocytes. **A:** Representative I_{peak} traces obtained from control and tamoxifen treated myocytes. **B:** Mean current-voltage (I-V) curves showing that I_{peak} is significantly larger in tamoxifen treated ventricular myocytes (n=12) compared to controls (n=11). Protocol is shown in inset (*p<0.05).

Figure 1 C-D. The density of the calcium-independent transient outward current (I_{to}) is increased in tamoxifen treated mouse myocytes. I_{to} was obtained by subtracting the current traces measured with and without the inactivating prepulse. **C:** Representative I_{to} from control and tamoxifen treated myocytes. **D:** Mean I-V curve showing that I_{to} is significantly increased in tamoxifen cells (n=12) compared to controls (n=11) (*p<0.05).

Figure 1 A-B. Total K^+ currents (I_{peak}) are markedly increased in tamoxifen treated mouse ventricular myocytes. Figure 1 C-D. The density of the calcium-independent transient outward current (I_{to}) is increased in tamoxifen treated mouse myocytes.

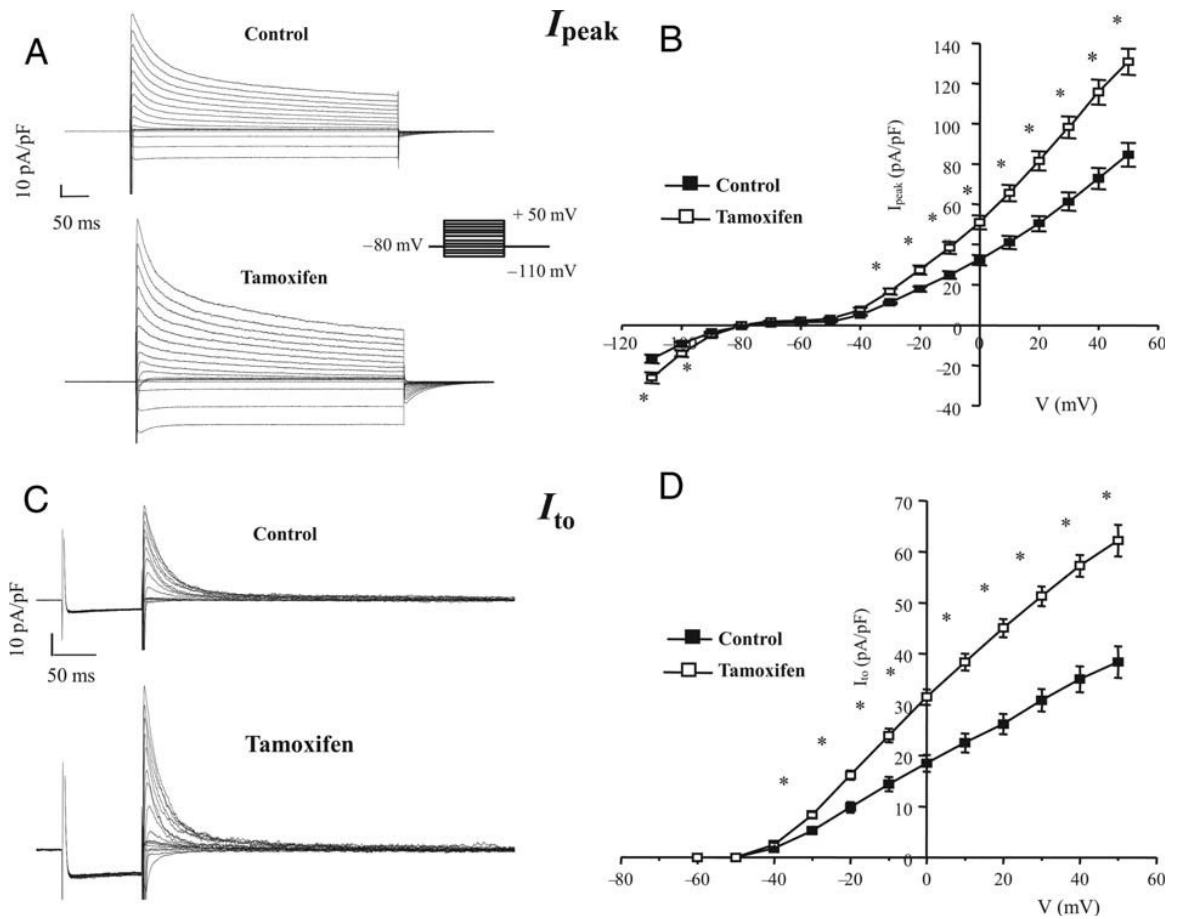


Figure 2 A-B. Steady-state outward K^+ current (I_{ss}) in mouse ventricular myocytes is significantly increased with tamoxifen treatment. An inactivating prepulse to -40 mV (inset) and the application of 100 μ M 4-aminopyridine (4-AP) were used to obtain I_{ss} . **A:** Representative I_{ss} traces from myocytes from control and tamoxifen mice. **B:** Mean I-V relationships showing that I_{ss} density is higher in the tamoxifen group. The mean data also shows that I_{K1} was significantly increased in tamoxifen group. (* $p < 0.05$; $n = 10$ /group).

Figure 2 C-D. The ultrapid delayed rectifier K^+ current (I_{Kur}) is increased in tamoxifen treated mouse myocytes. I_{Kur} was obtained by subtracting currents recorded in the presence of 100 μ M 4-AP from currents recorded in the absence of 4-AP. **C:** representative I_{Kur} recordings from control and tamoxifen treated ventricular myocytes. **D:** mean I-V curves show that I_{Kur} was significantly increased in the tamoxifen group compared to control. (* $p < 0.05$; $n = 10$ /group).

Figure 2 A-B. Steady-state outward K^+ current (I_{ss}) in mouse ventricular myocytes is significantly increased with tamoxifen treatment. Figure 2 C-D. The ultrapid delayed rectifier K^+ current (I_{Kur}) is increased in tamoxifen treated mouse myocytes.

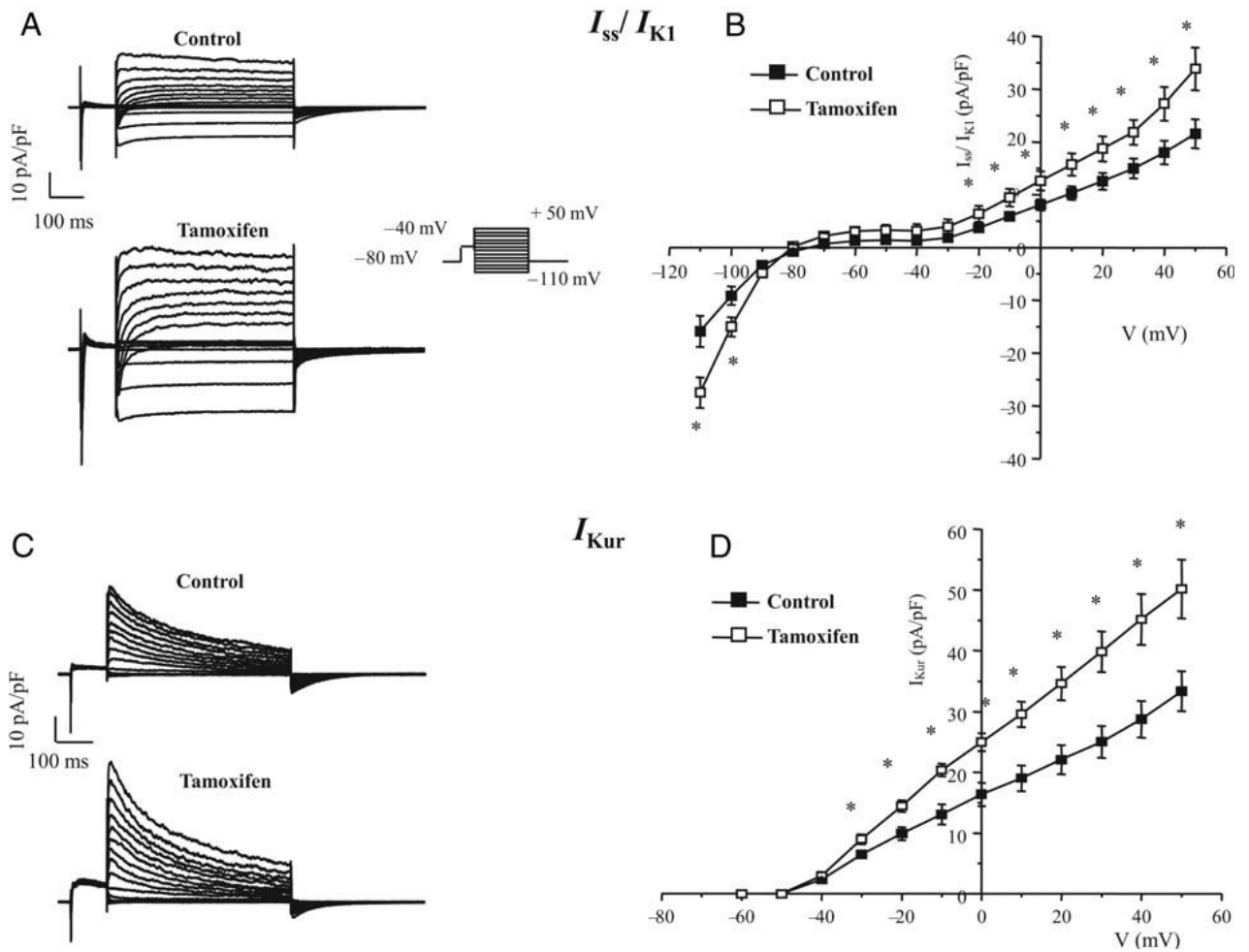


Figure 3. Steady-state inactivation of I_{to} and I_{Kur} in control and tamoxifen treated ventricular myocytes. **A: Voltage dependence of steady-state inactivation of I_{to} .** Left: example of a family of currents produced by a two-pulse voltage-clamp protocol. The 100-ms inactivating prepulse potential were varied from -110 to -20 mV; the 1-s test pulse potential was +30 mV (protocol shown in inset). Right: plot of voltage dependence of steady-state inactivation of I_{to} . The amplitude of I_{to} for each prepulse membrane potential was determined by subtracting each test pulse current with that obtained with the -40 mV prepulse. The I_{to} test pulse amplitude was normalized to the amplitude at the most negative prepulse potential. Data were pooled from control (n=3) and tamoxifen (n=4) treated cells.

B: Voltage dependence of steady-state inactivation of I_{Kur} . Left: example of a family of currents produced by a two-pulse voltage-clamp protocol showing the voltage dependence of the steady-state inactivation of I_{Kur} . Inactivating pulse (5-s duration) was varied from -110 to -20 mV; the test pulse potential (2.5-s duration) was +30 mV. Right: plot of voltage dependence of steady-state inactivation of I_{Kur} . The I_{Kur} test pulse amplitude was normalized to the test amplitude for the most negative prepulse potential. I_{Kur} was obtained by subtraction of the current at the end of the test pulse from the peak test pulse current. Data were pooled from control (n=3) and tamoxifen (n=4) treated cells. The smooth curves are the best fit Boltzmann functions.

Figure 3. Steady-state inactivation of I_{to} and I_{Kur} in control and tamoxifen treated ventricular myocytes.

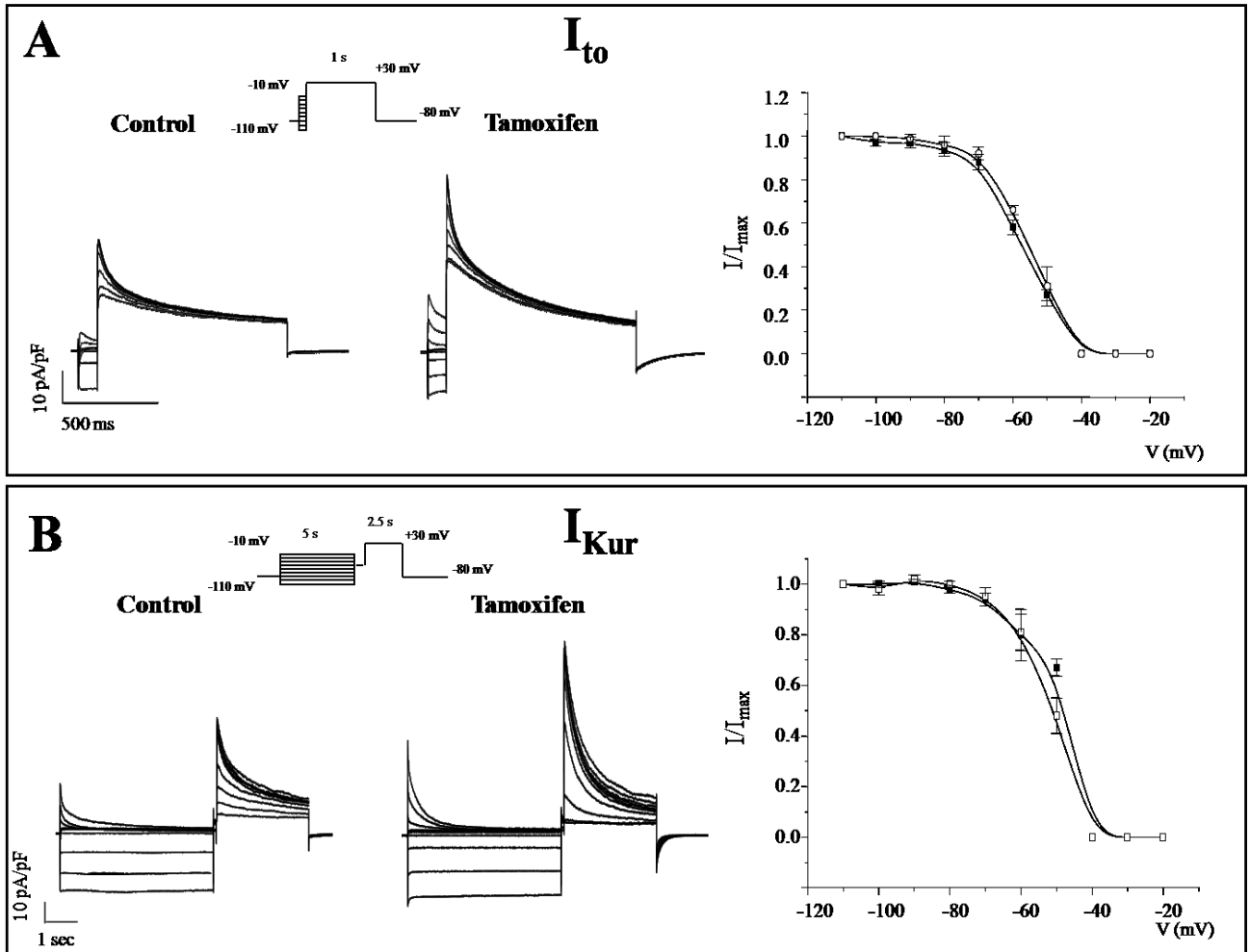


Figure 4. Reactivation of I_{to} and I_{Kur} in control and tamoxifen treated ventricular

A: Recovery from inactivation of I_{to} . Left: example of a family of membrane currents produced by a two-pulse voltage-clamp protocol, showing the time course of recovery of I_{to} from inactivation. A 500-ms inactivating pulse (+30 mV) was followed at intervals of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 200, 400, and 600 ms by an identical 500-ms test pulse. Right: membrane potential dependence of recovery from inactivation of I_{to} . Data were pooled from control (n=3) and tamoxifen (n=4) treated cells. P_2/P_1 is the ratio of test pulse current/prepulse current amplitudes. I_{to} amplitude was measured as the difference between peak outward current and the current 150 ms after the peak. The holding and interpulse potentials were -80 mV. The smooth lines are best fit single-exponential functions.

B: Recovery from inactivation of I_{Kur} . Left: example of a family of membrane currents produced by a two-pulse voltage-clamp protocol, showing the time course of recovery from inactivation of I_{Kur} . A 5-s inactivating pulse was followed at intervals between 50 ms and 3 s by a 2.5-s test pulse. Both pulses were preceded by a brief (100 ms at -40 mV) pulse to inactivate I_{to} . The holding and interpulse potentials were -80 mV. Right: membrane potential dependence of recovery from inactivation of I_{Kur} . Data were pooled from control (n=3) and tamoxifen (n=4) treated cells. I_{Kur} amplitude was measured as the difference between peak test pulse current and the current at the end of the inactivating pulse. The smooth lines are best fit single-exponential functions.

Figure 4. Reactivation of I_{to} and I_{Kur} in control and tamoxifen treated ventricular myocytes.

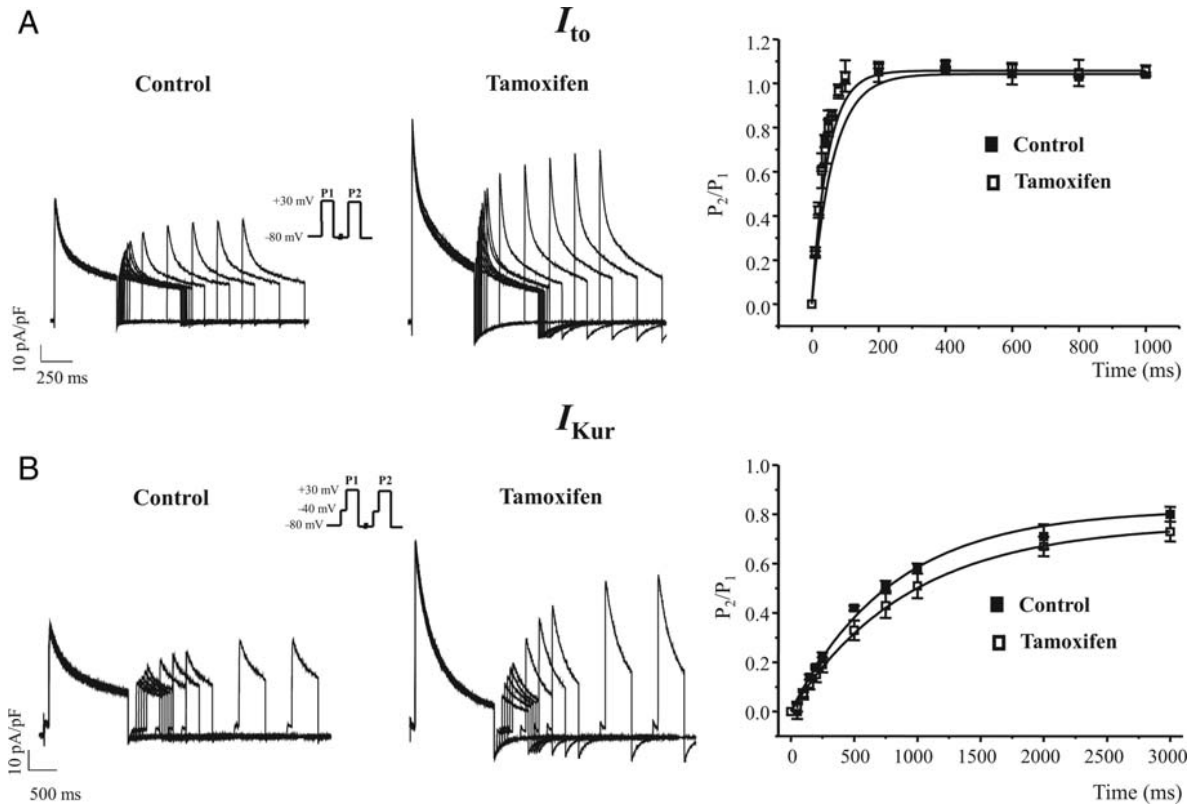


Figure 5 A-B. Ventricular protein expression of K⁺ channels in control and tamoxifen treated mice. **A:** Examples of Western blots of Kv1.5, Kv4.2, Kv4.3, KChIP2b, Kv2.1 and Kir2.1 on sarcolemmal-enriched proteins (100 μg/lane) isolated from control and tamoxifen treated mice. **B:** Bar graphs comparing the relative protein expression of the different K⁺ channel isoforms between the two groups show that protein expression of Kv1.5, Kv4.3, Kv2.1, and Kir2.1 are markedly increased after chronic tamoxifen treatment. Relative abundance was calculated with value for control mice as a reference of 1 (*p<0.05 versus Control; n=3/group; 2 hearts/sample). **C. Shortening of APD with chronic tamoxifen treatment.** Bar graphs comparing mean APD₉₀ recorded in ventricular myocytes from control (n=10) and tamoxifen (n=11) treated mice at a rate of 4 Hz (*p<0.05 versus Control).

Figure 5 A-B. Ventricular protein expression of K^+ channels in control and tamoxifen treated mice. **C.** Shortening of APD with chronic tamoxifen treatment.

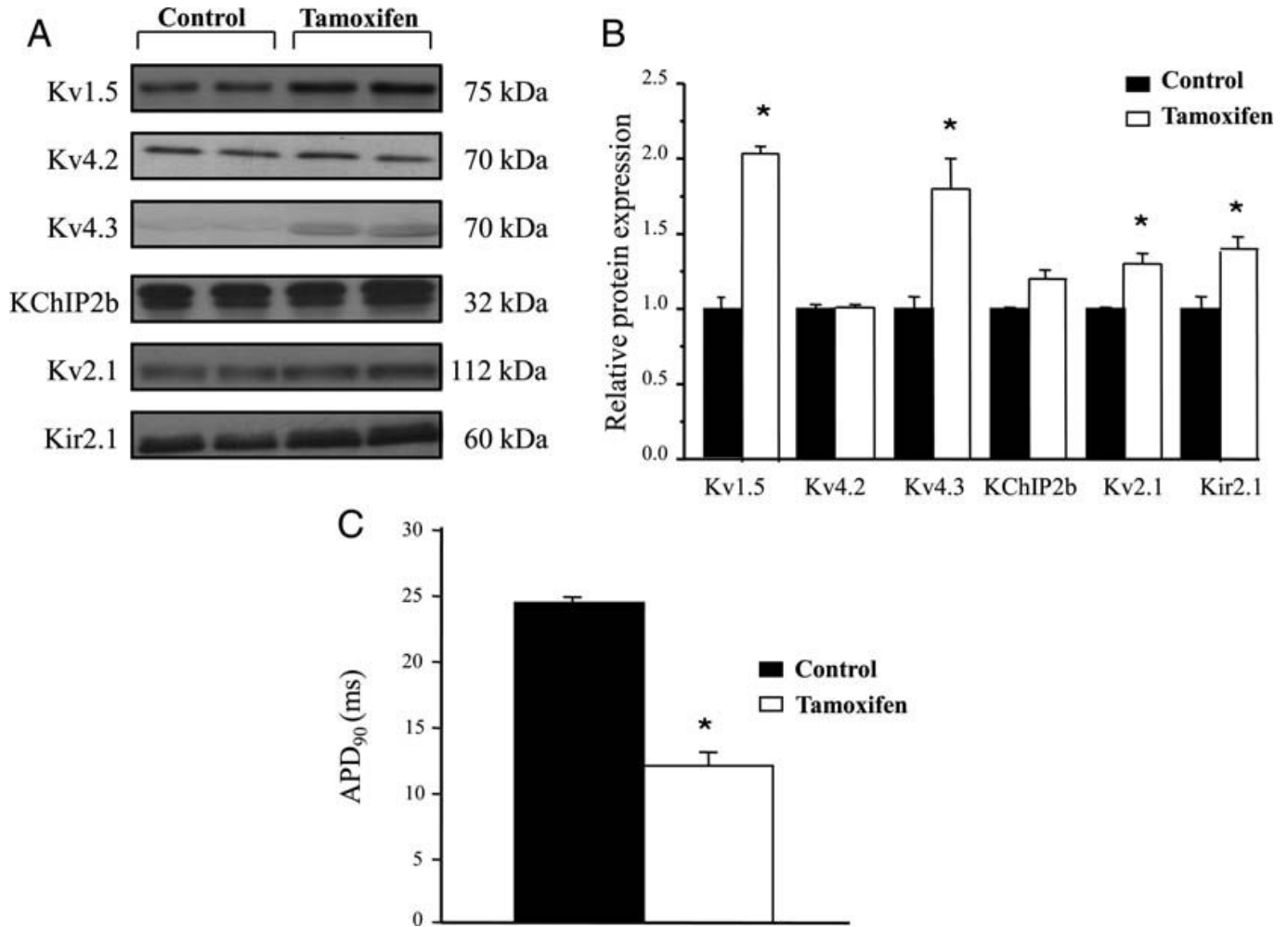
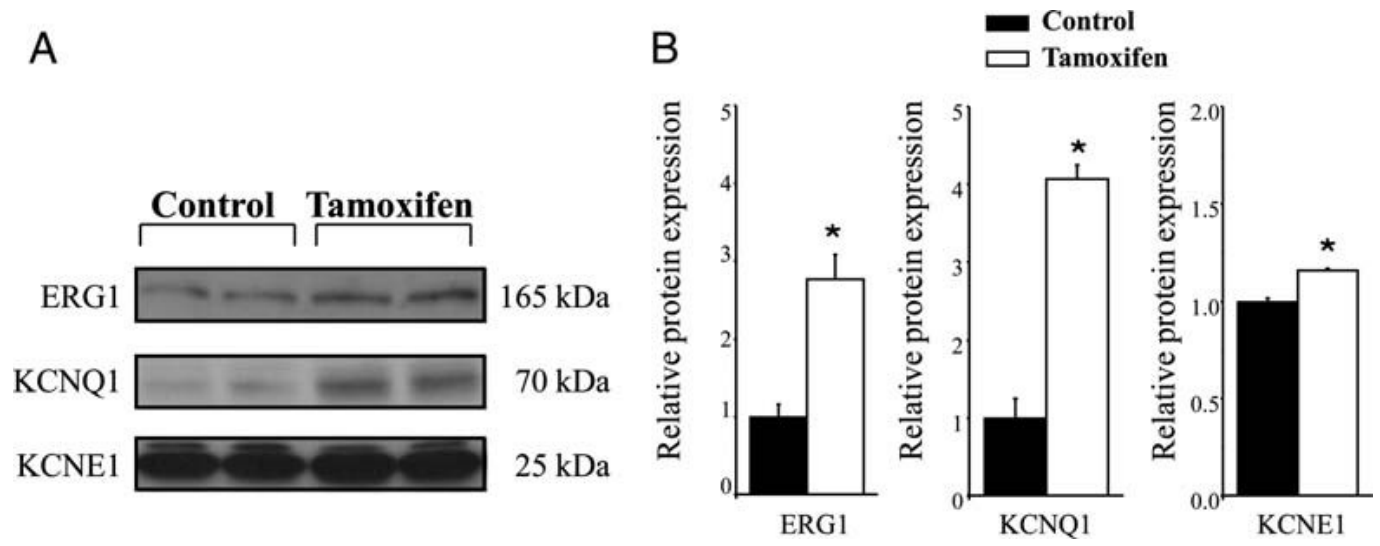


Figure 6. K⁺ channel protein expression in control and tamoxifen treated guinea pig ventricles. **A:** Examples of Western blots of ERG1, KCNQ1 and KCNE1 on sarcolemmal-enriched proteins (100 µg/lane) from control and tamoxifen treated guinea pig ventricles reveal a significant increase in ERG1, KCNQ1 and KCNE1 protein expression with chronic tamoxifen treatment. **B:** Bar graphs comparing relative abundance of ERG1, KCNQ1 and KCNE1 protein expression determined by densitometry. Relative abundance was calculated with value for control guinea pigs as a reference of 1 (*p<0.05 versus control; n=3/group; 1 heart/sample).

Figure 6. K^+ channel protein expression in control and tamoxifen treated guinea pig ventricles.



**Chapitre 4 La régulation de la repolarisation ventriculaire par les
oestrogènes et les récepteurs oestrogéniques chez la souris**

4.1 Avant-propos

4.1.1 Introduction

Bien que plusieurs études suggèrent que les androgènes régulent la repolarisation et qu'ils pourraient être impliqués dans la différence reliée au sexe dans la repolarisation cardiaque, l'influence des hormones sexuelles féminines sur la repolarisation ventriculaire et les courants K^+ est beaucoup moins claire. De plus, malgré qu'il ait été rapporté que les œstrogènes régulent l'expression de certains canaux K^+ au niveau du muscle utérin, du muscle lisse et du cerveau, et que nos études sur le tamoxifène suggèrent une association entre les œstrogènes, les récepteurs œstrogéniques et les courants K^+ , nous ne pourrions pas conclure que les œstrogènes régulent la repolarisation ventriculaire. Une troisième étude a été ainsi réalisée chez des souris femelles ovariectomisées et des souris déficientes en récepteurs œstrogéniques α ou β afin de vérifier le rôle des œstrogènes et des récepteurs œstrogéniques sur la repolarisation ventriculaire. Des études d'électrophysiologie (patch-clamp) combinées à des études de biologie moléculaire (western blot et PCR en temps réel) ont été réalisées afin de vérifier si les œstrogènes et les récepteurs œstrogéniques régulent la repolarisation cardiaque chez la souris. Les résultats de cette étude sont soumis à *Cardiovascular Research* en 2013 et ils sont présentés au chapitre 4.

4.1.2 Contribution des auteurs

Gracia El Gebeily : Expérimentation, analyse, rédaction

Céline Fiset : Conceptualisation du projet, supervision, rédaction finale

4.2 Article

REGULATION OF VENTRICULAR REPOLARIZATION BY ESTROGEN AND ESTROGEN RECEPTORS IN MOUSE HEART

Gracia El Gebeily^{1,2} and Céline Fiset^{1,2†}

¹ Research Center, Montreal Heart Institute
5000 Bélanger, Montréal, Québec, Canada, H1T 1C8

² Faculty of Pharmacy, Université de Montréal
Montréal, Québec, Canada

4.2.1 Résumé / Abstract

4.2.1.1 Résumé :

Les femmes ont un intervalle QT plus long que les hommes et sont plus susceptibles à développer des torsades de pointes, une tachycardie ventriculaire associée à un retard de repolarisation. Plusieurs études suggèrent que les androgènes accélèrent la repolarisation ventriculaire et contribuent aux différences entre les sexes au niveau de l'intervalle QT. Cependant, l'influence des oestrogènes et des récepteurs oestrogéniques (RE) est moins clair. Ainsi, le but de cette étude était d'étudier l'effet des oestrogènes et des RE sur les courants K^+ cardiaques chez la souris. Des études de patch-clamp en mode voltage-imposé réalisées sur des myocytes ventriculaires de souris femelles témoins (CTL) et ovariectomisées (OVX) ont montré que le courant K^+ transitoire sortant indépendant du Ca^{2+} (I_{to}) est augmenté chez les souris OVX comparativement aux CTL (OVX: 47.2 ± 1.5 pA/pF, n=33; CTL: 30.9 ± 2.2 pA/pF, n =32; $P < 0.05$). Les résultats de western blot et de PCR en temps réel (qPCR) ont montré une augmentation de l'expression protéique et d'ARNm de Kv4.3 chez les souris OVX comparativement aux CTL. Notre étude précédente a rapporté que l'inhibition à long terme des RE par le tamoxifène augmente l'expression des canaux K^+ suggérant ainsi que les RE régulent les canaux K^+ cardiaques. Puisque les RE α et les RE β peuvent jouer un rôle central dans les effets cardiovasculaires des oestrogènes, des souris transgéniques ERKO α et ERKO β ont été utilisés afin de déterminer le rôle de chacun de ces deux RE dans la régulation des canaux sous-jacents de I_{to} . Les qPCR ont montré une augmentation de l'expression d'ARNm de Kv4.3 chez les ERKO α et non ERKO β comparativement aux CTL alors que celle de Kv4.2 et KChiP2 étaient similaires entre les souris ERKO α et ERKO β comparativement aux CTL. Ces données suggèrent que les oestrogènes régulent la repolarisation ventriculaire et cet effet est médié par les RE α .

Mots clés: Oestrogène, ventricule, souris, courants K^+ , Kv4.3, récepteurs oestrogéniques.

4.2.1.2 Abstract:

Women have a longer QT interval than men and are more prone to develop torsade de pointe, a ventricular tachycardia associated with delayed repolarization. There is strong evidence that androgens accelerate ventricular repolarization and contribute to the sex-related difference in the QT interval. However, the influence of estrogens and estrogen receptors (ER) on ventricular repolarization is less understood. Accordingly, we assessed the involvement of estrogens and ER on K^+ currents in mouse. Voltage-clamp studies were carried out using ventricular myocytes isolated from sham-operated (CTL) and ovariectomised (OVX) female mice. These experiments show that there is an increase in the density of the Ca^{2+} -independent transient outward, I_{to} in OVX mice compared to CTL mice (OVX: 47.2 ± 1.5 pA/pF, $n=33$; CTL: 30.9 ± 2.2 pA/pF, $n=32$; $P < 0.05$). Western blot and real-time PCR (qPCR) showed a higher mRNA and protein expression of Kv4.3 (one of the underlying K^+ channels of I_{to}) in OVX mice compared to CTL. In contrast, no difference in protein or mRNA levels for Kv4.2 and KChIP2 was observed between OVX and CTL mice. Using the non-selective ER antagonist, tamoxifen, we established that a long-term inhibition of ER increased K^+ currents suggesting that these alterations were ER mediated. Since both $ER\alpha$ and $ER\beta$ may play a central role in the cardiovascular effects of estrogens, the use of $ER\alpha$ -knockout (ERKO α) or $ER\beta$ -knockout (ERKO β) female mice is interesting to further investigate the roles of the individual ER subtypes in the regulation of Kv4.3. While Kv4.2 and KChIP2 mRNA expression were similar, qPCR showed a higher Kv4.3 mRNA expression in ERKO α compared to wild type mice. Moreover, the mRNA expression of Kv4.3, Kv4.2 and KChIP2 were similar in ERKO β compared to wild type mice. Altogether, these data strongly suggests that the estrogens regulate ventricular repolarization and this effect is mediated by $ER\alpha$.

Key words: Estrogen, ventricle, mouse, K^+ currents, Kv4.3, estrogen receptor.

4.2.2 Introduction

There are important sex differences in the incidence and severity of a variety of cardiac arrhythmias.¹⁻¹¹ Sex-based differences in cardiac electrical activity modulated by sex steroid hormones are thought to be major contributing factors in the differential presentation of cardiac arrhythmias in men and women. For example, the increased incidence of torsade de pointe in women has been associated with their longer QT interval,¹²⁻¹⁷ which suggests a lower density of repolarizing K⁺ currents in women than men. In support of a role for sex hormones in these differences, there is now strong evidence that androgens accelerate ventricular repolarization and contribute to the sex-related difference in QT interval.^{18, 19}

On the other hand, the influence of female sex hormones on ventricular repolarizing K⁺ currents in the heart is less clear, although estrogen has been reported to exert effects on the expression of K⁺ channels in a variety of tissues including uterus, smooth muscle cells and brain.²⁰ Clinical observations documented fluctuations in arrhythmia inducibility in menopausal female patients, in which important hormonal changes might alter cardiac electrical function and vulnerability to arrhythmias.^{10, 21} Moreover, animal studies reported pregnancy-related downregulation of ventricular Kv4.3 gene expression.²² In the same line of work, Kv4.3 and Kv1.5 transcripts and their corresponding K⁺ currents (I_{to} and I_{Kur}, respectively) were shown to be decreased in ventricle of estrogen-treated ovariectomized mice.²³ Furthermore, we recently demonstrated that long-term exposure to tamoxifen, a non-selective estrogen receptor antagonist, increased the density and expression of ventricular K⁺ currents/channels in female mice.²⁴ These findings strongly suggest that there is an association between estrogen, estrogen receptors and the density of K⁺ channels in ventricular myocytes.

Thus, in the present study, ovariectomized (ovx) mice as well as transgenic approaches were used to directly assess the involvement of estrogen and specific estrogen receptor subtypes in cardiac repolarization. The findings presented here clearly show that the absence of estrogen leads to a specific increase in I_{to} density and Kv4.3 expression and these effects are mediated by estrogen receptor alpha.

4.2.3 Material and methods

All experiments were performed in accordance to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Experiments were also approved by the Montreal Heart Institute animal care committee (approval reference number 2009-8002). A detailed description of all the following methods can be found in the online data supplement.

Animals

Adult female CD-1 mice (2–3 months) were ovariectomized as previously described.²⁵ Briefly, female mice were anesthetized with isoflurane. A 1 cm incision was made in the skin and back muscles parallel to the midline of the animal. The oviduct, including the ovarian blood vessels, was ligated and the ovary removed. The incision in the back musculature was closed with nylon thread (Ethicon 4.0) and the skin was sutured with stainless steel wound clips (MikRon Autoclip). Throughout the surgical procedure mouse body temperature was maintained at 37°C with a heating pad. Age-matched sham-operated mice underwent a similar procedure except the ovaries and oviducts were not removed. Ovariectomized and sham-operated mice were studied 4-weeks post-surgery.

Adult (2–3 months) female C57BL/6 wild-type and transgenic with knockout of estrogen receptor α (ERKO α) or β (ERKO β) were used in this study to determine the roles of the individual ER subtypes in the regulation of cardiac repolarization. The generation of the ERKO α and ERKO β mice has been described before.^{26, 27}

Mouse Ventricular Myocytes Isolation

Single ventricular myocytes were isolated by enzymatic dispersion as previously described.²⁸ After being heparinized and anaesthetized with isoflurane, mice were sacrificed by cervical dislocation. Their hearts were rapidly removed and perfused retrogradely through the aorta using a modified Langendorff perfusion system. Single myocytes were isolated

from the right ventricular free wall after enzymatic dissociation using Worthington collagenase type 2 ($73.7 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Electrophysiology

The whole-cell voltage-clamp recording methods, data acquisition, voltage-clamp protocols, and analysis methods have been described previously.²⁹ All experiments were carried out at room temperature (20°C to 22°C). Ionic currents were normalized for cell capacitance and are expressed in terms of current density (in pA/pF).

Western blots analysis

Protocols used for isolation of sarcolemmal-enriched protein and Western blot analysis were identical to those reported previously.^{28, 30} Primary antibodies directed against each K^{+} channel of interest Kv1.5 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), Kv2.1, Kv4.2, Kv4.3, Kir2.1 (Alomone Labs, Israel), and Kv channel interacting protein type 2 (KChIP2) (Santa Cruz Biotech, CA) were used.

Real-time PCR

mRNA levels of the different K^{+} channels (Kv1.5, Kv2.1, Kv4.2, Kv4.3 and Kir2.1), and KChIP2 were determined by real-time PCR as described previously.^{31, 32} mRNA expression was quantified relative to cyclophyllin.

Statistical analysis

Data are reported as mean \pm standard error (SEM) and 'n' refers to the number of different cells or experiments. An unpaired Student's t-test was used to compare mean data. P-values smaller than 0.05 were considered to be statistically significant.

4.2.4 Results

Effect of ovariectomy on total K^{+} currents (I_{peak})

All K^{+} currents were recorded using techniques described previously by Brouillette et al.²⁹ We compared the density of total K^{+} current (I_{peak}) on isolated ventricular myocytes obtained from CTL or ovariectomized female mice using the whole-cell voltage-clamp technique. Fig. 1A illustrates representative examples of I_{peak} recorded from a control and an OVX ventricular myocyte. All currents were normalized to cell capacitance and expressed as current densities (pA/pF). On average, cell capacitance was smaller in OVX

(137 ± 5 pF, $n=40$) compared to CTL (155 ± 7 pF, $n=35$, $p<0.05$) female ventricular myocytes. The mean current-voltage (I–V) relationship for I_{peak} shows that the inwardly rectifying K^+ current, I_{K1} (voltages ranging from -110 to -40 mV), which maintains the resting membrane potential and modulates the final repolarization phase of the action potential in mouse ventricle was not altered in OVX myocytes (at -110 mV, CTL: -25.04 ± 1.55 pA/pF, $n=32$ and OVX: -24.84 ± 1.36 pA/pF, $n=36$, $P=ns$) (Fig. 1B). Consistent with this, the resting membrane potentials were also similar in the two groups (CTL: -73 ± 1 mV, $n=34$; OVX: -73 ± 1 mV, $n=36$; $p=NS$). In contrast, the current density of the outward portion of I_{peak} was significantly larger in OVX myocytes compared to controls as also shown on Figure 1 (at $+30$ mV, CTL: 69.5 ± 4.9 pA/pF and OVX: 89.3 ± 3.6 pA/pF, $p>0.05$).

In mouse ventricle, the outward K^+ current is composed of three components (i) the Ca^{2+} -independent transient outward K^+ current (I_{to}), (ii) the ultrarapid delayed rectifier K^+ current (I_{Kur}) and (iii) the steady-state outward K^+ current (I_{ss}). To determine the contribution of each of the individual K^+ currents to the larger outward I_{peak} in OVX myocytes, the outward K^+ current was separated into its three components. Figure 1C illustrates bar graphs comparing the density of all K^+ current density in mice between the two groups at $+30$ mV except for I_{k1} at -110 mV.

Ovariectomy increases I_{to} in mouse ventricular myocytes

Data presented in Figure 1C,D illustrates the increase in I_{to} density in OVX myocytes. To inactivate I_{to} , a short prepulse (100 ms step to -40 mV) was added prior to the voltage steps. I_{to} was then calculated by subtracting pairs of current recordings with and without the inactivating prepulse [24]. Fig. 2A presents typical I_{to} recordings from control and OVX myocytes and shows that I_{to} was increased in OVX myocytes. The mean IV curves illustrated in Fig. 2B show that ovariectomy significantly increased I_{to} density over the entire activation range (at $+30$ mV, CTL: 31.5 ± 2.3 pA/pF, $n=32$ and OVX: 47.2 ± 2.6 pA/pF, $n=33$, $p<0.05$).

Ovariectomy did not alter I_{ss} and I_{Kur} in mouse ventricular myocytes

The current that remains after I_{to} is inactivated consists of I_{ss} and I_{Kur} . To separate them, 100 μ M of 4-aminopyridine (4-AP), which selectively block I_{Kur} , were applied to the cells in combination with the prepulse used to inactivate I_{to} . The 4-AP-resistant current that remains after this protocol is I_{ss} while the 4-AP-sensitive current correspond to I_{Kur} . In Figure 3 A-B, we compared the 4-AP-sensitive component of K^+ current (I_{Kur}). Fig.3 present typical examples as well as mean I-V curve for I_{Kur} recorded in ventricular myocytes isolated from control and OVX female mice. As illustrated, I_{Kur} was unaffected by ovariectomy. The current density of I_{Kur} was similar for control (at +30 mV, 24.8 ± 2.7 pA/pF, n=22) and OVX (30.8 ± 2.6 pA/pF, n=24, $p>0.05$) mice. Overall, these voltage-clamp experiments indicate that ovariectomy increases the current density of I_{to} , but has no effect on I_{Kur} , I_{ss} or I_{K1} in ventricular mouse myocytes.

Next, Figure 3C illustrates superimposed current traces corresponding to I_{ss} obtained from CTL and OVX myocytes. Fig.3D presents the corresponding mean I-V relationships and shows that I_{ss} was similar between CTL and OVX (at +30mV, 16.2 ± 1.0 pA/pF, n=24 and 16.6 ± 1.1 pA/pF, n=25, respectively) ($p=ns$).

Ventricular Kv4.3 protein expression is increased in OVX mice

To determine whether an increase in protein expression could explain the higher current density of I_{to} , we examined the effects of ovariectomy on the protein expression for the K^+ channels corresponding to I_{to} in mouse ventricle (Kv4.2 and Kv4.3) as well as the accessory subunit KChIP2, which also contributes to I_{to} .³³ We also included the mouse ventricular K^+ channels responsible for the other currents described above, which correspond to Kv1.5 (coding for I_{Kur}), Kv2.1 (coding for I_{ss}) and Kir2.1 (coding for I_{K1}). Data presented in Figure 4 shows that Kv4.3 protein expression was significantly increased in ventricular tissues obtained from OVX mice while none of the other K^+ channels examined were different compared to control female animals.

Ventricular Kv4.3 mRNA expression is increased in OVX mice

To further investigate the effect of OVX on K^+ channels, we then measured the mRNA expression of the different K^+ channels underlying I_{to} with qPCR analysis using RNA

isolated from controls and OVX female mouse ventricles. Consistent with our electrophysiological and Western blot data, results reported in Figure 4 show that a long-term deficiency of ovarian hormones caused a specific upregulation of Kv4.3 mRNA expression in ventricular tissues isolated from OVX mice compared to CTL animals. Similar to what was observed in the Western blot experiments, Kv4.3 was also the only K⁺ channel affected by OVX (Figure 5). Together these data support a transcriptional regulation of Kv4.3 by female sex hormones.

Ventricular Kv4.3 mRNA expression is increased in ERKO α mice

We recently showed that chronic treatment with the non-selective ER antagonist, tamoxifen, increased the level of expression of ventricular K⁺ channels in female mice and guinea pigs,²⁴ suggesting that estrogen receptor regulate cardiac K⁺ channels. In order to directly examine the implication of the estrogen receptors and to delineate the roles of the two estrogen receptor subtypes on Kv4.3 mRNA expression, we realized additional experiments using mice homozygous for the targeted disruption of the estrogen receptor α (ERKO α) or β (ERKO β). As shown in Figure 6, qPCR analysis revealed that Kv4.3 mRNA expression was significantly increased in female ERKO α but not in ERKO β mice compared to control mice. Furthermore, Kv4.2 and KChIP2 mRNA were not altered in ERKO α . Collectively, findings reported here indicate that the alterations induced by OVX on I_{to} and Kv4.3 are estrogens -dependent and mediated by ER α but not ER β .

4.2.5 Discussion

Summary of main findings

This study is the first to report the effect of estrogen and estrogen receptor on the total (I_{peak}) and the calcium-independent transient outward K⁺ potassium current (I_{to}) which plays a critical and prominent role in the duration of ventricular repolarization. First, our results obtained in OVX mice, a model of post-menopausal women, revealed that sex hormones increased the density of I_{to} and the expression of Kv4.3, one of his underlying channels, suggesting a possible role of female sex hormones in the regulation of cardiac repolarization. Second, the increase of Kv4.3 seen in ERKO α and not ERKO β suggest that

the estrogen upregulates I_{to} and selectively Kv4.3 by a transcriptional mechanism involving the ER α .

Increased of I_{to} current and Kv4.3 protein and mRNA expression in OVX mice

The study of the OVX mice model showed two major findings: I_{to} is regulated by estrogen and this regulation is involving a transcriptional mechanism. Electrophysiological recordings reveal that ovariectomy increased I_{to} density in female ventricular myocytes. Because I_{to} current is composed of two components: Kv4.3 and Kv4.2, its up-regulation after chronic changes in female hormones suggest a possible molecular remodelling of its subunits. Therefore, using western blot, we revealed that there a significant increase in the protein expression of Kv4.3 in the OVX group but there is no changes in the expression of Kv4.2 and KChIP2b, the accessory subunit of I_{to} . The fact that both, I_{to} and Kv4.3, are highly increased in the OVX mice than CTL provides further support for the hypothesis that hormonal changes affect especially Kv4.3 and allow us to assume that the up-regulation of this current in OVX mice model is post-transcriptionally regulated. This finding strongly supports the report of Song et al.³⁴ which reported that estrogens remodels the expression of Kv4.3 channel in pregnant uterus and that the rise of estrogens is one factor that down regulates cardiac Kv4.3 gene expression²². The hormonal regulation of I_{to} has also been reported in different studies and publications. For example, I_{to} density is up-regulated by thyroid hormones in rats after myocardial infarction³⁵. In contrast, it is significantly down-regulated in hypothyroid ventricular myocytes (Sun ZQ et al. 2000) and after an adrenergic stimulation in cardiac disease (Van der Heyden et al., 2006). Moreover, in our study and in concordance with the results obtained by using patch-clamp technique and western blot analysis, real time-PCR shows that the Kv4.3 mRNA expression is significantly higher in the OVX model than CTL. The fact that the rise of protein levels correlated with an increase in Kv4.3 mRNA levels suggests (1) that female hormones play a role in the regulation and duration of cardiac repolarization, (2) more specifically in the modulation of I_{to} and (3) that the regulation of Kv4.3 protein expression in the absence of sex hormones involves a transcriptional mechanism.

Increased of Kv4.3 mRNA expression in ERKO α mice

Our previous study reported that long-term tamoxifen treatment increases K⁺ channels suggesting that the level of female hormones is mediated by ER. In addition, the results reported here are consistent with our data published before where we show that inhibition of the oestrogen receptors following long-term exposure to tamoxifen leads to a significant increase in cardiac Kv4.3 channel gene expression. In line with these findings, Eghbali et al. reported that the cardiac Kv4.3 transcript is downregulated by oestrogen treatment in ovariectomized mice.

Estrogen has two receptors in the heart, ER α and ER β but these two receptors have different targets. Previous study has reported that ER β is not affected by the female hormones level while it is the opposite for ER α . In fact, during pregnancy and postpartum, the protein expression level of ER α is maximum at the mid-pregnancy decreases at the end of gestation and at 2 days postpartum while ER β was stable all the time^{22, 36}. Similarly, in 2006, Ropero et al. have reported a downregulation of ER α induced by estrogen in isolated cardiomyocytes³⁷; This positive linear relation between the female hormones levels and ER α and the negative linear relation between the female hormones levels and Kv4.3 (reported in this study) may suggest and explain the increase of Kv4.3 in a mice model Knock-out of ER α and not ER β .

Kv4.3 is the component of I_{t0} affected by hormones

Kv4.2 and Kv4.3 correspond to the K⁺ channel isoforms of I_{t0} in mice. We previously reported the overexpression of the α 1 β -adrenergic and the human type 1 angiotensin II receptor decrease I_{t0} density, Kv4.2 and KChIP2 expression without affecting Kv4.3 expression.^{32, 38} In contrast, here we show that a change in the hormonal female status leads to an increase in I_{t0} and Kv4.3 although Kv4.2 and KChIP2 protein expression were unaffected. Similarly, a reduction of I_{t0} and Kv4.3 has been reported in pregnant or oestrogen treated animals. These findings guide us to believe that (1) hormones affect cardiac K⁺ channels in mice, (2) the regulation of the density of I_{t0} is associated with a

change in Kv4.2 or Kv4.3 (3) Kv4.2 is regulated by KChIP2 in mice and (4) change in the hormonal status affect only Kv4.3 isoform.

4.2.5.1 Conclusions

We clearly showed here that the increase of the density of I_{to} and the expression of Kv4.3 in mice after long term privation of female hormone is involving a transcriptional pathway through the $ER\alpha$.

Acknowledgements

This study was supported by operating grants to C. Fiset. This work was supported by the the Canadian Institutes of Health Research (CIHR MOP-64344), the Quebec Heart and Stroke Foundation (QHSF) and the Foundation of the Montreal Heart Institute. C. Fiset is a Research Scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

4.2.6 References

- (1) Albert CM, McGovern BA, Newell JB, Ruskin JN. Sex differences in cardiac arrest survivors. *Circulation* 1996 March 15;93(6):1170-6.
- (2) White CR, Darley-USmar V, Oparil S. Gender and cardiovascular disease. Recent insights. *Trends Cardiovascular Medicine* 1997;7:94-100.
- (3) Baysal K, Losordo DW. Oestrogen receptors and cardiovascular disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 1996;23:537-48.
- (4) Kim-Schulze S, McGowan KA, Hubchak SC, Cid MC, Martin MB, Kleinman HK, Greene GL, Schnaper HW. Expression of an estrogen receptor by human coronary artery and umbilical vein endothelial cells. *Circulation* 1996;94:1402-7.
- (5) Thompson LP, Weiner CP. Long-term estradiol replacement decreases contractility of guinea pig coronary arteries to the thromboxane mimetic U46619. *Circulation* 1997;95:709-14.
- (6) Larsen JA, Kadish AH. Effects of gender on cardiac arrhythmias. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 1998;9:655-64.
- (7) Rubart M, Von Der Lohe E. Sex steroid and cardiac arrhythmia: More questions than answers. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 1998;9:655-67.
- (8) Makkar RR, Fromm BS, Steinman RT, Meissner MD, Lehmann MH. Female gender as a risk factor for torsades de pointes associated with cardiovascular drugs. *JAMA* 1993;270:2590-7.
- (9) Manolio TA, Furberg CD, Rautaharju PM, Siscovick D, Newman AB, Borhani NO, Gardin JM, Tabatznik B. Cardiac arrhythmias on 24-h ambulatory electrocardiography in older women and men: the Cardiovascular Health Study. *Journal of the American College of Cardiology* 1994;23(4):916-25.
- (10) Kadish AH. The effects of gender on cardiac electrophysiology and arrhythmias. In: Zipes DP, Jalife J, eds. *Cardiac Electrophysiology: From cell to bedside*. 2 ed. Philadelphia: W.R. Saunders Company; 1995. p. 1268-75.
- (11) Kawasaki R, Machado C, Reinhoehl J. Increased propensity of women to develop torsades de pointes during complete heart block. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 1995;6:1032-8.

- (12) Rautaharju PM, Zhou SH, Wong S, Calhoun HP, Berenson GS, Prineas R, Davignon A. Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Canadian Journal of Cardiology* 1992;8(7):690-5.
- (13) Lehmann MH, Timothy KW, Frankovich D, Fromm BS, Keating M, Locati EH, Taggard RT, Towbin JA, Moss AJ, Schwartz PJ, Vincent M. Age-gender influence on the rate-corrected interval and the QT-heart rate relation in families with genotypically characterized long QT syndrome. *Journal of American College of Cardiology* 1997;29:93-9.
- (14) Locati E, Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, Vincent M, Lehmann MH, Towbin J, Priori SG, Napolitano C, Robinson JL, Andrews M, Timothy KW, Hall WJ. Age- and sex-related differences in clinical manifestations in patients with congenital Long-QT syndrome. Findings from the international LQTS registry. *Circulation* 1998;97:2237-44.
- (15) Merri M, Benhazin J, Alberti M, Locati E, Moss AJ. Electrocardiographic quantitation of ventricular repolarization. *Circulation* 1989;80:1301-8.
- (16) Stramba-Badiale M, Locati E, Martinelli A. Gender and the relationship between ventricular repolarization and cardiac cycle length during 24-hour Holter monitor recordings. *Eur Heart J* 1997;18:1000-6.
- (17) Stramba-Badiale M, Spagnolo D, Bosi G, Schwartz PJ. Are gender differences in QTc present at birth? *American Journal of Cardiology* 1995;75:1277-8.
- (18) Brouillette J, Trepanier-Boulay V, Fiset C. Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *Journal of Physiology* 2003;546:403-13.
- (19) Brouillette J, Rivard K, Lizotte E, Fiset C. Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens. *Cardiovascular Research* 2005 January 1;65(1):148-57.
- (20) Toro L, Stefani E, Erulkar S. Hormonal regulation of potassium currents in single myometrial cells. *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:2892-5.
- (21) Rashba EJ, Zareba W, Moss AJ, Hall WJ, Robinson J, Locati EH, Schwartz PJ, Andrews M. Influence of pregnancy on the risk for cardiac events in patients with hereditary long QT syndrome. LQTS Investigators. *Circulation* 1998;97(5):451-6.
- (22) Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan TY, Ruan H, Wang Y, Toro L, Stefani E. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res* 2005 June 10;96(11):1208-16.
- (23) Saito T, Ciobotaru A, Bopassa JC, Toro L, Stefani E, Eghbali M. Estrogen contributes to gender differences in mouse ventricular repolarization. *Circ Res* 2009 August 14;105(4):343-52.

- (24) El Gebeily G, Fiset C. Upregulation of ventricular potassium channels by chronic tamoxifen treatment. *Cardiovascular Research* 2011 April 1;90(1):68-76.
- (25) Lizotte E, Grandy SA, Tremblay A, Allen BG, Fiset C. Expression, distribution and regulation of sex steroid hormone receptors in mouse heart. *Cell Physiol Biochem* 2009;23(1-3):75-86.
- (26) Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90(23):11162-6.
- (27) Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β . *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:15677-82.
- (28) Trépanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circulation Research* 2001 August 31;89(5):437-44.
- (29) Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C. Functional properties of K^+ currents in adult mouse ventricular myocytes. *Journal of Physiology* 2004 September 15;559(3):777-98.
- (30) Lizotte E, Tremblay A, Allen BG, Fiset C. Isolation and characterization of subcellular protein fractions from mouse heart. *Analytical Biochemistry* 2005 August 23;345(1):47-54.
- (31) Grandy SA, Trepanier-Boulay V, Fiset C. Postnatal Development has a Marked Effect on Ventricular Repolarization in Mice. *AJP - Heart and Circulatory Physiology* 2007 August 3;293(4):H2168-H2177.
- (32) Rivard K, Paradis P, Nemer M, Fiset C. Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor causes delayed repolarization. *Cardiovasc Res* 2008;78(1):53-62.
- (33) Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJC, Lin JLC, Hoshijima M, Nguyen-Tran VTB, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross JJr, Giles WR, Chien KR. A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KCHIP2) gene leads to a complete loss of I_{to} and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 2001;107:801-13.
- (34) Song M, Helguera G, Eghbali M, Zhu N, Zarei MM, Olcese R, Toro L, Stefani E. Remodeling of Kv4.3 potassium channel gene expression under the control of sex hormones. *J Biol Chem* 2001 August 24;276(34):31883-90.
- (35) Wickenden AD, Kaprielian R, You XM, Backx PH. The thyroid hormone analog DITPA restores I_{to} in rats after myocardial infarction. *American Journal of Physiology* 2000;278:H1105-H1116.

- (36) Jankowski M, Wang D, Mukaddam-Daher S, Gutkowska J. Pregnancy alters nitric oxide synthase and natriuretic peptide systems in the rat left ventricle. *J Endocrinol* 2005 January;184(1):209-17.
- (37) Ropero AB, Eghbali M, Minosyan TY, Tang G, Toro L, Stefani E. Heart estrogen receptor alpha: distinct membrane and nuclear distribution patterns and regulation by estrogen. *J Mol Cell Cardiol* 2006 September;41(3):496-510.
- (38) Rivard K, Trépanier-Boulay V, Rindt H, Fiset C. Electrical remodeling in a transgenic mouse model of α 1B-adrenergic receptor overexpression. *AJP - Heart and Circulatory Physiology* 2009 March 1;296(3):H704-H718.

4.2.7 Figures/ Figures Legends

Figure 1. Effect of ovariectomy on I_{peak}

A. Superimposed current records illustrating I_{peak} under control conditions (Control) and in ovariectomized mice (Ovx) in ventricular myocytes. **B.** Mean current–voltage (I–V) relationships for I_{peak} in Control and Ovx ventricular myocytes. **C.** Bar graphs comparing the density of all K^+ current density in mice between the two groups. (* $P < 0.05$ compared to controls).

Figure 1. Effect of ovariectomy on I_{peak}

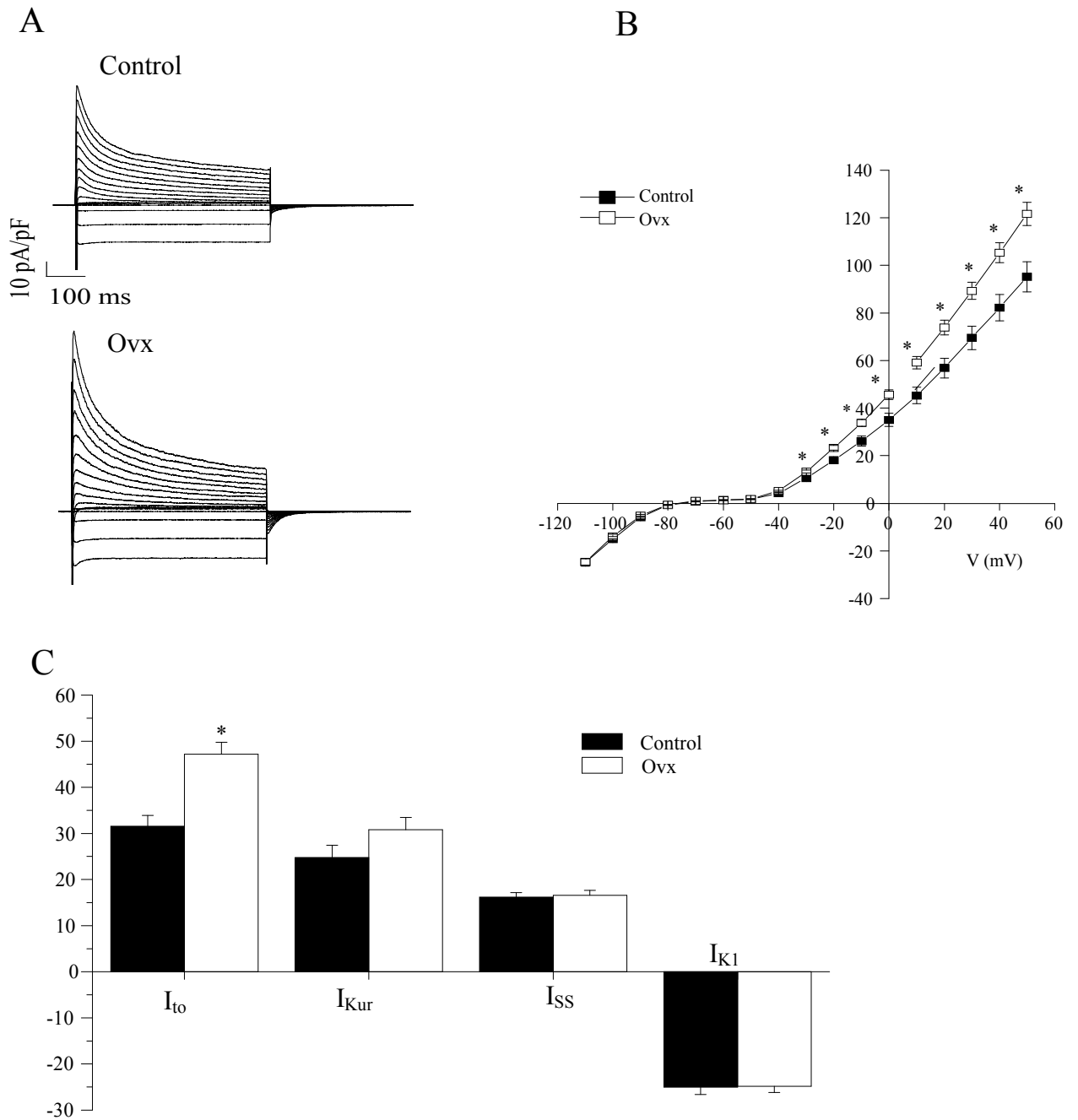


Figure 2. Effect of ovariectomy on I_{to}

A. Superimposed current records illustrating I_{to} from Control and Ovx mice ventricular myocytes. Current recordings were obtained by subtracting the corresponding current traces recorded with and without the inactivating prepulse. **B.** Mean I–V relationships for I_{to} in Control and Ovxventricular myocytes. (* $P < 0.05$ compared to controls).

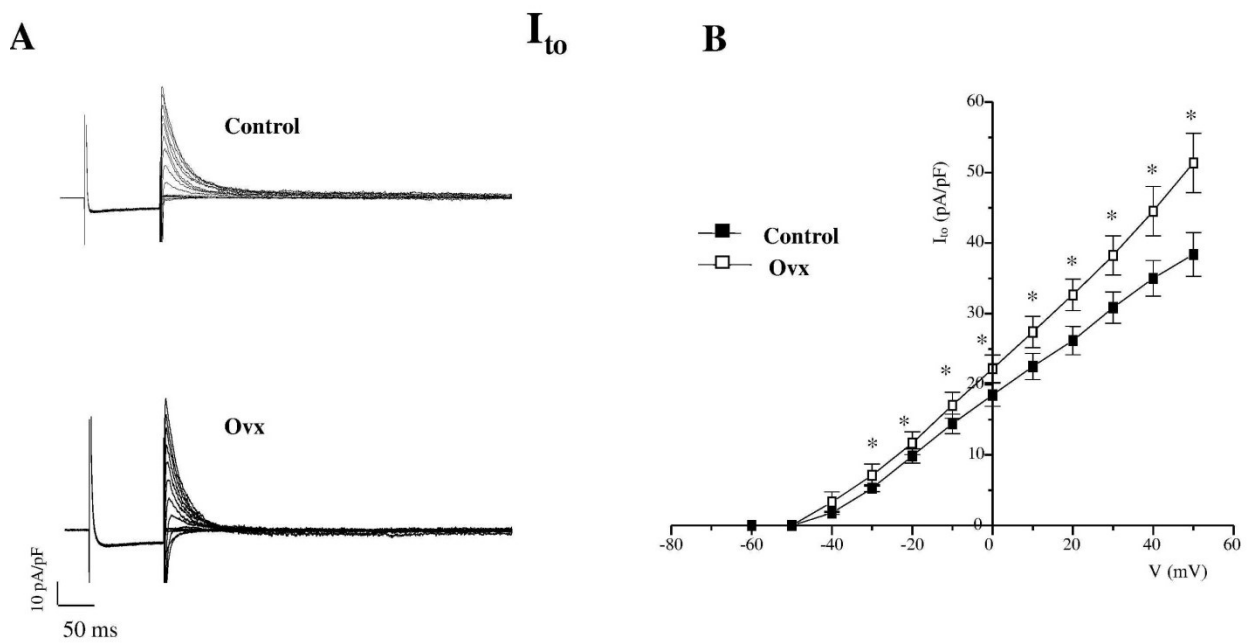
Figure 2. Effect of ovariectomy on I_{to} 

Figure 3. Effect of ovariectomy on I_{Kur} and I_{ss}

A-B. The ultrapid delayed rectifier K^+ current (I_{Kur}) is similar between control and Ovx groups. I_{Kur} was obtained by subtracting currents recorded in the presence of 100 μ M 4-AP from currents recorded in the absence of 4-AP. **A:** representative I_{Kur} recordings from control and Ovx ventricular myocytes. **B:** mean I-V curves show that I_{Kur} was similar between the two groups. (* $p < 0.05$). **C-D. Steady-state outward K^+ current (I_{ss}) in mouse ventricular myocytes is significantly increased with tamoxifen treatment.** **A:** Representative I_{ss} traces from myocytes from control and Ovx mice. **B:** Mean I-V relationships showing that I_{ss} density is similar between control and Ovx mice. The mean data also shows that I_{K1} was also comparable between groups. (* $p < 0.05$).

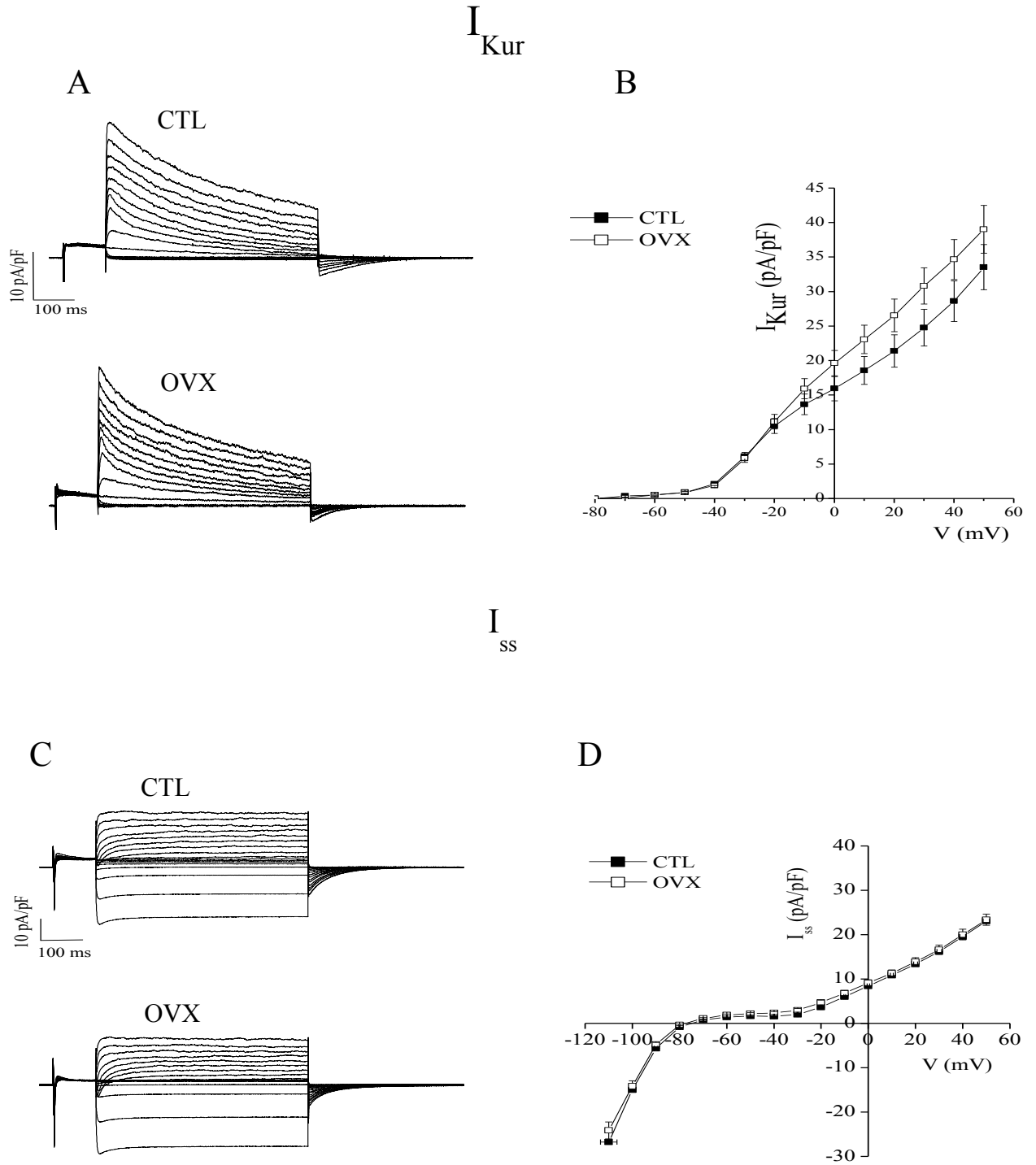
Figure 3. Effect of ovariectomy on I_{Kur} and I_{ss} 

Figure 4. Ventricular protein expression of K⁺ channels in Control and Ovx mice.

A: Examples of Western blots of Kv4.2, Kv4.3 and KChIP2b on sarcolemmal-enriched proteins (100 µg/lane) isolated from control and ovariectomized mice. **B:** Bar graphs comparing the relative protein expression of the different K⁺ channel isoforms between the two groups show that protein expression of Kv4.3 is markedly increased after ovariectomy. Relative abundance was calculated with value for control mice as a reference of 1 (*p<0.05 versus Control; n=3/group; 2 hearts/sample).

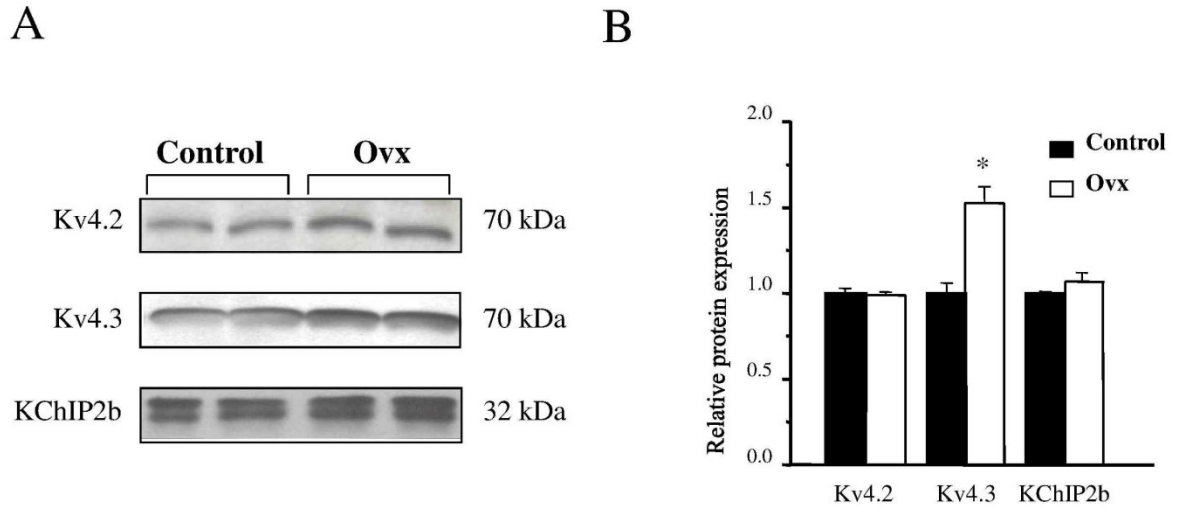
Figure 4. Ventricular protein expression of K⁺ channels in Control and Ovx mice

Figure 5. Effects of ovariectomy on mRNA expression of K⁺ channels

Ventricular mRNA expression of K⁺ channels in Control and Ovx mice. Bar graphs comparing the abundance of Kv4.2, Kv4.3 and KChIP2b mRNA transcripts in control and Ovx mice determined by quantitative real-time PCR. For each channel, Control and Ovx cDNA samples were amplified simultaneously. Data represent mean values of 3 Control and Ovx samples. Each sample was analyzed in triplicate (*P<0.05 compared to controls).

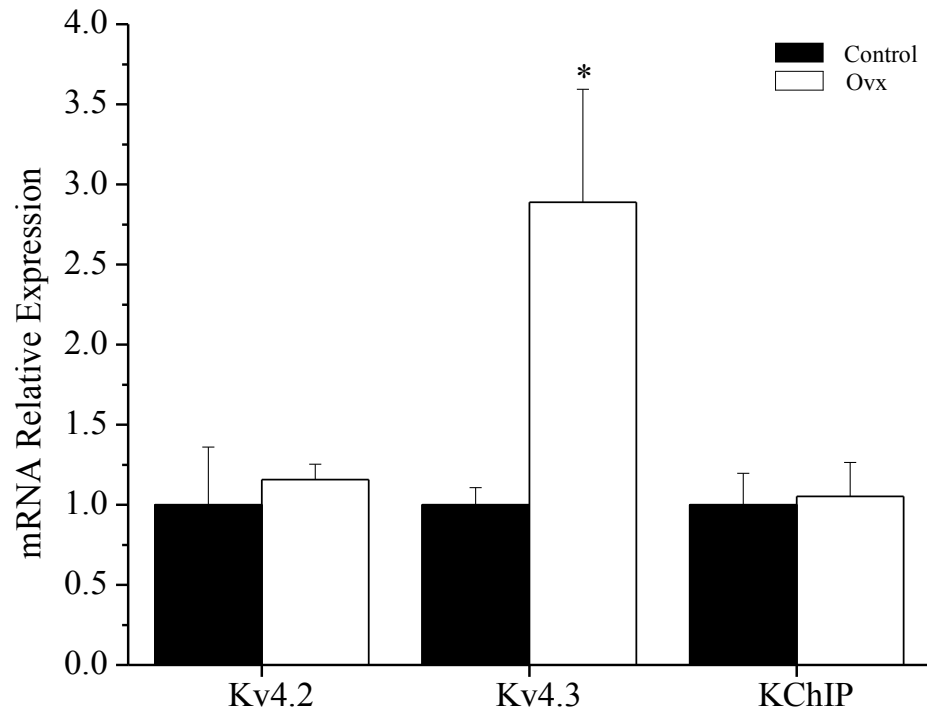
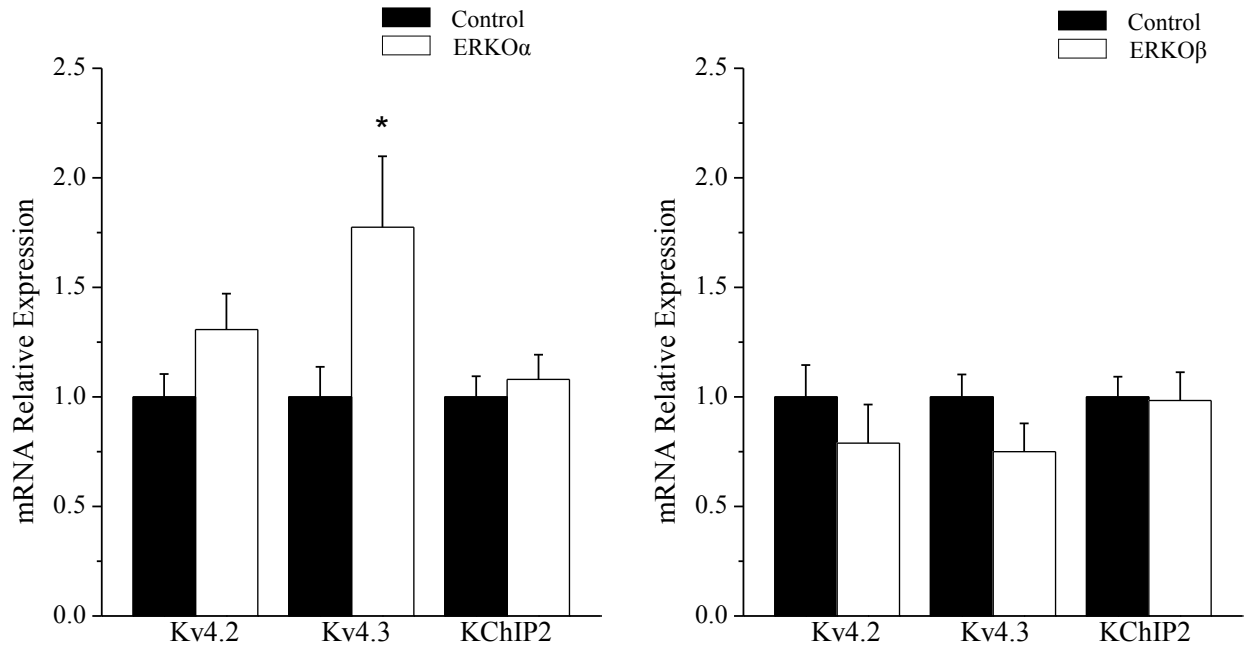
Figure 5. Effects of ovariectomy on mRNA expression of K⁺ channels

Figure 6. A. Ventricular mRNA expression of K⁺ channels in control and ERK α mice. Bar graphs comparing the abundance of Kv4.2, Kv4.3 and KChIP2b mRNA transcripts in control and ERK α mice determined by quantitative real-time PCR. (*P<0.05 compared to controls). **B. Ventricular mRNA expression of K⁺ channels in control and ERK β mice.** Bar graphs comparing the abundance of Kv4.2, Kv4.3 and KChIP2b mRNA transcripts in control and ERK β mice determined by quantitative real-time PCR. (*P<0.05 compared to controls).

Figure 6. A. Ventricular mRNA expression of K^+ channels in control and ERKO α mice. B. Ventricular mRNA expression of K^+ channels in control and ERKO β mice.



Chapitre 5 Modifications des paramètres électrocardiographiques chez la souris gestante

5.1 Avant-Propos

5.1.1 Introduction

Dans notre dernière étude, la grossesse était notre modèle d'intérêt mais cette fois-ci afin d'étudier l'effet des œstrogènes sur le rythme cardiaque et non pas sur la repolarisation. Des études précédentes ont montré une augmentation du rythme cardiaque de base chez les femmes comparativement aux hommes et son accélération chez les femmes enceintes. De plus, une autre étude montrait que les œstrogènes sont associés à un rythme cardiaque plus élevé et une conduction auriculo-ventriculaire plus courte chez la souris. Toutes ces observations nous ont suggérées que les hormones sexuelles peuvent jouer un rôle dans l'automaticité cardiaque et nous ont poussées à étudier ce modèle. L'augmentation du rythme cardiaque qui pourrait s'expliquer par des variations du système nerveux autonome et/ou de l'automatisme cardiaque a été l'objet de ce dernier chapitre. Ainsi les objectifs de cette étude étaient (1) de comparer le rythme cardiaque de souris non-gestantes, de souris gestantes et de souris en post-partum afin de vérifier si la souris est un bon modèle pour étudier l'influence de la gestation sur l'activité électrique cardiaque et (2) de déterminer si le système nerveux autonome contribue à l'augmentation du rythme cardiaque observée lors de la gestation. Les résultats de cette étude ont été présentés dans plusieurs congrès et ils sont présentés dans ce chapitre.

5.1.2 Contribution des auteurs

Gracia El Gebeily: Expériences, analyse, rédaction.

Dr. Céline Fiset : Conceptualisation du projet, supervision, rédaction finale

5.2 Article

Pregnancy-Related Differences in ECG Parameters in Mice

Gracia El Gebeily,^{1,2} and Céline Fiset^{1,2†}

¹ Research Center, Montreal Heart Institute

5000 Bélanger, Montréal, Québec, Canada, H1T 1C8

² Faculty of Pharmacy, Université de Montréal

Montréal, Québec, Canada

Running title: Increased Heart Rate of Pregnancy is Intrinsic to the Heart

5.2.1 Résumé / Abstract

5.2.1.1 Résumé

Une augmentation significative de la fréquence cardiaque (FC) au repos a été rapportée chez les femmes enceintes rendant les arythmies cardiaques plus susceptibles de se produire. Cependant, le mécanisme de cette accélération de la FC n'est pas encore compris. Pour clarifier cette observation, nous avons étudié l'effet de la grossesse sur les différents paramètres de l'électrocardiogramme (ECG) en conditions contrôles et en absence du système nerveux autonome. Des ECG de surface obtenus en conditions témoins ont montré que les souris gestantes (G) présentaient un rythme cardiaque plus rapide (531 ± 14 bpm, $n=15$) que les souris non gestantes (NG) (470 ± 27 bpm, $n=10$) et les souris en post-partum (PP) (477 ± 16 bpm, $n=6$) ($p < 0.05$). Cette augmentation de la FC est accompagnée d'une réduction de l'intervalle PR (NG: 43.5 ± 1.6 ms; G: 34.8 ± 0.7 ms; PP: 38.5 ± 2.7 ms; $p < 0.05$). De plus, les résultats obtenus en ECG en mode Langendorff ont montré que la FC est toujours plus rapide chez les souris G (385 ± 18 bpm, $n=11$) comparativement aux souris NG (327 ± 16 bpm, $n=10$) et aux souris en PP (291 ± 27 bpm, $n=6$) ($p < 0.05$). Les ECG de surface enregistrés en présence de l'isoprotérénol et du propranolol révèlent que la réponse à la modulation β -adrénergique est restée inchangée pendant la grossesse. Par contre, la sensibilité à la stimulation parasympathique est renforcée, comme indiquée par les effets plus prononcés de la réponse au carbachol et plus réduite à celle de l'atropine. En conclusion, une accélération de la FC et une réduction de PR sont associées à la grossesse chez la souris. Ces différences étant toujours présentes en absence du système nerveux autonome, suggèrent un mécanisme intrinsèque au cœur responsable de ces différences. En outre, bien que la réponse à la stimulation β -adrénergique soit inchangée, la sensibilité à la stimulation parasympathique est augmentée pendant la grossesse.

Mots clés: Grossesse, fréquence cardiaque, ECG, système nerveux autonome, souris.

5.2.1.2 Abstract

There is a significant increase in resting heart rate (HR) during pregnancy which makes cardiac arrhythmias more likely to occur. However, the mechanism for this faster HR is not understood. We investigated the effect of pregnancy on electrocardiographic (ECG) parameters in mice under control conditions and in absence of the autonomic nervous tone. Surface ECG recorded from anesthetized non-pregnant (NP) pregnant (P) and postpartum (PP) mice show that the HR was significantly faster in P (531 ± 14 bpm, $n=15$) compared to NP (470 ± 27 bpm, $n=10$) and PP (477 ± 16 bpm, $n=6$) mice ($p < 0.05$). The elevated heart rate of P mice was accompanied by a shorter PR interval (NP: 43.5 ± 1.6 ms; P: 34.8 ± 0.7 ms; PP: 38.5 ± 2.7 ms; $p < 0.05$). In addition, in Langendorff-perfused heart, the HR remained faster in P (385 ± 18 bpm, $n=11$) than in NP (327 ± 16 bpm, $n=10$) and PP (291 ± 27 bpm, $n=6$) ($p < 0.05$) mice. Surface ECGs recorded in presence of isoproterenol and propranolol reveal that the response to β -adrenergic modulation was unchanged during pregnancy. However, the sensitivity to parasympathetic stimulation was enhanced as indicated by the more pronounced effects of carbachol and reduced response to atropine. In summary, faster HR and shorter PR intervals are associated with pregnancy in mice. These differences are preserved in absence of autonomic input, suggesting a mechanism intrinsic to the heart. Furthermore, although the response to β -adrenergic modulation is unchanged, the sensitivity to parasympathetic stimulation is increased during pregnancy.

Keywords: Pregnancy, Heart rate, ECG, autonomic nervous tone, mouse.

5.2.2 Introduction

Pregnancy is associated with an increased incidence of arrhythmias which may have significant consequence for the mother and the fetus. The risk of both the exacerbation and new onset of supraventricular tachycardia has been reported during pregnancy (3; 16; 18; 42-44). Furthermore, it is well recognized that the resting heart rate is increased during pregnancy. Since increased resting heart rate is a risk factor for the development of cardiac arrhythmias, it is important to understand how pregnancy alters heart rate.

The heart rate originates in the sinoatrial node which is responsible for the automaticity of the heart (22). The increase in resting heart rate during pregnancy suggests an influence of pregnancy on the cardiac autonomic stimulation and/or the automaticity of the heart. Adaptation of the maternal heart in pregnancy involves a variety of important changes in the hormonal, hemodynamic and autonomic state in women (16; 18; 37-39; 42). For instance, there are significant elevations in circulating levels of estrogen, progesterone and other hormones during pregnancy which could modulate the heart rate and excitability of the heart (12; 17; 35; 36). Pregnancy is also characterized by changes in cardiac autonomic modulation which plays a central role in the adaptation of the cardiovascular system to various hemodynamic changes required for a normal pregnancy (13; 37; 38; 40). The heart is innervated by both the sympathetic and parasympathetic divisions of the autonomic nervous system. Stimulation of the sympathetic nerve fibers results in the release of norepinephrine which increases the rate of discharge of the sinoatrial node as well as the atrio-ventricular (AV) node conduction, which is reflected on the ECG by a faster heart rate and shorter PR interval, respectively. In contrast, parasympathetic stimulation by means of the vagus nerve releases acetylcholine and slows the pacemaker activity of the SA node as well as the conduction through the AV node (29).

Because pregnancy is associated with an increase in heart rate which is a risk factor of developing cardiac arrhythmias and because the autonomic nervous system regulates the heart rate, we realized this study (1) to determine whether pregnant mice exhibit an increased heart rate similar to what is seen during pregnancy in women, and (2) to determine whether heart rate is influenced by the autonomic nervous system differently during pregnancy. Accordingly, we first obtained surface ECG recordings on anaesthetized

mice to compare heart rate between non-pregnant (NP), pregnant (P) and postpartum (PP) mice. In addition, once we established that pregnant mice exhibit an increased heart rate, we then examined the influence of autonomic nervous system on heart rate using epicardial ECG recording in Langendorff-perfused NP, P and PP mouse hearts. To gain further insight into the autonomic modulation of the heart rate during pregnancy, we also determined the *in vivo* effects of β -adrenergic and parasympathetic agonists and antagonists on surface ECG parameters.

5.2.3 Methods

Animals. All experiments were performed on adult female CD1 mice (2-3 months old) obtained from Charles River (St Constant, Qc, Can). The mice were divided in 3 groups: non-pregnant (NP), late pregnancy (P: 18-19 gestation days) and postpartum (PP: 1-2 days after delivery) mice. All experiments were performed in accordance to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Experiments were also approved by the Montreal Heart Institute animal care committee (approval reference number 2009-8002).

Surface electrocardiograms (ECG). Mice were anaesthetized with isoflurane. Body temperature was maintained at 37°C using a heating pad. Platinum electrodes positioned subcutaneously were connected to a Biopac System MP100 (EMKA Technologies, France). Surface ECGs were recorded in lead I configuration at a rate of 2 kHz and performed on 5 minutes of continuous experimental recording after the end of the baseline period. The signal was filtered at 100 Hz (low pass) and 60 kHz (notch filter). Data were analyzed using ECG auto 1.7 (EMKA Technologies). RR, PR, QT intervals and P wave duration were calculated manually by a blinded observer from signal averaged ECG recordings (on 500-1000 cardiac cycles). The QTc interval was calculated using a modified Bazett's correction formula, $QTc = QT/(RR/100)^{1/2}$ (25).

Langendorff-perfused heart. Experiments were performed as previously described (5). Mice were heparinized (1 U/kg; IP) 20 minutes prior to sacrifice. They were then anesthetized with isoflurane and sacrificed by cervical dislocation. The heart was rapidly

excised and hung on a modified Langendorff apparatus and retrogradely perfused through the aorta at a constant perfusion rate of 2 ml/min with the Tyrodes solution containing (in mM): 130 NaCl; 5.4 KCl; 1 CaCl₂; 1 MgCl₂; 0.33 Na₂HPO₄; 10 HEPES, 5.5 glucose (pH adjusted to 7.4 with NaOH). The temperature of the perfusion solution was maintained at 37±1°C and equilibrated with 100% O₂. Epicardial ECG recording was obtained by placing one silver electrode at the base of the heart under the right atrium and another in the apex of the left ventricle. After an equilibration perfusion period, epicardial ECG measurements were recorded and RR, PR, QT, QTc intervals and P wave duration were calculated as above.

Pharmacological treatments. Additional surface ECG recordings were obtained on anesthetized mice before and after injection of agonists and antagonists of the sympathetic and parasympathetic nervous system. Specifically, the effects of the β- adrenergic agonist (isoproterenol, 100 nM) and antagonist (propranolol, 250 mM) as well as those of the parasympathetic agonist (carbachol, 10 mM) and antagonist (atropine, 125 mM) were examined. These drugs were administered by intravenous (IV) injection through the right jugular vein after an equilibration perfusion period with Tyrodes solution and the maximal effect occurred within 1-2 minutes. ECG parameters were then measured as described above. The drugs were all purchased from Sigma. Isoproterenol, carbachol and atropine were prepared in water whereas propranolol was dissolved in ethanol. Stock solutions of all drugs were then diluted in Tyrodes solution to achieve their respective final concentration.

Statistical analysis. All data are presented as mean ± SEM. Descriptive statistics were used either to compare between both ECG recording methods or to compare the response to β- adrenergic and parasympathetic receptor modulation. The comparison of surface ECG and Langendorff-perfused heart parameters between NP, P and PP mice were performed using Kruskal-Wallis Test. Mann-Whitney Test was used for comparison between two groups (i.e. P vs NP; P vs PP; and NP vs PP) and for comparison between P and NP mice after each pharmacological manipulation. Wilcoxon Signed Ranks test was used to compare the same group before and after each pharmacological manipulation. $P < 0.05$ was considered significantly different.

5.2.4 Results

Surface ECG parameters. To determine whether pregnancy in mice is associated with an increased in heart rate, lead I surface ECG data were obtained from 10 non-pregnant (NP), 15 pregnant (P) and 6 postpartum (PP) anesthetized female mice under baseline conditions. Note that the presence of pregnancy precluded the use of a telemetry system to monitor ECG since the insertion of the radiofrequency transmitter would not be possible in the peritoneal cavity of a pregnant mouse. Electrocardiographic parameters were compared between the three groups of mice with representative example for non pregnant and pregnant mice illustrated in Panel A of Figure 1. For each group, mean data for the heart rate (HR), PR interval (i.e. time interval between atrial and ventricular depolarization) and QT interval corrected for the heart rate (QTc), (i.e. ventricular repolarization) are summarized in Figure 1B. Pregnant mice exhibit a significantly higher resting heart rate compared to non-pregnant and postpartum mice (NP: 470 ± 27 bpm; P: 531 ± 14 bpm; PP: 477 ± 16 bpm; $p < 0.05$ P vs NP and PP). The PR interval was also significantly shorter in pregnant mice (NP: 43.5 ± 1.6 ms; P: 34.8 ± 0.7 ms; PP: 38.5 ± 2.7 ms; $p < 0.05$ P vs NP and PP) without any change in P wave duration (data not shown). Moreover, both the QT (data not shown) and QTc (NP: 48.5 ± 3.9 ms, $n=10$; P: 43.2 ± 1.6 ms, $n=15$; PP: 46.9 ± 2.0 ms, $n=6$; $p < 0.05$; P vs NP and PP) intervals were similar between the three groups. Furthermore, results obtained with the postpartum mice show that the changes in heart rate and PR interval associated with pregnancy were already back to non-pregnant values 1 to 2 days after delivery.

Langendorff-perfused heart. In the Langendorff or isolated perfused heart preparation, the heart is removed from the animal's body and then perfused in a reverse fashion via the aorta, usually with Krebs solution. The backwards pressure causes the aortic valve to shut, forcing the solution into the coronary vessels. This feeds nutrients and oxygen to the cardiac muscle, allowing it to continue beating after its removal from the animal. The Langendorff assay is an *in vitro* technique used in pharmacological and physiological research using animals. It allows the examination of heart rate and other parameters without the complications of an intact animal.

These next series of experiments were performed to explore the contribution of the autonomic nervous tone on the pregnancy-related differences observed in heart rate and PR intervals in the surface ECG experiments. Epicardial ECGs were recorded on Langendorff-perfused hearts isolated from non-pregnant, pregnant and postpartum mice. Panel A of Figure 2 presents typical examples of ECG traces recorded in non-pregnant and pregnant mice. Bar graphs reported on Figure 2B show the mean HR, PR and QTc intervals data obtained from all the hearts isolated from the three groups of mice. Similar to what was seen in the surface ECG experiments, in the Langendorff studies the heart rate was also significantly faster in pregnant mice compared to non pregnant and postpartum mice (NP: 327 ± 16 bpm, P: 377 ± 21 bpm, PP: 291 ± 27 bpm; $p < 0.05$ P vs NP and PP). The heart rate measured in the Langendorff-perfused heart preparation reflects the intrinsic heart rate and is significantly slower than that obtained with surface ECGs. This slower heart rate is explained by the absence of sympathetic stimulation which is known to positively control the heart rate (19). Akin to the results obtained with the surface ECGs, the PR interval was also significantly shorter in pregnant mice compared to the other groups (NP: 44.3 ± 1.8 ms; P: 38.3 ± 2.3 ms; PP: 42.2 ± 0.9 bpm, $p < 0.05$ P vs NP and PP). The faster AV conduction time measured was independent of atrial conduction since the P wave duration was unaltered in these animals (data not shown). There was no difference in the QT (not shown) and QTc intervals between NP, P and PP mice (NP: 71.5 ± 4.5 ms; P: 62.4 ± 4.3 ms; PP: 65.3 ± 7.2 ms; $p < 0.05$ P vs NP and PP). Thus, results obtained in these Langendorff experiments strongly suggest that the differences in heart rate and PR interval seen in pregnant mice are not due to alterations in the autonomic tone.

Pharmacological manipulation of the autonomic nervous system. In the last series of experiments we compared heart rate and PR intervals of non-pregnant and pregnant mice following the administration of agonists and antagonists of the autonomic nervous system to determine whether the sensitivity of the heart to autonomic stimulation would be altered during pregnancy.

Response to β -adrenergic receptor modulation. To explore the effect of pregnancy on the response to β -adrenergic receptor stimulation, surface ECGs were recorded on anesthetized

non-pregnant and pregnant mice before and after IV injection of isoproterenol. As shown in Figure 3A, isoproterenol significantly accelerated the heart rate in both non-pregnant and pregnant mice. Moreover, data presented in Panel 3B indicate that the increase in the heart rate induced by the β -adrenergic stimulation was similar between non-pregnant and pregnant mice even though the heart rate was significantly higher in pregnant mice under baseline conditions. Furthermore, the reduction of the heart rate produced by the administration of the β -adrenergic antagonist, propranolol was also similar between non-pregnant and pregnant mice (Figure 4A). As illustrated in Panels C-D of Figures 3 and 4, the response of the PR interval to isoproterenol and propranolol was also comparable between non-pregnant and pregnant mice again despite the shorter PR interval observed under baseline conditions in P mice. Altogether these results suggest that pregnancy did not affect the response of the cardiac conduction system to β -adrenergic modulation.

Response to parasympathetic receptor modulation. We then evaluated the impact of pregnancy on the response of the heart to muscarinic stimulation. Figure 5A shows that application of the muscarinic agonist carbachol significantly slowed the heart rate in both non-pregnant and pregnant mice. In addition, the response to carbachol was significantly larger in pregnant mice as illustrated in Figure 5B. However, Figures 5C-D indicates that there was no effect of carbachol on the PR interval of both non-pregnant and pregnant mice.

We then compared the effect of parasympathetic blockade (atropine) on surface ECG parameters in non-pregnant and pregnant mice. Although application of atropine significantly increased the heart rate of non-pregnant mice, pharmacological inhibition of the vagal tone was without any effect on pregnant mice as illustrated in Figures 6A-B. The atropine response of the PR interval was also reduced in pregnant mice compared to the non-pregnant response (Figures 6C-D). Overall, results these results suggest that pregnant mice are more sensitive to parasympathetic stimulation than control mice.

5.2.5 Discussion

Summary of main findings

In humans, pregnancy is associated with various types of arrhythmias and an increased resting heart rate, which is a risk factor for arrhythmias (1; 6; 16). Thus, the primary objective of this study was to determine whether pregnancy elicits a change in the heart rate in mice. Surface ECG recordings obtained in adult female mice revealed that pregnancy accelerates the resting heart rate and the AV node conduction time. Results obtained with Langendorff-perfused heart clearly showed that these differences persist in absence of autonomic nervous system input. These results suggest that these differences could reflect pregnancy-related changes in the cardiac conduction system rather than a change in autonomic tone. Moreover, pharmacological manipulations of the autonomic nervous system show that pregnancy is associated with an enhanced sensitivity to parasympathetic stimulation whereas the response to β -adrenergic modulation is not altered. Hormonal changes (increase in female sex hormones) that occur during pregnancy are likely to be involved in these adaptations of the heart to pregnancy.

Relation to human studies

There is an increase in resting heart rate of approximately 10-15 beats /min during pregnancy in women (1; 16; 30; 37; 38; 40). In this study, the extent to which the heart rate was increased during pregnancy in mice was similar to what has been reported in pregnant women. In addition, the faster heart rate of pregnant mice was accompanied by a shorter PR interval. Clinical studies have reported that woman ECGs do not display differences in the P wave duration during pregnancy, indicating that atrial conduction is unchanged (1). Results presented here are consistent with these clinical reports. Indeed, as mentioned earlier the P wave duration was not different between the three groups of mice, suggesting that the shorter PR interval of pregnant mice was due to an effect of pregnancy on the AV node conduction rather than on the atrial conduction time. In addition, no evidence for QT interval differences has been found in women during pregnancy (1). Again, the comparable QTc intervals between non-pregnant, pregnant and postpartum mice reported here suggest

that the processes underlying ventricular repolarization are not altered during pregnancy in mice similar to what is observed in human. In the present study we also examined surface ECG parameters in pregnant mice at gestation day (gd) 12-13 to determine whether the increased heart rate observed in late pregnancy was present at an earlier stage of gestation in mice. Interestingly, the heart rate was increased to a similar extent whether the mice were studied at gd 12-13 (530 ± 12 bpm, $n=9$) or at gd 18-19 (531 ± 14 bpm, $n=15$). These findings are consistent with the human reports which showed that the change in the resting heart rate begins in early pregnancy (1; 9; 14; 18; 37; 38).

Changes are reversible upon delivery

Of note, in our study, the heart rate was significantly higher in pregnant mice compared, not only to non-pregnant mice, but also to postpartum mice. In fact, it is quite interesting to see that the changes in ECG parameters were fully reversible upon delivery but also that this postpartum resolution occurred very rapidly. Indeed, the postpartum animals were studied 1 to 2 days after delivery, which is a very short period of time for the ECG parameters to return to control values and yet the results reported here clearly indicate that this time period was sufficient to reverse the effect of pregnancy on the heart rate and PR interval. The same phenomenon is also observed in humans where the heart rate has been reported to return to the pre-pregnant values within two weeks after delivery (18; 34).

ECG differences preserved in absence of autonomic input

Pregnancy is characterized by changes in cardiac autonomic modulation which plays a central role in the adaptation of the cardiovascular system to various hemodynamic changes required for a normal pregnancy. In this study we examined the impact of the autonomic tone by means of Langendorff-perfused heart preparations. Results obtained in these experiments reveal that in the absence of autonomic input the changes in the heart rate and PR interval were still present in pregnant mice, indicating that these pregnancy-related changes do not result from changes in the autonomic tone but rather reflect a change intrinsic to the heart. Similar explanation has also been proposed for the increased heart rate observed during pregnancy in women (4; 37). It is possible that the increased levels of several female hormones (e.g., estrogen, progesterone, relaxin) associated with pregnancy could affect the electrophysiological properties of the sinus node and conduction system

(17). In addition, in support of a change inherent to the heart, clinical studies has shown that women have a higher resting heart rate than men (2; 7; 20; 31; 32; 44), and that this difference is preserved after autonomic blockade (28). Furthermore, in mice estrogen has been associated with faster heart rate and shorter AV node conduction time (7). Thus, altogether these findings suggest that sex hormones may play major roles on the automaticity of the heart. In addition, sex-specific hormonal fluctuations in arrhythmias inducibility that correlated with gestation, menopause, and even changes in the menstrual cycles have been reported (8; 9; 27). Although the mechanisms of these differences are still unknown they may be related to hormonal effects (3; 31; 44).

Pharmacological manipulations of the autonomic nervous system

Results obtained in the Langendorff experiments and the pharmacological studies with β -adrenergic agonist and antagonist clearly indicate that the increased heart rate seen in pregnant mice is not due to an increased β -adrenergic stimulation or a higher sensitivity to β -adrenergic stimulation. On the other hand, data presented here suggest an increased sensitivity of the heart rate to muscarinic stimulation during pregnancy. The negative modulation of the heart rate by vagal stimulation may be more important during pregnancy in response to the elevated basal heart rate associated with pregnancy. While some studies have reported a sympathetic overactivity and a reduction in vagal parasympathetic tone during pregnancy (37), the hypothesis of a combined vagal activation and sympathetic withdrawal has also been suggested (15; 37). In fact, Speranza *et al.* reported that heart rate variability (HRV) decreases during pregnancy and that the Low-/High-Frequency peak (LF/HF) ratio of HRV decreases in pregnant women (37). Since the LF/HF ratio is considered as an index of sympathovagal balance (37), such a rearrangement of the autonomic tone during pregnancy would favor a vagal predominance (37). Results obtained in our pharmacological studies are consistent with the hypothesis of a relative vagal preponderance during pregnancy. Different human studies have also examined HRV and the sympathetic/parasympathetic balance (10; 28). Interestingly, the majority of these studies have reported that man have higher resting sympathetic response than females, suggesting a prevalence of vagal responsiveness in women. Furthermore, when compared

to control rats, ovariectomized animals showed enhanced sympathetic activation and attenuated baroreflex sensitivity whereas vagal tone and such differences were minimized by estrogen treatment (26; 33). These findings also support a role for the female hormones in modulating the sympathovagal balance in favor of a vagal predominance, which would agree with the increased sensitivity to the muscarinic stimulation observed in the pregnant mice. Surprisingly in both non-pregnant and pregnant mice the PR interval was unaffected by carbachol. It is possible that a larger dose of carbachol would be required to slow down the AV node conduction. However, in the present study this was not possible because *in vivo* administration of carbachol at higher concentrations elicited non cardiac effects including bronchial secretion and hypotension. The absence of effect of carbachol on PR interval at the dose used in the present study suggests a higher sensitivity of the SA node to muscarinic stimulation than that of the AV node. A more important parasympathetic innervation of the SA node could contribute to explain such a difference. However, to the best of our knowledge, such a difference between the SA and AV node is not known. Alternatively, it has been shown that the muscarinic modulation of the pacemaker activity of the SA node that occurs with low acetylcholine concentration involved the inhibition of the pacemaker current “ I_f ” whereas much higher concentrations are required to activate the acetylcholine-dependent K^+ current ($I_{K,ACh}$) (11; 41). Thus, the absence of carbachol effect on PR interval suggests that in the AV node the relative contribution of I_f and $I_{K,ACh}$ may be different from that of the SA node. Interestingly, it has been shown that I_f (23) and its underlying HCN channel isoforms are much more abundant in SA node than AV node (21; 24). Thus, those observations would be consistent with the higher responsiveness of the heart rate compared to that of the PR interval to carbachol.

Conclusion.

Faster heart rates combined with shorter PR intervals and increased sensitivity to parasympathetic stimulation is associated with pregnancy in mice. These differences were not abolished by the absence of autonomic system, indicating a mechanism intrinsic to the heart. The exact nature of these effects on the cardiac conduction system during pregnancy remains to be elucidated. With better understanding, management of arrhythmias that

correlate with female hormone fluctuations and/or pregnancy-induced arrhythmias could be improved.

Funding

This work was supported by operating grants to C.F. from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP-64344). C. Fiset was a Research Scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

Acknowledgements

The authors are thankful to M.A. Gillis for skilled technical assistance.

5.2.6 References

1. **Adamson DL and Nelson-Piercy C.** Managing palpitations and arrhythmias during pregnancy. *Heart* 93: 1630-1636, 2007.
2. **Bazett H.** An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart* 7: 353- 370, 1920.
3. **Bernal O and Moro C.** [Cardiac arrhythmias in women]. *Rev Esp Cardiol* 59: 609- 618, 2006.
4. **Bootsma M, Swenne CA, Van Bolhuis HH, Chang PC, Cats VM and Bruschke AV.** Heart rate and heart rate variability as indexes of sympathovagal balance. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 266: H1565- H1571, 1994.
5. **Brouillette J, Lupien MA, St Michel C and Fiset C.** Characterization of ventricular repolarization in male and female guinea pigs. *J Mol Cell Cardiol* 42: 357-366, 2007.
6. **Burkart T and Conti J.** Cardiac Arrhythmias During Pregnancy. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine* 12: 457-471, 2010.
7. **Burke JH, Goldberger JJ, Ehlert FA, Kruse JT, Parker MA and Kadish AH.** Gender differences in heart rate before and after autonomic blockade: Evidence against an intrinsic gender effect. *The American Journal of Medicine* 100: 537-543, 1996.
8. **Clapp JF, III.** Maternal heart rate in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 152: 659- 660, 1985.
9. **Clapp JF and Capeless E.** Cardiovascular Function Before, During, and After the First and Subsequent Pregnancies. *Am J Cardiol* 80: 1469-1473, 1997.
10. **Dart AM, Du XJ and Kingwell BA.** Gender, sex hormones and autonomic nervous control of the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 53: 678-687, 2002.
11. **DiFrancesco D, Ducouret P and Robinson RB.** Muscarinic modulation of cardiac rate at low acetylcholine concentrations. *Science* 243: 669-671, 1989.

12. **Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan TY, Ruan H, Wang Y, Toro L and Stefani E.** Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res* 96: 1208-1216, 2005.
13. **Eckholm EM and Erkkola RU.** Autonomic cardiovascular control in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 64: 29-36, 1996.
14. **Eckholm EM, Erkkola RU, Piha SJ, Jalonen JO, Metsala TH and Antila KJ.** Changes in autonomic cardiovascular control in mid-pregnancy. *Clin Physiol* 12: 527-536, 1992.
15. **Eneroth-Grimfors E, Westgren M, Ericson M, Ihrman-Sandahl C and Lindblad LE.** Autonomic cardiovascular control in normal and pre-eclamptic pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 73: 680-684, 1994.
16. **Gowda RM, Khan IA, Mehta NJ, Vasavada BC and Sacchi TJ.** Cardiac arrhythmias in pregnancy: clinical and therapeutic considerations. *Int J Cardiol* 88: 129-133, 2003.
17. **Han X, Habuchi Y and Giles WR.** Relaxin increases heart rate by modulating calcium current in cardiac pacemaker cells. *Circ Res* 74: 537-541, 1994.
18. **Hunter S and Robson SC.** Adaptation of the maternal heart in pregnancy. *British Heart Journal* 68: 540-543, 1992.
19. **Jones SA, Lancaster MK and Boyett MR.** Ageing-related changes of connexions and conduction within the sinoatrial node. *J Physiol* 560: 429-437, 2004.
20. **Larsen JA and Kadish AH.** Effects of gender on cardiac arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 9: 655-664, 1998.
21. **Liu J, Noble PJ, Xiao G, Abdelrahman M, Dobrzynski H, Boyett MR, Lei M and Noble D.** Role of pacemaking current in cardiac nodes: Insights from a comparative study of sinoatrial node and atrioventricular node. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 96: 294-304, 2001.
22. **Mangoni ME and Nargeot JI.** Genesis and Regulation of the Heart Automaticity. *Physiological Reviews* 88: 919-982, 2008.
23. **Marger L, Mesirca P, Alig J, Torrente A, Dubel S, Engeland B, Kanani S, Fontanaud P, Striessnig J, Shin HS, Isbrandt D, Emke H, Nargeot J and Mangoni ME.** Pacemaker activity and ionic currents in mouse atrioventricular node cells. *Channels (Austin)* 5: 2011.

24. **Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J, Lei M, Escande D and Demolombe S.** Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol* 562: 223-234, 2005.
25. **Mitchell GF, Jeron A and Koren G.** Measurement of heart rate and QT interval in the conscious mouse. *Am J Physiol* 274: H747-H751, 1998.
26. **Mohamed MK, El-Mas MM and Abdel-Rahman AA.** Estrogen enhancement of baroreflex sensitivity is centrally mediated. *Am J Physiol* 276: R1030-R1037, 1999.
27. **Myerburg RJ, Cox MM, Interian A, Jr., Mitrani R, Girgis I, Dylewski J and Castellanos A.** Cycling of inducibility of paroxysmal supraventricular tachycardia in women and its implications for timing of electrophysiologic procedures. *Am J Cardiol* 83: 1049-1054, 1999.
28. **Ng AV, Callister R, Johnson DG and Seals DR.** Age and gender influence muscle sympathetic nerve activity at rest in healthy humans. *Hypertension* 21: 498-503, 1993.
29. **Opthof T.** The normal range and determinants of the intrinsic heart rate in man. *Cardiovasc Res* 45: 177-184, 2000.
30. **Page RL.** Treatment of arrhythmias during pregnancy. *Am heart J* 130: 871-876, 1995.
31. **Peters RW and Gold MR.** The influence of gender on arrhythmias. *Cardiol Rev* 12: 97-105, 2004.
32. **Rautaharju PM, Zhou SH, Wong S, Calhoun HP, Berenson GS, Prineas R and Davignon A.** Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Can J Cardiol* 8: 690-695, 1992.
33. **Saleh TM and Connell BJ.** Centrally mediated effect of 17beta-estradiol on parasympathetic tone in male rats. *Am J Physiol* 276: R474-R481, 1999.
34. **San-Frutos L, Engels V, Zapardiel I, Perez-Medina T, Almagro-Martinez J, Fernandez R and Bajo-Arenas JM.** Hemodynamic changes during pregnancy and postpartum: a prospective study using thoracic electrical bioimpedance. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011.
35. **Schannwell CM, Zimmermann T, Schneppenheim M, Plehn G, Marx R and Strauer BE.** Left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in healthy pregnant women. *Cardiology* 97: 73-78, 2002.

36. **Song M, Helguera G, Eghbali M, Zhu N, Zarei MM, Olcese R, Toro L and Stefani E.** Remodeling of Kv4.3 potassium channel gene expression under the control of sex hormones. *J Biol Chem* 276: 31883-31890, 2001.
37. **Speranza G, Verlato G and Albiero A.** Autonomic changes during pregnancy: Assessment by spectral heart rate variability analysis. *J Electrocardiol* 31: 101-109, 1998.
38. **Stein PK, Hagley MT, Cole PL, Domitrovich PP, Kleiger RE and Rottman JN.** Changes in 24-hour heart rate variability during normal pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 180: 978-985, 1999.
39. **Thilen U and Olsson SB.** Pregnancy and heart disease: A review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 75: 43-50, 1997.
40. **Thornburg KL, Jacobson SL, Giraud GD and Morton MJ.** Hemodynamic changes in pregnancy. *Semin Perinatol* 24: 11-14, 2000.
41. **Vinogradova TM, Fedorov VV, Yuzyuk TN, Zaitsev AV and Rosenshtraukh LV.** Local cholinergic suppression of pacemaker activity in the rabbit sinoatrial node. *J Cardiovasc Pharmacol* 32: 413-424, 1998.
42. **Wolbrette D.** Treatment of arrhythmias during pregnancy. *Curr Womens Health Rep* 3: 135-139, 2003.
43. **Wolbrette D, Naccarelli G, Curtis A, Lehmann M and Kadish A.** Gender differences in arrhythmias. *Clin Cardiol* 25: 49-56, 2002.
44. **Wolbrette D and Patel H.** Arrhythmias and women. *Curr Opin Cardiol* 14: 36-43, 1999.

5.2.7 Figures / Figures legend

Figure 1 Surface ECGs on anesthetized mice reveal increased heart rate and shortening of PR interval during pregnancy. **A.** Typical examples of surface ECG traces from anaesthetized NP and P mice. As indicated, the PR interval was measured from the beginning of the P-wave to the beginning of the QRS complex. The QT interval begins at the onset of the QRS complex and ends at the endpoint of the T-wave. The RR interval represents the time between two consecutive R waves ($HR=60/RR$ in sec) **B.** Bar graphs comparing the HR, PR and QTc intervals between the 3 groups show that HR is markedly increased and PR interval significantly reduced in P mice while QTc is similar between the 3 groups. Data were pooled from NP (n=10), P (n=15) and PP (n=6) mice (* $p<0.05$ vs NP and PP).

Figure 1 Surface ECGs on anesthetized mice reveal increased heart rate and shortening of PR interval during pregnancy.

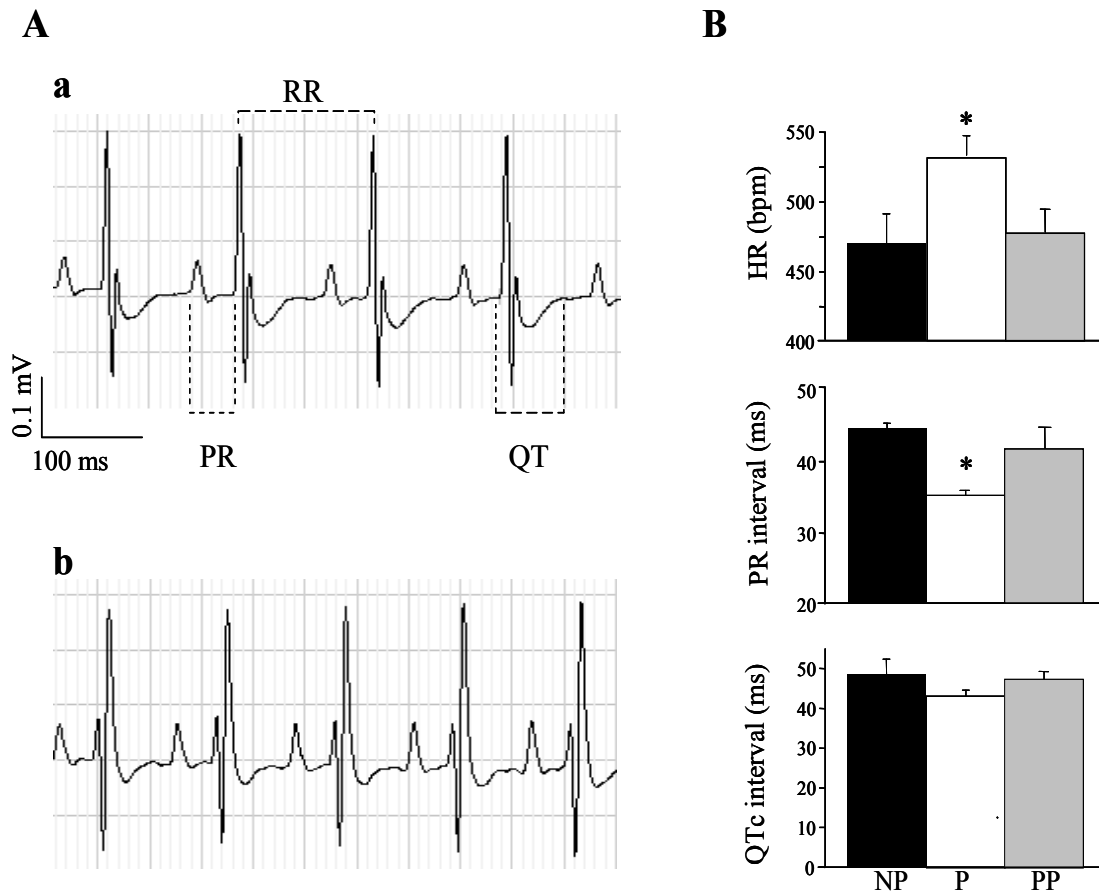


Figure 2 Pregnancy is associated with accelerated heart rate and reduced PR interval on Langendorff-perfused mouse hearts. A. Representative epicardial ECG recordings obtained using Langendorff-perfused hearts in NP and P mice. **B.** Bar graphs comparing mean HR, PR and QTc intervals in hearts from NP, P and PP mice reveal a faster HR and shorter PR interval in P mice. QTc intervals were similar between groups. Data were pooled from NP (n=10), P (n=11) and PP (n=6) mice (*p<0.05 vs NP and PP).

Figure 2 Pregnancy is associated with accelerated heart rate and reduced PR interval on Langendorff-perfused mouse hearts.

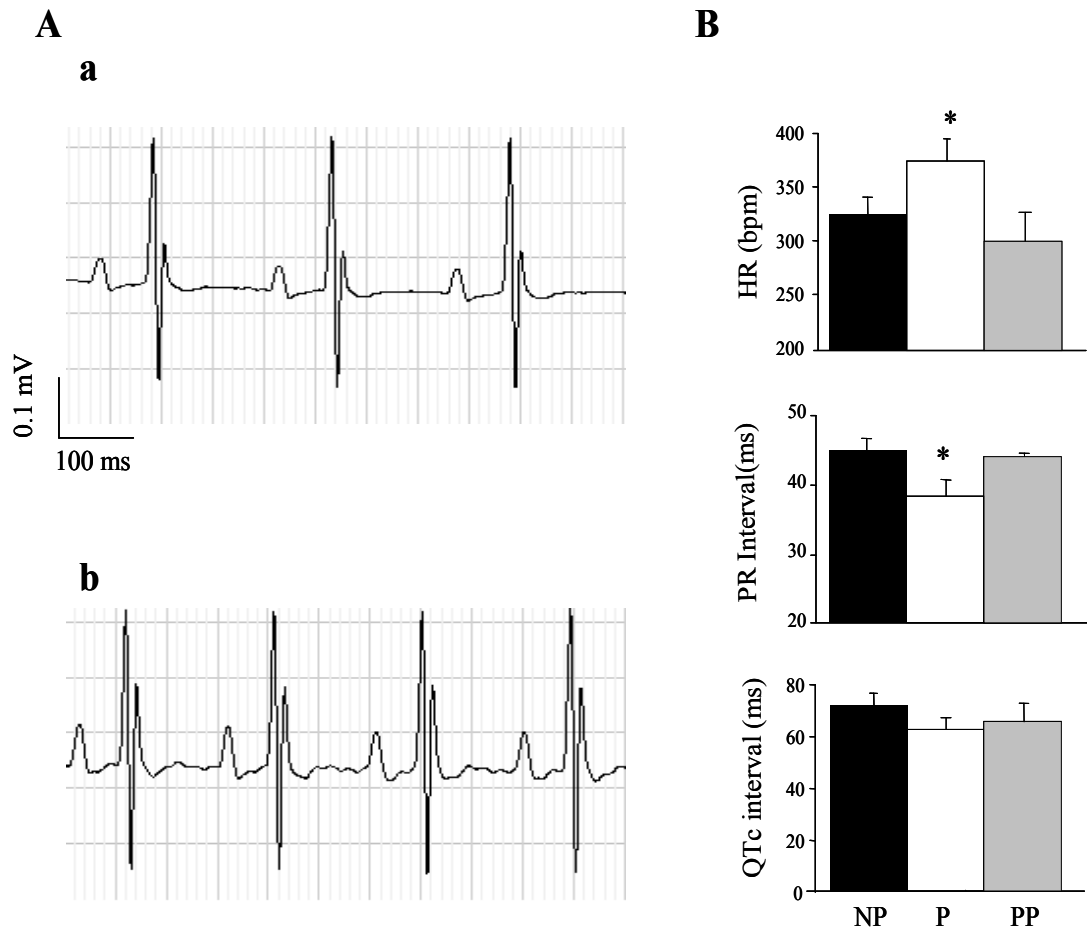


Figure 3. Effect of isoproterenol on heart rate and PR interval is not affected by pregnancy. **A-C.** Bar graphs presenting the mean data for HR and PR interval recorded on surface ECG traces of anesthetized NP and P mice before and after isoproterenol (Iso, 100nM). **B-D.** Bar graphs illustrating the difference between the HR and PR interval before and after Iso (Δ HR and Δ PR, respectively) in NP and P mice. The response to Iso was similar between NP and P mice. Data obtained from NP (n=6) and P (n=6) mice (*p<0.05 vs baseline conditions; †p<0.05 P vs NP).

Figure 3. Effect of isoproterenol on heart rate and PR interval is not affected by pregnancy.

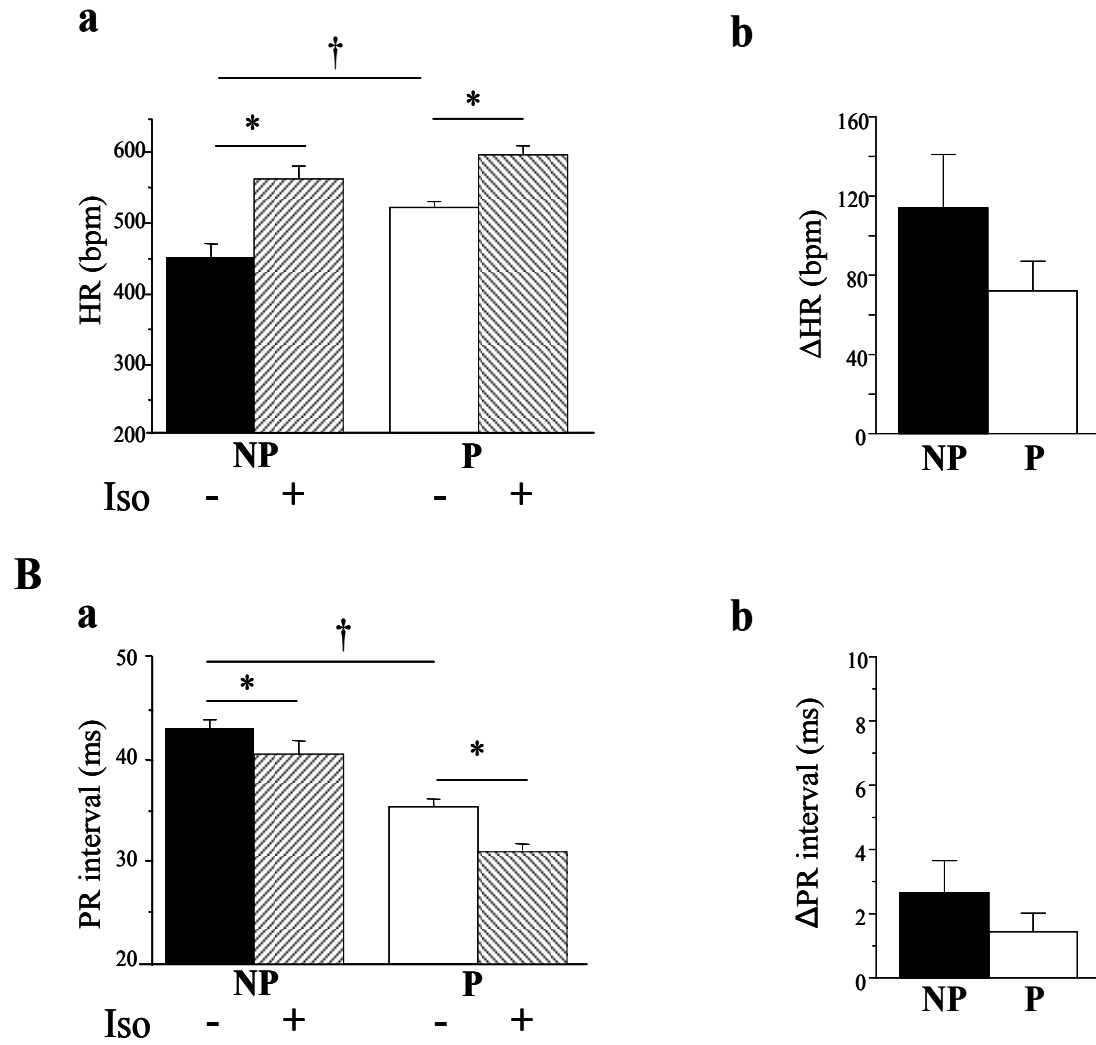


Figure 4. Effect of propranolol on heart rate and PR interval is not affected by pregnancy. **A-C.** Bar graphs presenting the mean data for HR and PR interval calculated from surface ECG traces of anesthetized NP and P mice before and after propranolol (Pro, 250mM). **B-D.** Bar graphs illustrating the difference between the HR and PR interval before and after Pro (Δ HR and Δ PR) in NP and P mice. The response to Pro was similar in both groups. Data obtained from NP (n=6) and P (n=5) mice. (*p<0.05 vs baseline conditions; †p<0.05 P vs NP).

Figure 4. Effect of propranolol on heart rate and PR interval is not affected by pregnancy.

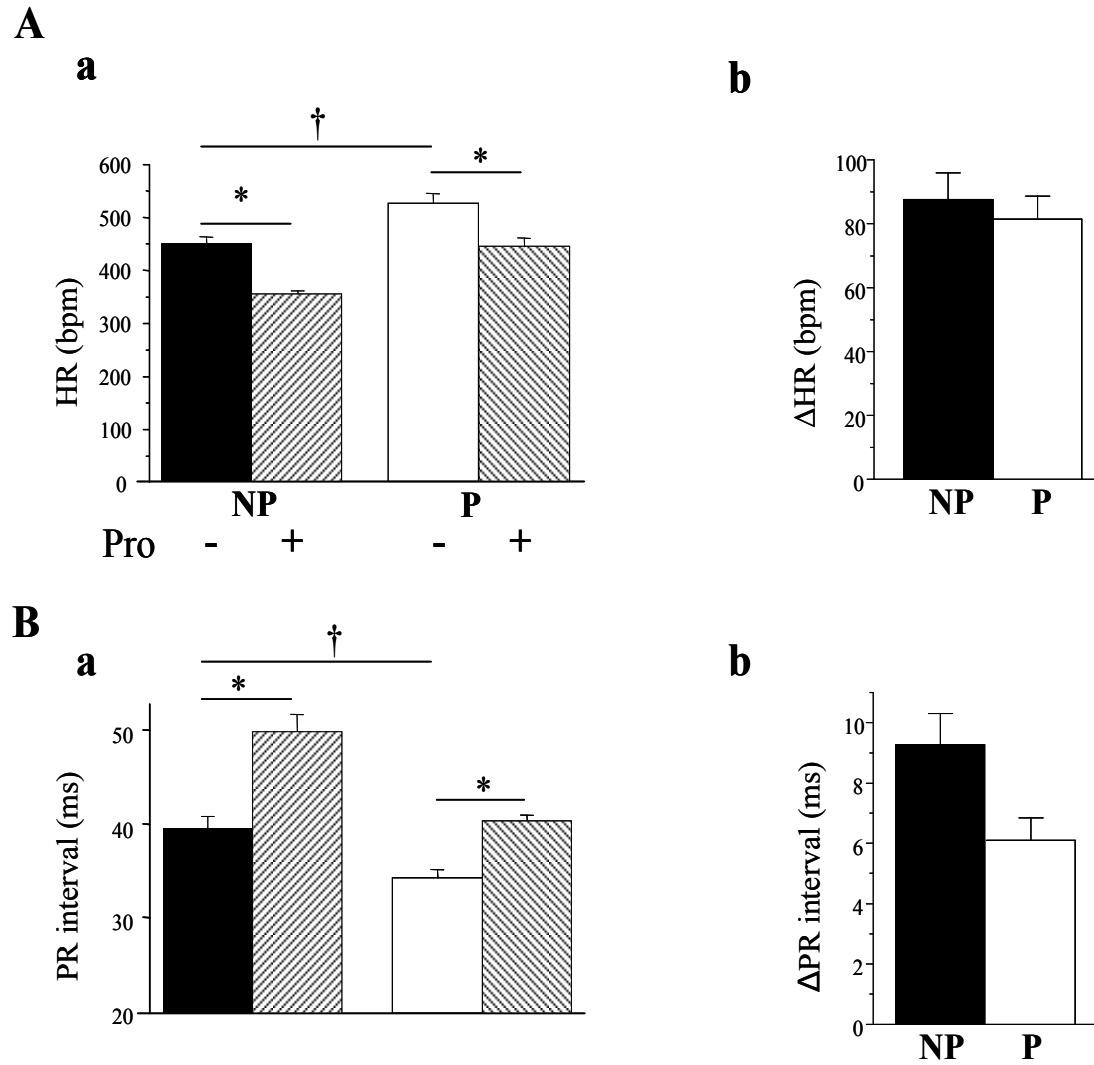


Figure 5 Pregnancy increased the response of the heart rate to carbachol.

A. The application of carbachol (Carb 10mM) reduces the heart rate on surface ECG of NP and P mice. **B.** The HR was significantly more sensitive to Carb during pregnancy as illustrated by the bar graphs that report the difference between the HR measured before and after Carb (Δ HR) in NP and P mice. **C-D.** At 10 mM carbachol had no significant effect on PR interval in both groups. Data were obtained from NP (n=9) and P (n=5) mice. (*p<0.05 vs baseline conditions; †p<0.05 P vs NP; ‡ p<0.05 vs Carb).

Figure 5 Pregnancy increased the response of the heart rate to carbachol.

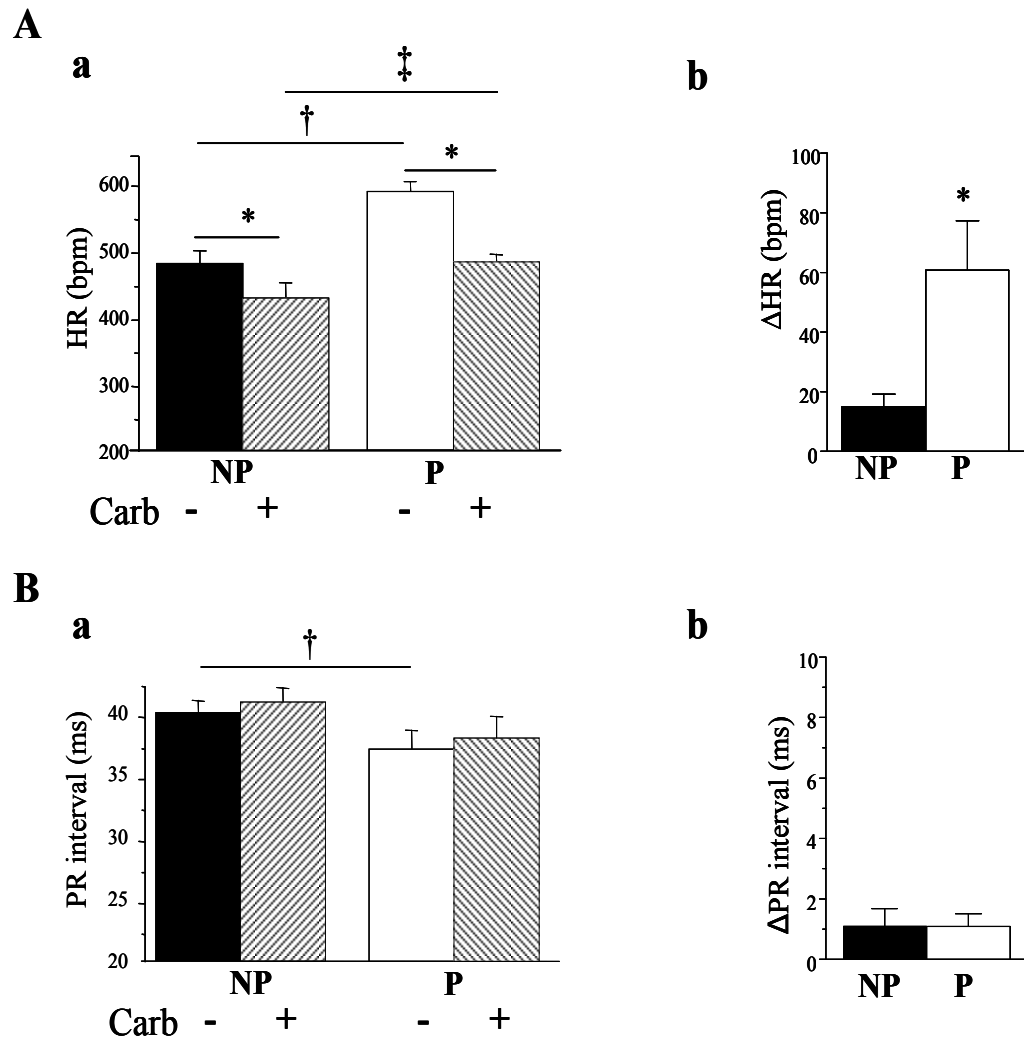
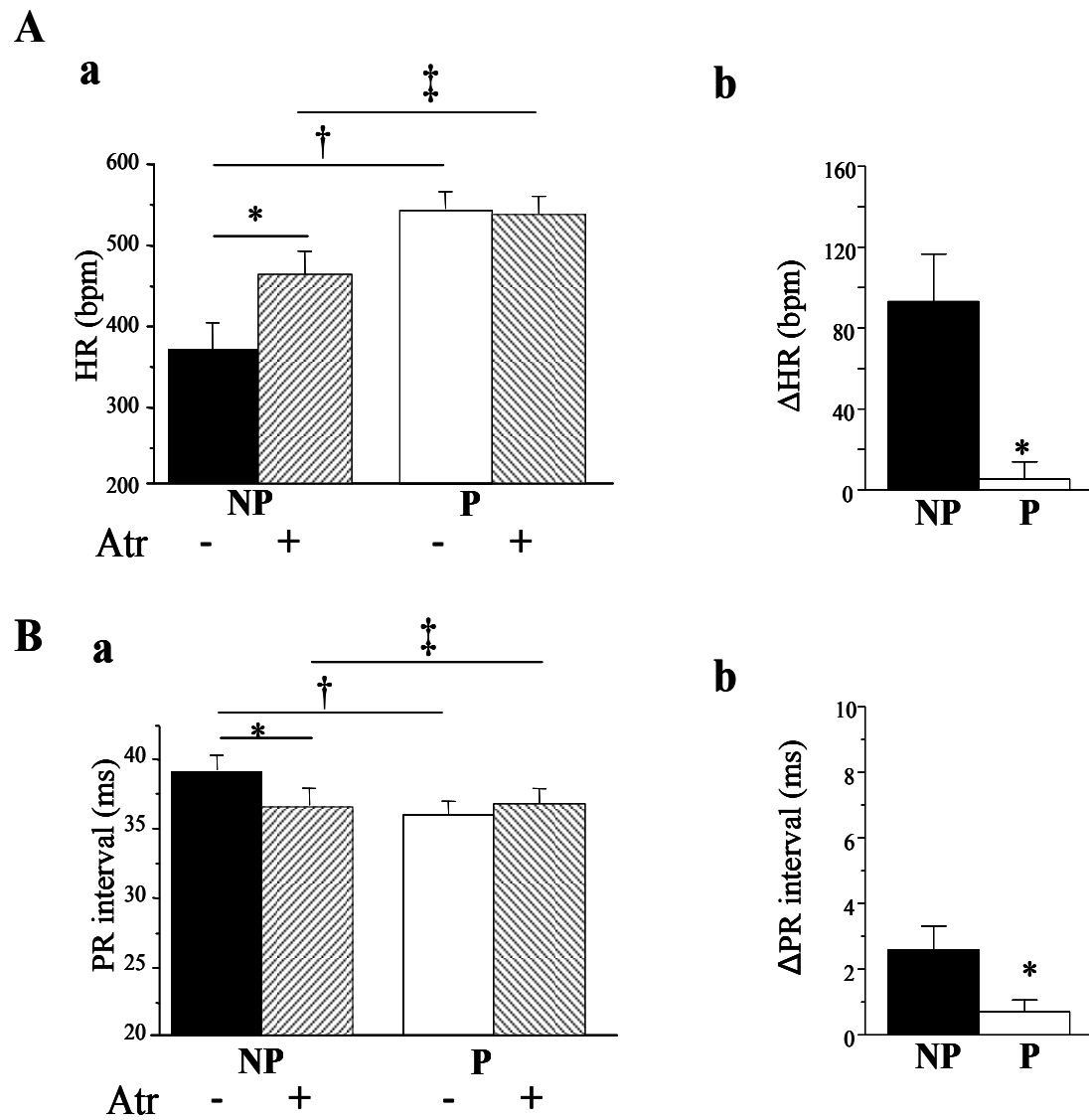


Figure 6. The atropine sensitivity of the heart rate and PR interval is reduced during pregnancy. **A-B.** The application of atropine (Atr 125mM) increased the HR of NP mice but had no significant effect on P mice as illustrated by the bar graphs showing the difference between the HR before and after Atr (Δ HR) in NP and P mice. **C-D.** The Atr response of the PR interval was also reduced in P mice as illustrated by the PR interval and the Δ PR measured before and after Atr in NP and P mice. Data were obtained from NP (n=7) and P (n=5) mice. (*p<0.05 vs baseline conditions; †p<0.05 P vs NP; ‡ p<0.05 vs Atr).

Figure 6. The atropine sensitivity of the heart rate and PR interval is reduced during pregnancy.



Chapitre 6

Discussion

6.1 Résumé des principaux résultats

Dans cette thèse nous avons essayé de comprendre le rôle des œstrogènes, des antagonistes oestrogéniques ainsi que des récepteurs aux œstrogènes dans la repolarisation ventriculaire. La souris a constitué un modèle de choix pour étudier l'électrophysiologie et ceci pour plusieurs raisons. Bien que les potentiels d'action et le rythme cardiaque soient différents entre la souris et l'homme, ces deux espèces partagent sensiblement les mêmes types de courants/ canaux ioniques. De plus, la dissection complète des courants de repolarisation ainsi que l'étude de la densité et de la cinétique des courants et canaux K^+ présents chez la souris développées dans notre laboratoire ont constitué un moyen important afin d'approfondir nos études sur les mécanismes cellulaires responsables de notre sujet d'étude.³⁹ D'autre part, la possibilité de faire les chirurgies soit l'ovariectomie et l'insertion des implants de tamoxifène ainsi que la disponibilité des souris déficientes en récepteurs oestrogéniques et des souris gestantes a permis d'analyser en profondeur le rôle des œstrogènes au niveau du fonctionnement du myocarde.

Plusieurs études suggéraient qu'un traitement aigu avec le tamoxifène, un modulateur sélectif des récepteurs œstrogéniques, pouvait réguler la repolarisation cardiaque et ceci en diminuant les courants K^+ .^{134;148;149} Puisque le premier passage hépatique du tamoxifène résulte en une augmentation significativement importante de son activité due à la présence de son métabolite primaire, le 4-hydroxytamoxifène, nous avons étudié le rôle de ce dernier dans la repolarisation ventriculaire. Nous avons démontré que l'application aiguë du 4-hydroxytamoxifène entraînait, comme dans le cas du tamoxifène, une diminution des courants K^+ . Cette diminution des courants K^+ totaux chez la souris est due à une plus faible densité des courants I_{to} , I_{Kur} et I_{K1} qui jouent un rôle important dans la repolarisation ventriculaire chez la souris. Cet effet inhibiteur toujours observé en présence de

l'antagoniste spécifique des récepteurs œstrogéniques, l'ICI-182,780, ou de l'inhibiteur de la synthèse d'ARN, l'actinomycine D, suggère un effet direct sur le canal.¹⁵⁰ Cette réduction des courants K^+ permet de supposer qu'une prise de tamoxifène peut retarder la repolarisation cardiaque et prolonger l'intervalle QT sur l'ECG. Or, les femmes qui utilisent le tamoxifène et qui sont sous traitement chronique de cinq ans ne présentent pas d'arythmies. Cette observation nous a incités à étudier l'effet d'une thérapie à long terme avec le tamoxifène. Afin de simuler l'environnement hormonal des femmes pré- et post-ménopausées recevant le tamoxifène, nous avons traité avec le tamoxifène administré sous forme des implants sous-cutanés des souris femelles CD-1 intactes et ovariectomisées. Contrairement à l'effet aigu, le traitement à long terme des souris avec du tamoxifène a révélé que les courants K^+ et les canaux sous-jacents sont significativement augmentés et que la durée du potentiel d'action est significativement plus courte chez la souris. Cette étude nous suggère fortement qu'en bloquant les récepteurs œstrogéniques, le tamoxifène va prévenir l'effet inhibiteur des œstrogènes sur les courants K^+ et entraîner leur augmentation. Ces résultats nous permettent aussi de conclure que bien que certaines données cliniques suggéraient une prolongation de l'intervalle QT chez des femmes utilisant le tamoxifène à long terme sans qu'aucun cas de torsades de pointes n'ait été reporté, il est fort probable que ce retard de repolarisation n'était pas associé à la prise du tamoxifène et que d'autres facteurs étaient à l'origine des anomalies de l'ECG. Ainsi, à l'aide de nos études, nous avons clairement démontré que la prise chronique du tamoxifène est sécuritaire et que les œstrogènes jouent un rôle important dans la repolarisation ventriculaire.

Afin de poursuivre nos études et de vérifier si les récepteurs œstrogéniques jouent un rôle dans les effets des œstrogènes, nous avons donc utilisé des souris déficientes en récepteurs œstrogéniques soient les souris ERKO. Notre caractérisation de la repolarisation des souris femelles ERKO α et ERKO β n'a révélé aucune différence au niveau de la densité des courants K^+ et plus précisément au niveau de I_{to} . Par contre, comme dans le cas des souris ovariectomisées et des souris traitées avec le tamoxifène, l'expression protéique du canal Kv4.3 sous-jacent au courant K^+ I_{to} était significativement augmentée chez les ERKO α et ERKO β . Ainsi, les hormones sexuelles féminines et leurs récepteurs semblaient être essentiels au niveau de la repolarisation.

Ces résultats forts encourageants suggérant que les œstrogènes pouvaient réguler la repolarisation dans des modèles de souris déficientes en œstrogènes ou en récepteurs oestrogéniques nous ont encouragés à étudier leurs rôles dans un modèle en excès d'œstrogènes, soit la grossesse. Puisque ce modèle n'avait pas été étudié auparavant, nous avons essayé de comprendre ses caractéristiques de base et de voir si la souris est un bon modèle pour étudier la grossesse. Nos résultats d'électrocardiographie n'ont montré aucune différence au niveau de l'intervalle QT. Par contre, nos données dévoilent que, comme chez la femme, la souris gestante présente une accélération du rythme cardiaque qui est associé à une augmentation de la sensibilité du cœur aux agents parasymphatiques. Ainsi donc, des études d'électrophysiologie cellulaire et moléculaire du nœud sinusal vont être intéressantes afin de caractériser cette condition physiologique.

6.1.1 Caractérisation de la repolarisation ventriculaire chez la souris après un traitement aigu au 4OH-tamoxifène

Le traitement à court terme des myocytes ventriculaires de souris avec le 4-hydroxytamoxifène a montré que l'effet inhibiteur des courants K^+ n'est pas génomique et n'implique pas les récepteurs oestrogéniques. Par contre, le site d'action du 4-hydroxytamoxifène est probablement les canaux K^+ . Les résultats obtenus avec le 4-hydroxytamoxifène chez la souris corrélaient parfaitement les données expérimentales suggérant que le tamoxifène régule la repolarisation dans d'autres modèles animaux. Selon ces études, tout portait à croire qu'après un traitement aigu et en diminuant les courants K^+ , le tamoxifène ou son métabolite actif le 4-hydroxytamoxifène pouvait prolonger l'intervalle QT et induire des arythmies ventriculaires. Mais est-ce qu'il est possible de conclure qu'après un traitement chronique, le tamoxifène (ou le 4-hydroxytamoxifène) augmenterait aussi le risque de prolongation de l'intervalle QT? Ainsi, une étude à long terme était nécessaire afin de déterminer si le tamoxifène affecte les courants K^+ , prolonge l'intervalle QT et augmente le risque des torsades de pointes. Quels seraient donc les effets chroniques du tamoxifène sur la repolarisation cardiaque? C'est ce que nous avons tenté de vérifier dans notre deuxième projet.

6.1.2 Caractérisation de la repolarisation ventriculaire chez la souris après un traitement chronique au tamoxifène

Dans cette étude, nous avons démontré que contrairement au traitement aigu, le traitement à long terme des souris avec des implants de tamoxifène entraînait un raccourcissement du potentiel d'action et une augmentation des courants K^+ (I_{to} , I_{Kur} , I_{ss} , and I_{K1}). Ceci était associé à une plus forte densité des canaux correspondants ($Kv4.3$, $Kv1.5$, $Kv2.1$ et $Kir2.1$, respectivement) plutôt que des changements dans les propriétés biophysiques des canaux K^+ .

L'augmentation des courants K^+ rapportée dans notre étude pourrait expliquer l'absence des arythmies cardiaques associée à la prise du tamoxifène, qui dans la plupart des études précédentes a été associée à une inhibition du courant I_{Kr} et à une prolongation de l'intervalle QT. L'inhibition de I_{Kr} étant généralement un facteur important pour la prolongation de l'intervalle QT induite par les médicaments chez les humains. Bien que la souris soit un bon modèle animal pour étudier le rôle du tamoxifène sur les courants K^+ , ce modèle a aussi ses limites. Dans le cas de la souris, la limite provient du fait que les courants I_{Kr} et I_{Ks} ne sont pas exprimés au niveau ventriculaire adulte. Ces courants membranaires de repolarisation étant importants pour l'extrapolation des données chez l'humain et leur absence constituent un facteur limitant pour l'interprétation de nos données aux conditions humaines. Ainsi, afin de compléter nos études et de contourner cette limite de notre modèle animal, nous avons aussi utilisé le cobaye, qui contrairement à la souris possède les courants I_{Kr} et I_{Ks} , tous deux impliqués dans la repolarisation ventriculaire chez l'humain. Dans ce projet, nous avons traité les cobayes femelles avec du tamoxifène via des implants sous-cutanés pour la même durée de traitement que les souris et nous avons mesuré les niveaux d'expression des canaux sous-jacents à I_{Kr} et I_{Ks} ($ERG1$, et $KvLQT1$ - $mink$) au niveau ventriculaire. Notre caractérisation de l'effet chronique du tamoxifène au niveau des ventricules a révélé que la densité des canaux sous-jacents à I_{Kr} et I_{Ks} est significativement augmentée chez les cobayes traités avec le tamoxifène. Ces travaux chez la souris et le cobaye ont permis de voir que l'effet chronique du tamoxifène n'est pas spécifique aux canaux K^+ exprimés au niveau du cœur de la souris. Nos données indiquent que les canaux de repolarisation sont augmentés y compris ceux retrouvés chez l'homme

soit I_{to} , I_{K1} ainsi que I_{Kr} et I_{Ks} . Bien qu'il n'y ait pas de modèle animal parfait, en combinant le cobaye et la souris, qui présentent tous les deux des avantages clairs, nous avons pu mettre en évidence l'effet chronique du tamoxifène sur la repolarisation ainsi que la sécurité du traitement avec le tamoxifène.

Mécanismes impliqués dans la contradiction des effets aigus et chroniques du tamoxifène

L'effet rapide obtenu suite à l'application aiguë du 4-hydroxytamoxifène suggère que l'inhibition des courants K^+ ne passe ni par la transcription ni par les récepteurs oestrogéniques nucléaires mais en même temps n'élimine pas complètement le rôle des récepteurs oestrogéniques membranaires. Par contre, la diminution des courants K^+ par le 4-hydroxytamoxifène toujours présente après l'application de l'ICI-182,780, ou de l'actinomycine D, prouve que l'effet aigu est direct sur le canal et non médié par les récepteurs oestrogéniques membranaires ou nucléaires. Cet effet peut être une modification de son état d'ouverture, un changement du site de liaison dans le canal etc.. Alors que l'augmentation des courants K^+ après une exposition chronique au tamoxifène suggère fortement que d'autres mécanismes prennent place lors d'un traitement à long terme. Un des mécanismes qui pourrait expliquer ce phénomène est que le tamoxifène par son activité antagoniste des récepteurs oestrogéniques peut enlever l'effet répresseur des œstrogènes sur les courants K^+ et induire leur augmentation. De plus, ces deux effets opposés semblent indiquer que plusieurs sites d'action seraient impliqués selon la nature aiguë ou chronique de l'exposition. Par exemple, l'effet aigu réducteur est dû à un effet rapide, non-génomique et directe sur les canaux K^+ alors que l'effet chronique est beaucoup plus lent (60 jours de traitement), génomique et nécessite une interaction tamoxifène-récepteurs oestrogéniques responsable de l'augmentation des courants et canaux K^+ . Afin de consolider cette hypothèse, d'autres études étaient nécessaires soit la caractérisation de la repolarisation ventriculaire chez des souris déficientes en œstrogènes et en récepteurs oestrogéniques.

6.1.3 Caractérisation de la repolarisation ventriculaire chez les souris ovariectomisées

Nos résultats obtenus avec le tamoxifène suggèrent un rôle important des œstrogènes et des récepteurs oestrogéniques dans la régulation de la repolarisation ventriculaire. Afin de vérifier ce rôle et de déterminer si l'ovariectomie est capable de reproduire les effets du tamoxifène, nous avons caractérisé tout d'abord la repolarisation ventriculaire chez des souris déficientes en œstrogènes, i.e. en utilisant des souris ovariectomisées. Ce modèle qui mime la post-ménopause montre les effets hormonaux sur l'expression des courants et des canaux K^+ et indique leur rôle possible dans la régulation de la modulation de la repolarisation cardiaque et de l'intervalle QT au niveau du cœur. Malgré les différences liées au sexe dans la repolarisation cardiaque et dans l'intervalle QTc, les effets des hormones sexuelles femelles sur la repolarisation n'ont pas été bien caractérisés. L'étude de ce sujet était importante afin d'expliquer également l'incidence élevée des maladies cardiovasculaires chez les femmes après la ménopause et la protection cardiovasculaire avant la ménopause. Nos résultats obtenus dans les modèles de souris femelles en pré- (souris témoin) et post- (souris ovariectomisées) ménopause suggèrent que lorsque le statut hormonal est altéré suite à la diminution des niveaux oestrogéniques, il va y avoir sélectivement une augmentation de l'amplitude du courant $K^+ I_{to}$ chez les souris ovariectomisées. En outre, cette augmentation qui est en corrélation avec l'augmentation de l'expression d'ARNm et protéique du canal sous-jacent Kv4.3 suggère que les hormones sexuelles féminines peuvent jouer un rôle crucial dans la régulation de la repolarisation cardiaque et plus spécifiquement dans la modulation du courant I_{to} . D'un autre côté, cette étude montre qu'il n'y a pas de différences significatives dans la durée de l'intervalle QT ni dans la durée du potentiel d'action mesurée à 20%, 50% et 90% de repolarisation. Ces résultats prouvent que contrairement à ce à quoi nous attendions, cette augmentation de I_{to} n'affecte pas le profil de la repolarisation cardiaque. Les résultats de Saba et al. soutiennent notre conclusion, puisqu'ils ont constaté que ni l'ovariectomie, ni l'administration des œstrogènes affecte l'intervalle QT des souris femelle C57/J.¹⁵¹ Une explication fort possible de nos résultats est que puisque le courant $K^+ I_{to}$ et les courants Ca^{2+} sont responsables de la phase plateau du potentiel d'action, nous proposons que le mécanisme responsable de ce

résultat soit dû à une éventuelle compensation entre les deux courants: un courant K^+ de repolarisation et un courant Ca^{2+} de dépolarisation. Nos données supportent l'hypothèse selon laquelle les hormones sexuelles féminines pourraient également avoir un effet sur les courants Ca^{2+} au niveau du ventricule de souris. En fait, les effets des œstrogènes sur les courants Ca^{2+} ont été rapportés et des études antérieures ont suggéré que les œstrogènes inhibent I_{CaL} grâce à l'interaction directe des stéroïdes avec la sous-unité $\alpha 1$ du canal calcique.¹²⁵ Un autre groupe a rapporté une augmentation de l'expression de I_{CaL} dans des modèles de souris ERKO α .¹²⁴ Pris ensemble, un raccourcissement de la durée du potentiel d'action en raison de l'augmentation de I_{to} et une prolongation de la durée du potentiel d'action en raison d'une augmentation possible de I_{CaL} chez les souris ovariectomisées pourraient contrebalancer ces deux effets opposés. Ainsi, l'impact de l'absence des œstrogènes et l'augmentation associée de Kv4.3 n'était pas apparent en conditions physiologiques et ne conduit pas à des perturbations électrophysiologiques telles que le changement pathologique de l'intervalle QTc mais pourrait être déterminant et influencer l'APD en conditions pathologiques. Est-ce que cet effet obtenu sur I_{to} est médité ou non par les récepteurs oestrogéniques? Cette question constitue le but de l'étude suivante qui a été réalisée sur des modèles des souris déficientes en RE α ou RE β , soient les souris ERKO α et ERKO β .

6.1.4 Caractérisation de la repolarisation ventriculaire chez les souris ERKO α et ERKO β

La suite de nos projets portait sur l'étude de l'effet de la déficience en récepteurs oestrogéniques sur la repolarisation ventriculaire et plus particulièrement sur le courant K^+ I_{to} . Les souris ERKO α et ERKO β permettent de vérifier le rôle individuel de chacun des récepteurs oestrogéniques dans la régulation de I_{to} . L'étude des souris ERKO α et ERKO β a montré que la densité des courants K^+ et l'expression protéique de Kv4.3, Kv4.2 et KChIP2b étaient similaires entre les souris témoins et les ERKO α et β . De plus, l'expression de l'ARNm de Kv4.2 et KChIP2b étaient inchangés entre ces trois groupes. Alors que comme dans le cas des souris ovariectomisées et des souris traitées à long terme avec le tamoxifène, l'expression de l'ARNm de Kv4.3 est augmentée chez les souris ERKO α sans aucun changement chez les ERKO β .

Rôle des sous-unités accessoires aux canaux ioniques

Le principal rôle des sous-unités accessoires aux canaux ioniques est de réguler les niveaux d'expression du canal à la membrane ainsi que les cinétiques d'activation et d'inactivation du courant. Chez la souris, I_{to} est formé par la combinaison de deux sous-unités Kv4.2 et Kv4.3 et par la sous-unité accessoire KChIP2b. Des études précédentes ont montré que la coexpression de KChIP2b avec les protéines des canaux Kv4.X augmente l'expression du canal à la membrane, ralentit l'inactivation et accélère le recouvrement de l'inactivation.¹ Les sous-unités α , les sous-unités β et les protéines engagées dans le transport et l'adressage des canaux à la membrane pourraient être la cible de certaines hormones. Une étude réalisée au niveau du tissu utérin a montré que l'injection des œstrogènes diminue l'expression et l'ARNm de Kv4.3 et induit une localisation périnucléaire de ce canal suggérant que la transcription et l'adressage à la membrane de Kv4.3 sont régulés par les hormones sexuelles.⁷⁹ Toutefois, les mécanismes responsables de ces changements restent à être clarifiés. Le rôle des sous-unités β a été aussi mis en évidence dans des études qui ont suggéré une régulation de KChIP2b par l'angiotensine ou par la stimulation adrénergique. En effet, l'expression protéique de KChIP2b était diminuée dans les ventricules des deux modèles de souris transgéniques surexprimant le récepteur AT1 à l'angiotensine ou le récepteur α_{1B} -adrénergique.^{32,33} Ceci est associé à une diminution de l'expression de Kv4.2 à la membrane chez les souris transgéniques. De plus, d'autres sous-unités β associées aux courants K^+ semblent être régulées par les hormones sexuelles et contribuer à la régulation de la repolarisation. Par exemple, l'ARNm de la sous-unité β du courant I_{Ks} , minK, est réduite dans les ventricules de lapines ovariectomisées traitées aux œstrogènes ou à la DHT.¹²¹ Un autre groupe a montré que l'augmentation de l'ARNm de KChIP2 contribue à l'augmentation de I_{to} des cardiomyocytes observée durant la période postnatale chez le rat.¹⁵² Ces variations de KChIP2 sont accompagnées par de faibles variations de l'ARNm de Kv4.2 et de Kv4.3. Dans nos études chez la souris, nous avons analysé l'expression protéique et d'ARNm de KChIP2b puisque l'augmentation de I_{to} , courant sensible aux œstrogènes, était expliquée par une augmentation spécifique de l'expression protéique et d'ARNm de sa sous-unité principale Kv4.3. Nos résultats ont montré que chez les souris ovariectomisées et chez les souris traitées au tamoxifène, l'expression protéique et d'ARNm de Kv4.2 et de KChIP2b n'étaient pas différentes et qu'elles n'étaient pas affectées par des

variations importantes des niveaux des œstrogènes. Ces résultats suggèrent que dans le cas des conditions pathologiques (hypertrophie cardiaque, remodelage cardiaque..), KChIP2b régule spécifiquement les niveaux d'expression de Kv4.2. Alors que les variations hormonales semblent affecter plus particulièrement la sous-unité Kv4.3. Ces observations suggèrent que la régulation de Kv4.3 et Kv4.2 implique des voies de signalisation différentes.

Comment alors interpréter les résultats obtenus avec les souris ERKO α et ERKO β ?

Dans le cas des souris traitées au tamoxifène ou les souris ovariectomisées, une stimulation du récepteur œstrogénique par les œstrogènes est impossible car soit les deux récepteurs œstrogéniques sont bloqués soit les œstrogènes sont absents. Puisque la densité et l'expression protéique de I_{to} sont identiques chez les ERKO, on peut suggérer que, juste dans des conditions de changements importants en œstrogènes que I_{to} est affectée.

Par contre, bien que les résultats des analyses des niveaux d'expression d'ARNm de Kv4.2, Kv4.3 et KChIP2 sont similaires entre les souris ERKO β et les souris témoins, Kv4.3 est la seule qui est augmentée chez les souris ERKO α . Ceci suggère que les œstrogènes régulent l'expression de ce canal au niveau post-transcriptionnel, engagent spécifiquement le RE α et n'affectent pas la traduction des canaux.

La réalisation de ces différentes études chez des souris où les deux récepteurs œstrogéniques sont bloqués ou chez qui les œstrogènes sont absents nous a permis de confirmer que (1) les changements en œstrogènes jouent un rôle important dans la repolarisation ventriculaire et que (2) l'absence des récepteurs aux œstrogènes engendrent une augmentation de l'expression des canaux K^+ en enlevant l'effet répresseur des œstrogènes sur ces canaux. Nos études nous ont permis de montrer le rôle prépondérant du RE α dans l'augmentation de Kv4.3.

Facteurs potentiellement responsables des effets œstrogéniques sur I_{to}

I_{to} joue un rôle important dans la repolarisation ventriculaire chez l'humain et chez la souris. Plusieurs études suggèrent que la densité et l'expression de I_{to} pourrait être régulé par les hormones. En fait, la densité de I_{to} est modulée par les hormones thyroïdiennes chez le rat et augmentée par l'insuline et le glutathion chez le rat diabétique.^{153;154} En revanche, il est significativement régulé à la baisse dans les myocytes ventriculaires des modèles d'hypothyroïdie et après une stimulation adrénergique ou AT1R dans les maladies cardiaques.³² Nos enregistrements électrophysiologiques montrent que la densité de I_{to} est augmentée chez la souris déficiente en œstrogènes ou en récepteurs œstrogéniques. Ces modifications de I_{to} qui surviennent après des changements chroniques en hormones féminines suggèrent fortement que les œstrogènes peuvent influencer la repolarisation cardiaque. Cette augmentation de I_{to} propose directement que la sous-famille des Kv4 et/ou KChIP pourraient être affectés. Nos résultats de qPCR ont révélé une augmentation significative de l'expression d'ARNm de Kv4.3 chez les souris déficientes en œstrogènes ou en récepteurs œstrogéniques. La hausse de l'expression protéique et d'ARNm de Kv4.3 chez les souris ovariectomisées suggère qu'en absence des hormones sexuelles la régulation de Kv4.3 est transcriptionnelle.

De nos études, nous pouvons tirer trois conclusions principales:

- a) les œstrogènes régulent la repolarisation ventriculaire et cet effet est médié par les récepteurs œstrogéniques.
- b) I_{to} est modulé par les hormones sexuelles féminines et l'absence des œstrogènes régule spécifiquement la transcription de Kv4.3.
- c) le RE α joue un rôle dans la régulation de Kv4.3.

Nos résultats appuient fortement ceux de Song et coll. qui ont rapporté que I_{to} est modulé par les œstrogènes chez les souris gestantes et que l'augmentation des œstrogènes est un facteur qui diminue l'expression génique de Kv4.3 au niveau de l'utérus et du cœur.^{79;155}

Toutes les études présentées dans cette thèse suggèrent que les œstrogènes et les récepteurs œstrogéniques affectent les courants K^+ et la repolarisation ventriculaire et ceci en utilisant des modèles de souris déficientes en œstrogènes, de l'un ou l'autre des deux récepteurs œstrogéniques ou dont les récepteurs œstrogéniques ont été bloqués. Nos résultats nous

ont incitées à approfondir davantage et vérifier si les œstrogènes affectaient l'activité électrophysiologique cardiaque mais cette fois-ci dans un modèle animal où les niveaux d'œstrogènes sont élevés, soit la grossesse. Puisque ce modèle n'avait pas été étudié auparavant, nous avons essayé de comprendre tout d'abord ses caractéristiques électrocardiographiques et de voir si la souris est un bon modèle pour étudier l'effet de la grossesse sur l'électrophysiologie cardiaque.

6.1.5 Étude des paramètres électrocardiographiques chez la souris gestante

La dernière étude présentée dans cette thèse a montré que comme chez la femme enceinte, l'intervalle QT n'est pas altéré chez la souris pendant la grossesse.¹³⁷ Par contre, des enregistrements en ECG de surface ont démontré que comme chez la femme enceinte, la souris gestante présente une accélération du rythme cardiaque et de la conduction auriculo-ventriculaire. De plus, l'intervalle PR est raccourci chez la souris gestante alors que l'onde P n'est pas modifiée.¹³⁷ Ces différences qui concordent avec les changements observés chez la femme suggèrent que le raccourcissement de l'intervalle PR chez la souris gestante est dû à des modifications au niveau du temps de la conduction auriculo-ventriculaire plutôt qu'au niveau de la conduction auriculaire. Tous ces résultats prouvent que la souris est un modèle intéressant pour comprendre l'accélération du rythme cardiaque lors de la grossesse. De plus, des enregistrements d'ECG chez les souris en post-partum nous ont révélé que ces souris présentent le même profil électrophysiologique que les souris non-gestantes. En fait, les effets de la grossesse sur la fréquence cardiaque et l'intervalle PR sont réversibles 1 à 2 jours après l'accouchement. Ceci est également observé chez la femme chez qui la fréquence cardiaque revient aux valeurs de base (72 bpm) dans les deux semaines suivant l'accouchement.¹⁴⁴ De plus, les résultats des enregistrements d'ECG obtenus en Langendorff ont montré que les différences au niveau de la fréquence cardiaque et de l'intervalle PR persistent toujours en absence du système nerveux autonome. Puisque ces différences ont été observées en absence et en présence du SNA, ceci suggère que ces changements qui surviennent lors de la grossesse sont au niveau du système de conduction. En fait, il est possible que l'augmentation des niveaux de plusieurs hormones féminines (par exemple: œstrogène, progestérone et relaxine) pendant la grossesse puisse affecter les

propriétés électrophysiologiques du système de conduction étant donné que leurs rôles dans l'automaticité cardiaque ont été rapportés dans plusieurs études. Plus précisément, les femmes ont un rythme cardiaque de base plus élevé que les hommes et les œstrogènes ont été associés à une accélération du rythme cardiaque et de la conduction auriculo-ventriculaire chez la souris.^{91-94;103;143}

La deuxième partie de l'étude faite chez la souris gestante a montré que la grossesse est associée à une sensibilité accrue à une stimulation parasympathique alors que la réponse à la modulation β -adrénergique n'est pas modifiée. Ce résultat indique que l'effet de la stimulation vagale sur le rythme cardiaque qui est plus important pendant la gestation est une conséquence à l'augmentation du rythme cardiaque observée lors de la grossesse.

Cette prédominance vagale a été rapportée par Speranza et coll., qui ont montré un changement de la balance sympathique-parasympathique en faveur d'une réponse au parasympathique durant la grossesse.¹³⁹ De plus, une autre étude clinique montre que les femmes ont une réponse sympathique moins importante que les mâles.¹⁵⁶ Ce qui propose une augmentation de la sensibilité et de la réponse à une stimulation parasympathique chez la femme.

Ainsi, nos données fournissent des évidences claires que la souris présente les mêmes modifications que la femme enceinte et que l'augmentation des niveaux des hormones féminines lors de la grossesse pourrait affecter l'équilibre sympathovagale ainsi que les propriétés électrophysiologiques du nœud sinusal et du système de conduction et alors jouer un rôle important dans la régulation de l'activité électrique cardiaque.

6.2 Mise en lien de nos résultats dans un contexte physiologique

6.2.1 Les effets des oestrogènes

L'effet aigu des œstrogènes sur la repolarisation et l'activité électrique cardiaque a été mis en évidence dans plusieurs études. En fait, une de ces observations suggèrent un effet pro-arythmique des œstrogènes par diminution de la densité des courants potassiques et prolongation de la durée du potentiel d'action et/ou de l'intervalle QT¹¹³ alors qu'une autre étude suggère un effet anti-arythmique par diminution des courants calciques.¹¹⁸ Ces différentes études ont rapporté que les effets du 17β -œstradiol sont dépendants de la dose et

se produisent en quelques minutes. La rapidité des effets du 17β -œstradiol sur les courants ioniques suggère que des effets sur la transcription des canaux produits par les récepteurs nucléaires sont peu probables. Ces observations suggèrent une interaction directe du 17β -œstradiol avec les canaux ioniques ou avec les récepteurs oestrogéniques situés sur la membrane plasmique et qui peuvent agir via plusieurs voies de signalisation. De plus, nos expériences prouvent que comme les œstrogènes, les effets aigus du 4OH-tamoxifène régulent à la baisse les canaux K^+ . Ces effets sont indépendants des récepteurs aux œstrogènes étant donné que l'application de l'ICI 182,780 ou de l'actinomycine D n'a pas modifié les effets inhibiteurs du 4OH-tamoxifène des canaux K^+ . Ainsi, ces observations non génomiques montrent l'importance des effets indépendants des récepteurs stéroïdiens et fournissent des informations additionnelles dans la compréhension des effets des modulateurs oestrogéniques sur l'activité électrique et sur la repolarisation.

D'autre part, il a été démontré que comme en aigu, le traitement chronique avec des concentrations physiologiques en œstrogènes diminue les courants K^+ et induit une prolongation excessive de la durée du potentiel d'action suite à l'utilisation de l'E4031, inhibiteur de I_{Kr} . Ces résultats étant similaires à ceux obtenus après l'utilisation de l'ICI 182,780 dans des cellules qui n'expriment pas les récepteurs oestrogéniques suggèrent que les œstrogènes sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle des canaux K^+ . En bref, l'utilisation aigu ou chronique des œstrogènes et par la suite l'effet non génomique ou l'effet de la transcription peuvent tous les deux conduire à augmenter la sensibilité des femmes aux arythmies.

Cet effet à long terme des œstrogènes est complètement opposé aux effets chroniques du tamoxifène. De plus, en opposition avec la réduction des courants K^+ induite par le traitement aigu du 4OH-tamoxifène, l'augmentation de la densité et l'expression des canaux K^+ suite au traitement à long terme avec le tamoxifène suggère qu'en conditions chroniques le mécanisme d'action du tamoxifène est différent. Bien qu'il soit difficile de généraliser le mécanisme d'action des effets chroniques transcriptionnels et aigus du tamoxifène sur la repolarisation cardiaque et de les rapporter aux humains, on peut supposer que l'augmentation des courants K^+ rapportée dans notre étude pourrait contribuer à expliquer l'absence de troubles du rythme cardiaque lors d'un traitement chronique au tamoxifène.

6.2.2 Les différences mâle-femelle

Dans notre laboratoire, des études ont montré que les androgènes pouvaient réguler la repolarisation et jouer un rôle important dans les différences mâle-femelle au niveau de la repolarisation ventriculaire.¹¹¹ En fait, un ralentissement de la repolarisation cardiaque et une plus faible densité du courant $I_{K_{ur}}$ et de son canal correspondant, Kv1.5, a été démontré chez les souris mâles castrés comparativement aux souris mâles témoins.¹¹¹ De plus, les souris ayant des niveaux faibles ou réduits en androgènes, soit les souris C57BL/6 caractérisés par des taux très faibles de testostérone et de la dihydrotestostérone chez les mâles, ne présentaient pas de différence de repolarisation entre les sexes. Ainsi, en condition basales, les hormones sexuelles mâles semblent être essentielles à la présence des différences mâle-femelle dans la repolarisation ventriculaire.

En comparant les résultats obtenus avec les androgènes et ceux présentés dans cette thèse, on peut conclure que les changements importants en œstrogènes régulent différemment les courants et les canaux K^+ . En effet, nous avons montré que c'est I_{to} et non pas $I_{K_{ur}}$ qui est régulé par les variations hormonales féminines. La densité de I_{to} ainsi que l'expression d'ARNm et protéique d'un de ses deux canaux associés, Kv4.3, et non pas celle de $I_{K_{ur}}$, soit Kv1.5, étaient augmentées chez des souris ayant des niveaux faibles ou réduits en œstrogènes. Les mêmes changements étaient observés chez des souris déficientes en récepteurs œstrogéniques ou traitées à long terme avec le tamoxifène prouvant ainsi l'implication des œstrogènes et de leurs récepteurs dans la régulation de I_{to} et de Kv4.3. Ainsi en se basant sur nos données et bien que I_{to} n'était pas impliqué dans les différences reliées au sexe chez la souris, on peut conclure que I_{to} est sensible à des changements importants en œstrogènes (ovariectomie, traitement aux hormones..) alors qu'à des niveaux physiologiques (différence mâle-femelle..) il n'est pas affecté d'une façon significative.

Bien que notre laboratoire a montré une absence de différence mâle-femelle dans la densité de I_{to} chez la souris, une étude faite chez le chien a révélé une augmentation de sa densité chez des chiens mâles comparés aux femelles.¹⁵⁷ Toutefois, il est important de noter que, comme chez l'humain, I_{to} du chien est associé au canal Kv4.3 et son unité accessoire KChIP2. Celui de la souris étant associé à la combinaison de Kv4.2/Kv4.3 et KChIP2. Ainsi, une extrapolation des données obtenues chez le chien vers l'humain est envisageable.

Une fois extrapolés, les données obtenues chez le chien montreront une diminution de la densité du courant I_{to} chez les femmes et pourront expliquer la prolongation de la repolarisation. Toutes ces données suggèrent que les hormones sexuelles régulent I_{to} et que différentes voies de signalisation sont à l'origine des résultats obtenus dans différentes espèces.

6.2.3 Oestrogènes, I_{to} et repolarisation

Le rôle d'un traitement chronique aux hormones sexuelles féminines a été étudié dans la repolarisation cardiaque par Eghbali et coll.¹⁵⁵ Ce groupe a montré, comme dans notre étude, que le courant I_{to} cardiaque était régulé par des variations hormonales importantes. Plus précisément, la densité de ce courant ainsi que l'expression d'ARNm de Kv4.3 étaient réduites chez les souris gestantes.¹⁵⁵ Ceci a été reproduit chez les souris ovariectomisées traitées aux œstrogènes et non traitées à la progestérone. De plus, les auteurs de l'étude ont montré que l'utilisation de l'ICI 182,780, prévenait la diminution de l'ARNm du canal Kv4.3, confirmant l'implication des œstrogènes et de leurs récepteurs dans la régulation du courant de repolarisation I_{to} . Ainsi, nos résultats combinés à ceux d'Eghbali et coll., démontrent que des changements en œstrogènes observés soit dans des modèles caractérisés par une forte présence des œstrogènes (grossesse) ou par une absence des œstrogènes (suite à une ovariectomie), par blocage des récepteurs oestrogéniques (tamoxifène) ou en absence des récepteurs oestrogéniques (ERKO α/β), induisent spécifiquement des changements au niveau de Kv4.3. De plus, ces résultats montrent que la régulation du courant $K^+ I_{to}$ se fait par l'activation des récepteurs oestrogéniques.

Récemment, Saito et coll. a aussi étudié le rôle des œstrogènes dans la régulation de la repolarisation ventriculaire chez la souris C57BL/6 tout en portant une attention particulière aux fluctuations hormonales observées durant le cycle œstrus.¹²³ Cette étude a montré que la densité du courant K^+ total chez la souris est plus basse chez les animaux durant l'œstrus comparativement aux animaux en diestrus et aux mâles démontrant ainsi comme dans notre étude que les œstrogènes ont un rôle répresseur sur les courants K^+ . De plus, les auteurs ont attribué cette diminution de la densité du courant K^+ total à une diminution de I_{Kslow} et de I_{to} ce qui concorde avec notre interprétation et nos résultats. Par contre, ces résultats d'Eghbali et coll. sont en opposition avec ceux obtenus par Brouillette et coll. qui ont

rapporté qu'il n'y a pas de différence mâle-femelle au niveau de la repolarisation chez le souris C57Bl/6 étant donné que les souris mâles et femelles présentent le même niveau hormonal d'androgènes.¹¹² Cependant, l'étude faite par Brouillette et coll. n'a pas porté une attention particulière au cycle œstrus chez les femelles.¹¹² Une autre étude faite chez les humains par Burke et coll. a montré qu'en absence des médicaments qui altèrent la repolarisation cardiaque, cette dernière n'est pas différente entre les phases du cycle menstruel suggérant ainsi que la variation cyclique des niveaux hormonaux durant le cycle menstruel ne joue aucun rôle dans les différences mâle-femelle au niveau de la repolarisation.¹⁰³

6.2.3.1 Régulation de I_{to} dans l'hypertrophie cardiaque : rôle de Kv4.2 et Kv4.3

La régulation de I_{to} a été rapportée dans les deux types d'hypertrophie cardiaque: l'hypertrophie concentrique et l'hypertrophie excentrique.^{33;122}

L'hypertrophie concentrique ou l'hypertrophie pathologique est caractérisée par l'épaississement des parois musculaires du ventricule et est rencontrée dans la sténose aortique ou l'hypertension artérielle. Cette hypertrophie est associée à une prolongation du potentiel d'action et de l'intervalle QT, une diminution des courants K^+ ainsi qu'à une augmentation du risque d'arythmie.^{158;159;159-161}

L'hypertrophie excentrique ou l'hypertrophie physiologique est caractérisée par une dilatation et un allongement des myocytes. L'hypertrophie physiologique est rencontrée lors de la grossesse et de l'exercice. Elle est aussi reproduite en absence de la myostatine (ex. souris déficiente en myostatine).¹⁶³ Au contraire de l'hypertrophie concentrique, l'hypertrophie excentrique n'est pas associée à des anomalies électriques ou une augmentation du risque d'arythmie.^{158;160}

Un modèle de souris transgéniques d'hypertrophie concentrique pathologique a été étudié dans notre laboratoire. Ces souris sont caractérisées par une surexpression spécifique des récepteurs AT1 de l'angiotensine (AT1R) et par la présence de l'hypertrophie pathologique cardiaque au niveau cellulaire et ventriculaire. Des études d'électrophysiologie chez ces souris ont montré une régulation de I_{to} .^{32;33} Cette régulation se produit par une diminution

de l'expression protéique de Kv4.2 et de l'expression d'ARNm de Kv4.2 et de KChIP2b chez les AT1R.³³ Puisque chez la souris I_{to} est produit par Kv4.2 et Kv4.3 et KChIP2 et comme la diminution de l'expression d'un des canaux est suffisante pour diminuer la densité de I_{to} , Il a été rapporté dans cette étude, que la diminution de l'expression de Kv4.2 et de KChIP2b pourraient être responsable de la diminution de I_{to} chez les AT1R. L'ensemble de ces résultats suggère que la diminution d'une seule isoforme est suffisante pour diminuer I_{to} et que dans le cas d'hypertrophie pathologique et non physiologique la diminution de l'expression de Kv4.2 et non pas Kv4.3 est responsable de la réduction de la densité de I_{to} .

D'autre part, des études des modèles d'hypertrophie physiologique, soient les souris en entraînement, suggèrent une augmentation des courants K^+ cardiaques en parallèle avec l'augmentation des sarcomères afin de maintenir une fonction cardiaque normale.^{158;160;162} Ces souris qui présentent de l'hypertrophie excentrique ne montrent pas d'anomalie de l'intervalle QT par rapport aux souris témoins. Ceci est intéressant du fait que chez ces deux groupes de souris une augmentation des courants K^+ n'est pas nécessairement associée à une accélération du QT ou de la durée du potentiel d'action.¹⁶² Par contre, il a été démontré que l'exercice maintient l'activité électrique normale par une augmentation de la transcription des courants ioniques.¹⁶² De plus, les auteurs ont suggéré que des mécanismes post-transcriptionnels peuvent aussi contribuer à cette augmentation de la densité et de l'amplitude des courants K^+ observée lors de l'hypertrophie physiologique. Plus précisément, les auteurs ont révélé que la densité de I_{to} ainsi que l'expression protéique des canaux sous-jacents à I_{to} sont significativement augmentées chez les souris en entraînement. De plus, une augmentation de l'expression d'ARNm de Kv4.2, Kv4.3 et KChIP2 a été rapporté chez les souris hypertrophiées. Ces résultats contradictoires avec ceux obtenus avec l'hypertrophie pathologique, suggèrent fortement que lors de d'hypertrophie physiologique, différentes voies de signalisation sont à l'origine de la régulation de I_{to} . Ces résultats obtenus dans un modèle d'hypertrophie physiologique (souris en exercice) pourraient suggérer que la grossesse soit associée aussi à des modifications au niveau de I_{to} .

Une seule étude a évoqué la possibilité de la régulation des canaux K^+ pendant la grossesse. Eghbali et coll., ont observé des niveaux de Kv4.3 plus faibles chez les souris femelles gestantes que chez les témoins.¹²² Ce résultat est différent et ne corrèle pas avec l'augmentation de l'expression des canaux observés (augmentation de Kv4.3) pendant l'hypertrophie physiologique lors de l'exercice. Ces données suggèrent que bien que la grossesse soit un cas d'hypertrophie physiologique, il y a aussi l'impact des hormones sexuelles (i.e. les œstrogènes) qui peuvent intervenir et qui semblent avoir un effet prédominant et relié à la diminution de Kv4.3. Le faible nombre d'études réalisées pendant la grossesse ne permet pas de clarifier le rôle d' I_{to} et des œstrogènes dans ce modèle d'hypertrophie physiologique. D'autres études seront nécessaires afin de vérifier les différentes voies de signalisation impliquées dans la régulation des canaux K^+ lors de la grossesse.

D'autre part, une autre étude récente suggère aussi un rôle des courants ioniques dans l'hypertrophie excentrique. Rodgers et coll., ont montré que la myostatine est un répresseur de la croissance musculaire physiologique et de la fonction cardiaque.¹⁶³ En fait, il a été démontré que la myostatine inhibe tous les processus requis pour le développement des cardiomyocytes: la prolifération, la différenciation et la synthèse protéique. Dans cette étude, les auteurs ont suggéré que la perte de la myostatine induit une hypertrophie excentrique et non pathologique, ce qui pourrait aider à réparer le muscle cardiaque endommagé. Ceci est dû au fait que l'absence de la myostatine induit une augmentation des transients calciques, des contractions et de la libération calcique du réticulum sarcoplasmique. La régulation de la concentration d'ions calciques libres dans le cytoplasme influence non seulement la contraction, mais aussi la repolarisation. Par exemple, une augmentation de la densité des I_{CaL} présents lors de la phase plateau du potentiel d'action peut retarder la repolarisation et causer une prolongation de la durée du potentiel d'action, ce qui permet de suggérer un lien possible entre la myostatine et les courants K^+ . Il est alors fort probable qu'une absence de myostatine affecte la régulation des canaux potassiques dans ce nouveau modèle d'hypertrophie physiologique. Parmi ces courants K^+ , notons le courant I_{to} dont la régulation par les cascades de signalisation dépendantes du Ca^{2+} intracellulaire (calmoduline et calcineurine) a été rapportée dans différentes études.

6.3 Impact de ces travaux

6.3.1 La ménopause

À la puberté, les femmes ont un rythme cardiaque plus rapide au repos et un intervalle QT plus long que les hommes. Les résultats de plusieurs études démontrent que cette prolongation de l'intervalle QT favorise l'incidence de torsades de pointes lors de l'administration des médicaments susceptible de bloquer les canaux K^+ et de prolonger la repolarisation. Particulièrement, l'étude de plus de 3000 patients recevant du sotalol a révélé que les femmes avaient trois fois plus de risque que les hommes de développer cette arythmie.⁴³ Cette incidence d'arythmie n'est pas observée entre les femmes lorsqu'elles étaient séparées selon l'âge (supérieur à 15 ans) et la ménopause (pré- et post-ménopause).⁴³ Ce résultat suggère que l'intervalle QTc et la repolarisation ne pourraient pas être modulés par les hormones sexuelles féminines puisque des changements de ces derniers marquent l'adolescence et la ménopause. Or, il a été rapporté dans une étude faite chez 34000 femmes ménopausées que les femmes traitées aux œstrogènes présentent une prolongation significative de 2.5 ms de l'intervalle QTc comparativement au groupe témoin et de 1.6 ms comparativement au groupe sous hormonothérapie combinée (œstrogènes et progestérone).¹⁰¹ Bien que des différences significatives aient été rapportées suite au traitement aux œstrogènes, cette faible différence ne peut avoir une conséquence importante telle que l'induction des arythmies ventriculaires sévères de type torsades de pointes. Toutefois, il a été rapporté que le traitement aux œstrogènes des femmes ovariectomisées n'a aucun effet sur l'ECG. L'intervalle QTc ainsi que la repolarisation ventriculaire étaient non modifiés.¹⁶⁴ Ces observations concordent avec les données présentées dans cette thèse chez les souris ovariectomisées, ce modèle qui représente le milieu hormonal des femmes ovariectomisées ou ménopausées. En effet, dans notre étude, nous avons montré que les changements hormonaux chez les souris ovariectomisées induisent une augmentation du courant de repolarisation I_{to} . Par conséquent, se pourrait-il que ces hormones soient impliquées dans une modification de l'intervalle QTc? Nos données ont montré que les modifications de I_{to} n'affectent pas la durée du potentiel d'action et par la suite l'intervalle QTc et la repolarisation ventriculaire suggérant un rôle limité des œstrogènes dans ce phénomène. Cette augmentation du courants K^+ I_{to} et de $Kv4.3$ non associée à des

anomalies de l'intervalle QT ou de la durée du potentiel d'action a été aussi rapportée dans des modèles de souris présentant l'hypertrophie physiologique.¹⁶² Finalement, le risque de développer une maladie cardiovasculaire est plus élevé chez les femmes post-ménopausées comparativement aux femmes pré-ménopausées. D'où la présence d'un fort lien entre les hormones féminines et le développement des maladies cardiovasculaires chez les femmes. Définitivement, d'autres études sont requises dans ce contexte pour élucider le rôle exact des œstrogènes au niveau de la repolarisation et plus généralement de la santé du système cardiovasculaire.

6.3.2 Importance de l'étude de la régulation de la repolarisation auriculaire

Des études précédentes faites dans notre laboratoire par Brouillette et coll., montrent clairement que le canal sous-jacent à I_{Kur} , soit $Kv1.5$, est régulé par les androgènes.^{111;112} Puisque ce canal est présent à la fois au niveau des oreillettes des souris et des humains, il serait alors intéressant de vérifier s'il existe des différences mâle/femelle au niveau de la repolarisation auriculaire chez la souris. Si on suppose que le canal $Kv1.5$ est plus exprimé au niveau des oreillettes des souris mâles que des femelles et ceci comme dans le cas des ventricules, la repolarisation auriculaire serait plus rapide, les potentiels d'action seraient plus courts et les phénomènes de ré-entrées seront plus probables chez les mâles que chez les femelles. Cette hypothèse pourrait expliquer l'incidence plus élevée chez les hommes que chez les femmes (rapport de 2 :1). D'autre part, on vient de montrer que la grossesse, caractérisée par des niveaux élevés en œstrogènes, est associée à une augmentation de la fréquence cardiaque qui est un facteur de risque des arythmies. De plus, chez la femme la grossesse est associée à une augmentation de l'incidence des tachycardies supraventriculaires.¹³⁷ Ces observations laissent supposer que les hormones sexuelles pourraient affecter l'activité électrique auriculaire lors de la grossesse et jouer un rôle dans l'incidence accrue des arythmies supraventriculaires lors de la grossesse.

6.4 Perspectives

Les résultats obtenus lors de la caractérisation de la repolarisation ventriculaire dans des différents modèles de souris, ainsi que les données d'ECG que nous avons obtenus chez

les souris gestantes, suggèrent plusieurs pistes de recherche qui seraient intéressantes à explorer.

6.4.1 Suite des travaux sur l'effet aigu du 4OH-tamoxifène sur la repolarisation ventriculaire

Bien que plusieurs observations aient rapporté l'effet aigu du tamoxifène sur les courants K^+ cardiaques, cette étude est la première dans la caractérisation de l'effet du métabolite principal du tamoxifène, le 4OH-tamoxifène, sur la repolarisation ventriculaire. Les résultats présentés dans cette thèse démontrent clairement que comme dans le cas du tamoxifène, le 4OH-tamoxifène produit une inhibition des courants K^+ après un traitement à court terme. Dans cette étude, il était impossible de mesurer et d'enregistrer les potentiels d'action peut être suite à une inhibition des courants Na^+ . L'inhibition des courants Na^+ a été démontrée après application du tamoxifène, et alors il serait tout intéressant de vérifier si les courants Na^+ sont aussi diminués après l'application du 4OH-tamoxifène.

6.4.2 Suite des travaux sur l'effet chronique du tamoxifène sur la repolarisation ventriculaire

Les études présentées dans cette thèse révèlent les mécanismes d'action impliqués dans l'effet chronique du tamoxifène au niveau de la repolarisation cardiaque chez la souris et plus particulièrement au niveau des courants K^+ . De plus, elles guident les futures recherches sur ce sujet. Plus précisément, afin de confirmer que c'est l'effet antagoniste des récepteurs aux œstrogènes du tamoxifène et non pas une autre activité du tamoxifène qui induit une augmentation des densités des courants K^+ et des canaux sous-jacents, l'étude de l'effet chronique du tamoxifène chez des souris prétraitées avec un autre antagoniste oestrogénique pourraient donner des évidences additionnelles sur le rôle des récepteurs oestrogéniques.

D'autre part, puisque l'étude des différents modèles de souris et du cobaye a montré une augmentation des courants K^+ et de leurs canaux sous-jacents après un traitement chronique au tamoxifène, il serait intéressant de vérifier si ceci a un impact sur l'ECG. Ainsi, il serait intéressant de voir l'effet du tamoxifène sur les différents paramètres

électrocardiographiques. Une attention particulière pourrait notamment être portée sur l'effet du tamoxifène si l'intervalle QT est diminué ou non.

Bien que dans nos projets nous avons utilisé plusieurs modèles animaux, les données expérimentales obtenues avec la souris, le cobaye ou avec tout autre modèle animal sont difficilement extrapolées à l'humain. Toutefois, malgré leurs limitations, les modèles animaux demeurent supérieurs aux expériences chez l'humain pour les raisons qui suivent : la difficulté d'isoler des myocytes de bonne qualité et car les myocytes doivent provenir de la même chambre et de la même couche du cœur puisque les canaux K^+ ne sont pas exprimés de façon homogène dans les différentes parties du cœur. En plus de l'enregistrement des courants K^+ , il serait intéressant d'étudier l'expression protéique et les niveaux d'ARNm des sous-unités responsables des courants K^+ et en particulier, ceux de Kv4.3, Kv4.2 et de KChIP2. De plus, il serait fort intéressant de voir le profil électrocardiographique des femmes recevant à long terme le tamoxifène. La sélection des candidates devrait par contre être très rigoureuse et respecter plusieurs critères:

1. Il serait alors essentiel que les femmes témoins soient divisées en femmes en pré- et post-ménopause afin de déterminer les niveaux des œstrogènes.
2. Les femmes ne devraient pas souffrir de maladies cardiaques associées à des modifications dans la densité et l'expression de canaux K^+ .
3. Les femmes ne devraient pas être sous hormonothérapie.

Si ces conditions sont respectées, ceci constituerait une suite très intéressante aux effets chroniques du tamoxifène.

6.4.3 Suite des travaux sur l'effet des récepteurs oestrogéniques sur la repolarisation ventriculaire

L'utilisation des souris ERKO α et ERKO β représente un outil puissant pour étudier l'effet et la fonction de chacun de ces récepteurs individuellement sur la repolarisation ventriculaire. De plus, la possibilité d'avoir accès à des souris transgéniques double knockout RE α et RE β (dERKO) qui n'expriment ni l'un ni l'autre des récepteurs oestrogéniques constituerait une avenue intéressante afin d'approfondir encore davantage

les études qui visent à élucider le rôle exact des œstrogènes et des récepteurs œstrogéniques dans la régulation des canaux K^+ .

Il serait aussi tout particulièrement intéressant d'utiliser des souris ERKO (α ou β) mâles ou des souris ERKO (α ou β) femelles ovariectomisés. Ces deux modèles caractérisés par des niveaux bas en œstrogènes permettent de tester en même temps l'impact de l'absence des récepteurs œstrogéniques et de l'effet des œstrogènes sur les $RE\alpha/\beta$ sur les courants K^+ et spécifiquement sur I_{to} et ainsi dans la régulation hormonale de Kv4.3, Kv4.2 et KChIP2b.

6.4.3.1 Régulation cardiaque par les hormones sexuelles féminines: les œstrogènes

Bien que toutes nos études ont montré que les œstrogènes régulent à la baisse la densité des courants et l'expression des canaux K^+ , le traitement des souris ovariectomisées avec du 17β -œstradiol constitue une autre approche pour voir si les changements à long terme des niveaux en œstrogènes peuvent affecter la repolarisation ventriculaire.

6.4.3.2 Régulation cardiaque par les hormones sexuelles féminines: la progestérone

Le dévoilement d'une régulation de l'électrophysiologie cardiaque par les œstrogènes ouvre la porte à l'étude des effets d'une autre hormone sexuelle féminine, la progestérone. Tout récemment, une équipe a étudié l'effet aigu de la progestérone sur la repolarisation cardiaque chez les cobayes.¹¹⁴ Les auteurs ont rapporté que la progestérone induit une augmentation de I_{Ks} et une diminution de I_{CaL} et ceci via une voie non-génomique étant donné la rapidité des effets. Ils ont aussi suggéré que I_{CaL} est diminué par les œstrogènes et la progestérone alors que la progestérone active les courants K^+ et les œstrogènes les diminuent. Une étude faite chez des femmes atteintes du syndrome du LQT pendant les menstruations et en post-partum, deux périodes caractérisées par des bas niveaux de la progestérone, a rapporté une augmentation de l'incidence des événements arythmiques suggérant ainsi un rôle protecteur de la progestérone.⁴⁴ Une autre étude a montré que l'intervalle QT est similaire entre les femmes témoins et les femmes traitées à l'hormonothérapie combinée (HT œstrogène et progestérone) alors qu'il est prolongé chez les femmes traitées aux œstrogènes comparées aux femmes témoins et aux femmes traitées

à l'HT. Ces résultats suggèrent que la progestérone agit comme un antagoniste des effets oestrogéniques.¹⁰¹ En se basant sur ces différentes études qui mettent en évidence les effets opposés des œstrogènes et de la progestérone et le fait que leurs niveaux varient fortement pendant le cycle menstruel et pendant la grossesse, des études complémentaires sur les effets de la progestérone s'avèreraient intéressantes.

6.4.3.3 Régulation cardiaque par les hormones sexuelles féminines: courants ioniques autres que K⁺

Dans nos différentes études, nous avons montré que les courants K⁺ sont la cible des hormones sexuelles. Par contre, ces résultats n'excluent pas que d'autres courants ioniques qui jouent un rôle dans le potentiel d'action pourraient être affectés aussi par les hormones sexuelles. Plusieurs études dévoilent une régulation hormonale du courant calcique I_{CaL}. Bien que les résultats aient démontré que l'effet inotrope négatif des œstrogènes est une conséquence d'une inhibition des courants calciques voltage-dépendants de type L (I_{CaL}), les concentrations utilisées étaient supra-physiologiques, ce qui limite la portée de ces études.^{117;165} Des effets similaires ont été observés avec les modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes suggérant ainsi que cet effet réducteur est médié par les récepteurs oestrogéniques. Différentes études ont suggéré que le complexe œstrogène-récepteurs oestrogéniques est capable d'activer des voies de signalisation intracellulaires qui à leur tour vont inhiber I_{CaL} et diminuer la contractilité des cardiomyocytes. D'autres supposent que ce complexe va migrer vers le noyau où il agit comme facteur de transcription négatif pour I_{CaL}, alors que plusieurs études sont plus en faveur d'une diminution de la densité canal par les œstrogènes indépendamment de ses récepteurs. Ces différentes observations montrent que les mécanismes de l'activité oestrogénique sur I_{CaL} et par la suite sur la contractilité ne sont pas encore clairs et que la caractérisation des voies impliquées dans l'effet oestrogénique inotrope négatif est loin d'être complète. D'autre part, peu d'études ont clarifié l'effet des œstrogènes sur le courant Na⁺. Il a été suggéré que chez l'humain, le courant Na⁺ est plus important chez les femmes étant donné que le complexe QRS est plus court chez les femmes que chez les hommes.⁴¹ Ce qui est contradictoire avec d'autres études qui ont montré que le courant Na⁺ ne présentait pas de

différence mâle/femelle chez la souris.¹⁶⁶ Ici encore, d'autres études sont requises afin d'éclaircir ces différentes observations.

6.4.4 Suite des travaux sur la grossesse

6.4.4.1 Étude de l'influence de la grossesse sur l'automaticité et le nœud sinusal

Nos résultats montrent que la fréquence cardiaque est élevée chez les souris gestantes. Étant donné que l'augmentation de la fréquence cardiaque est considérée comme un facteur de risque pour le développement des arythmies cardiaques, il est important de comprendre si la grossesse pourrait avoir un impact sur les propriétés électrophysiologiques du nœud sinusal et du système de conduction. Ainsi, une étude qui examine les effets de la grossesse sur l'automaticité des cellules sinusales et les courants ioniques qui sous-tendent le fonctionnement du pacemaker cardiaque constituerait une excellente approche afin d'évaluer le rôle de cette augmentation importante des hormones sexuelles féminines dans ce phénomène. En fait, plusieurs études supportent le rôle des hormones dans l'automaticité cardiaque. Les études qui ont étudié les différences homme-femme au niveau du rythme cardiaque ont montré que les femmes ont un rythme sinusal de base plus élevé que les hommes^{41;91;92} et ceci persiste après le blocage du système nerveux autonome.¹⁶⁷ D'autres études ont aussi rapporté le rôle des hormones sexuelles dans l'induction de certains types d'arythmies. Une caractérisation plus détaillée du courant pacemaker cardiaque pourrait être intéressante afin d'expliquer l'augmentation de la fréquence cardiaque observée pendant la grossesse et par la suite l'augmentation de l'incidence des arythmies. De plus, il serait intéressant de déterminer la nature des hormones, dont la concentration varie énormément pendant la grossesse, qui est responsable des différences observées lors de cette période. Des travaux sont présentement en cours dans le laboratoire du Dr. Fiset sur ces sujets.¹⁶⁸

6.4.4.2 Étude de l'influence de la grossesse sur la repolarisation auriculaire

La grossesse est associée à une augmentation de l'incidence des tachycardies supraventriculaires. L'augmentation des hormones sexuelles lors de la grossesse pourrait affecter l'activité électrique cardiaque au niveau auriculaire. Et alors il serait important de

déterminer les mécanismes responsables des changements induits par la grossesse au niveau de la repolarisation auriculaire chez les souris femelles témoins, en fin de gestation et en post-partum. Des techniques d'électrophysiologie (la densité et la cinétique des courants) et de biologie moléculaire (l'expression de l'ARNm et des protéines) pourraient être combinées afin de comparer la repolarisation auriculaire entre ces différents groupes de souris femelles.

6.4.4.3 Caractérisation des souris en post-partum

Nos enregistrements d'ECG ont montré que les souris en post-partum et les souris non-gestantes présentent le même profil électrophysiologique. En fait, nous avons rapporté que, comme chez la femme, la fréquence cardiaque s'ajuste très vite et retourne aux valeurs témoins chez les souris en post-partum. Ainsi, essayer de comprendre ce retour extrêmement rapide de la fréquence cardiaque et la réversibilité des effets de la grossesse une fois que la souris ait mis bas serait très intéressant.

6.5 Mécanisme d'action des œstrogènes aigu versus chronique

L'originalité de nos études provient du fait que nous avons suivi l'impact des œstrogènes dans plusieurs modèles animaux et à différents niveaux de la repolarisation ventriculaire (moléculaire et cellulaire). Ainsi, dans tous les modèles utilisés, nous avons étudié les effets sur les potentiels d'action, les courants K^+ , l'expression protéique et d'ARNm des canaux K^+ . Bien qu'il y ait aussi d'autres modèles à étudier, ces différentes méthodes nous ont permis de différencier le mécanisme d'action aigu et chronique des œstrogènes.

Les études précédentes faites en aigu ont révélé que le mode d'action des œstrogènes ne se restreint pas aux effets des récepteurs oestrogéniques nucléaires et aux facteurs de transcription. En fait, les hormones stéroïdiennes peuvent agir au niveau des récepteurs oestrogéniques localisés au niveau de la membrane plasmique et ceci est mis en évidence par le complexe imperméable à la membrane: le 17β -œstradiol-BSA.⁷² Malgré l'imperméabilité de la membrane au complexe 17β -œstradiol-BSA, l'association de ce complexe à la membrane induit une réponse cellulaire rapide qui n'est pas observée suite à l'activation nucléaire. De plus, comme rapporté dans l'introduction, l'administration aiguë

du 17β -œstradiol chez différentes espèces animales réduit certains courants K^+ et prolonge la durée du potentiel d'action. Cette voie peut impliquer une liaison directe au canal et induire des effets aigus. Étant donné que ces effets sont rapides (quelques minutes), nous pouvons conclure qu'en aigu les œstrogènes agissent via une voie non-génomique qui ne nécessite pas la synthèse protéique. Ceci concorde avec nos résultats obtenus suite à l'étude de l'effet aigu du 4OH-tamoxifène sur les courants K^+ . On a montré que l'effet répressif du 4OH-tamoxifène sur les courants K^+ n'est pas modifié après perfusion avec l'antagoniste des récepteurs œstrogéniques, l'ICI-182,780, ou l'inhibiteur de la synthèse protéique, l'actinomycine D. En conclusion, nos résultats suggèrent une liaison directe du 4OH-tamoxifène au canal K^+ membranaire sans passer par les récepteurs œstrogéniques et les facteurs de transcription.

Par contre, notre étude chez les souris ovariectomisées a montré que l'absence des ovaires est associée à une augmentation de l'expression des canaux K^+ et de la densité des courants K^+ . De même, nos résultats obtenus suite à l'exposition chronique au tamoxifène montrent que l'inhibition des récepteurs œstrogéniques est capable de reproduire les effets de l'ovariectomie sur la repolarisation ventriculaire. En fait, l'effet à long terme du tamoxifène résulte en une augmentation significative des courants K^+ cardiaques associée à une augmentation de l'expression génomique des canaux K^+ sous-jacents. Étant donné la similarité des effets, ces deux études démontrent que l'effet œstrogénique passe par les récepteurs aux œstrogènes. De plus, l'augmentation de l'expression des canaux K^+ chez les ERKO suggère encore une fois que l'effet des œstrogènes se produit via les récepteurs œstrogéniques. Ainsi, l'absence des œstrogènes et des récepteurs œstrogéniques préviennent l'effet répressif des œstrogènes sur les canaux K^+ cardiaques. En d'autres termes, la présence des œstrogènes ou des récepteurs œstrogéniques est associée à une diminution de l'expression des canaux K^+ , réduction de la densité du courant et en conséquence un ralentissement de la repolarisation. En résumé, nos différentes études montrent que l'activation de la synthèse d'ARNm et la régulation de la production des protéines après une privation chronique des œstrogènes ou des récepteurs œstrogéniques sont observés suite à l'activation nucléaire et elle est une conséquence de l'activation de la machinerie transcriptionnelle et ainsi de la régulation de la transcription des gènes cibles.

La réalisation de ces travaux pourrait servir à orienter et à développer des stratégies thérapeutiques chez les femmes souffrant des problèmes cardiaques.

6.6 Commentaire final

Cette thèse a mené à des progrès dans la compréhension de la régulation hormonale de l'électrophysiologie cardiaque chez les femmes. L'avancement du savoir dans ce domaine aidera à développer des stratégies thérapeutiques améliorées chez les femmes.

Références

- (1) Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005;85:1205-1253.
- (2) Aehlert B. *ECGs made easy*. 2nd ed. St-Louis: 2002.
- (3) James AF, Choisy SC, Hancox JC. Recent advances in understanding sex differences in cardiac repolarization. *Prog Biophys Mol Biol* 2007.
- (4) Keating MT, Sanguinetti MC. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 2001;104:569-580.
- (5) Bers DM, Perez-Reyes E. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc Res* 1999;42:339-360.
- (6) Fabiato A, Fabiato F. Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol* 1979;41:473-484.
- (7) Tomaselli GF, Marban E. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999;42:270-283.
- (8) Oudit GY, Ramirez RJ, Backx PH. Voltage-regulated Potassium Channels. In: Zipes DP, Jalife J, eds. *Cardiac electrophysiology : from cell to bedside*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Inc; 2004;19-32.
- (9) Janse MJ. Historical vignette: The long QT syndrome and the sympathetic nerves. *Heart Rhythm* 2004;1:284.
- (10) Hohnloser SH, Singh BN. Proarrhythmia with class III antiarrhythmic drugs: definition, electrophysiologic mechanisms, incidence, predisposing factors, and clinical implications. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1995;6:920-936.
- (11) Soyka LF, Wirtz C, Spangenberg RB. Clinical safety profile of sotalol in patients with arrhythmias. *Am J Cardiol* 1990;65:74A-81A.
- (12) Hollister LE, Kosek JC. Sudden death during treatment with phenothiazine derivatives. *JAMA* 1965;192:1035-1038.
- (13) Giles TD, Modlin RK. Death associated with ventricular arrhythmia and thioridazine hydrochloride. *JAMA* 1968;205:108-110.
- (14) Monahan BP, Ferguson CL, Killeavy ES, Lloyd BK, Troy J, Cantilena LR, Jr. Torsades de pointes occurring in association with terfenadine use. *JAMA* 1990;264:2788-2790.
- (15) Roden DM, Viswanathan PC. Genetics of acquired long QT syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 2005;115:2025-2032.

- (16) Kannankeril P, Roden DM, Darbar D. Drug-induced long QT syndrome. *Pharmacol Rev* 2010;62:760-781.
- (17) Tester DJ, Ackerman MJ. Cardiomyopathic and channelopathic causes of sudden unexplained death in infants and children. *Annu Rev Med* 2009;60:69-84.
- (18) Moss AJ. Measurement of the QT interval and the risk associated with QTc interval prolongation: A review. *American Journal of Cardiology* 1993;72:23B-25B.
- (19) Roden DM, Spooner PM. Inherited long QT syndromes: a paradigm for understanding arrhythmogenesis. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1999;10:1664-1683.
- (20) Dessertenne F. La tachycardie ventriculaire à deux foyers opposés variables. *Archives des maladies du coeur* 1966;2:263-272.
- (21) Viskin S, Alla SR, Barron HV et al. Mode of Onset of Torsade de Pointes in Congenital Long QT Syndrom. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:1262-1268.
- (22) Darbar D, Kimbrough J, Jawaid A, McCray R, Ritchie MD, Roden DM. Persistent atrial fibrillation is associated with reduced risk of torsades de pointes in patients with drug-induced long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:836-842.
- (23) Bednar MM, Harrigan EP, Anziano RJ, Camm AJ, Ruskin JN. The QT interval. *Prog Cardiovasc Dis* 2001;43:1-45.
- (24) Roden DM. Drug-Induced Prolongation of the QT interval. *N Engl J Med* 2004;350:1013-1022.
- (25) Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 2000;525:285-298.
- (26) Snyders DJ. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 1999;42:377-390.
- (27) Tamargo J, Caballero R, Gomez R, Valenzuela C, Delpon E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 2004;62:9-33.
- (28) Majumder K, De BM, Wang Z, Wible BA. Molecular cloning and functional expression of a novel potassium channel beta-subunit from human atrium. *FEBS Letters* 1995;361:13-16.
- (29) Rosati B, Pan Z, Lypen S et al. Regulation of KChIP2 potassium channel {beta} subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol (Lond)* 2001;533:119-125.

- (30) Kuo HC, Cheng CF, Clark RB et al. A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KCHIP2) gene leads to a complete loss of I_{to} and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 2001;107:801-813.
- (31) Fiset C, Clark RB, Larsen TS, Giles WR. A rapidly activating sustained K^+ current modulates repolarization and excitation-contraction coupling in adult mouse ventricle. *J Physiol* 1997;504:557-563.
- (32) Rivard K, Trépanier-Boulay V, Rindt H, Fiset C. Electrical remodeling in a transgenic mouse model of α 1B-adrenergic receptor overexpression. *Am J Physiol* 2009;296:H704-H718.
- (33) Rivard K, Paradis P, Nemer M, Fiset C. Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor causes delayed repolarization. *Cardiovasc Res* 2008;78:53-62.
- (34) Dierich A, Sairam MR, Monaco L et al. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling *in vivo*: Targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:13612-13617.
- (35) Karas RH, Schulen H, Pare G et al. Effects of estrogen on the vascular injury response in estrogen receptor α, β (double) knockout mice. *Circ Res* 2001;89:534-539.
- (36) Li GR, Feng J, Wang Z, Fermini B, Nattel S. Adrenergic Modulation of Ultrarapid Delayed Rectifier K^+ Current in Human Atrial Myocytes. *Circ Res* 1996;78:903-915.
- (37) Vaissaire J-P. *Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoire*. Paris: Imprimerie de Compiègne, 1977.
- (38) Lizotte E, Grandy SA, Tremblay A, Allen BG, Fiset C. Expression, distribution and regulation of sex steroid hormone receptors in mouse heart. *Cell Physiol Biochem* 2009;23:75-86.
- (39) Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C. Functional properties of K^+ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 2004;559:777-798.
- (40) Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C et al. Risk Stratification in the Long-QT Syndrom. *New Engl J Med* 2003;348:1866-1874.
- (41) Rautaharju PM, Zhou SH, Wong S et al. Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Can J Cardiol* 1992;8:690-695.
- (42) Arya A. Gender-related differences in ventricular repolarization: beyond gonadal steroids. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2005;16:525-527.

- (43) Lehmann MH, Hardy S, Archibald D, Quart B, MacNeil DJ. Sex difference in risk of torsade de pointes with *d,l*-sotalol. *Circulation* 1996;94:2534-2541.
- (44) Seth R, Moss AJ, McNitt S et al. Long QT syndrome and pregnancy. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1092-1098.
- (45) Ling S, Komesaroff P, Sudhir K. Cellular mechanisms underlying the cardiovascular actions of oestrogens. *Clin Sci (Lond)* 2006;111:107-118.
- (46) Couse JF, Korach KS. Exploring the role of sex steroids through studies of receptor deficient mice. *Journal of Molecular Medicine* 1998;76:497-511.
- (47) Gerhard M, Walsh BW, Tawakol A et al. Estradiol therapy combined with progesterone and endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women. *Circulation* 1998;98:1158-1163.
- (48) Jovanovic A, Jovanovic S. Estrogen and vascular system: more questions for the future. *Cardiovasc Res* 1999;42:9-11.
- (49) Saleh TM, Connell BJ. Centrally mediated effect of 17beta-estradiol on parasympathetic tone in male rats. *Am J Physiol* 1999;276:R474-R481.
- (50) Vidal O, Lindberg MK, Hollberg K et al. Estrogen receptor specificity in the regulation of skeletal growth and maturation in male mice. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:5474-5479.
- (51) Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:5925-5930.
- (52) Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 2005;307:1625-1630.
- (53) Babiker FA, De Windt LJ, van Eickels M, Grohe C, Meyer R, Doevendans PA. Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function. *Cardiovasc Res* 2002;53:709-719.
- (54) Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR, Jr., Bland KI. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* 2002;16:70-84.
- (55) Hewitt SC, Korach KS. Estrogen receptors: structure, mechanisms and function. *Rev Endocr Metab Disord* 2002;3:193-200.
- (56) Cowley SM, Parker MG. A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69:165-175.

- (57) Hall JM, McDonnell DP, Korach KS. Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements. *Mol Endocrinol* 2002;16:469-486.
- (58) Billon-Gales A, Fontaine C, Douin-Echinard V et al. Endothelial estrogen receptor-alpha plays a crucial role in the atheroprotective action of 17beta-estradiol in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 2009;120:2567-2576.
- (59) Hess RA, Fernandes SA, Gomes GR, Oliveira CA, Lazari MF, Porto CS. Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. *J Androl* 2011;32:600-613.
- (60) Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 1999;13:307-319.
- (61) Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene GL, Levin ER. Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol Endocrinol* 2004;18:2854-2865.
- (62) Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med* 2006;27:299-402.
- (63) Marino M, Ascenzi P. Steroid hormone rapid signaling: the pivotal role of S-palmitoylation. *IUBMB Life* 2006;58:716-719.
- (64) Le RM, Treilleux I, Leconte N et al. Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell* 2008;31:212-221.
- (65) Galluzzo P, Caiazza F, Moreno S, Marino M. Role of ERbeta palmitoylation in the inhibition of human colon cancer cell proliferation. *Endocr Relat Cancer* 2007;14:153-167.
- (66) Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;346:904-910.
- (67) Spary EJ, Maqbool A, Batten TF. Oestrogen receptors in the central nervous system and evidence for their role in the control of cardiovascular function. *J Chem Neuroanat* 2009;38:185-196.
- (68) Brailoiu E, Dun SL, Brailoiu GC et al. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol* 2007;193:311-321.

- (69) Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 2000;6:225-236.
- (70) Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 2005;19:833-842.
- (71) Litwack G, Schmidt TJ. Biochemistry of hormones II: Steroid hormone. In: Devlin TM, ed. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. 4th ed. New York: Wiley-Liss; 1997;893-918.
- (72) Russell KS, Haynes MP, Sinha D, Clerisme E, Bender JR. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:5930-5935.
- (73) Migliaccio S, Newbold RR, Bullock BC et al. Alterations of maternal estrogen levels during gestation affect the skeleton of female offspring. *Endocrinology* 1996;137:2118-2125.
- (74) Endoh H, Sasaki H, Maruyama K et al. Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:99-102.
- (75) Morley P, Whitfield JF, Vanderhyden BC, Tsang BK, Schwartz JL. A new nongenomic estrogen action: The rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology* 1992;131:1305-1312.
- (76) Jacobi JS, Martin C, Nava G, Jeziorski MC, Clapp C, Martinez dE. 17-Beta-estradiol directly regulates the expression of adrenergic receptors and kisspeptin/GPR54 system in GT1-7 GnRH neurons. *Neuroendocrinology* 2007;86:260-269.
- (77) Taylor AH, Al-Azzawi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *Journal of Molecular Endocrinology* 2000;24:145-155.
- (78) Grohé C, Kahlert S, Löbbert K et al. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Letters* 1997;416:107-112.
- (79) Song M, Helguera G, Eghbali M et al. Remodeling of Kv4.3 potassium channel gene expression under the control of sex hormones. *J Biol Chem* 2001;276:31883-31890.
- (80) Kim H, Laing M, Muller W. c-Src-null mice exhibit defects in normal mammary gland development and ERalpha signaling. *Oncogene* 2005;24:5629-5636.
- (81) Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A et al. PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J* 2001;20:6050-6059.

- (82) Booz GW. Putting the brakes on cardiac hypertrophy: exploiting the NO-cGMP counter-regulatory system. *Hypertension* 2005;45:341-346.
- (83) Jankowski M, Rachelska G, Donghao W, McCann SM, Gutkowska J. Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:11765-11770.
- (84) Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:5212-5216.
- (85) Dorn GW, Force T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 2005;115:527-537.
- (86) Molkenin JD. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res* 2004;63:467-475.
- (87) Bazett H. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart* 1920;7:353-370.
- (88) Makkar RR, Fromm BS, Steinman RT, Meissner MD, Lehmann MH. Female gender as a risk factor for torsades de pointes associated with cardiovascular drugs. *JAMA* 1993;270:2590-2597.
- (89) Eghbali M, Wang Y, Toro L, Stefani E. Heart hypertrophy during pregnancy: a better functioning heart? *Trends Cardiovasc Med* 2006;16:285-291.
- (90) Ruizeveld de Winter JA, Trapman J, Vermey M, Mulder E, Zegers ND, Van der Kwast TH. Androgen receptor expression in human tissues: an immunohistochemical study. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1991;7:927-936.
- (91) Larsen JA, Kadish AH. Effects of gender on cardiac arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;9:655-664.
- (92) Wolbrette D, Patel H. Arrhythmias and women. *Curr Opin Cardiol* 1999;14:36-43.
- (93) Peters RW, Gold MR. The influence of gender on arrhythmias. *Cardiol Rev* 2004;12:97-105.
- (94) Burke JH, Goldberger JJ, Ehlert FA, Kruse JT, Parker MA, Kadish AH. Gender differences in heart rate before and after autonomic blockade: Evidence against an intrinsic gender effect. *The American Journal of Medicine* 1996;100:537-543.
- (95) Charbit B, Christin-Maitre S, Demolis JL, Soustre E, Young J, Funck-Brentano C. Effects of testosterone on ventricular repolarization in hypogonadic men. *Am J Cardiol* 2009;103:887-890.

- (96) Bigi MA, Aslani A, Aslani A. Short QT interval: A novel predictor of androgen abuse in strength trained athletes. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2009;14:35-39.
- (97) Stolt A, Karila T, Viitasalo M, Mäntysaari M, Kujala UM, Karjalainen J. QT interval and QT dispersion in endurance athletes and in power athletes using large doses of anabolic steroids. *American Journal of Cardiology* 1999;84:364-366.
- (98) Vrtovec B, Meden-Vrtovec H, Jensterle M, Radovancevic B. Testosterone-related shortening of QTc interval in women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest* 2008;31:653-655.
- (99) Nakagawa M, Ooie T, Takahashi N et al. Influence of menstrual cycle on QT interval dynamics. *Pacing Clin Electrophysiol* 2006;29:607-613.
- (100) Bidoggia H, Maciel JP, Capalozza N et al. Sex-dependent electrocardiographic pattern of cardiac repolarization. *Am Heart J* 2000;140:430-436.
- (101) Kadish AH, Greenland P, Limacher MC, Frishman WH, Daugherty SA, Schwartz JB. Estrogen and progestin use and the QT interval in postmenopausal women. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2004;9:366-374.
- (102) Rodriguez I, Kilborn MJ, Liu XK, Pezzullo JC, Woosley RL. Drug-induced QT prolongation in women during the menstrual cycle. *JAMA* 2001;285:1322-1326.
- (103) Burke JH, Ehlert FA, Kruse JT, Parker MA, Goldberger JJ, Kadish AH. Gender-specific differences in the QT interval and the effect of autonomic tone and menstrual cycle in healthy adults. *American Journal of Cardiology* 1997;79:178-181.
- (104) Bai CX, Kurokawa J, Tamagawa M, Nakaya H, Furukawa T. Nontranscriptional regulation of cardiac repolarization currents by testosterone. *Circulation* 2005;112:1701-1710.
- (105) Ridley JM, Shuba YM, James AF, Hancox JC. Modulation by testosterone of an endogenous hERG potassium channel current. *J Physiol Pharmacol* 2008;59:395-407.
- (106) Shuba YM, Degtiar VE, Osipenko VN, Naidenov VG, Woosley RL. Testosterone-mediated modulation of HERG blockade by proarrhythmic agents. *Biochemical Pharmacology* 2001;62:41-49.
- (107) Pham T, Sosunov E, Gainullin R, Danilo P, Rosen M. Impact of sex and gonadal steroids on prolongation of ventricular repolarization and arrhythmias induced by I_K-blocking drugs. *Circulation* 2001;103:2207-2212.

- (108) Liu XK, Katchman A, Whitfield BH et al. In vivo androgen treatment shortens the QT interval and increases the densities of inward and delayed rectifier potassium currents in orchietomized male rabbits. *Cardiovasc Res* 2003;57:28-36.
- (109) Hara M, Danilo PJr, Rosen MR. Effects of gonadal steroids on ventricular repolarization and on the response to E4031. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;285:1068-1072.
- (110) Fulop L, Banyasz T, Szabo G et al. Effects of sex hormones on ECG parameters and expression of cardiac ion channels in dogs. *Acta Physiol (Oxf)* 2006;188:163-171.
- (111) Brouillette J, Trepanier-Boulay V, Fiset C. Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *J Physiol* 2003;546:403-413.
- (112) Brouillette J, Rivard K, Lizotte E, Fiset C. Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens. *Cardiovasc Res* 2005;65:148-157.
- (113) Philp KL, Hart G, Coker SJ. A gender-independent proarrhythmic action of 17beta-estradiol in anaesthetized rabbits. *Eur J Pharmacol* 2007;575:113-121.
- (114) Kurokawa J, Tamagawa M, Harada N et al. Acute effects of oestrogen on the guinea pig and human IKr channels and drug-induced prolongation of cardiac repolarization. *J Physiol* 2008;586:2961-2973.
- (115) Berger F, Borchard U, Hafner D, Pütz I, Weis TM. Effects of 17β-estradiol on action potential and ionic currents in male rat ventricular myocytes. *Naun Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1997;356:788-796.
- (116) Jiang C, Poole-Wilson PA, Sarrel PM, Mochizuki S, Collins P, Macleod KT. Effect of 17 beta-oestradiol on contraction, Ca²⁺ current and intracellular free Ca²⁺ in guinea-pig isolated cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* 1992;106:739-745.
- (117) Berger F, Borchard U, Hafner D, Putz I, Weis TM. Effects of 17beta-estradiol on action potentials and ionic currents in male rat ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997;356:788-796.
- (118) Philp KL, Hussain M, Byrne NF, Diver MJ, Hart G, Coker SJ. Greater antiarrhythmic activity of acute 17beta-estradiol in female than male anaesthetized rats: correlation with Ca²⁺ channel blockade. *Br J Pharmacol* 2006;149:233-242.
- (119) Boyle MB, MacLusky NJ, Naftolin F, Kaczmarek LK. Hormonal regulation of K⁺ channel messenger RNA in rat myometrium during oestrus cycle and in pregnancy. *Nature* 1987;330:373-375.

- (120) Erulkar SD, Rendt J, Nori RD, Ger B. The influence of 17β -oestradiol on K^+ currents in smooth muscle cells isolated from immature rat uterus. *Proceeding of Royal Society of London* 1994;B:59-65.
- (121) Drici MD, Burklow TR, Haridasse V, Glazer RI, Woosley RL. Sex hormones prolong the QT interval and downregulate potassium channel expression in the rabbit heart. *Circ Res* 1996;94:1471-1474.
- (122) Eghbali M, Deva R, Alioua A et al. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res* 2005;96:1208-1216.
- (123) Saito T, Ciobotaru A, Bopassa JC, Toro L, Stefani E, Eghbali M. Estrogen contributes to gender differences in mouse ventricular repolarization. *Circ Res* 2009;105:343-352.
- (124) Johnson BD, Zheng W, Korach KS, Scheuer T, Catterall WA, Rubanyi GM. Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice. *J Gen Physiol* 1997;110:135-140.
- (125) Ullrich ND, Krust A, Collins P, Macleod KT. Genomic deletion of estrogen receptors ERalpha and ERbeta does not alter estrogen-mediated inhibition of Ca^{2+} influx and contraction in murine cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H2421-H2427.
- (126) Lim YC, Desta Z, Flockhart DA, Skaar TC. Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;55:471-478.
- (127) Johnson MD, Zuo H, Lee KH et al. Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 2004;85:151-159.
- (128) Jordan VC. Overview from the International Conference on Long-Term Tamoxifen Therapy for Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:231-234.
- (129) Park WC, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators (SERMS) and their roles in breast cancer prevention. *Trends Mol Med* 2002;8:82-88.
- (130) Winer EP, Hudis C, Burstein HJ et al. American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2002. *J Clin Oncol* 2002;20:3317-3327.
- (131) Coezy E, Borgna JL, Rochefort H. Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. *Cancer Res* 1982;42:317-323.

- (132) Katzenellenbogen BS, Norman MJ, Eckert RL, Peltz SW, Mangel WF. Bioactivities, estrogen receptor interactions, and plasminogen activator-inducing activities of tamoxifen and hydroxy-tamoxifen isomers in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 1984;44:112-119.
- (133) Furr BJ, Jordan VC. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacol Ther* 1984;25:127-205.
- (134) He J, Kargacin ME, Kargacin GJ, Ward CA. Tamoxifen inhibits Na⁺ and K⁺ currents in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H661-H668.
- (135) Pollack IF, DaRosso RC, Robertson PL et al. A phase I study of high-dose tamoxifen for the treatment of refractory malignant gliomas of childhood. *Clin Cancer Res* 1997;3:1109-1115.
- (136) Trump DL, Smith DC, Ellis PG et al. High-dose oral tamoxifen, a potential multidrug-resistance-reversal agent: phase I trial in combination with vinblastine. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1811-1816.
- (137) Adamson DL, Nelson-Piercy C. Managing palpitations and arrhythmias during pregnancy. *Heart* 2007;93:1630-1636.
- (138) Gowda RM, Khan IA, Mehta NJ, Vasavada BC, Sacchi TJ. Cardiac arrhythmias in pregnancy: clinical and therapeutic considerations. *Int J Cardiol* 2003;88:129-133.
- (139) Speranza G, Verlato G, Albiero A. Autonomic changes during pregnancy: Assessment by spectral heart rate variability analysis. *J Electrocardiol* 1998;31:101-109.
- (140) Tawam M, Levine J, Mendelson M, Goldberger J, Dyer A, Kadish A. Effect of pregnancy on paroxysmal supraventricular tachycardia. *Am J Cardiol* 1993;72:838-840.
- (141) Wolbrette D. Treatment of arrhythmias during pregnancy. *Curr Womens Health Rep* 2003;3:135-139.
- (142) Wolbrette D, Naccarelli G, Curtis A, Lehmann M, Kadish A. Gender differences in arrhythmias. *Clin Cardiol* 2002;25:49-56.
- (143) Saba S, Shusterman V, Usiene I, London B. Cardiac autonomic modulation by estrogen in female mice undergoing ambulatory monitoring and in vivo electrophysiologic testing. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2004;9:142-148.
- (144) Hunter S, Robson SC. Adaptation of the maternal heart in pregnancy. *British Heart Journal* 1992;68:540-543.

- (145) San-Frutos L, Engels V, Zapardiel I et al. Hemodynamic changes during pregnancy and postpartum: a prospective study using thoracic electrical bioimpedance. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011.
- (146) Stein PK, Hagley MT, Cole PL, Domitrovich PP, Kleiger RE, Rottman JN. Changes in 24-hour heart rate variability during normal pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1999;180:978-985.
- (147) Thornburg KL, Jacobson SL, Giraud GD, Morton MJ. Hemodynamic changes in pregnancy. *Semin Perinatol* 2000;24:11-14.
- (148) Best L. Inhibition of glucose-induced electrical activity by 4-hydroxytamoxifen in rat pancreatic beta-cells. *Cell Signal* 2002;14:69-73.
- (149) Diaz M. Triphenylethylene antiestrogen-induced acute relaxation of mouse duodenal muscle. Possible involvement of Ca²⁺ channels. *Eur J Pharmacol* 2002;445:257-266.
- (150) El Gebeily G, Fiset C. 4-Hydroxytamoxifen inhibits K⁺ currents in mouse ventricular myocytes. *European Journal of Pharmacology* 2010;629:96-103.
- (151) Saba S, Zhu W, Aronovitz MJ et al. Effects of estrogen on cardiac electrophysiology in female mice. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2002;13:276-280.
- (152) Kobayashi T, Yamada Y, Nagashima M et al. Contribution of KChip2 to the developmental increase in transient outward current of rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:1073-1082.
- (153) Shimoni Y, Fiset C, Clark RB, Dixon JE, McKinnon D, Giles WR. Thyroid hormone regulates postnatal expression of transient K⁺ channel isoforms in rat ventricle. *J Physiol* 1997;500.1:65-73.
- (154) Rozanski GJ, Xu Z. Sulfhydryl modulation of K⁺ channels in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:1623-1632.
- (155) Eghbali M, Deva R, Alioua A et al. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res* 2005;96:1208-1216.
- (156) Dart AM, Du XJ, Kingwell BA. Gender, sex hormones and autonomic nervous control of the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2002;53:678-687.
- (157) 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.
- (158) Mayet J, Shahi M, McGrath K et al. Left ventricular hypertrophy and QT dispersion in hypertension. *Hypertension* 1996;28:791-796.

- (159) McIntyre H, Fry CH. Abnormal action potential conduction in isolated human hypertrophied left ventricular myocardium. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1997;8:887-894.
- (160) Biffi A, Maron BJ, Di GB et al. Relation between training-induced left ventricular hypertrophy and risk for ventricular tachyarrhythmias in elite athletes. *Am J Cardiol* 2008;101:1792-1795.
- (161) Marionneau C, Brunet S, Flagg TP, Pilgram TK, Demolombe S, Nerbonne JM. Distinct cellular and molecular mechanisms underlie functional remodeling of repolarizing K⁺ currents with left ventricular hypertrophy. *Circ Res* 2008;102:1406-1415.
- (162) Yang KC, Foeger NC, Marionneau C, Jay PY, McMullen JR, Nerbonne JM. Homeostatic regulation of electrical excitability in physiological cardiac hypertrophy. *J Physiol* 2010;588:5015-5032.
- (163) Rodgers BD, Interlichia JP, Garikipati DK et al. Myostatin represses physiological hypertrophy of the heart and excitation-contraction coupling. *The Journal of Physiology* 2009;587:4873-4886.
- (164) Siniscalchi M, De FP, Palomba S et al. Effects of surgical menopause and estrogen replacement therapy on atrio-ventricular conduction and ventricular repolarization. *Maturitas* 2001;40:47-51.
- (165) Jiang C, Sarrel PM, Poole-Wilson PA, Collins P. Effect of 17 β -oestradiol on contraction, Ca²⁺ current and intracellular free Ca²⁺ in guinea-pig isolated cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* 1992;263:H271-H275.
- (166) Trépanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res* 2001;89:437-444.
- (167) Ng AV, Callister R, Johnson DG, Seals DR. Age and gender influence muscle sympathetic nerve activity at rest in healthy humans. *Hypertension* 1993;21:498-503.
- (168) El Khoury N, Mathieu S, Marger L, Ross J, El Gebeily G, Ethier N, Fiset C. Upregulation of the hyperpolarization activated current increases pacemaker activity of the sino-atrial node and heart rate during pregnancy in mice. *Circulation* 2013;127(20):2009-20.

