

Université de Montréal

**Localisation souscellulaire des récepteurs aux hormones
sexuelles stéroïdiennes dans le coeur de souris**

par
Éric Lizotte

Université de Montréal
Faculté de Pharmacie
Institut de Cardiologie de Montréal

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
En Sciences Pharmaceutiques

Janvier 2005



© Eric Lizotte, 2005

QV
705
U58
2005
v.009

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Identification du Jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Localisation souscellulaire des récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes dans le coeur de souris

Présenté par
Eric Lizotte

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Céline Fiset	Directrice de recherche
Dr Marc Servant	Président-rapporteur
Dr Bruce G. Allen	Membre du jury



Lorsque l'on a écarté tous les impossibles, on doit constater ce qui reste, aussi invraisemblable que cela puisse nous sembler, là se trouvera la vérité.

Sir Arthur Conan Doyle

Résumé

Le taux de maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension et l'athérosclérose est plus élevé chez les hommes que chez les femmes. Par contre, cette différence s'estompe, lors de la ménopause. Dans la littérature, on retrouve des preuves menant à l'implication des hormones sexuelles (ex: oestrogènes, androgènes et progestérones) dans ces différences.¹ Récemment dans le laboratoire du Dr. Fiset, Trépanier et coll. ont démontré une différence marquée entre les souris mâles et femelles au niveau de la repolarisation ventriculaire.² De plus, Brouillette et coll. ont évalué le rôle des androgènes et de la castration dans la repolarisation cardiaque. Afin de déterminer l'implication des hormones sexuelles dans les maladies cardiovasculaires, il est primordial d'étudier si celles-ci agissent au niveau cardiaque. Sachant que l'effet des hormones est médié par une liaison à leurs récepteurs, nous avons déterminé si ces récepteurs étaient présent au niveau du ventricule de souris. Ces récepteurs peuvent se retrouver au niveau du sarcolemme, du cytosol ou bien au niveau du noyau.³ Cette distribution souscellulaire peut varier selon les différents tissus.⁴ Récemment Grohé et coll. ont démontré la présence des récepteurs aux oestrogènes (ER α et ER β) dans les ventricules de rat.⁵

Premièrement, nous avons démontré l'enrichissement des différentes fractions protéiques (totale, cytosolique, membranes totales, sarcolemmale et nucléaire) obtenues avec deux techniques d'isolation protéiques. Nous avons utilisé des marqueurs spécifiques pour différents organelles cellulaires (Na⁺/K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase, G-6-PDH, GRP (Bip) 78, Nuc P62). La seule contamination constatée a été dans la fraction

sarcolemmale où nous avons noté la présence de réticulum sarcoplasmique a été observé. Ensuite nous avons procédé à la localisation souscellulaire des récepteurs pour : les oestrogènes ($ER\alpha$ et $ER\beta$), les androgènes (AR) et la progestérone (PgR-A et PgR-B) dans le ventricule de souris. $ER\alpha$ est localisé au niveau du sarcolemme, du noyau et très peu dans le cytosol. La localisation de $ER\beta$ est partagée entre le cytosol et le noyau tout comme AR. Pour ce qui est de PgR-A et PgR-B, ils sont principalement situés dans le cytosol. Nous avons ensuite évalué la localisation souscellulaire dans les oreillettes de souris. Nous avons remarqué que la localisation dans les oreillettes est semblable entre les ventricules et les oreillettes mais que le niveau d'expression des différents récepteurs varient. $ER\alpha$, AR et PgR-A est plus élevé dans les ventricules par contre PgR-B est plus élevé dans les oreillettes tandis que l'expression de $ER\beta$ est similaire entre les ventricules et les oreillettes de souris.

Finalement nous avons évalué l'effet de l'ovarectomie sur les niveaux d'expression des différents récepteurs. Six semaines post-ovarectomie, il y a une augmentation du niveau d'expression de $ER\alpha$ (sarcolemmal) et de PgR-A (cytosolique) tandis que $ER\beta$ et AR ne sont pas affectés. Finalement les niveaux d'expression de ces différents récepteurs ne varient pas dans les oreillettes contrairement aux ventricules. Ces résultats suggèrent donc que même si ces récepteurs sont présent autant chez l'homme que la femme, la capacité des cellules cardiaques à répondre à une variation hormonale diffère entre les hommes et les femmes ce qui pourrait influencer les fonctions cardiaques et contribuer aux différences d'incidence des maladies cardiovasculaires.

Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) are the principal cause of death in Western society. Sex steroid hormones (SSH) affect the cardiovascular system. In fact the incidence of CVD is lower in premenopausal women than in men. However, after menopause, this gender difference is lost where the incidence of CVD in these women reaches that of men.¹ The SSH play their roles via interactions with their specific receptors. The expression level and subcellular distribution of the SSH receptors (SSHR) can differ between tissues.⁴ We have examined the expression and subcellular localization of estrogen ($ER\alpha$, $ER\beta$), progesterone (PR-a, PR-b) and androgen (AR) receptors in the mouse heart.

Following two protein isolation techniques, mouse ventricles and atria were resolved into different protein fractions (total, cytosolic, total membranes, sarcolemmal and nuclear). The subcellular localization of the SSH receptors (SSHR) was determined in these fractions by Western Blot analysis. $ER\alpha$ and AR immunoreactivity was most abundant in the sarcolemmal and cytosolic fraction respectively and to a lesser extent in the nuclear fraction. $ER\beta$ was found in both the cytosolic and nuclear fractions whereas PR-a and PR-b were localized almost exclusively in the cytosolic fraction with only minimal expression in the nuclear fraction. There was no gender-based difference in the level of expression of the different SSHR studied. In the atrium, the expression levels of $ER\alpha$, AR and PR-a were lower than the expression levels in the ventricle whereas the expression levels of $ER\beta$ and PR-b were similar between both chambers. The results show that SSHR have a different subcellular localization, that they are present in both

the mouse atria and ventricle and that the expression levels of ER α , AR and PR-a are lower in the atria compared to the ventricle. These findings support an implication of SSH in the gender-based difference in cardiovascular diseases.

Rôle spécifique

Dans ces travaux j'ai été responsable de l'isolation des différentes fractions protéiques et de la réalisation des essais enzymatiques sur ces fractions protéiques. J'ai aussi réalisé les immunobuvardages des récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes sur ces différentes fractions protéiques. J'ai pratiqué la chirurgie sur les souris femelles (ovarectomie) et produit les différentes figures nécessaires pour les manuscrits. Finalement j'ai rédigé les deux manuscrit intitulé "*Subcellular localization of sex steroid hormone receptors in the mouse heart*" ainsi que "*Isolation and characterization of subcellular protein fractions from mouse heart*".

Le Dr. Céline Fiset a supervisé les différentes étapes de cette étude. Elle fut responsable de l'écriture des manuscrits dans leurs formes finales qui sont soumis pour publication dans la revue *Cardiovascular Research* et *Analytical Biochemistry* respectivement.

Dans l'article intitulé "*Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization : importance of androgens*" qui est présenté en annexe, j'ai réalisé les électrocardiogrammes et les immunobuvardages sur les souris mâles C57BL/6 avec/sans traitement de remplacement à la DHT. J'ai aussi participé à la rédaction du manuscrit.

Remerciements

J'aimerais remercier ma directrice de recherche Dr. Céline Fiset pour m'avoir permis de réaliser cette étude et participer à d'autres projets. Elle a su être présente pour orienter mes projets et être une oreille attentive. J'aimerais aussi remercier les membres du laboratoire pour leur aide et leur soutien soit Judith Brouillette, Annie Tremblay, Chantale St-Michel et Véronique Trépanier-Boulay.

Je voudrais remercier les membres de mon comité aviseur, le Dr. Bruce G. Allen et le Dr. Eric Thorin, pour m'avoir aidé avec leurs appuis scientifiques et leurs conseils techniques. De plus, j'aimerais aussi remercier Benoit Boivin pour ces conseils lors de l'isolation de fractions protéiques nucléaires ainsi que Marc-Antoine Gillis pour les conseils techniques de chirurgie sur les souris.

Je tiens à remercier mes amies pour leurs intérêts dans mes recherches. Ils ont été une source de compréhension et de soutien moral tout au long de ma maîtrise.

Finalement, j'aimerais remercier mes parents qui ont toujours su être présent lorsque j'en avais besoin. Ils ont été une source d'inspiration et de détermination pour continuer mes études jusqu'à ce jour. C'est donc pour ces raisons que je voudrais leur dédier ce mémoire.

Table des matières

IDENTIFICATION DU JURY	II
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	VI
RÔLE SPÉCIFIQUE	VIII
REMERCIEMENTS.....	IX
TABLE DES MATIÈRES	X
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	XIII
INTRODUCTION	17
MALADIES CARDIOVASCULAIRES	18
<i>Incidence des maladies cardiovasculaires.....</i>	<i>18</i>
<i>Électrophysiologie.....</i>	<i>19</i>
<i>Arythmies</i>	<i>22</i>
INFLUENCE HORMONALE	25
<i>Synthèse des hormones sexuelles stéroïdiennes.....</i>	<i>25</i>
<i>Rôle des hormones sexuelles stéroïdiennes</i>	<i>27</i>
<i>Ménopause.....</i>	<i>29</i>
<i>Remplacement hormonal</i>	<i>30</i>
<i>Controverse</i>	<i>33</i>
RÉCEPTEURS HORMONAUX.....	36
<i>Structure</i>	<i>36</i>
<i>Localisation tissulaire</i>	<i>38</i>
<i>Domaines.....</i>	<i>40</i>
<i>Mécanisme d'action.....</i>	<i>45</i>
EFFETS GÉNOMIQUES ET NON-GÉNOMIQUES	48
<i>Effet génomique</i>	<i>48</i>
<i>Effet non-génomique.....</i>	<i>51</i>
LOCALISATION SOUSCELLULAIRE DES RÉCEPTEURS HORMONAUX	54
<i>Localisation</i>	<i>54</i>

<i>Membrane plasmique</i>	56
<i>Modification post-traductionnelle</i>	57
RÉGULATION HORMONALE.....	59
<i>Effet de l'ovarectomie sur les récepteurs hormonaux</i>	59
BUT DU PROJET	61
ARTICLES	63
DISCUSSION	124
ÉVALUATION DES FRACTIONS PROTÉIQUES	125
<i>Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PDH)</i>	125
<i>Na⁺/K⁺-ATPase</i>	127
<i>Ca²⁺-ATPase</i>	128
<i>GRP (BIP) 78</i>	130
<i>NUC P62</i>	133
LES RÉCEPTEURS AUX HORMONES SEXUELLES STÉROÏDIENNES.....	133
<i>Localisation souscellulaire ventriculaire</i>	133
<i>Comparaison entre ventricules et oreillettes</i>	136
<i>Comparaison entre mâles et femelles</i>	138
<i>Variations hormonales</i>	142
<i>Remplacement Hormonal</i>	147
CONCLUSION	148
BIBLIOGRAPHIE	151
ANNEXE	169

Liste des figures

FIGURE 1 : INTERVALLE QT ET POTENTIEL D'ACTION DE CARDIOMYOCYTE VENTRICULAIRE	21
FIGURE 2 : PROLONGATION DU POTENTIEL D'ACTION ET TORSADES DE POINTES	22
FIGURE 3 : SYNTHÈSE DES HORMONES SEXUELLES STÉROÏDIENNES.....	26
FIGURE 4 : RÉPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA SUPERFAMILLE DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES.....	41
FIGURE 5 : RÉPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES RÉCEPTEURS À LA PROGESTÉRONE	42
FIGURE 6 : RÉPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES RÉCEPTEURS AUX OESTROGÈNES.....	44
FIGURE 7 : MÉCANISME MOLÉCULAIRE DE LA TRANSCRIPTION DE GÈNES CIBLES MÉDIÉE PAR LES COMPLEXES OESTROGÈNES/RÉCEPTEURS	48
FIGURE 8 : MÉCANISME CELLULAIRE DE SIGNALISATION DES OESTROGÈNES À LEURS RÉCEPTEURS.....	52
FIGURE 9 : LOCALISATION DES RÉCEPTEURS AUX OESTROGÈNES.....	58
FIGURE 10 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU PROTOCOLE D'ISOLATION DE DIFFÉRENTES FRACTIONS PROTÉIQUES	126
FIGURE 11 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU PROTOCOLE D'ISOLATION DE FRACTION NUCLÉAIRE.....	127
FIGURE 12 : TABLEAU DESCRIPTIF DE L'ACTIVITÉ DE LA SERCA ET BIP 78 ENTRE LES FRACTIONS SARCOLEMMALE ET TOTALE	132
FIGURE 13 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES VOIES DE SIGNALISATION DES HORMONES SEXUELLES STÉROÏDIENNES SUR LA SURVIE CELLULAIRE.....	146

Liste des abbréviations

ADN:	Acide désoxyribonucléique
AF-1:	Activation function-1; Fonction d'activation-1
AF-2:	Activation function-2; Fonction d'activation-2
AF-3:	Activation function-3; Fonction d'activation-3
AMPc:	Adénosine monophosphate cyclique
ANF	Atrial natriuretic factor; Facteur natriurétique des oreillettes
AP	Action potential; Potentiel d'action
AP-1:	Activating protein-1; Protéine d'activation-1
AR:	Androgen receptor; Récepteur aux androgènes
ARE:	Androgen response element; Élément de réponse aux androgènes
ARKO:	AR knockout mouse; Souris déficiente en récepteurs aux androgènes
ARN:	Acide ribonucléique
ARNm:	ARN messenger
AT1	Angiotensine receptor; Récepteur de l'angiotensine
ATP	Adénosine triphosphate
β ERKO:	ER β knockout mouse; Souris déficiente en récepteurs aux oestrogènes ER β
BSA:	Bovine serum albumin; Albumine de sérum bovin
CARE	Cholesterol And Recurrent Events study
CBP:	CREB binding protein; Protéine liant le CREB
CHO	Chinese hamster ovary; Ovaire de hamster chinois
CREB:	cAMP response element binding protein; Protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc
COX	Cyclooxygénase
DERKO:	Souris ER α et ER β knockout
DBD	DNA binding domain; Domaine liant l'ADN
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DHT:	Dihydrotestostérone
E ₂ :	17 β -estradiol

EAD:	Early after depolarization; Dépolarisation précoce
ECG:	Électrocardiogramme
EGF	Epidermal Growth Factor; Facteur de croissance de l'épiderme
ENOS:	Endothelial NO synthase; NO synthase endothéliale
ERA	Estrogen Replacement and Atherosclerosis study
ER α :	Estrogen receptor α ; Récepteur aux oestrogènes α
ER β :	Estrogen receptor β ; Récepteur aux oestrogènes β
ERE:	Estrogen response element; Élément de réponse aux oestrogènes
ERH	Élément de réponse à l'hormone
ERKO:	ER α knockout mouse; Souris déficiente en récepteurs aux oestrogènes ER α
GR:	Glucocorticoid receptor; Récepteur aux glucocorticoïdes
HAT:	Histone acétyltransférase
HDL:	High density lipoprotein; Lipoprotéines de haute densité
HERS:	Heart and Estrogen/progestin Replacement Study
HRT:	Hormone replacement therapy; Thérapie de remplacement hormonale
HSF-1 :	Heat shock protein transcription factor 1; Facteur de transcription d'une protéine de choc thermique 1
HSP:	Heat shock protein; Protéines de choc thermique
IGF-1	Insulin-like Growth Factor
IP3	Inositol triphosphate
JNK	c-Jun N-terminal kinase; Kinase de c-Jun N-terminal
KCl	Potassium chloride; Chlorure de potassium
kDa	Kilodalton
LBD	Ligand binding domain; Domaine liant le ligand
LDL:	Low density lipoprotein; Lipoprotéines de faible densité
LP(a)	Lipoprotein (a)
M:	Molaire
mL:	Millilitre
mM:	Millimolaire
MAPK:	Mitogen activated protein kinase

MCV:	Maladies cardiovasculaires
MR	Mineralocorticoid receptor; Récepteur aux minéralocorticoïdes
μL :	Microlitre
μM :	Micromolaire
NcoR:	Nuclear receptor corepressor; Corépresseur de récepteurs nucléaires
NO:	Nitric oxide; Monoxyde d'azote
NOS	NO synthase
OVX:	Souris ovariectomisée
pM	Picomolaire
PEPI	Postmenopausal Estrogen/Progestin Intervention trial
PBS:	Phosphate buffered Saline; Solution tampon de phosphate
PgRKO:	PgR-A and PgR-B knockout mouse; Souris déficiente en récepteurs à la progestérone PgR-A et PgR-B
PKA:	Protéine kinase A
PKC:	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PgR:	Progesterone receptor; Récepteur à la progestérone
QT:	Intervalle QT
QTc:	Intervalle QT corrigé
RAR	Retinoic acid receptor; Récepteur de l'acide rétinoïque
RHS:	Récepteurs aux hormones sexuelles
RNA Pol	RNA Polymerase
rpm:	Rotation par minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Sh	Sham-Operated; Groupe témoin
SRC	Steroid receptor coactivator; Coactivateur de récepteur aux stéroïdes
TBP	TATA binding protein; protéine liant la région TATA
TBS	Tris buffered saline; Solution tampon de tris
TdP	Torsades de Pointes
TG	Triglycérides
TR	Thyroid hormone receptor; Récepteur des hormones thyroïdiennes

VCAM	Vascular cell adhesion molecule; Molécule d'adhésion aux cellules vasculaires
VLDL	Very low density lipoprotein; Lipoprotéine de très basse densité
WGA	Wheat germ agglutinin
WHI	Women's Health Initiative

INTRODUCTION

Maladies Cardiovasculaires

Incidence des maladies cardiovasculaires

Il est bien établi que des différences existent entre les hommes et les femmes au niveau du fonctionnement et des maladies du système cardiovasculaire.⁶⁻⁹ Malgré le fait que l'incidence de maladies cardiovasculaires telles que les maladies coronariennes, l'hypertension et l'athérosclérose est beaucoup plus élevée chez les hommes que chez les femmes du même âge,¹⁰⁻¹⁴ au Canada ces maladies représentent tout de même la première cause de mortalité tant chez les femmes que les hommes.¹⁵⁻¹⁹ Avant la ménopause, les femmes semblent protégées contre les maladies cardiovasculaires comparativement aux hommes du même âge.^{6,20} En effet, comparativement aux hommes, les femmes tendent à développer des maladies cardiovasculaires plus tard dans leur vie.¹⁷ C'est-à-dire environ 10 à 15 ans plus tard.^{19,21} De plus, même entre frères et sœurs, souffrant d'hypercholestérolémie familiale, on remarque que les femmes ont un début de maladies cardiovasculaires plus tardif que les hommes.²¹ Les différences d'incidence de maladies cardiovasculaires entre les hommes et les femmes sont probablement dues, en partie, aux facteurs de risque et possiblement aux hormones.¹⁰ Parmi les facteurs de risque, on retrouve le tabagisme, l'hypertension, la dyslipidémie, l'obésité, la sédentarité et l'histoire familiale d'athérosclérose.

La ménopause est aussi considérée comme un facteur de risque.⁶ En effet, lors du début de la ménopause, le taux d'incidence de ces maladies grimpe rapidement pour rejoindre celle observée chez les hommes.^{7,11-14,20-23} On retrouve, dans la littérature, plusieurs évidences menant à l'implication des hormones sexuelles stéroïdiennes

(oestrogènes, androgènes et progestérones) dans les différences d'incidence des maladies cardiovasculaires.^{1,20} Ces différences d'incidence suggèrent que les hormones sexuelles féminines aient un rôle cardioprotecteur dans les maladies cardiovasculaires.^{1,10,21,24,25} En effet, la notion que les oestrogènes préviennent les maladies cardiovasculaires est soutenue par un grand nombre d'études épidémiologiques ou observationnelles chez les animaux et les humains.^{23,26} De plus, des données expérimentales et épidémiologiques supportent l'importance des oestrogènes dans la prévention de l'athérosclérose^{10,27,28} et de l'ostéoporose chez la femme.^{28,29} Par contre, des études récentes telles Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS) ainsi que Women's Health Initiative (WHI) qui seront décrites plus loin viennent contredire les études antérieures. Ces études ont observé que les effets bénéfiques des oestrogènes étaient absents. De plus ces études semblent démontré que les oestrogènes auraient des effets néfastes sur le système cardiovasculaire. D'autres études sur l'implication des androgènes ont pu démontrer que l'hyperandrogénisme pouvait être associée a une augmentation significative des maladies cardiovasculaires.³⁰ Il est donc important de comprendre le rôle et l'implication des hormones sexuelles dans les maladies cardiovasculaires et de leurs pathogénèses.^{19,23}

Électrophysiologie

Depuis quelques années, il est devenu apparent qu'il existe des différences entre les hommes et les femmes quant aux aspects physiologiques et pathophysiologiques du coeur. En effet, il semble exister des différences entre les hommes et les femmes au niveau de l'électrophysiologie cardiaque. Des auteurs suggèrent que ces différences entre les hommes et les femmes soient possiblement expliquées par des différences dans : 1) le

type ou le nombre individuelle de canaux ioniques, 2) les effets directs de ces hormones sur les canaux ioniques, 3) l'innervation du cœur, 4) les effets des hormones sur l'innervation, 5) la fonction cardiaque qui peut altérer l'électrophysiologie cardiaque et 6) la masse ventriculaire gauche qui est plus large chez l'homme que chez la femme même lorsque corrigée pour la masse corporelle (ratio poids ventricule gauche/poids corporel).^{31,32} Il existe aussi des différences entre les hommes et les femmes au niveau de l'électrocardiogramme (ECG). En effet, l'amplitude moyenne du complexe QRS est significativement plus large chez les hommes comparativement aux femmes.³¹ De plus, plusieurs études ont démontré que la durée de la repolarisation ventriculaire cardiaque est plus longue chez les femmes comparé aux hommes du même âge.³³⁻³⁹

La durée de repolarisation est souvent représenté par l'intervalle QT (ou bien QTc lorsque l'intervalle QT est corrigé par rapport au rythme cardiaque).⁴⁰ Ainsi, une différence significative existe entre les hommes et les femmes au niveau de l'intervalle QTc. Cette différence a été décrite pour la première fois en 1920 par Bazett *et coll.* et depuis confirmée par plusieurs autres études.^{33,35,37,41} Dans ces études, les intervalles QT étaient les mêmes entre les femmes et les hommes par contre le rythme cardiaque, au repos, était plus rapide chez les femmes et par conséquent les intervalles QTc sont plus longs chez les femmes.^{32,33,41-43} Cette prolongation de l'intervalle QTc est souvent associée à une prolongation du potentiel d'action (Figure 1). Ceci est dû, généralement, à une diminution des courants potassiques sortants mais peut aussi être dû à une augmentation des courants sodiques ou calciques.³⁶

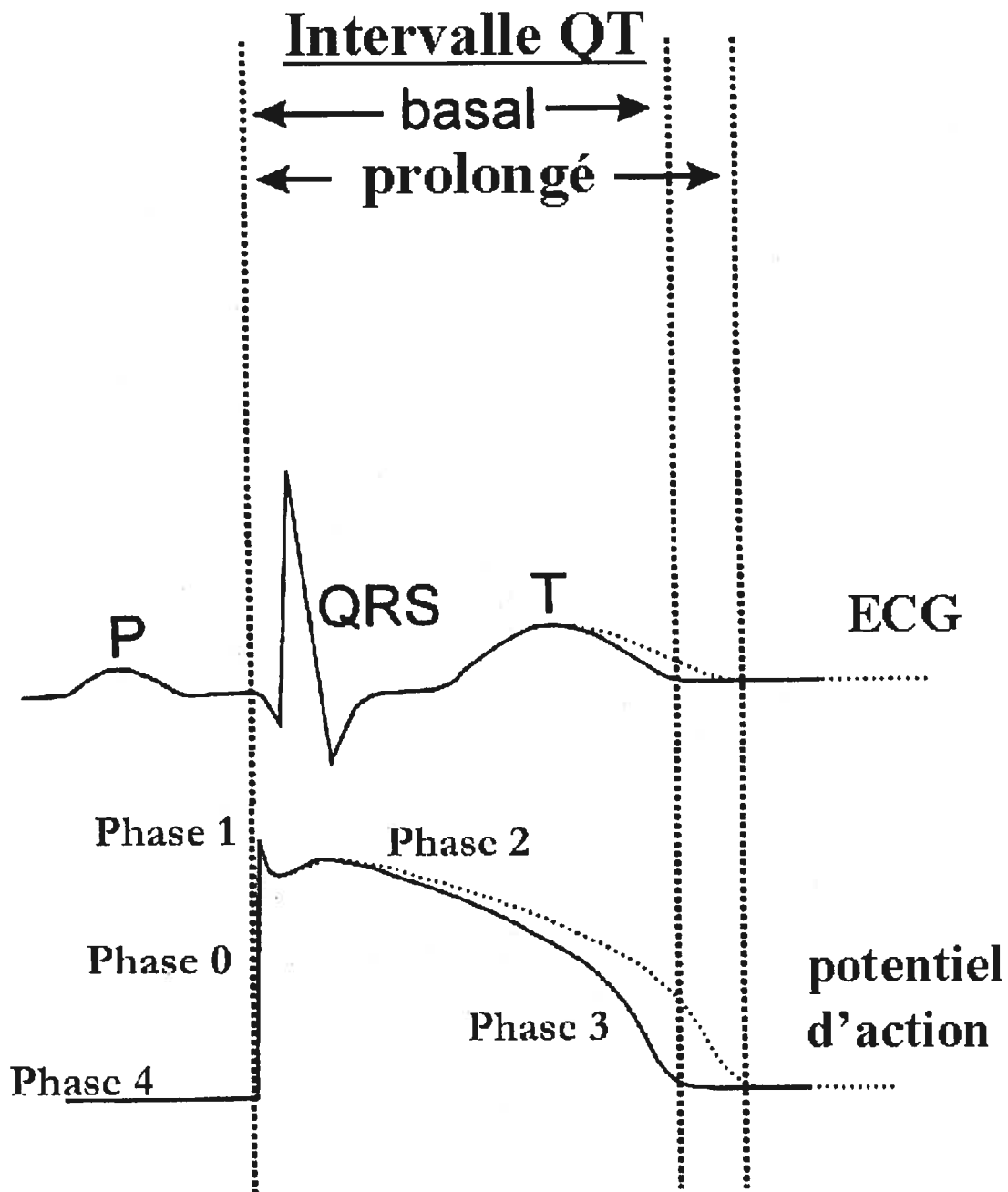


Figure 1 : Intervalle QT et potentiel d'action de cardiomyocyte ventriculaire

Au niveau de l'ECG, l'intervalle QT (début de l'onde Q à la fin de l'onde T) correspond à la durée du potentiel d'action dans les cardiomyocytes ventriculaire ainsi qu'à la durée de la repolarisation ventriculaire. En pointillée, la prolongation de l'intervalle QT correspond à une prolongation du potentiel d'action et ce, par le fait même, à un ralentissement de la repolarisation du ventricule.

Arythmies

La prolongation de l'intervalle QTc est considérée comme un précurseur d'arythmies (Torsades de Pointes) et de mort subite.^{44,45} Les Torsades de pointes sont bien reconnues comme étant des tachycardies ventriculaires polymorphiques associées à une prolongation excessive de la repolarisation cardiaque (ou intervalle QTc). Ces arythmies ventriculaires sévères peuvent dégénérer en fibrillations ventriculaires et en mort subite cardiaque.^{36,46-48} Les Torsades de pointes sont associés à un degré de prolongation de l'intervalle QTc (Figure 2) avec un ou plusieurs des facteurs suivants : l'hypokaliémie, l'hypomagnésémie, la bradycardie, la prise de médicament provoquant une prolongation de la durée de repolarisation ventriculaire cardiaque (antiarythmiques de classe 1A et 3, antihistaminiques, etc) ainsi que le sexe féminin.^{42,43,46,49-51}

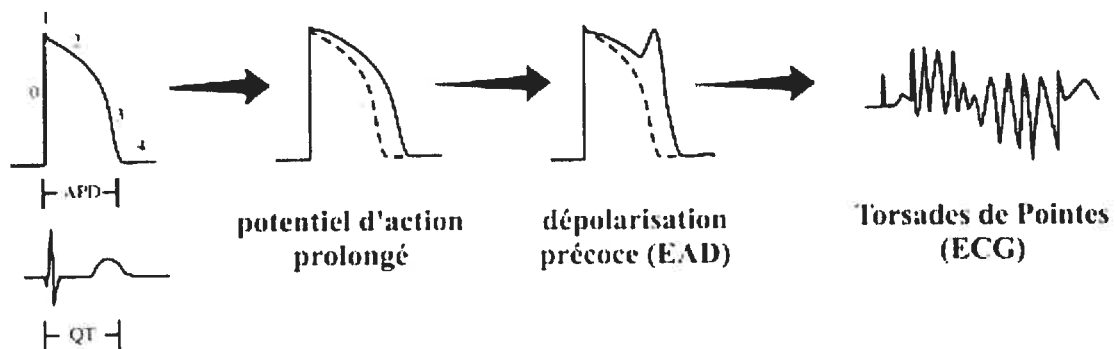


Figure 2 : Prolongation du potentiel d'action et Torsades de Pointes

La prolongation du potentiel d'action (AP) peut être produit par plusieurs facteurs incluant plusieurs agents pharmacologiques et provoque un ralentissement de la repolarisation cardiaque. Ce ralentissement de repolarisation favorise l'apparition de dépolarisation précoce (EAD) et le développement d'arythmie ventriculaire polymorphique appelée Torsades de Pointes.

En effet, des études suggèrent que le sexe féminin, au niveau de la repolarisation cardiaque, puisse être responsable de l'incidence plus élevée de ces arythmies mortelles chez la femme.³⁶ Les femmes sont donc plus sujettes à développer les Torsades de pointes,^{32,34,37,38,41,42,48-50,52,53} L'incidence de ces arythmies est deux fois plus élevée chez les femmes comparativement aux hommes du même âge.^{31,33,41,46,54,55} De plus, il existe d'autres types d'arythmies où les taux d'incidences varient selon le sexe. En effet, l'incidence de fibrillation auriculaire est beaucoup plus élevée chez les hommes comparés aux femmes du même âge. Des études ont démontré une forte prédominance dans l'incidence de fibrillation auriculaire chez les hommes.³¹ En effet, 79% des patients souffrant de fibrillation auriculaire et n'ayant pas de maladies cardiovasculaires auparavant étaient des hommes.³¹ De plus, la tachycardie supraventriculaire est aussi une arythmie à prédominance masculine.³¹ Par contre, les arythmies jonctionnelles de réentrée sont plus souvent présentes chez les femmes que chez les hommes.^{31,56,57}

Les différences entre les hommes et les femmes au niveau de ces différentes arythmies sont possiblement dues aux effets des hormones sexuelles stéroïdiennes.^{31,37,41} Récemment, des études ont démontré que l'intervalle QTc chez les mâles raccourcit à la puberté.^{35,58} En effet, le raccourcissement de l'intervalle QTc survient lorsque les niveaux d'androgènes s'élèvent.^{34-36,38,39} Il est donc possible que les androgènes soient responsable du raccourcissement du QTc et des risques plus faibles de Torsades de pointes chez les hommes. En effet, dans d'autres études, des hommes castrés démontrent des QTc aussi longs que les femmes, mais si ces hommes castrés sont traités avec des androgènes, les QTc reviennent comme les hommes normaux.³⁸ Une étude épidémiologique a rapporté une prolongation de l'intervalle QT chez des hommes castrés

chimiquement. De plus, on remarque un raccourcissement de l'intervalle QT chez des femmes souffrant d'hyperplasie des glandes surrénales. Cette hyperplasie mène à une augmentation des taux d'androgènes circulants et à un raccourcissement éventuel de l'intervalle QT. On peut aussi remarquer un raccourcissement plus marqué chez les athlètes faisant usage d'androgènes (stéroïdes anabolisants). Ceci suggère donc un rôle important des androgènes dans la repolarisation cardiaque.³⁷ Par contre, le cycle menstruel n'a pas d'effet sur l'intervalle QT.^{38,41} De plus, les traitements aux oestrogènes avec/sans progestérone n'ont pas d'effet sur l'intervalle QT.³⁸

Des études suggèrent que les hormones sexuelles stéroïdiennes pourraient moduler l'expression de gènes codant pour différents canaux ioniques cardiaques.^{36,48} De plus, les hormones sexuelles stéroïdiennes pourraient aussi moduler la fonction de ces canaux ioniques.^{36,48} Ebert *et coll.* ont rapporté qu'au niveau des cardiomyocytes de lapin, la densité de IKr est plus élevée chez les mâles expliquant la prolongation du QTc chez les femelles.³⁶ Récemment dans le laboratoire du Dr. Fiset, Véronique Trépanier-Boulay a démontré dans le cadre de son projet de maîtrise qu'il existe une différence marquée entre les souris mâles et femelles au niveau de la repolarisation ventriculaire chez la souris.² Une deuxième étudiante graduée, Judith Brouillette, a évalué le rôle des androgènes et de la castration dans la repolarisation cardiaque.³⁹ Les différences entre les hommes et les femmes suggèrent donc une influence des hormones stéroïdiennes dans l'incidence des maladies cardiovasculaires.

Influence Hormonale

Synthèse des hormones sexuelles stéroïdiennes

Les androgènes, c'est-à-dire la dihydrotestostérone (DHT), la testostérone et la déhydroépiandrostérone (DHEA) ainsi que les oestrogènes et la progestérone sont tous des hormones sexuelles stéroïdiennes.²³ Ces hormones sont produites par les surrénales, les ovaires et les testicules.^{38,59} Les testicules synthétisent principalement la testostérone et la DHT tandis que les ovaires produisent principalement les oestrogènes et la progestérone.^{21,60,61} Ces hormones stéroïdiennes sont dérivées du cholestérol (Figure 3).²³ La voie de transformation majoritaire de la testostérone est la conversion en DHT (androgène actif)^{5,62,63} et en moindre partie en androstanediols (androgène inactif) par la 5 α -réductase.^{64,65} Cette enzyme est localisée dans la membrane nucléaire.⁶⁴ De plus, seulement la DHT est transportée à l'intérieur du noyau.⁶⁴ Il existe deux isoenzymes de la 5 α -réductase. Le type 1 a un rôle catabolique tandis que le type 2 à un rôle anabolique. Dans le tissu prostatique, on retrouve le type 2 dans le cytoplasme tandis que le type 1 se situe dans le cytoplasme et le noyau.⁶² Suite à l'activation par la DHT, cette dernière est transformée en 5 α -androstanedione (androgène inactif) et transformée, ultérieurement, en 3 α - et 3 β -androstanediols (androgènes inactifs).⁶⁴ Il peut aussi y avoir une synthèse locale d'oestrogènes. Cette synthèse locale requiert la présence d'aromatase (enzyme du cytochrome P450) qui permet de métaboliser les stéroïdes comme l'androstènedione et la testostérone en oestrogènes par l'aromatation.^{5,10,59,66-69} Chez les femmes postménopausées, les oestrogènes sont produits par l'aromatation d'androgènes en oestrogènes dans les cellules périphériques, notamment au niveau des adipocytes^{23,70} ainsi qu'au niveau des surrénales.

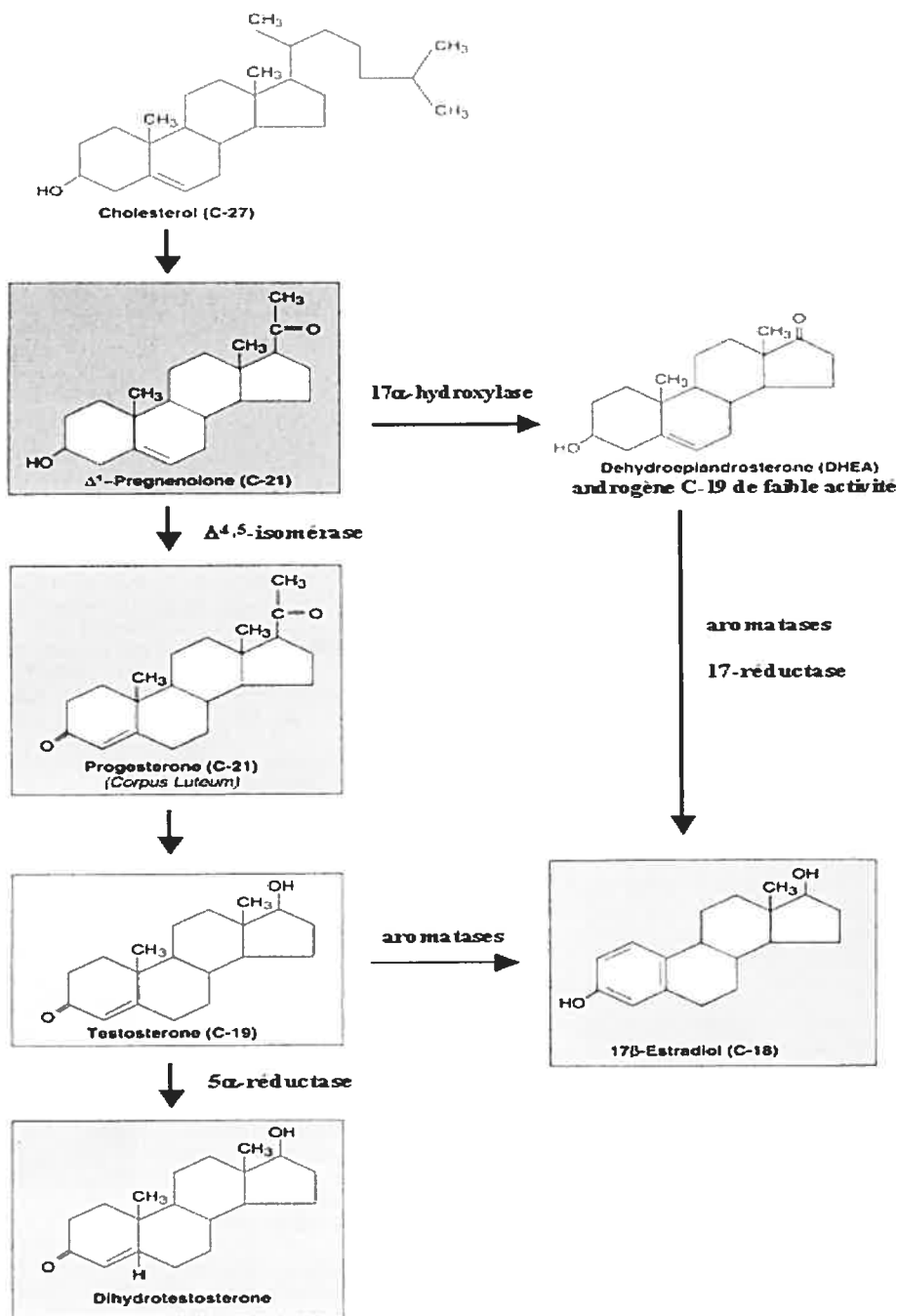


Figure 3 : Synthèse des hormones sexuelles stéroïdiennes

Synthèse des hormones sexuelles stéroïdiennes tel l'oestrogène (17β-estrodol), les androgènes (déhydroépiandrostérone, testostérone, dihydrotestostérone) ainsi que la progestérone provenant toutes à la base du cholestérol. Cette synthèse se produit via plusieurs enzymes spécifiques tel que : 17α-hydroxylase, 17-réductase, 5α-réductase, aromatase, etc.

Rôle des hormones sexuelles stéroïdiennes

Les niveaux d'oestrogènes augmentent simultanément avec ceux de la testostérone durant la puberté. Pendant cette période l'augmentation des niveaux d'hormones corrèle positivement avec l'âge osseux, le poids, la grandeur et le stade pubère.^{69,71} Les oestrogènes et la progestérone ont toujours été considérés comme des hormones féminines. Récemment, des études ont montré leurs rôles aussi important dans la régulation du développement et de l'entretien des fonctions reproductives chez les hommes.^{69,71,71,71-73} Les hormones stéroïdiennes sont impliquées dans plusieurs aspects de la croissance, du développement, de la différenciation, de la reproduction et de l'homéostasie.^{61,63,65,74} Les récepteurs hormonaux et les enzymes métabolisant les stéroïdes sont importants pour maintenir l'équilibre entre les différentes hormones sexuelles stéroïdiennes selon le sexe masculin ou féminin.⁷⁵ Cet équilibre entre les différentes hormones sexuelles stéroïdiennes est essentiel pour leurs effets respectifs.⁷¹

Dans la littérature, des études démontrent que les oestrogènes ont un rôle dans la régulation de différentes fonctions physiologiques comme la croissance, la minéralisation osseuse, les fonctions cardiovasculaires, la masculinisation du cerveau et les comportements sexuels par l'action des hormones sur différents tissus cibles.^{10,28,69,71,72,76} De plus, les oestrogènes jouent aussi un rôle dans le développement et fonctionnement des organes sexuels et du système nerveux central autant chez les hommes que chez les femmes.^{69,73} Les oestrogènes influencent aussi plusieurs procédés pathologiques comme des cancers du sein, de l'endomètre ou des ovaires ainsi que l'ostéoporose.⁷³ Par contre, sur le système cardiovasculaire, les oestrogènes jouent un rôle protecteur en inhibant la

réponse aux blessures vasculaires et le développement de l'athérosclérose. Les mécanismes des hormones stéroïdiennes proposées comme protecteurs inclus: la stimulation de l'activité et de l'expression des enzymes oxyde nitrique synthase (NOS) et cyclooxygénase (COX-1),^{20,77,78} la modification des niveaux sériques des différents lipides,^{15,69,71} la production de prostacycline et l'inhibition de l'aggrégation plaquettaire.⁷⁹ L'entretien des niveaux lipidiques semble être un atout majeur dans l'effet cardioprotecteur mais il y a aussi d'autres effets comme l'amélioration de la fonction endothéliale, l'inhibition de la prolifération cellulaire, la promotion de la vasorelaxation, l'amélioration du métabolisme du glucose et la diminution des niveaux sériques d'insuline qui interviennent.^{7,10,15,21,23,71,80}

La régulation de la progestérone joue un rôle important dans la physiologie du cycle menstruel, dans la reproduction (début de la grossesse et le maintien de la grossesse)^{81,82} ainsi que dans différentes pathologies de système reproducteur chez les femmes.⁸³ La progestérone affecte, de façon adverse, les effets des oestrogènes sur les niveaux des lipides athérogéniques et athéroprotecteurs^{81,84} ainsi que l'expression des protéines de coagulation et de thrombolyse.^{81,85} La progestérone peut aussi inhiber la vasorelaxation et diminuer la prolifération des cellules du muscle lisse vasculaire et des cellules endothéliales.^{21,81}

Le développement et les fonctions physiologiques des organes sexuelles masculines sont dépendent des androgènes. Aussi, les androgènes jouent un rôle important dans le fonctionnement de plusieurs organes et tissus.⁸⁶ La DHT mène à

l'augmentation de l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales, de l'expression des molécules d'adhésion aux cellules vasculaires-1 (VCAM-1) endothéliales, de l'expression plaquettaire des récepteurs aux thromboxanes ainsi que de l'aggrégation plaquettaire.²¹ De plus, la testostérone améliore la libido chez les femmes post-ménopausées.¹¹ Des observations récentes suggèrent que la testostérone puisse jouer un rôle de protection contre l'athérosclérose. En effet, cette cardioprotection se produirait via l'aromatation de la testostérone en oestrogènes (action faite via l'enzyme aromatasase).¹¹ De plus, la synthèse locale d'oestrogènes peut jouer un rôle dans la régulation des effets biologiques dans les tissus cibles.^{5,87} En effet, des études ont démontré la synthèse locale des oestrogènes via l'aromatase dans le cerveau, les ovaires, les cellules endothéliales et les cellules musculaire lisses vasculaires.¹¹

Ménopause

Comme mentionné auparavant, la ménopause est considérée comme un facteur de risque de maladies cardiovasculaires.⁶ En effet, l'incidence des maladies cardiovasculaires augmente chez les femmes lorsqu'elles atteignent la ménopause et rejoignent l'incidence des hommes du même âge.^{17,88,89} La ménopause se manifeste par une chute abrupte des oestrogènes et de la progestérone produits par les ovaires.^{26,72,90} Chez les filles préadolescentes les niveaux d'oestrogènes sont faibles mais ces niveaux augmentent lors de la ménarche. C'est-à-dire qu'au moment du début de la puberté, l'ovulation s'accompagne d'une sécrétion hormonale d'oestrogènes et de progestérone produit par les ovaires. Les niveaux d'oestrogènes varient, chez les femmes, de 367 pmol/L dans la phase folliculaire, à 2200 pmol/L à l'ovulation et jusqu'à 70 000 pmol/L

durant la grossesse. Après la ménopause, les oestrogènes chutent à des niveaux similaires aux hommes (18-74 pmol/L).¹⁰ Les oestrogènes semblent avoir des effets protecteurs sur la progression de l'athérosclérose et de l'ostéoporose.^{6,17,80} Des observations ont démontré que, chez les femmes préménopausées avec des maladies cardiovasculaires, les niveaux plasmatiques d'oestrogènes sont plus bas que chez les femmes préménopausées sans maladie cardiovasculaire.¹⁶ De plus, des études ont démontré que l'ovarectomie et la ménopause précoce sont associées avec une augmentation de l'incidence des maladies cardiovasculaires.^{16,91} En effet, une irrégularité menstruelle est associée avec une augmentation significative de l'incidence des maladies cardiovasculaires.¹⁶ De plus, la perte d'oestrogènes facilite les fractures dues à l'apparition progressive de l'ostéoporose.⁹⁰ Lors de la ménopause, la chute d'oestrogènes est plus élevée que la perte d'androgènes et donc le ratio plus élevé d'androgènes/oestrogènes pourrait être responsable de l'augmentation de l'incidence des maladies cardiovasculaires chez les femmes post-ménopausées.³⁰

Remplacement hormonal

L'incidence des maladies athérosclérotiques est basse chez les femmes préménopausées mais augmente chez les femmes postménopausées.¹⁰ Plusieurs études suggèrent une réduction des maladies cardiovasculaires chez les femmes ménopausées faisant usage d'une thérapie de remplacement aux oestrogènes.⁹² Les mécanismes proposés pour l'effet protecteur des oestrogènes incluent des changements favorables dans le profil lipidique, les lipoprotéines, les facteurs de coagulation, la réactivité vasculaire et l'action antioxydante. De plus, le fait d'utiliser un remplacement hormonal à

long terme réduirait le risque de fracture relié à l'ostéoporose.^{15,92} L'idée de cardioprotection était basée sur les résultats des effets des oestrogènes sur le profil lipidique. Encore vers la fin des années 90 on croyait que l'administration d'oestrogènes, chez des femmes ménopausées, amenait une diminution de 50% des événements cardiovasculaires comparées aux femmes ménopausées ne prenant pas de thérapie de remplacement aux oestrogènes.^{7,21,27,79,80,92-94}

Depuis longtemps, les effets athéroprotecteurs des oestrogènes étaient attribués principalement à l'effet de ces hormones sur les niveaux des lipides plasmatiques. Par contre, l'effet de réduction des lipides par les oestrogènes est responsable seulement d'environ un tiers des effets bénéfiques observés.^{10,17,20,77,95,96} En effet, l'administration d'oestrogènes oralement permet de réduire les LDL de 10-15% ainsi que d'augmenter les HDL de 10-15% et les triglycérides de 20-25%. Les mécanismes responsables de ces effets bénéfiques sont dus à l'augmentation de l'activité des récepteurs pour les LDL ainsi qu'à l'accroissement de la production des triglycérides, des VLDL et des apolipoprotéines B et A-1. Le fait d'administrer la médroxyprogestérone avec les oestrogènes affecte négativement l'effet des oestrogènes sur les HDL et TG mais pas sur les LDL.^{15,92,97}

Les oestrogènes jouent un rôle bénéfique non seulement sur les niveaux lipidiques mais aussi sur le fibrinogène, la viscosité du plasma, les inhibiteurs de l'activation du plasminogène-1, la sensibilité à l'insuline, l'homocystéine, l'aggrégation plaquettaire et l'activation des cellules endothéliales. De plus, les oestrogènes inhibent l'hyperplasie

intimale et la migration des cellules du muscle lisse, favorisent l'angiogénèse et ont des propriétés anti-oxydantes.¹⁵ En effet, les oestrogènes augmentent les HDL, réduisent les niveaux de LDL, de lipoprotéine a (Lp(a)), de fibrinogène, d'inhibiteurs de l'activation du plasminogène-1 et d'insuline. Les oestrogènes inhibent aussi l'oxydation des LDL et améliorent la fonction vasculaire endothéliale.^{10,16,98,99} L'effet potentiellement important des oestrogènes, sur les maladies athérosclérosantes, repose sur ces propriétés anti-oxydantes. En effet, ceci prévient l'oxydation des LDL, ce qui est une étape importante dans la formation de cellules spumeuses. La formation de ces cellules représente une étape primordiale dans l'initiation de la formation de plaques athérosclérotiques et le développement de l'athérosclérose.^{6,53,79} De plus, les oestrogènes chez les femmes postménopausées réduisent les niveaux de protéines chimioattractives-1 des monocytes (monocyte chemoattractant protein-1). Cet effet est un autre mécanisme qui peut réduire la progression de l'athérosclérose.^{6,16} Les oestrogènes, comme mentionné auparavant, préviennent aussi les fractures en inhibant l'ostéoporose. En effet, une thérapie de remplacement aux oestrogènes à long terme réduit les risques de fracture de 50-60%.⁹⁰ Cette diminution des fractures est due à l'effet des oestrogènes sur l'activité des ostéoclastes.⁹⁰

Par contre, un effet néfaste de l'usage des oestrogènes est l'augmentation importante de l'incidence de développement du cancer endométrial. Ceci peut être éliminé par l'administration concomittante de progestérone avec les oestrogènes. De plus, selon diverses études l'administration d'un remplacement aux oestrogènes amènerait une augmentation de 25% des risques de développer un cancer du sein.^{79,100,101} Il est donc

important de comprendre les mécanismes de fonctionnement des hormones sur les différents organes.

Controverse

Il existe toujours une controverse importante en rapport avec l'effet du remplacement hormonal ovarien sur les maladies cardiovasculaires.¹⁶ Des études ont démontré, chez des femmes sans maladie cardiovasculaire, un effet bénéfique des oestrogènes lors de traitement de remplacement hormonal.^{10,81,102,103} En effet, l'étude Lipid Research Clinics Program Follow-up a noté des bénéfices importants quant aux niveaux lipidiques suite à une thérapie de remplacement hormonale.¹⁶ L'étude Nurse's Health Study a aussi démontré une réduction des maladies cardiovasculaires jusqu'à 40-50% suite à l'utilisation d'un traitement de remplacement hormonal.¹⁶ De plus, l'étude Cholesterol and Recurrent Events (CARE) a évalué l'utilisation de pravachol pour diminuer le facteur de risque du cholestérol. Chez la femme, la réduction est de l'ordre de 46% par rapport à une diminution du facteur de risque de seulement 20% pour les hommes. Les bénéfices apparaissent aussi plus tôt chez les femmes comparativement aux hommes, ce qui pourrait être expliqué par l'implication des hormones stéroïdiennes dans ces différences.¹⁷ L'étude Postmenopausal Estrogen/Progestin Intervention trial (PEPI) a aussi démontré qu'une combinaison d'oestrogènes/progestérone avait des effets hautement significatifs et favorables sur les niveaux de lipides ainsi que sur l'hyperplasie endométriale. Par contre, l'incidence des cancers du sein ne change pas.^{79,84}

Par ailleurs, d'autres études ont démontré des résultats qui allaient dans le sens contraire des études précédentes. En effet, l'étude Estrogen Replacement and Atherosclerosis (ERA) a recruté des femmes qui étaient âgées de 65 ans, en moyenne et présentaient des évidences de maladies cardiovasculaires démontrées par angiographie.¹⁵ Cette étude n'a démontré aucun bénéfice lors de la prise d'oestrogènes et médroxyprogestérone sur la sténose coronarienne. Elle supporte les résultats obtenus par d'autres études. L'étude Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS) porte sur la prévention secondaire des maladies cardiovasculaires chez les femmes postménopausées (environ 65 ans) avec des antécédents de maladies cardiovasculaires.¹⁰⁴ Cette étude a évalué l'effet d'un traitement d'oestrogènes/progestérone sur les maladies cardiovasculaires. Cette étude n'a démontré aucun bénéfice à prendre un traitement de remplacement hormonal. Récemment une autre étude, Women's Health Initiative (WHI), a évalué les effets bénéfiques/néfastes d'une thérapie de remplacement hormonale chez les femmes postménopausées (67 % des femmes étaient âgées de 60 ans et plus). Les résultats de l'étude WHI ont démontré, tout comme dans l'étude HERS, que l'usage d'oestrogènes avec/sans progestérone ne prévenait pas les maladies cardiovasculaires.⁹⁴ De plus, cette étude a démontré que le traitement de remplacement hormonal amenait une augmentation des risques de maladies cardiovasculaires, d'infarctus du myocarde, de thrombose et de cancer du sein. Par contre, ils ont observé une plus grande densité osseuse et un effet bénéfique sur les risques de cancer du colon.^{100,101,103}

Dans ces études, le manque d'effets bénéfiques, est possiblement dû au fait que les femmes ont débuté le traitement de remplacement hormonal plusieurs années après le

début de la ménopause.¹⁵ Ce manque d'effet bénéfique ne s'applique possiblement pas chez les sujets plus jeunes. C'est-à-dire que des effets bénéfiques pourraient peut-être se manifester si le traitement de remplacement aux oestrogènes était débuté avant le début de la ménopause.^{10,102,105,106} De plus, l'absence d'effet bénéfique pourrait aussi être expliqué par le fait que la durée du traitement est trop courte. En effet, il est possible que les effets bénéfiques du traitement arrivent plus tard que les effets néfastes.¹⁵ Ces limitations peuvent aussi être dues à la voie d'administration ou bien aux quantités données. La voie transdermale mimique beaucoup plus la physiologie et le métabolisme normal des hormones sexuelles endogènes.^{21,94} En effet, la voie orale a beaucoup plus d'effets sur le profil lipidique et les protéines de coagulation, par contre par cette voie d'administration il faut dix fois plus d'hormones pour obtenir des niveaux plasmatiques similaires.²¹ Il est donc possible que la voie d'administration et les quantités données aient différents effets.⁹⁴

Une controverse existe envers l'usage de traitement de remplacement hormonal sur les maladies cardiovasculaires. Les oestrogènes auraient des effets bénéfiques sur la progression de l'athérosclérose (phase précoce) en régulant la progression de stries lipidiques en plaques athérosclérotiques chez les femmes de 45-50 ans.¹⁶ Par contre, ces effets bénéfiques disparaîtraient chez les femmes de 55 ans et plus (progression de la plaque).^{16,98,107} Les résultats obtenus de ces études devraient stimuler d'autres recherches sur le traitement de remplacement hormonal.

Récepteurs hormonaux

Les hormones sexuelles stéroïdiennes sont impliquées dans plusieurs aspects de la croissance, du développement, de la différenciation, de la reproduction et de l'homéostasie. Leurs effets se réalisent par la liaison de ces hormones à leurs récepteurs spécifiques.^{61,63,65,74} C'est-à-dire qu'il y a des récepteurs pour les oestrogènes (ER), la progestérone (PgR) et les androgènes (AR).^{7,61,71-74,82,108-119} Ces hormones interagissent avec leurs récepteurs spécifiques pour agir sous forme de facteur de transcription. Par contre, les androgènes peuvent aussi exercer leurs actions en se liant aux récepteurs aux oestrogènes, suite à l'aromatization des androgènes en oestrogènes.^{62,86}

Structure

Le clonage du premier récepteur stéroïdien, celui pour les glucocorticoïdes (GR) en 1985, a été une collaboration entre Ronald Evans, Michael Rosenfeld et Brad Thompson. Par la suite, une vague d'études a été réalisée menant à une meilleure compréhension du mécanisme d'action des hormones et de leurs récepteurs. En effet, le clonage des récepteurs pour ER α , PgR et AR se sont produits en 1986, 1987 et 1988 respectivement.^{114,120} De plus, un deuxième récepteur de l'oestrogène, ER β a été cloné en 1996.¹²¹ La présence d'un deuxième récepteur pour les oestrogènes (ER β) a introduit un niveau de complexité plus élevé dans les mécanismes médiés par les oestrogènes.⁴ Le clonage des récepteurs à la progestérone a permis de voir que ces récepteurs sont composés de deux isoformes (PgR-A et PgR-B).^{61,65,82,119,122,123} Ces derniers sont exprimés à partir d'un seul gène chez les petits mammifères et les humains. Ces deux isoformes sont le résultat, dans la transcription, de deux promoteurs différents et

d'initiation de la traduction à deux différents sites de départ (codon AUG).¹²⁴ Par contre, les deux isoformes des récepteurs aux oestrogènes (ER α et ER β)^{3,71,114,118,125-127} sont codées par deux gènes différents, chacun de 9 exons.^{28,71}

Le gène de ER α code pour une protéine de 595 acides aminés avec un poids moléculaire de 67 kDa, tandis que ER β est fait de 530 acides aminés et a un poids moléculaire de 60 kDa.^{7,71} Par contre les deux isoformes PgR-A et PgR-B sont composés de 769 et 933 acides aminés, respectivement.¹²⁸ Ces protéines migrent à des poids moléculaires de 82 kDa et 118 kDa pour PgR-A et PgR-B, respectivement.^{128,129} Cette différence de poids moléculaire est due au fait que l'isoforme PgR-A est plus court, de 164 acides aminés, dans la région N-terminal.^{61,119,124,130} Ces récepteurs sont régulés par la phosphorylation de résidues spécifiques. Par exemple, les récepteurs aux oestrogènes sont régulés par la phosphorylation de résidues sérine et tyrosine.¹²⁵ Cet état de phosphorylation peut être responsable de la formation de doublet ou triplet de bande dans le gel de polyacrylamide d'un même récepteur. Par exemple, lors de l'analyse par immunobuvardage, les récepteurs des androgènes migrent sous forme d'un doublet de bande à 110 kDa et 112 kDa où la phosphorylation du récepteur augmente le poids moléculaire du récepteur légèrement. Le doublet de bande au niveau des récepteurs aux androgènes est dû à différents degrés de phosphorylation.¹¹² Un autre exemple est l'isoforme PgR-B qui peut migrer, lors d'analyse par Western Blot, sous forme d'un triplet de bande (114 kDa, 117 kDa et 120 kDa) Ce triplet de bande est aussi dû à différents degrés de phosphorylation.¹¹² En effet, PgR est déjà phosphorylé sans ligand, mais lorsqu'il se lie à son ligand, il devient hyperphosphorylé.⁶⁵ Donc, la présence de

récepteur phosphorylé et non-phosphorylé se traduit par la présence d'un doublet ou triplet de bande lors de l'analyse par immunobuvardage.

Localisation tissulaire

Des études ont été produites chez plusieurs espèces incluant les rats, les singes et les humains. Ces études ont permis d'évaluer la localisation des différents récepteurs stéroïdiens dans une variété de tissus des deux sexes incluant les cellules endothéliales vasculaires et les cellules musculaires lisses vasculaires^{10,131} ainsi que les cellules du myocarde.^{10,76,95,132-135} Les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires, les cellules des tissus reproducteurs, des os, du foie et du cerveau expriment les deux isoformes des récepteurs pour les oestrogènes.^{15,23,127,136} Ces récepteurs sont aussi retrouvés dans, ainsi que la glande thyroïde et les glandes surrénales.^{76,137,138} La distribution tissulaire diffère beaucoup pour ER α et ER β . ER α existe comme récepteur prédominant dans la plupart des organes cibles.²⁸ Par contre, ER β comparé à ER α est fortement présent dans différents organes incluant : la prostate, la vessie, les vésicules séminales, les testicules, les ovaires, les poumons et l'hypothalamus.^{28,71,114} Cette différence dans la présence de ER α ou bien ER β suggèrent que les actions des oestrogènes dans ces différents tissus puissent être médié via l'activation de ER β au lieu de ER α . Les effets des oestrogènes sont donc spécifiques au rapport de ER α /ER β et au type cellulaire des différents organes.¹³⁹

Des études récentes ont démontré que le cœur est un organe cible pour l'effet des oestrogènes.^{5,140} Les récepteurs des oestrogènes se retrouvent au niveau du cœur

d'humains, de rats et de babouins.^{7,141} En effet les ER sont localisés dans les cardiomyocytes et les fibroblastes de rats.⁵⁻⁷ Des études immunohistologiques ont démontré la présence de ER α et ER β dans les oreillettes et les ventricules humains, autant chez le sexe masculin que féminin.^{5,10,21,139} Par contre, d'autres études ont démontré que les récepteurs aux oestrogènes ont été trouvés seulement dans les oreillettes et non les ventricules.⁶⁰ Il y a donc controverse par rapport à la localisation tissulaire des récepteurs pour les oestrogènes.

Sur le plan de la localisation tissulaire, les récepteurs aux androgènes varient autant que les récepteurs aux oestrogènes. En effet, les récepteurs aux androgènes ont été démontrés dans différents tissus incluant les organes reproducteurs, le système nerveux central, les os, la peau, le foie, les glandes surrénales ainsi que les muscles squelettiques et lisses.^{63,138} Leur présence a aussi été rapportée dans les macrophages où ils sont en plus grande quantité chez les hommes comparativement aux femmes.^{21,66} Les AR sont aussi localisés, en faible quantité, dans l'aorte¹⁸ ainsi que dans le tissu cardiaque de plusieurs mammifères incluant l'humain,³⁴ les babouins⁸⁶ ainsi que les rats.¹⁴¹ De plus, par des études autoradiographiques, les récepteurs aux androgènes ont été démontrés chez le babouin et le singe rhésus des deux sexes.⁸⁶

Les récepteurs à la progestérone varient beaucoup quant à la localisation tissulaire. Ces récepteurs sont impliqués dans tous les aspects de la grossesse, alors ce n'est pas surprenant qu'on les retrouve dans l'utérus, les ovaires et les glandes mammaires de souris.¹¹⁹ Ces récepteurs ont aussi été localisés dans les fibroblastes,

l'hypothalamus et les poumons de souris.^{61,119} De plus, ces récepteurs ont été retrouvés dans l'aorte et le myocarde de babouin.¹⁴²

Domaines

Chez les humains, les gènes codant pour les différents récepteurs stéroïdiens sont retrouvés dans différents chromosomes. Le gène responsable de ER α est retrouvé sur le chromosome 6,^{69,143} par contre celui pour ER β est situé sur le chromosome 14.^{69,143} Le gène codant pour PgR est localisé sur le chromosome 11 tandis que celui pour AR est situé sur le chromosome X de la 23^e paire.⁶⁵ Tous ces récepteurs font partie d'une superfamille de récepteurs nucléaires. Cette superfamille compte parmi elle, non seulement les récepteurs pour les oestrogènes (ER α , ER β), les androgènes (AR) et la progestérone (PgR-A, PgR-B), mais aussi les récepteurs pour les hormones thyroïdiennes (TR), les glucocorticoïdes (GR), les minéralocorticoïdes (MR) ainsi que l'acide rétinoïque (RAR) et la vitamine D3.^{59,61,65,73,74,81,82,86,108,111,112,118,119,122-124,144-148} Ces récepteurs sont des protéines à plusieurs domaines avec une structure commune entre eux. Ils sont constitués de six domaines fonctionnels, de A à F, où chacun des domaines a des fonctions différentes et spécifiques (Figure 4).^{3,7,72,73}

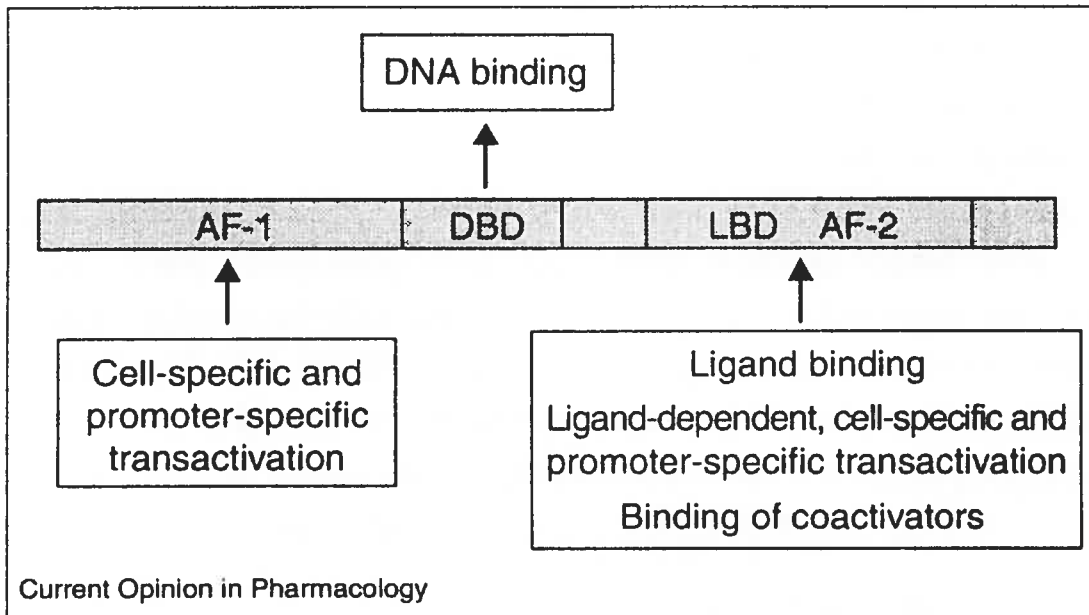


Figure 4 : Représentation schématique de la superfamille des récepteurs nucléaires

Représentation schématique de la superfamille des récepteurs nucléaires comprenant six domaines distinctes jouant des rôles spécifiques. Le domaine A/B contient la fonction d'activation de la transcription (AF-1) indépendante du ligand. Le domaine C joue le rôle de liaison à l'ADN tandis que le domaine D joue un rôle de charnière possiblement pour un changement conformationnelle. Le domaine E contient un rôle de liaison au ligand (hormone), un rôle de liaison aux cofacteurs nécessaire à la transcription ainsi qu'une fonction d'activation de la transcription (AF-2) dépendante du ligand. Le domaine F a possiblement un rôle de régulation de liaison du ligand au domaine E

Le domaine A/B, situé du côté N-terminal, contient une fonction d'activation de la transcription (AF-1) qui est indépendante de la liaison du ligand.^{3,7,10,65,73,143,148,149} Ce domaine est hautement variable puisqu'il n'y a seulement que 18% du domaine et 30% de la séquence AF-1 qui sont conservés entre les deux récepteurs aux oestrogènes.^{59,110,118,146,150} Ce manque d'homologie dans la partie N-terminale, mènent à des spéculations que les deux récepteurs aux oestrogènes pourraient réguler, de façon différente, les différents gènes cibles.¹¹⁸ Le domaine A/B des récepteurs aux androgènes

démontrent aussi un degré d'homologie très faible avec les autres récepteurs aux hormones sexuelles.^{86,112} De plus, la région N-terminale des récepteurs pour la progestérone est pauvrement conservée entre les espèces.¹⁴⁸ Les isoformes des récepteurs pour la progestérone (PgR-A et PgR-B) diffèrent dans le sens que l'isoforme PgR-B a une séquence additionnelle de 164 acides aminés du côté N-terminale.^{119,128,130} Ce domaine spécifique à PgR-B code pour une troisième fonction d'activation de la transcription (AF-3) qui est absente dans le domaine N-terminale de l'isoforme PgR-A (Figure 5).^{82,119,122,124} Des études récentes ont démontré que, lorsque PgR est lié à la progestérone, AF-3 permet de lier une autre série de coactivateurs sur PgR-B qui n'est pas recrutée efficacement par PgR-A.^{82,119,128} Donc, lorsqu'ils sont exprimés individuellement dans des cellules en culture, PgR-A et PgR-B démontrent des propriétés de transactivation différentes qui sont spécifiques aux lignées cellulaires et au contexte du promoteur du gène cible.⁸² De plus, PgR-A et PgR-B sont associés à différentes habilités pour le recrutement de différentes protéines co-régulatrices spécifiques.⁸²

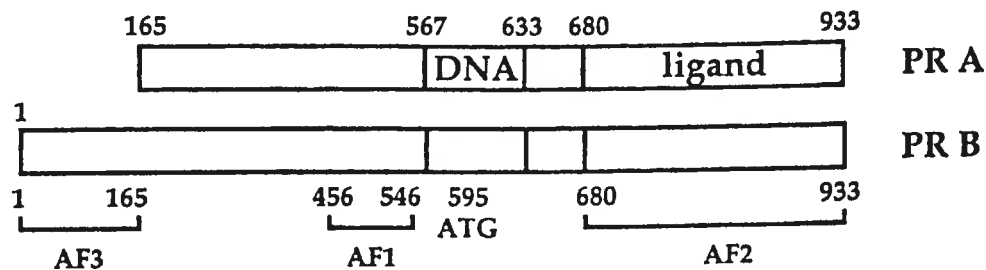


Figure 5 : Représentation schématique des récepteurs à la progestérone

Les récepteurs à la progestérone contiennent aussi les domaines A à F où le domaine C et le domaine E jouent un rôle de liaison à l'ADN et à la progestérone, respectivement. Le domaine A/B diffère beaucoup entre la PgR-A et la PgR-B. En effet, dans la PgR-B ce domaine contient 164 acides aminés de plus. Cette différence amène une nouvelle fonction d'activation de la transcription (AF-3).

Le domaine hydrophile C a un rôle de liaison à l'ADN.¹⁴³ Il contient deux doigts de zinc qui forment un motif hélice-boucle-hélice.⁵⁹ Ce domaine permet de lier l'ADN à des séquences appelées élément de réponse à l'hormone spécifique (ERH). C'est-à-dire que si cette séquence permet de lier les oestrogènes alors cette séquence se nommera élément de réponse aux oestrogènes (ERE).^{3,10,59,65,149} C'est le domaine le plus conservé dans les récepteurs nucléaires.^{7,122} En effet, les récepteurs aux oestrogènes ont 95% d'homologie entre les deux isoformes (Figure 6).^{59,77,110,114,118,127,146,148} Des études ont déterminé que le domaine de liaison de l'ADN agit directement ou indirectement sur la stabilisation de la séquence N-terminale. Cette stabilisation pourrait expliquer, par exemple, la fonction de AF3 dans PgR-B.¹²² De plus, le domaine C contient aussi une fonction de liaison des protéines de choc thermique (heat shock proteins) de 90 kDa.³

Le domaine D est extrêmement variable et contient une séquence permettant d'agir comme une charnière.^{59,143} Ceci permet de changer de conformation tridimensionnelle. Ce domaine contient aussi une séquence permettant une localiation des récepteurs au niveau nucléaire.^{3,10,65,146,149}

Le domaine E est responsable de plusieurs fonctions incluant la liaison du ligand, l'association aux protéines de choc thermique (HSP), la dimérisation du récepteur, une partie de la séquence de localisation nucléaire ainsi que la fonction d'activation de la transcription (AF-2) qui est dépendante de la liaison du ligand et est parfois une activité de répression transcriptionnelle.^{3,7,10,59,65,73,114,127,143,146,148,149} Les contributions relatives

de AF-1 et AF-2 varient, de manière spécifique, selon les différentes cellules et les différents promoteurs.⁷³ Le domaine E est le deuxième domaine le plus conservé.^{112,122} En effet, les deux récepteurs pour les oestrogènes partagent environ 55% d'homologie dans ce domaine (Figure 6).^{59,114,127,146,148,150} Cette séquence leur confère une haute affinité similaire pour le 17 β -oestradiol. Par contre, ils ont des affinités différentes pour différents ligands agonistes/antagonistes (synthétiques ou naturels).^{71,77} Ces différences permettent d'obtenir des signaux de régulation opposés en réponse à un même ligand.^{3,114}

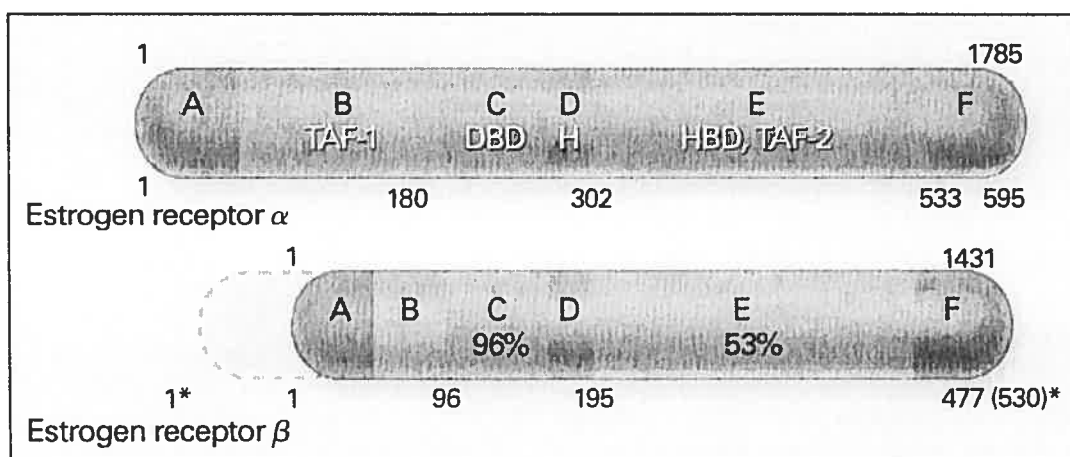


Figure 6 : Représentation schématique des récepteurs aux oestrogènes

Le domaine C contient une très forte similarité entre les récepteurs aux oestrogènes α et β . Ce domaine permet de lier l'ADN aux séquences appelées élément de réponse aux oestrogènes (ERE). Le domaine E contient environ 53% d'homologie entre les deux récepteurs aux oestrogènes conférant une affinité similaires pour le 17 β -oestradiol mais des affinités différentes pour d'autres dérivés oestrogéniques tel que le tamoxifène amenant des effets différents entre ces deux récepteurs. Par contre, le domaine A/B diffère beaucoup entre les deux récepteurs aux oestrogènes amenant possiblement une différence dans l'activation de la transcription via la fonction AF-1.

Le domaine F est très peu connu. En effet, des études suggèrent que, dans les récepteurs aux oestrogènes, ce domaine contient la séquence pour l'hélice 12 du

récepteur. Cette hélice est replier sur la surface du domaine de liaison à l'hormone (HBD) et serait nécessaire pour les différentes réponses face aux différents ligands.^{3,10,65,143,149,150} Le domaine F varie considérablement. Par exemple, ER β manque une grande partie du domaine F comparé au domaine F de ER α , ce qui pourrait en partie expliquer les différentes affinités pour les divers ligands.⁷

Mécanisme d'action

La liaison de l'hormone stéroïdienne à son récepteur spécifique induit un changement conformationnel du récepteur qui résulte en la dimérisation de deux complexes ligand-récepteur pour devenir un complexe transcriptionnellement actif.^{59,112,119,148} En absence de ligand ou dans sa forme inactive, les récepteurs aux hormones stéroïdiennes sont associés à plusieurs protéines de choc thermique (ex : HSP 70 et HSP 90).²⁰ Ces protéines jouent un rôle dans la stabilisation des récepteurs non liés au ligand en prévenant l'aggrégation et le repliement de ces récepteurs ainsi que la liaison à l'ADN.⁶⁵ Les protéines de choc thermique sont des molécules chaperones exprimées constitutivement.²⁰ Une fois liées à leurs récepteurs spécifiques, les hormones provoquent la séparation des protéines de choc thermique et permettent aux récepteurs de dimériser.^{71,74,119,124} Le degré d'homo- ou d'hétéro-dimérisation peut influencer l'interaction avec l'ADN, tout comme le type de ligand occupant le récepteur et la disponibilité dans la cellule de différentes protéines corégulatrices.^{10,23,28,76,144} L'hétérodimérisation apporte un degré de complexité dans la détermination de la régulation d'activation des gènes en réponse aux oestrogènes.⁹⁰ En effet, ER α stimule et ER β inhibe la transcription.^{10,77,134,135} L'homodimère de ER α et l'hétérodimère ER α /ER β

sont fait préférentiellement par rapport à l'homodimère de ER β et peut donc expliquer la variation des effets des dimères sur la transcription.^{3,7}

Après la dimérisation, il y a une augmentation de la phosphorylation du récepteur.^{59,119,124} Cette phosphorylation amène la liaison du dimère à des sites spécifiques, c'est-à-dire des éléments de réponse aux hormones (HRE) sur l'ADN qui sont localisés dans les régions du promoteur des gènes cibles.^{3,28,110-112,119,124,146,148,151} Les éléments de réponse aux hormones sont des séquences consensus de 15 paires de bases arrangées en deux séquences de six paires de bases qui sont inversées une par rapport à l'autre. Ces deux séquences sont séparées par des paires de bases aléatoires. Lorsqu'il y a dimérisation, un récepteur se lie à chacune des séquences de six paires de bases.^{7,65} Finalement, il y a interaction des complexes dimère-ADN avec des coactivateurs spécifiques et des facteurs de transcription généraux.^{59,119,124,143,148} Ceci permet de produire des complexes permettant l'initiation de la transcription sur les promoteurs spécifiques des gènes cibles.^{7,65,72,74,112,113,118,119,125,147,152} Le complexe hormone-récepteur déclenche la régulation de la synthèse d'ARNm spécifique et la production de protéines responsables des effets des hormones de façon dépendante du type cellulaire.³ L'homodimérisation ER α /ER α ou l'hétérodimérisation ER α /ER β provoque une activation de la transcription qui est plus intense que l'activation fait par l'homodimère ER β /ER β .^{59,71} De plus, il y a aussi une variation dans l'activation de la transcription selon le dimère produit avec les récepteurs de la progestérone (PgR-A/PgR-A, PgR-A/PgR-B ou PgR-B/PgR-B).^{61,124} Ces différents dimères autant pour les récepteurs aux oestrogènes

que ceux pour la progestérone peuvent donc provoquer des réponses différentes dans la transcription et la synthèse protéique selon la dimérisation produite.⁷¹

Les complexes dimère-ADN peuvent aussi lier des corépresseurs incluant : des corépresseur des récepteurs nucléaires (NcoR) et des médiateurs silencieux des récepteurs pour l'acide rétinoïque et les hormones thyroïdiennes (SMRT). Ces corépresseurs peuvent donc empêcher la transcription.^{7,59} En effet, l'action inhibitrice de PgR-A est due à l'habilité de ce récepteur d'interagir avec des corépresseurs comme SMRT mais pas avec des coactivateurs.⁶⁵ Par contre, des études ont démontré que les coactivateurs peuvent améliorer dramatiquement l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires.^{3,74} Les coactivateurs (SRC-1, CBP) agissent en deux étapes (Figure 7).⁵⁹ Premièrement, ils font le lien entre les complexes stéroïdes-récepteurs et la machinerie transcriptionnelle. Deuxièmement, des études ont démontré que ces protéines accessoires possèdent ou interagissent avec des protéines ayant une activité histone acétyltransférase (HAT).^{59,74,143} Cette activité histone acétyltransférase permet, en remodelant la chromatine, de stabiliser le complexe de préinitiation de la transcription des gènes cibles.⁶⁵ La CBP est une protéine liant la CREB. Cette dernière est une protéine qui lie les éléments de réponse à l'AMPc.⁷⁴ Des études ont démontré que le CBP et SRC-1 fonctionnent ensemble, en interagissant avec AF-1 et AF-2, pour augmenter la fonction et l'activité transcriptionnelle de ER, AR et PR.^{59,74} En effet, ces coactivateurs (SRC-1 et CBP) sont importants pour moduler l'activation de l'expression de PgR médié par ER.⁷⁴ In vitro, SRC-1 augmente l'activité transcriptionnelle d'une variété de récepteurs nucléaires, incluant ER α , ER β et PgR, de façon dépendante du ligand.⁷⁴ De plus, le SRC-

1 est exprimé dans une variété de tissus répondant aux hormones stéroïdiennes incluant le cerveau, la prostate, les seins et l'utérus.⁷⁴

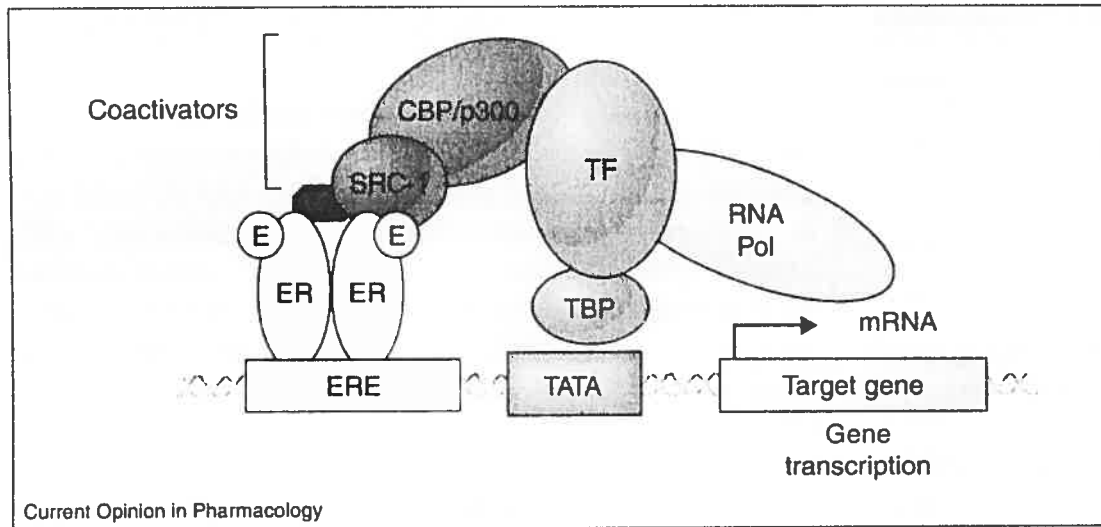


Figure 7 : Mécanisme moléculaire de la transcription de gènes cibles médiée par les complexes oestrogènes/récepteurs

La liaison de l'oestrogène à son récepteur provoque la dimérisation de deux complexes oestrogène/récepteur et amène la liaison de ce dimère à une séquence ERE sur l'ADN. Une fois liés, les récepteurs interagissent avec des coactivateurs tel que le « Steroid receptor coactivator » (SRC-1) et la « CREB binding protein » (CBP/p300). Ces coactivateurs jouent un rôle d'intermédiaire entre les récepteurs et la machinerie transcriptionnelle. Une fois recrutés, les facteurs de transcription se fixent à la « TATA binding protein » (TBP). Cette dernière permet de se lier à la séquence promoteur TATA en amont du gène cible. Finalement, la RNA polymérase interagit avec le facteur de transcription et permet l'initiation de la transcription du gène cible.

Effets génomiques et non-génomiques

Effet génomique

La voie classique des hormones sexuelles stéroïdiennes (aussi appelée effet génomique) est médiée, à long terme (heures à jours), via l'interaction entre les hormones et leurs récepteurs spécifiques.^{7,20,153,154} Lorsque les hormones stéroïdiennes se lient à

leurs récepteurs intracellulaires, ces derniers transloquent du cytosol au noyau et agissent comme facteur de transcription.^{3,34,139} Ces récepteurs sont des facteurs de transcription qui, une fois activés, peuvent altérer l'expression de gènes (Figure 8).^{10,15,147} En effet, ces altérations dans l'expression des gènes mènent à des changements dans les niveaux d'expression de différentes protéines.⁷ Par exemple, les oestrogènes augmentent les niveaux d'expression de HDL¹⁵⁵, de canaux calciques⁷, de facteur de croissance endothélial vasculaire¹⁵⁵ ainsi que de l'oxyde nitrique synthase (NOS) inductible (iNOS) et de la NOS endothéliale (eNOS).⁷ Au contraire, les oestrogènes provoquent une diminution des niveaux d'expression de LDL, de Lp(a), de protéine inhibitrice de l'activation du plasminogène¹⁵⁵ ainsi que d'angiotensinogène.⁷ De plus, les oestrogènes provoquent aussi une augmentation des niveaux d'expression du facteur natriurétique des oreillettes (ANF).⁷ La déficience en oestrogènes amène l'augmentation du niveau d'expression des récepteurs pour l'angiotensine (AT1).⁷ Les oestrogènes sont aussi responsable de l'inhibition de la réponse aux blessures vasculaires ainsi que l'effet préventif contre l'athérosclérose.^{7,10} De plus, les récepteurs aux oestrogènes et ceux pour la progestérone peuvent réguler la transcription de la connexin 43 trouvée dans les junctions gap du myocarde.⁷

Les récepteurs aux oestrogènes peuvent aussi activer la transcription via un mécanisme indépendant des oestrogènes (Figure 8).²⁸ C'est-à-dire que ce mécanisme se produit lors de l'absence d'oestrogènes. Par exemple, les facteurs de croissance tel « epidermal growth factor » (EGF) ou bien « insulin-like growth factor » (IGF-1) peuvent se lier aux récepteurs aux oestrogènes.¹⁵⁶ Ce mécanisme oestrogènes-indépendant peut se

produire via différentes voies signalitiques intracellulaires selon le type de cellules (vasculaires et non-vasculaires).¹⁰ Les facteurs de croissance activent donc les récepteurs aux oestrogènes et permettent d'augmenter l'activation de gènes cibles et l'expression de différentes protéines.¹⁵⁶ Il est possible que la voie oestrogènes-indépendant permet l'activation des récepteurs aux oestrogènes, chez les mâles dû à la présence de concentration très faible d'oestrogènes chez ces derniers.

Les deux mécanismes discuter auparavant font appel à la présence d'une séquence ERE dans la région du promoteur des gènes cibles. La transcription de certains gènes peut aussi être réalisée via des interactions protéines-protéines comme les facteurs nucléaires (NF-kB) ou bien les protéines activatrices (AP-1). Ces réactions n'impliquent pas les éléments de réponse aux hormones sur l'ADN et sont donc ERE-indépendant.^{3,73,147} En effet, les oestrogènes une fois lié à leurs récepteurs (ER α) peuvent activer l'expression de IGF-1 et de la collagénase. Ce mécanisme est médié par l'interaction du complexe oestrogènes-récepteurs avec les protéines Fos et Jun au niveau du site AP-1 sur l'ADN (Figure 8). Des études ont démontré que ce mécanisme nécessite les domaines contenant AF-1 et AF-2.¹⁵⁶ Ces deux domaines permettent d'augmenter l'activité des coactivateurs et d'augmenter la transcription. ER α joue un rôle d'activateur par contre ER β a un rôle d'inhibiteur lors de l'action des oestrogènes avec AP-1.^{114,146} Effectivement, ER β ne peut activer la transcription via ce mécanisme puisqu'il lui manque le domaine AF-1 qui est présent pour ER α .¹⁵⁶

D'une manière complètement différente, les oestrogènes peuvent moduler la transcription via des récepteurs extérieurs au noyau (voie alternative). Cette voie active les cascades signalitiques qui vont ultimement induire la transcription via les activateurs des éléments de réponse à l'AMPc ou bien via la phosphorylation et l'activation de facteurs de transcription.³

Effet non-génomique

Le modèle traditionnel de mécanisme d'action des hormones sexuelles a souvent été attribué aux actions de ces hormones via la localisation de leurs récepteurs spécifiques aux compartiments intracellulaires cytosoliques et nucléaires. Cette dispersion mène aux influences sur la transcription discuter auparavant (effets génomiques). Ceci résulte donc en un changement dans la synthèse protéique.^{4,7,10,153} Par contre, ce mécanisme n'explique pas une variété d'effets obtenus par l'action des hormones stéroïdiennes.¹⁵⁷ Plusieurs études récentes démontrent la présence d'effets rapides des stéroïdes (secondes à minutes).^{4,10,17,28,77,90,109,125,127,147,158-161} Ces effets rapides sont souvent référés comme étant des effets non-génomiques puisqu'ils ne sont pas dépendent d'un changement dans l'expression de gènes spécifiques (Figure 8).^{7,10,20,90,156,157}

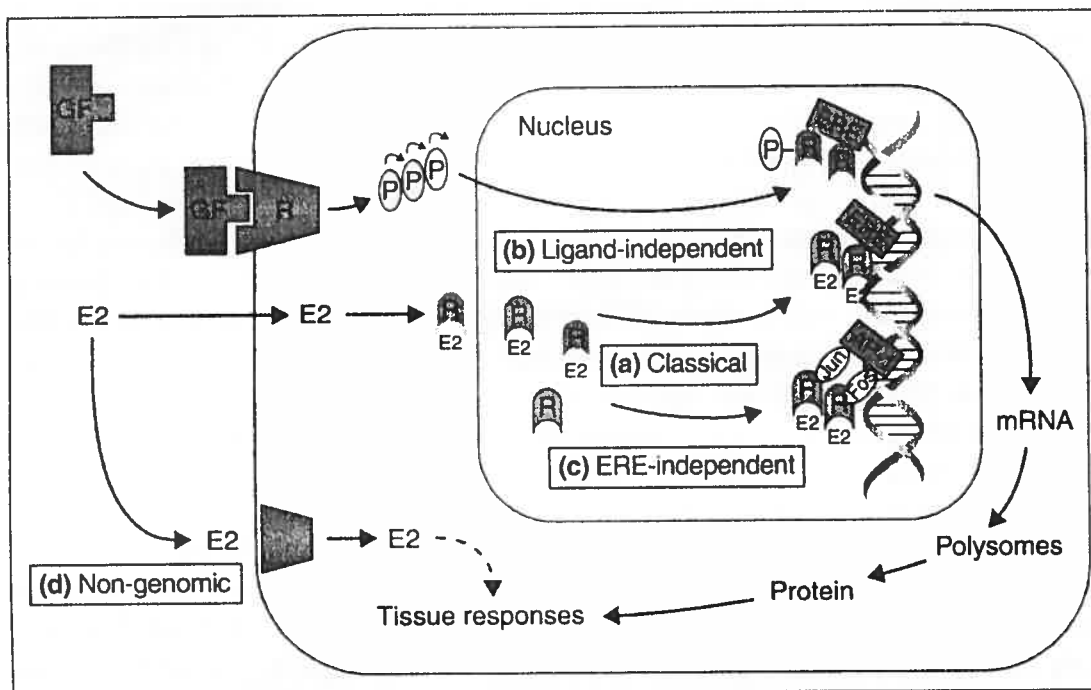


Figure 8 : Mécanisme cellulaire de signalisation des oestrogènes à leurs récepteurs

Quatre mécanismes possible sont présentés, desquels les trois premiers sont des voies génomiques. (A) La voie classique où la transcription de gène cible est ligand-dépendant. (B) la voie oestrogènes-indépendant, où la phosphorylation des récepteurs aux oestrogènes est produite par la liaison de ces derniers à des facteurs de croissance. (C) La voie ERE-indépendant où les complexes oestrogènes/récepteurs se lient à Jun et Fos pour s'attacher à la séquence AP-1 sur l'ADN au lieu de la séquence ERE. (D) La voie non-génomique où les effets rapides sont produits sans la transcription de gènes cibles.

Il y a beaucoup d'évidences démontrant que les hormones stéroïdiennes peuvent produire des effets rapides. Par exemple, la progestérone peut stimuler rapidement une augmentation du calcium intracellulaire dans les spermatozoïdes.¹⁴⁷ Les androgènes ont aussi été associés à une altération du calcium pouvant contribuer à la réponse hypertrophique dans les cardiomyocytes.³⁴ Plusieurs études ont démontré que les oestrogènes, à concentrations physiologiques (nanomolaire), peuvent provoquer la relâche rapide d'oxyde nitrique (NO) dans des cellules endothéliales en culture. Cette

relâche est trop rapide pour être associée à une augmentation de la transcription.^{23,125} Cet effet est associé aux récepteurs ER α au niveau de la membrane plasmique.³ De plus, plusieurs voies de signalisation peuvent être activées par les oestrogènes¹⁶² incluant le flux de calcium,¹⁴⁷ les kinases et l'activation de la NOS endothéliale,^{109,147,151,161} la génération d'AMP cyclique (AMPc), d'inositol triphosphate (IP3)¹⁴⁷ et la stimulation de phospholipase C (PLC).^{28,109,147,161} La génération d'AMPc et d'inositol triphosphate mène à l'activation de protéine kinase A (PKA) et protéine kinase C (PKC) respectivement.^{155,159}

Ces effets rapides suggèrent la présence de récepteurs stéroïdiens sur la membrane plasmique.^{4,7,10,23,147,151,153,155,158} De plus, les oestrogènes médient leurs actions via des récepteurs aux oestrogènes se trouvant dans le cytosol. La liaison des oestrogènes à leurs récepteurs ER α ou ER β peut déterminer l'interaction ou non avec Src ce qui peut donc provoquer un changement conformationnel de Src et mener à l'activation de la cascade de signalisation de Src/Ras/ERK. Des résultats similaires pour l'activation de cette cascade ont été démontrés via l'interaction avec les récepteurs aux androgènes ainsi qu'avec les récepteurs pour la progestérone.³ L'activation d'une kinase est dépendante du récepteur avec lequel le ligand interagit. Par exemple, les oestrogènes activent la kinase c-Jun N-terminal (JNK) via ER β mais l'inhibe via ER α dans les cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) exprimant les récepteurs aux oestrogènes.^{28,147,155}

Localisation souscellulaire des récepteurs hormonaux

Localisation

Une grande partie de ces récepteurs peuvent être récupérés dans la partie cytosolique de la cellule suite à une fractionnement de l'homogénat tissulaire.¹⁶³ En effet, les récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes ont été caractérisés dans le cytosol mais aussi dans les noyaux de différents tissus ou de cultures cellulaires de plusieurs espèces incluant le rat et l'humain.^{18,71,75,118} De plus, les PgR ont été retrouvés dans le cytosol mais très peu dans les noyaux de différents tissus.¹⁴² Il est bien établi que ces récepteurs peuvent faire la navette entre le noyau et le cytosol en absence de leur ligand (Figure 9).^{3,152} Une fois lié à leurs ligands, les récepteurs font la translocation du cytosol vers le noyau.^{113,125,152,153,164}

Les molécules entre 20-40 kDa traverse la double membrane nucléaire par simple diffusion passive tandis que le transport de molécules de plus de 40 kDa se produit par un mécanisme différent.¹⁶⁵ Le transport de ces dernières à travers la double membrane nucléaire se fait par un complexe de pore nucléaire (NPC).¹⁶⁵⁻¹⁶⁸ Ce transport est médié par une famille de facteurs de transport appelé les karyophérines- β .¹⁶⁵⁻¹⁶⁸ Ces dernières sont séparé en deux classes soit les importines et les exportines où elles dirigent les protéines dans le noyau ou bien à l'extérieur du noyau respectivement.¹⁶⁵⁻¹⁶⁸ Les importines, retrouvées dans le cytosol, se lient à la séquence de localisation nucléaire (NLS) de la protéine d'intérêt et ce complexe interagit avec une nucléoporine, ce qui permet de faire le transport vers le noyau à travers le pore nucléaire.¹⁶⁶⁻¹⁶⁹ Une fois dans le noyau, le complexe interagit avec une RanGTP qui permet la dissociation de

l'importine (qui sera recyclé vers le cytosol) et de la protéine d'intérêt.¹⁶⁶⁻¹⁶⁹ La RanGTP régule autant l'import que l'export de protéine à travers la membrane nucléaire.¹⁶⁶⁻¹⁶⁹ En effet, la protéine d'intérêt forme un complexe avec l'exportine qui lie ensuite la RanGTP et provoque la translocation vers le cytosol.¹⁶⁶⁻¹⁶⁹ Ce mécanisme pourrait s'appliquer aux récepteurs des hormones sexuelles stéroïdiennes. En effet, Freedman *et coll.* ont démontré que les récepteurs aux glucocorticoïdes, une fois liés à leurs ligands, interagissent avec les importines pour transloquer du cytosol vers le noyau.¹⁶⁷

Les récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes sont donc considérés comme étant des protéines intracellulaires. Par contre, les récepteurs aux oestrogènes peuvent se retrouver sur la membrane plasmique.¹²⁵ En effet, plusieurs études ont démontré la présence de ER α sur la membrane plasmique de cellules musculaires lisses vasculaires, pituitaires ou endothéliales.^{152,161} La présence et la distribution de ces récepteurs peuvent varier selon les différents tissus.⁴ En effet, ER α mais pas ER β est retrouvé dans le foie de mammifère.⁷² De plus, l'expression de ER α varie selon les différentes parties du cerveau.⁷² Il est important de noter que la différence de distribution de ER α et ER β pourrait expliquer les effets spécifiques des oestrogènes dans les différents tissus.^{72,95} On retrouve la même chose dans l'expression des isoformes des récepteurs de la progestérone. Le rapport PgR-A/PgR-B diffère selon les espèces.¹¹¹ En effet, chez les rats et les humains, l'isoforme A est plus abondant que l'isoforme B contrairement à d'autres espèces où l'isoforme B est la plus abondante.¹³⁰ D'autres études ont démontré la possibilité de retrouver ER α ou ER β au niveau de la membrane plasmique, dans des cellules ovariennes de hamster (CHO) transfectées.^{109,147,147,161} Par contre, la localisation

de ER β au niveau de la membrane plasmique peut être expliquée par le fait que les cellules transfectées surexpriment ces récepteurs de façon importante.⁷¹ Cette transfection permet aux oestrogènes d'exercer des effets rapides via les récepteurs ER α et ER β .⁷¹ Il est donc important, pour étudier les rôles des hormones sexuelles stéroïdiennes de déterminer la localisation souscellulaire des récepteurs spécifiques à ces différentes hormones. Ces récepteurs peuvent donc se retrouver au niveau de la membrane plasmique, du cytosol ou bien au noyau.³

Membrane plasmique

Les ER α au niveau de la membrane plasmique sont similaires aux ER α retrouvés dans les noyaux.²⁸ Ces deux récepteurs proviennent du même produit de la transcription et ils possèdent le même poids moléculaire.¹⁶² De plus, ils interagissent avec les mêmes anticorps spécifiques contre ER α .³ Des études ont démontré que les ER α sont associés, en partie, avec des microdomaines appelés les cavéolae qui facilitent les mécanismes de signalisation intracellulaire.^{28,71,77,109,151,155,158,159,161} Les cavéolae sont des invaginations de la membrane plasmique.¹⁷⁰ Ces structures ont été impliquées dans différents processus incluant l'endocytose, le trafic intracellulaire du cholestérol et les mécanismes de signalisation intracellulaire.¹⁷¹ Les cavéolae ont une composition distincte du reste de la membrane plasmique. En effet, elles sont enrichies de cholestérol, de glycosphingolipides et de sphingomyélines ainsi que des protéines de signalisation modifiées en lipides.¹⁷¹ Cette localisation des ER α associée aux cavéolae est dépendante d'une haute teneur de la membrane plasmique en cholestérol et de la présence de cavéoline-1.^{28,155} Dans les cellules du cancer du sein, la cavéoline-1 facilite la translocation de ER α à la membrane

et la localisation des ER α dans les cavéolae. Ces deux protéines se lient dans le cytosol et dans la membrane plasmique.^{159,161} L'expression de cavéoline-1 est suffisante pour induire l'activation de ER α indépendamment de son ligand et peut aussi potentialiser la signalisation de ER α en présence de ligand.¹⁷¹ De plus, dans les cellules ovariennes de hamster (CHO), les ER α peuvent s'associer avec la cavéoline-1 ou la cavéoline-2.¹⁶¹ Récemment des études ont démontré l'importance du résidu sérine 522 (retrouvé dans la région du domaine E) dans la translocation, la localisation et la fonction de ER α au niveau de la membrane plasmique.¹⁶¹

Modification post-traductionnelle

On ne sait pas si les ER α sont associés à la membrane plasmique ou bien s'ils traversent complètement cette membrane. Il est difficile de concevoir la présence de ER α directement à travers la membrane plasmique. Un passage transmembranaire nécessite un domaine hydrophobe assez long qui n'est pas existant dans les ER α .^{71,162} Les ER α ont seulement une courte région hydrophobe qui pourrait être considérée comme cible pour la membrane plasmique, mais cette séquence est directement située dans la région de liaison du ligand.^{23,76,144} Une alternative est l'implication de modifications lipidiques post-traductionnelles des récepteurs allant vers la membrane plasmique.^{23,76,144,147,152,158,162} Ces modifications peuvent être dues à une myristoylation ou palmitoylation.^{152,158} En effet, l'addition de ces ancrages lipidiques (palmitoylation or myristoylation) permettraient de promouvoir le mouvement de ces récepteurs vers la membrane plasmique. Il y a absence de sites de palmytoylation, par contre quatre à sept séquences de myristoylation ont été démontrées chez plusieurs espèces.^{4,71,147} Ces ancrages lipidiques permettraient aux

récepteurs de se lier à une protéine près de la membrane plasmique ou carrément à une protéine directement dans cette membrane.^{23,76,144}

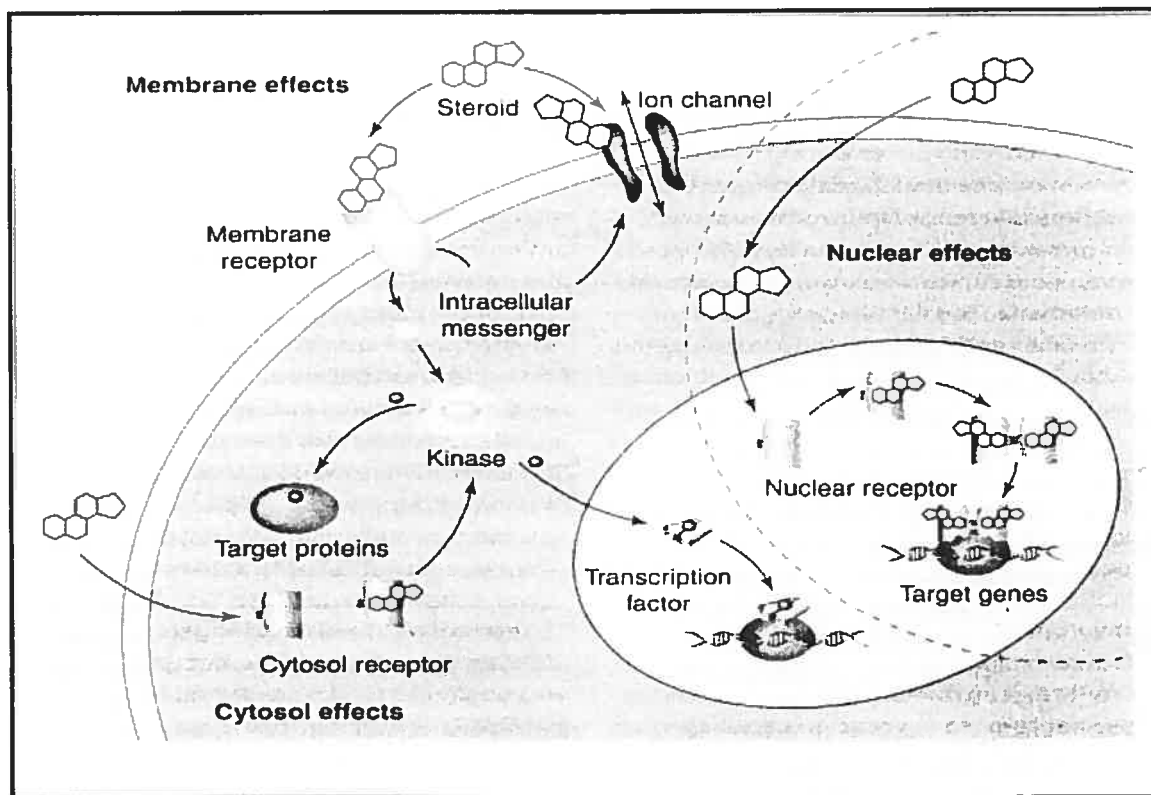


Figure 9 : Localisation des récepteurs aux oestrogènes

Les cibles potentielles des oestrogènes apparaissent dans trois compartiments cellulaires distincts. Premièrement, au niveau de la membrane plasmique, les cibles incluent les récepteurs aux oestrogènes ainsi que les canaux ioniques activés soit par un ligand ou par le voltage. L'activation de ces récepteurs peut provoquer l'activation de second messenger intracellulaire agissant sur les kinases. Deuxièmement, des récepteurs cytosoliques peuvent aussi agir sur des mécanismes reliés aux kinases. L'activation des récepteurs plasmiques ou cytosoliques peuvent ultimement agir sur l'expression de certains gènes. Finalement, les oestrogènes peuvent aussi agir sur des récepteurs nucléaires, qui provoquera un changement dans la transcription de gènes cibles en se liant sur l'ADN.

Régulation hormonale

Effet de l'ovarectomie sur les récepteurs hormonaux

L'ovarectomie résulte en une diminution significative des niveaux d'oestrogènes et de progestérones circulants ce qui s'apparente à la ménopause.^{89,118,141,172} En effet, lors de la ménopause, il y a une chute importante des taux d'oestrogènes et de progestérone produits par les ovaires.^{26,72,90} Chez le rat, l'ovarectomie mène à une augmentation des réserves énergétiques corporelles.¹⁷³ Les oestrogènes seraient responsables de ces effets puisqu'un traitement de remplacement des oestrogènes prévient ce gain énergétique chez les rates ovariectomisées.¹⁷³ Cette augmentation est accompagnée par des adaptations concomitantes du métabolisme périphérique des lipides incluant une augmentation de la production de lipide par le foie, une élévation des taux de lipoprotéines circulants et l'induction des voies impliquées dans l'accumulation des gras.¹⁷³ On remarque donc un gain pondéral des sujets ovariectomisés,^{72,89,118,141,173} ceci étant dû à une diminution de l'activité catabolique des oestrogènes.¹⁷³ De plus, l'ovarectomie mène à une atrophie de l'utérus due à une diminution de l'activité utéro-trophique des oestrogènes. Cette atrophie de l'utérus est inhibée par un traitement de remplacement aux oestrogènes.^{20,48,80,89,118,127,141,157,172,173}

Plusieurs études ont eu lieu sur les effets des oestrogènes sur différents tissus et dans différentes espèces. En effet, des études ont démontré dans des cellules endothéliales de foie que l'ovarectomie mène à une diminution des récepteurs aux oestrogènes.⁷⁷ L'ovarectomie amène aussi une diminution des récepteurs aux oestrogènes dans les tissus intestinaux de rats ainsi qu'une diminution de l'ARNm des récepteurs aux

oestrogènes dans les tissus osseux de rats. En effet, on remarque une diminution des récepteurs aux oestrogènes chez les sujets ovariectomisés mais une augmentation de ces récepteurs chez les sujets ovariectomisés recevant un traitement de remplacement aux oestrogènes.⁷² Par contre, d'autres études ont démontré que l'ovariectomie provoquait une augmentation des récepteurs aux oestrogènes dans les reins et l'utérus de rats⁷² ainsi que dans les plaquettes de cochons.²⁰ De plus, dans ces études, les traitements de remplacement aux oestrogènes suite à l'ovariectomie ont provoqué un retour à la normale des niveaux d'expression des récepteurs aux oestrogènes.^{20,72,77} Les traitements d'oestrogènes font aussi diminuer les niveaux des récepteurs aux oestrogènes et augmenter les niveaux de récepteurs à la progestérone cytosoliques dans les cellules cancéreuses de l'endomètre et du sein de souris.¹⁷⁴

La régulation des récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes suite à l'ovariectomie et aux traitements de remplacement oestrogéniques varie selon les différents tissus étudiés. La connaissance des niveaux d'expression et de la régulation de ces récepteurs est importante pour évaluer le rôle spécifique des agonistes et des antagonistes dans les différents tissus. Ces connaissances permettront d'améliorer la compréhension des mécanismes d'action de ces récepteurs et ultérieurement d'ouvrir la voie dans l'étude des voies possibles de signalisation intracellulaire.

But du projet

Les maladies cardiovasculaires (MCV) telles l'hypertension, l'athérosclérose, les arythmies et la mort subite cardiaque constituent la principale cause de mortalité au Canada autant chez les femmes que chez les hommes. Cependant, il existe une différence importante entre les sexes dans l'incidence de ces maladies. En effet, les hommes d'âge moyen ont plus de risque de développer ces maladies comparativement aux femmes du même âge. Par contre, cette différence s'estompe lors de l'apparition de la ménopause où l'incidence des MCV, chez la femme, devient similaire ou supérieure à celle observée chez les hommes du même âge. Sachant que les différences entre les hommes et les femmes au niveau de l'incidence des maladies cardiovasculaires s'estompe lors de la ménopause on peut donc faire l'hypothèse qu'il y a une implication des hormones sexuelles stéroïdiennes relié à ces différences. Récemment le laboratoire du Dr. Fiset a démontré une différence marquée entre les souris mâles et femelles au niveau de la repolarisation ventriculaire. De plus, le laboratoire a aussi évalué le rôle des androgènes et de la castration dans la repolarisation cardiaque. Afin de déterminer l'implication des hormones sexuelles dans les maladies cardiovasculaires, il est primordial d'étudier si ces hormones agissent au niveau cardiaque.

Sachant que l'effet des hormones est médié par la liaison à leurs récepteurs spécifiques, l'objectif principal était donc d'évaluer la présence et la localisation souscellulaire des récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes au niveau du coeur de souris. La localisation souscellulaire d'un récepteur peut déterminer si son action est génomique ou non-génomique. Le premier objectif était d'évaluer les niveaux

d'enrichissement et/ou de contamination des différentes fractions protéiques obtenues suite à des protocoles d'isolation de protéines. Cette évaluation à été faite avec différents marqueurs spécifiques d'organelles intracellulaires. Le deuxième objectif était de déterminer la localisation sous cellulaire et la comparaison, entre les ventricules et les oreillettes, des niveaux d'expression de ces différents récepteurs entre les mâles et les femelles. Finalement, le dernier objectif était d'examiner l'effet de l'ovarectomie sur le niveau d'expression des récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes chez la souris. Donc, cette étude nous a permis d'améliorer notre compréhension des mécanismes de fonctionnement des hormones sexuelles et de leurs récepteurs spécifiques au niveau cardiaque.

ARTICLES

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SUBCELLULAR PROTEIN
FRACTIONS FROM MOUSE HEART**

Eric Lizotte,^{1,2} Annie Tremblay,^{1,2} Bruce G Allen¹ and Céline Fiset^{1,2}

¹Research Center, Montreal Heart Institute

²Faculty of Pharmacy, Montreal University
Montreal, Quebec, Canada

Short title: Protocols for isolating subcellular protein fractions

Corresponding author: Dr. Céline Fiset

Research Center, Montreal Heart Institute

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

Tel : 514-376-3330 (Ext. 3025)

Fax : 514-376-1355

E-mail : celine.fiset@icm-mhi.org

Key Words: Membrane isolation, cardiac muscle, mouse, enzyme

ABSTRACT

In this study we report different protocols used to obtain highly enriched and well-characterized protein fractions that could be used to determine the subcellular localization of proteins. Different protein fractions (total, cytosolic, total membrane, sarcolemmal and nuclear protein) were isolated from mouse heart by a combination of either Polytron homogenization or liquid nitrogen pulverization followed by density gradient centrifugation. Triton X-100 was used in specific fractions to help solubilization of proteins obtained with fractionation protocols. Following the isolation, enzymatic assays and Western Blot analysis were used to evaluate the enrichment and/or cross-contamination of these protein fractions. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, Na⁺/K⁺-ATPase, Mitochondrial Ca²⁺-ATPase, Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase, GRP(Bip)78 and NucP62 were used as specific markers for the cytosol, sarcolemma, mitochondria, sarco-endoplasmic reticulum, endoplasmic reticulum and nucleus, respectively. The results show that we obtained enriched protein fractions with little to no cross-contamination. These purification protocols allow us to obtain different protein fractions that could be used in a wide variety of studies.

INTRODUCTION

Several different procedures have been described for the isolation of different protein fractions (sarcolemma, sarcoplasmic reticulum, cytosol, mitochondria, nucleus, etc) from mammalian tissues [1-8]. The diversity of methods emphasizes the fact that not one procedure is generally accepted as yielding highly purified protein fractions [1]. In fact, a wide variety of techniques, reported by Bers *et al.* used different methods to break up cells such as Waring blender, Potter-Elvehem, Polytron homogenization or hypotonic shock [9]. Furthermore, low speed differential centrifugation or density gradient centrifugation can increase the diversity of the different methods that can be utilized [9].

Using a modification of protocols published by Jones *et al.* [1] and Boivin *et al.* [10], we have isolated different protein fractions (homogenate, total, cytosolic, total membrane and sarcolemmal) while nuclear protein fractions were prepared using a modified protocol published by Jones *et al.* [8]. Some enzymes have the property of catalyzing chemical reactions but can also be used as specific markers depending on their localization. Indeed, Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G-6-PDH) [11-13], Na⁺/K⁺-ATPase [14-16], Mitochondrial Ca²⁺-ATPase (MCA) [3;17;18], Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) [[18-21], Glucose-Regulated Protein (GRP(Bip)78) [21] and Nucleoporin P62 (NucP62) [22;23] were used as specific markers for the cytosol, the sarcolemma, the mitochondria, the sarco-endoplasmic reticulum, the endoplasmic reticulum and the nucleus respectively. The purpose of this study was to obtain highly enriched and well characterized protein fractions that could be used to determine the subcellular localization of different proteins in the mouse heart.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

Male and female CD1 mice (Charles River laboratories, St-Constant, Quebec, Canada) were anesthetized with isoflurane and sacrificed by cervical dislocation. Hearts were quickly removed and placed on ice-cold tyrode solution containing (in mM) 130 NaCl, 5.4 KCl, 1 MgCl₂, 0.33 Na₂HPO₄, 10 Hepes, 5.5 glucose and 1 CaCl₂ (pH 7.4). Ventricles and atria were then separated, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. Animal handling followed the guidelines of the Canadian Council of Animal Care.

Membrane preparation

Five different protein fractions (homogenate, total, cytosolic, total membrane and sarcolemmal) were prepared using a modification of protocols published by Jones *et al.* [1] and Boivin *et al.* [10]. The frozen hearts [4] were homogenized three times at high speed (Polytron PowerGen125) at 4°C in a homogenizing solution for 20 sec. The homogenizing solution contained (in mM) 20 Tris (pH 7.4), 1 EDTA, 0.01 leupeptin, 1 Na₃VO₄, 0.6 benzamidine, 1 PMSF and 15 µg/mL aprotinin. A small quantity of homogenate was kept as is while the remainder was aliquoted into three tubes. After a 2-hour incubation period at 4°C with 1% triton X-100 to solubilize the protein, the first tube was centrifuged at 10 000 g for 10 min to remove cell debris, nuclei and mitochondria. The supernatant was kept as the total protein fraction. The second tube was centrifuged at 200 000 g and 4°C for 20 min. The supernatant was referred to as the cytosolic fraction while the pellet was resuspended in homogenizing buffer containing 1% triton X-100. After 30 min incubation on ice, a second centrifugation was done at 200 000 g as

described above and the resulting supernatant was referred to as the total membrane protein fraction. The third tube was centrifuged at 10 000 g for 10 min. The supernatant obtained was centrifuged at 200 000 g and 4°C for 20 min and the pellet was resuspended in the homogenizing buffer containing 0.6 M KCl to dissociate myofibrillar proteins. A second and third centrifugation were done at 200 000 g and 4°C for 20 min to wash out the KCl. Finally, the pellet was resuspended in the homogenizing buffer and employed herein as an enriched sarcolemmal fraction [1].

Nuclear membrane proteins were prepared using a modified protocol published by Jones *et al.* [8] The hearts were crushed into a fine powder in liquid nitrogen. The powder was mixed with Tris-buffered saline (TBS) solution containing (in mM) 25 Tris, 135 NaCl, 2.5 KCl (at pH 7.4) and homogenized once at low speed for 30 sec (Polytron PowerGen125). A first centrifugation was done at 450 g and 4°C for 15 min to remove cell debris. The resulting supernatant was mixed with an isotonic solution comprising (in mM) 10 Hepes (pH 7.4), 1.5 MgCl₂, 10 KCl, 0.5 DTT, 0.2 Na₃VO₄ and 25 µg/mL leupeptin. Nuclei were pelleted by centrifugation at 2 000 g and 4°C for 15 min. The pellet was then resuspended in a hypertonic solution comprising (in mM) 300 Hepes, 1400 KCl, 30 MgCl₂, 0.2 Na₃VO₄ and 25 µg/ml leupeptin and incubated on ice for 20 min to allow the nuclei to shrink. The resuspended pellet was then centrifugated at 2 000 g as described above. The final pellet was resuspended in a storage solution containing (in mM) 20 Hepes, 420 NaCl, 1.5 MgCl₂, 0.2 EDTA, 0.5 PMSF, 0.5 DTT, 0.2 Na₃VO₄, 25% (v/v) glycerol and 25 µg/mL leupeptin. Protein concentrations were determined by

the method of Bradford using bovine serum albumin as a standard [24]. Following isolation all fractions were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

Enzymatic assays

Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) activity was employed as a specific marker for the cytosol [11-13]. The reaction medium contained 1 M Tris-HCl (pH 9.0), 1 mM β -nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADP) and 10 mM glucose-6-phosphate. Samples were added to 1 ml of the reaction medium and the optical density was determined at 340 nm every 5 min for a period of 90 min. All samples were assayed in duplicate. Preliminary experiments were performed to ensure that the quantity of each subcellular fraction assayed was within the luminal range of each marker assay system.

Na^+/K^+ -ATPase. The Na^+/K^+ -ATPase activity was assayed as a marker for the sarcolemma [15;16]. The Na^+/K^+ -ATPase activity was “unmasked” by preincubating the proteins on ice in the presence of 1% SDS for 30 min. Activity was subsequently assessed in a medium containing (in mM) 50 histidine, 1 EGTA, 3 MgCl_2 , 10 KCl, 10 NaN_3 , 100 NaCl and 1 DTT with or without 1.5 mM ouabain. The latter is a specific inhibitor of the Na^+/K^+ -ATPase. The reaction was initiated by the addition of ATP solution (in mM) (30 Tris-ATP, 50 histidine and 3 MgCl_2). Following an incubation at 37°C for 60 min, reactions were terminated by the addition of 10% SDS and the formation of inorganic phosphate was measured (see below). The Na^+/K^+ -ATPase

activity was defined as the ouabain-sensitive difference in inorganic phosphate released per mg of protein per hour [14]. All tubes were done in duplicate.

Ca²⁺-ATPase. There are three different Ca²⁺ pumps present in the heart: the mitochondrial Ca²⁺-ATPase (MCA), the plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) and the sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA). The Ca²⁺-ATPase activity was measured under three different conditions in a solution containing (in mM) 50 histidine, 1 EGTA, 3 MgCl₂, 110 KCl, 1 DTT, 1.5 ouabain and in the presence or absence of 10 mM sodium azide (NaN₃) or 10 mM NaN₃ plus 10 μM thapsigargin. NaN₃ is a specific inhibitor for the MCA [3;17] while thapsigargin is a specific inhibitor for the SERCA [21]. Each of these activities was determined in the presence or absence of 1.5 μM CaCl₂. Then 1.5 μM Ca²⁺ ionophore A23187 (calcymycin) was added to the proteins before the beginning of the assay. Reactions were started by the addition of ATP solution (same as described above in Na⁺/K⁺-ATPase assay) and allowed to proceed at 37 °C for 90 min. Reactions were terminated by the addition of 10% SDS and the release of inorganic phosphate was measured (see below). The Ca²⁺-dependent activity was calculated by subtracting the basal (Ca²⁺-independent) activity from the total activity for each of the three different buffers. All tubes were done in duplicate.

Determination of inorganic phosphate. Inorganic phosphates released were measured by a modified version of the method of Fiske and Subbarow [25]. Preliminary experiments ensured that inorganic phosphate release was linear with time or amount of protein added. Inorganic phosphate was determined colorimetrically by adding 9% ascorbic acid and a

mixture of 1.25% ammonium molybdate and 6.5% H₂SO₄ [26]]. After 30 min of incubation at room temperature, the absorbance was read at 660 nm and the amount of inorganic phosphate determined from a standard curve.

Western blots

Equal quantities of protein were separated by SDS-PAGE electrophoresis. This technique was performed using a 4% acrylamide stacking gel followed by a 5-15% gradient separating gel. The proteins were electrophoretically transferred onto nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech Inc, San Francisco, Ca) for 1½ hours at 350 mV. The non-specific binding sites of the membranes were blocked by incubation for 1½ hours at room temperature in TBS buffer containing 0.1% Tween 20 and 5% non-fat dried milk (TBST-NFDM 5%). Afterward, the membranes were incubated overnight in TBST-NFDM 1% at 4°C with polyclonal antibodies generated against either the N-terminal amino acids of human GRP (BIP) 78 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, California, USA) which is a specific marker of the endoplasmic reticulum [21], or the C-terminal of rat Nuc P62 (1:250; Santa Cruz biotechnology, California, USA) which was used as a specific marker of the nuclear membrane [23]. Afterward, the blots with Nuc P62 were washed and incubated for 1 hour with donkey anti-goat IgG antibodies conjugated to biotin in TBST-Bovine Serum Albumin (BSA) 1% (1:10 000; Jackson Laboratories, PA, USA). Finally, blots with GRP (BIP) 78 antibodies were washed and incubated with donkey anti-goat IgG antibodies conjugated to horseradish peroxidase (1:10 000; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) for 3 hours whereas the other blots were incubated for 3 hours with goat anti-rabbit IgG antibodies conjugated to

horseradish peroxidase (1:10 000; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). The blots with Nuc P62 were washed again and then incubated for 1 hour with streptavidin conjugated to horseradish peroxidase in TBST (1:10 000; Jackson Laboratories, PA, USA). The membranes were washed again and immune complexes were visualized by enhanced chemiluminescence. Ponceau S was used to confirm uniformity of the protein transfer to nitrocellulose membranes.

Reagents

All standard chemicals and reagents were obtained from Sigma Chemicals Co. (St-Louis, MO) unless otherwise specified.

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Unpaired Student t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed with a Newman-Keuls post-hoc test was used to compare mean data. The results were considered statistically significant when P values were less than 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

PROTEIN FRACTIONS

Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. The different proteins fractions obtained were tested with specific markers for different cellular organelles to determine the degree of enrichment and/or contamination of these fractions. The activity of the G-6-PDH (a marker for the cytosol) was measured, in the presence of excess glucose-6-phosphate and NADP, by the increase in absorbance at 340 nm, which corresponds to the formation of NADPH (reduction of NADP) [13]. As shown in Figure 1, when compared to the homogenate, the enzymatic activity of this marker showed a 2.5-fold increase and almost a 5-fold increase of activity in the total and cytosolic protein fractions, respectively. The small activity of this enzyme in the nuclear fraction may reflect the presence of cytosol from inside the nucleus, the perinuclear space or the endoplasmic reticulum lumen. In contrast, the total membrane protein fraction possesses a slight portion of the enzymatic activity comparable to the homogenate activity. In the sarcolemmal fraction, the G-6-PDH activity was very low demonstrating only minor cross-contamination of the sarcolemma with cytosol. Hence the total protein and cytosolic fractions were enriched in cytosolic markers whereas membranous protein fractions contained minimal or no cytosolic proteins.

Na⁺/K⁺-ATPase. Using ouabain-sensitive Na⁺/K⁺-ATPase activity we have evaluated the degree of enrichment and/or contamination of sarcolemma. Ouabain is a potent inhibitor of Na⁺/K⁺-ATPase. Indeed 98% of the activity of the enzyme can be inhibited by 50 μM ouabain [15;16]. After subfractionation, the sarcolemmal vesicles have a tendency to

reseal in an inside-out or outside-out orientation and thus influences the orientation of the Na^+/K^+ -ATPase pumps and mask its activity [27]. In fact, the activity of this pump cannot be measured in sealed plasma membrane vesicles, regardless of orientation of the vesicles, since ATP and ouabain bind on opposite membrane faces of this transmembrane pump. Hence we used 1% SDS to render the sarcolemmal vesicles leaky and allow the ouabain and the ATP to access both populations of sites [4]. Results obtained in this study show that the Na^+/K^+ -ATPase activity was 10-fold higher in the sarcolemmal fraction compared to the homogenate (Figure 2). Moreover the other protein fractions contained only minimal or no contamination.

Earlier studies used the pellet of the 10 000 g centrifugation, instead of the supernatant, to ultimately obtain the sarcolemmal fraction [4,28-30]. Usually, following the 10 000 g centrifugation, the supernatant was centrifuged at 200 000 g to pellet sarcolemmal vesicles. To validate this method in relation to previous techniques for isolating sarcolemma, we reserved the pellet from the 10 000 g centrifugation and kept on going with the ultracentrifugation as described in the methods to obtain sarcolemmal proteins. The Na^+/K^+ -ATPase activity was measured and only a very small activity was observed in this fraction compared to the sarcolemmal fraction obtained from the supernatant of the 10 000 g centrifugation; proving thus that we lose very few plasma membranes in the 10 000 g pellet (data not shown).

Ca²⁺-ATPase. Determining the Ca^{2+} -ATPase activities allowed us to compare the activity of the three different Ca^{2+} pumps (PMCA, MCA, SERCA) in the subcellular

fractions. The activity of these pumps was obtained by the difference in inorganic phosphate produced in presence and absence of calcium. Using NaN_3 and thapsigargin to inhibit the MCA and SERCA respectively we were able to determine the relative amount of the different organelles present in the different protein fractions. As shown in Figure 3A, the activity of the MCA is significantly higher in the homogenate compared with the other fractions. In fact, the other fractions were almost free of mitochondrial contamination. One would expect an increase of activity of the MCA in the total membrane fraction; however the activity of the mitochondrial calcium pumps was undoubtedly lost due to an uncoupling of the mitochondrial F_1F_0 -ATPase activity following the treatment with detergent Triton X-100 [18].

There was no detectable enrichment or depletion in the PMCA activity in all of the protein fractions (Figure 3B). There are at least two possible explanations for this result. First, in muscle cells the relative contribution of PMCA is negligible [3]. The quantity of Ca^{2+} -ATPase pump on the plasma membrane is very low compared to the SERCA or the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger [31]. Typically, in the cardiac muscle cell the PMCA pumps represent only a minor fraction (0.1%-0.01%) of the intrinsic membrane proteins [32;33]. Moreover, vanadate inhibits the PMCA activity. Studies have shown that 1 mM vanadate inhibits PMCA-mediated Ca^{2+} extrusion by up to 99% [34;35]. These studies also showed that vanadate inhibition is irreversible and that its effects are comparable between intact cells and isolated or purified PMCA preparations [34;35].

SERCA activity is not affected by treatment with Triton X-100, although the mitochondrial calcium pump is uncoupled by this detergent [18]. Ca^{2+} -ATPase isoforms from skeletal and cardiac muscle sarcoplasmic reticulum, hepatocyte microsomes and brain endoplasmic reticulum are sensitive to very low concentrations of thapsigargin (<1 nM) [19;20]. In fact, Ji et al. showed that even with preincubation (2 min at 37°C) of reaction mixture containing microsomal protein with only 1 μM of thapsigargin resulted in 92-96% inhibition of Ca^{2+} -dependent ATP hydrolysis [36]. Although SERCA is similar to the Na^+/K^+ -ATPase in terms of reaction mechanism, thapsigargin does not affect Na^+/K^+ -ATPase nor the PMCA activity [2,32,37]. In the present study, calcymycin (A23187) was added to the reaction to render the protein vesicles calcium-permeable, thereby avoiding inhibition of the Ca^{2+} -ATPase activity by a rise of calcium in the lumen of the vesicles [19]. As shown in Figure 3C, the SERCA activity was higher in the homogenate and sarcolemmal fraction compared to the other protein fractions. In fact, there was a significant depletion of sarcoplasmic reticulum marker in all of the protein fractions compared to the homogenate, except for the sarcolemma. The homogenate and the sarcolemmal fraction were not significantly different from each another. Figure 3C shows that there is a possible smooth endoplasmic reticulum contamination of the sarcolemmal protein fraction. In skeletal muscle, the surface area of the plasma membrane is relatively small compared to sarcoplasmic reticulum (SR) membranes and transverse-tubule-derived membranes. Hence, these more abundant membranes can be present as contaminants in sarcolemmal preparations: the degree of contamination will vary with the different isolation/purification techniques [7].

We can see in Figure 4 the comparison of the ATPase activity (Na^+/K^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase) in our five different fractions. The ATPase activity of the MCA and PMCA were minimal compared to the activity of the SERCA and the Na^+/K^+ -ATPase. The Na^+/K^+ -ATPase was enriched 10-fold in the sarcolemmal fraction compared to the homogenate. In contrast, there was no significant difference in the SERCA activity between the homogenate and the sarcolemmal fraction, but these two fractions were different from the four other protein fractions studied. Knowing that there is the presence of smooth endoplasmic reticulum in the sarcolemmal fraction, we looked also for the presence of rough endoplasmic reticulum.

GRP (BIP) 78. The glucose-regulated protein GRP (BIP) 78 is found almost exclusively in the endoplasmic reticulum [21]. Like other endoplasmic reticulum-luminal proteins, it contains a carboxy-terminal tetra peptide sequence KDEL, which is known to act as a retention signal in the endoplasmic reticulum. The Western blot analysis of GRP (BIP) 78 (78 kDa) distribution shows a high abundance of this protein in the total membrane fraction (Figure 5). This result reflects the high sedimentation of endoplasmic reticulum in the total membrane protein fraction. In the total protein fraction, we can observe lower intensity in the band compared to the total membrane fraction whereas the nuclear fraction has a very faint band. The fact that the outer nuclear membrane is an extension of the endoplasmic reticulum membrane could explain the presence of this faint band in the nuclear fraction [38]. The cytosolic fraction, however, shows an absence of any endoplasmic reticulum contamination. The sarcolemmal fraction showed a 2-fold increase compared to the total protein fraction. This result shows that either GRP (BIP)

78 is localized in part on the sarcolemma or that there is a small contamination in the sarcolemmal fraction with endoplasmic reticulum [21]. Of note, under normal culture conditions only baseline levels of this marker are expressed on cell membrane [21].

Using GRP (BIP) 78 as a marker for both the smooth and rough endoplasmic reticulum, we showed higher abundance of endoplasmic reticulum in the total membrane protein fraction and in the sarcolemmal protein fraction compared to the total protein fraction. This result is consistent with the results obtained with the SERCA activity in Figure 4, where there was higher abundance of sarcoplasmic reticulum in the sarcolemmal fraction compared to the total protein fraction. In fact, when looking at Figure 4, there is a 8-fold increase of the SERCA activity in the sarcolemmal fraction compared to the total protein fraction, establishing the presence of smooth endoplasmic reticulum in the sarcolemmal fraction. If the abundance of the rough endoplasmic reticulum does not vary between protein fractions, we should see at least a 8-fold increase of the total endoplasmic reticulum in the sarcolemmal fraction compared to the total protein fraction. But when looking at Figure 5, there is only a 2-fold increase of total endoplasmic reticulum (smooth and rough) expression in the sarcolemmal fraction compared to the total protein fraction. This 2-fold increase of GRP (BIP) 78 in the sarcolemmal fraction compared to the total protein fraction indicates that there was depletion of rough endoplasmic reticulum from the sarcolemmal fraction.

The loss of rough endoplasmic reticulum can be explain by the fact that in the presence of 0.5mM EDTA, 50% of rough endoplasmic reticulum is precipitated with

association to the mitochondria and only 35% of the ribosomes are still attached to the rough endoplasmic reticulum.(5;39) Furthermore with the addition of 0.5 M KCl to the homogenizing buffer, there is a complete uncoating of ribosomes from the rough endoplasmic reticulum leading to a lighter equilibrium density [6,40,41]. In the present study, the homogenizing buffer contains 1mM EDTA with the addition of 0.6 M of KCl to obtain the sarcolemmal fraction. After the 200 000 g centrifugation, the buffer helps to precipitate the sarcolemmal protein while leaving the rough endoplasmic reticulum in the supernatant. The comparison of results shown in Figures 4-5 confirm that our subfractionation technique results in depletion of rough endoplasmic reticulum from the sarcolemmal fraction.

NUC P62. Using the Nucleoporin p62 (Nuc p62), we have evaluated the degree of enrichment and/or contamination of nuclear components in the different protein fractions [23]. The nuclear envelope (NE) is made of two distinct membranes (i.e. the outer nuclear membrane and the inner nuclear membrane). This double membrane is separated by a perinuclear space, where this lumen is structurally and functionally related to the endoplasmic reticulum [22;23]. Both membranes are thought to fuse at the nuclear pore complex, which controls the bidirectional traffic of macromolecules across the nuclear membrane [42;43]. In Figure 6, Nuc p62 is weakly detected in the total protein fraction whereas stronger signals were observed in the total membrane protein fraction. The nuclear fraction showed an enrichment of Nuc p62 compared to the total protein fraction. The cytosolic and sarcolemmal fractions are almost free of any nuclear contamination. The nuclear fraction contained only low levels of the different specific markers

suggesting that the nuclear fraction was highly enriched having little or no contamination with other cellular organelles. The presence of the endoplasmic reticulum marker GRP (BIP) 78 in the nuclear fraction (Figure 5) may be due to the fact that the outer nuclear membrane is a continuation of the rough endoplasmic reticulum and hence may share some of the same membrane-bound proteins [44].

CONCLUSION

In this study, different protein fractions (total, cytosolic, total membrane, sarcolemmal and nuclear) were isolated from mouse heart using fractionation protocols. Using specific markers for different cellular organelles, we established that our subfractionation techniques produced protein fractions that were highly enriched and contained only minimal cross-contamination. These fractionating protocols can be utilized to isolate different protein fractions that can be used in a wide variety of studies.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by operating grants to C. Fiset from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Quebec Heart and Stroke Foundation (QHSF), the Foundation of the Montreal Heart Institute. C.F. is a research scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and B.G.A. is a research scholar from the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC). The authors are grateful to Benoit Boivin for advises on technical aspects of this work.

FIGURE LEGEND

Figure 1. G-6-PDH activity in different protein fractions of mouse ventricles. A. Fractions from the homogenate (H), total (T), cytosolic (C), total membrane (M), sarcolemmal (S) and nuclear (N) proteins derived from mouse ventricles were tested for the G-6-PDH activity as a specific marker for the cytosol. Bar graph showing mean G-6-PDH activity (\pm SEM) defined as NADPH formed/mg protein/hour.

Figure 2. Na⁺/K⁺-ATPase activity in different protein fractions of mouse ventricles. A. Fractions from the homogenate (H), total (T), cytosolic (C), total membrane (M), sarcolemmal (S) and nuclear (N) proteins derived from mouse ventricles were tested for the Na⁺/K⁺-ATPase activity as a specific marker for the sarcolemma. Bar graph showing mean Na⁺/K⁺-ATPase activity (\pm SEM) defined as inorganic phosphate formed/mg protein/hour sensitive to ouabain.

Figure 3. Ca²⁺-ATPase activity in the different protein fractions of mouse ventricles. Fractions from the homogenate (H), total (T), cytosolic (C), total membrane (M), sarcolemmal (S) and nuclear (N) proteins derived from mouse ventricles were tested for the Ca²⁺-ATPase activity. **A.** Bar graph showing mean mitochondrial Ca²⁺-ATPase (MCA) activity (\pm SEM) defined as inorganic phosphate formed/mg protein/hour sensitive to sodium azide. **B.** Bar graph showing mean sarcolemmal Ca²⁺-ATPase (PMCA) activity (\pm

SEM) defined as inorganic phosphate formed/mg protein/hour following subtraction of MCA and sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) activity from total activity. **C.** Bar graph showing mean SERCA activity (\pm SEM) defined as inorganic phosphate formed/mg protein/hour sensitive to thapsigargin.

Figure 4. Comparison of enrichment of specific ATPase markers in different protein fractions of mouse ventricles. Fractions from the homogenate (H), total (T), cytosolic (C), total membrane (M), sarcolemmal (S) and nuclear (N) proteins derived from mouse ventricles were tested for the Na^+/K^+ -ATPase activity Bar graph showing mean Na^+/K^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase activity (\pm SEM) defined as inorganic phosphate formed/mg protein/hour.

Figure 5. A. Localization of GRP (Bip) 78 in different protein fractions of mouse ventricles determined by Western Blot analysis. Fractions from total (lane 1), cytosolic (lane 2), total membrane (lane 3), sarcolemmal (lane 4) and nuclear (lane 5) proteins (100 μg of protein loaded/lane) derived from mouse ventricles were subjected to immunoblotting. Membranes were probed with anti-GRP (Bip) 78 (78 kDa) as a specific marker for the endoplasmic reticulum. **B. Localization of Nuc P62 in different protein fractions of mouse ventricles.** The different protein fractions (100 μg /lanes) were subjected to immunoblotting. Membranes were probed with anti-Nuc P62 (62 kDa) as a specific marker for the nuclear membrane.

REFERENCES

1. L. R. Jones, Besch H.R., Fleming J.W., McConnaughey M.M., Watanabe A.M., Separation of vesicles of cardiac sarcolemma from vesicles of cardiac sarcoplasmic reticulum, *J.Biol.Chem.* 254 (1979) 530-539.
2. J. Lytton, M. Westlin, M. R. Hanley, Thapsiargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps, *J.Biol.Chem.* 266 (1991) 17067-17071.
3. Y. Ji, E. Loukianov, M. Periasamy, Analysis of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport and Ca^{2+} ATPase enzymatic properties using mouse cardiac tissue homogenates, *Analytical Biochemistry* 269 (1999) 236-244.
4. S. Seiler, S. Fleischer, Isolation of plasma membrane vesicles from rabbit skeletal muscle and their use in ion transport studies, *J.Biol.Chem.* 257 (1982) 13862-13871.
5. P. Meier, M. A. Spycher, U. A. Meyer, Isolation and characterization of rough endoplasmic reticulum associated with mitochondria from normal rat liver, *Biochim. Biophys. Acta.* 646 (1981) 283-297.
6. J. Cascarano, D. F. Montisano, C. B. Pickett, T. W. James, Rough endoplasmic reticulum-mitochondrial complexes from rat liver, *Exp.Cell.Res.* 139 (1982) 39-50.
7. R. Sacchetto, A. Margreth, M. Pelosi, E. Carafoli, Colocalization of the dihydropyridine receptor, the plasma-membrane calcium ATPase isoform 1 and the

- sodium/calcium exchanger to the junctional-membrane domain of transverse tubules of rabbit skeletal muscle, *European Journal of Biochemistry* 237 (1996) 483-488.
8. B. Dawn, Y. T. Xuan, M. Marian, M. P. Flaherty, S. S. Murphree, T. L. Smith et al., Cardiac-specific abrogation of NF-kappaB activation in mice by transdominant expression of a mutant IkappaBalpha, *J.Mol.Cell.Cardiol.* 33 (2001) 161-173.
 9. Isolation and characterization of cardiac sarcolemma, *Biochim.Biophys.Acta.* 555 (1979) 131-146.
 10. B. Boivin, B. G. Allen, Regulation of membrane-bound PKC in adult cardiac ventricular myocytes, *Cellular Signaling* 15 (2003) 217-224.
 11. S. Matsubara, Simultaneous demonstration of acid phosphatase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in mouse hepatocytes. A novel electron-microscopic dual staining enzyme-cytochemistry, *European Journal Histochemistry* 46 (2002) 237-242.
 12. F. Duffieux, J. V. Roy, P. A. M. Michaels, F. R. Opperdoes, Molecular characterization of the first two enzymes of the pentose-phosphate pathway of *trypanosoma brucei*, *J.Biol.Chem.* 275 (2000) 27559-27565.
 13. P. Cohen, M. A. Rosemeyer, Glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes, *Methods in Enzymology* 41 (1975) 208-214.

14. C. Donnet, E. Arystarkhova, K. J. Sweadner, Thermal denaturation of the Na,K-ATPase provides evidence for α - α oligomeric interaction and subunit association with the C-terminal domain, *J.Biol.Chem.* 276 (2001) 7357-7365.
15. T. Nakanishi, J. M. Jarmakani, Developmental changes in myocardial mechanical function and subcellular organelles., *Am J Physiol* 246 (1984) H615-H625.
16. L. C. Cantley, L. G. Cantley, L. Josephson, A characterization of vanadate interactions with (Na,K)-ATPase, *J.Biol.Chem.* 253 (1978) 7361-7368.
17. A. C. Stam, J. W. Shelburne, D. Feldman, E. H. Sonnenblick, A myocardial sarcolemma preparation and the ouabain-sensitive (Na⁺-K⁺)-ATPase, *Biochim.Biophys.Acta.* 189 (1969) 304-307.
18. M. Tada, T. Yamamoto, Y. Tonomura, Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum, *American Physiological Society* 58 (1978) 1-79.
19. M. S. Kirby, Y. Saraga, S. Gaa, G. Inesi, W. J. Lederer, T. B. Rogers, Thapsigargin inhibits contraction and Ca²⁺ transient in cardiac cells by specific inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump, *J.Biol.Chem.* 267 (1992) 12545-12551.
20. Y. Sagara, G. Inesi, Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations, *J.Biol.Chem.* 266 (1991) 13503-13506.

21. A. Delphino, P. Piselli, D. Vismara, S. Vendetti, D. Colizzi, Cell surface localization of the 78 kD glucose regulated protein (GRP78) induced by thapsigargin, *Mol. Membr. Biol.* 15 (1998) 21-26.
22. G. Guihard, S. Proteau, E. Rousseau, Does the nuclear envelope contain two types of ligand-gated Ca^{2+} release channels?, *FEBS Letters* 414 (1997) 89-94.
23. G. Guihard, S. Proteau, M. D. Payet, D. Escande, E. Rousseau, Patch-clamp study of liver nuclear ionic channels reconstituted into giant proteoliposomes, *FEBS Letters* 476 (2000) 234-239.
24. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248-254.
25. C. H. Fiske, Y. Subbarow, The colorimetric determination of phosphorus, *J.Biol.Chem.* 66 (1925) 375-379.
26. P. S. Chen, T. Y. Toribara, H. Warner, Microdetermination of Phosphorus, *Analytical Chemistry* 28 (1956) 1756-1758.
27. F. Cornelius, Functional reconstitution of the sodium pump. Kinetics of exchange reactions performed by reconstituted Na/K-ATPase, *Biochim.Biophys.Acta.* 1071 (1991) 19-66.
28. Ch. V. Rao, S. Mitra, Gonadotropin and prostaglandins binding sites in nuclei of bovine corpora lutea, *Biochim.Biophys.Acta.* 584 (1979) 454-466.

29. Ch. V. Rao, J. J. Ireland, J. F. Roche, Decrease of various luteal enzyme activities during prostaglandin F-2 α -induced luteal regression in bovine, *Mol. Cell. Endocrinol* 34 (1984) 99-105.
30. J.-P. Giacobino, M. Chmelar, Comparison of plasma membranes and endoplasmic reticulum fractions obtained from whole white adipose tissue and isolated adipocytes, *Biochim. Biophys. Acta.* 406 (1975) 68-82.
31. D. Guerini, The significance of the isoforms of plasma membrane calcium ATPase, *Cell Tissue Research* 292 (1998) 191-197.
32. F. Wuytack, L. Raeymaekers, The Ca²⁺-transport ATPases from the plasma membrane, *J. Bioenerg. Biomembr.* 24 (1992) 285-300.
33. E. Carafoli, D. Guerini, Molecular and cellular biology of plasma membrane calcium ATPase, *Trends Cardiovascular Medicine* 3 (1993) 177-184.
34. T. Tiffert, V. L. Lew, Kinetics of inhibition of the plasma membrane calcium pump by vanadate in intact human red cells, *Cell Calcium* 30 (2001) 337-342.
35. E. Carafoli, The Ca²⁺ pump of the plasma membrane., *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 2115-2118.
36. Y. Ji, E. Loukianov, T. Loukianova, L. R. Jones, M. Periasamy, SERCA1a can functionally substitute for SERCA2a in the heart, *Am J Physiol* 276 (1999) H89-H97.

37. T. Wang, L. Tsai, J. Solaro, A. O. Grassi deGende, A. Schwartz, Effects of potassium on vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase from dog cardiac and rabbit skeletal muscle, *Biochem Biophys Res Commun* 91 (1979) 356-361.
38. D. G. Bole, R. Dowin, M. Doriaux, J. D. Jamieson, Immunocytochemical localization of BIP to the rough endoplasmic reticulum: Evidence for protein sorting by selective retention, *Journal of Histochemical Cytochemistry* 37 (1989) 1817-1823.
39. D. D. Sabatini, Y. Tashiro, G. E. Palade, On the attachment of ribosomes to microsomal membranes, *J. Mol. Biol.* 19 (1966) 503-524.
40. A. Amar-Costesec, M. Wibo, D. Thinès-sempoux, H. Beaufay, J. Berthet, Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. Modifications of microsomal components induced by digitonin, EDTA, and pyrophosphate, *J. Cell. Biol.* 62 (1974) 717-745.
41. G. Shore, J. R. Tata, Two fractions of rough endoplasmic reticulum from rat liver, *J. Cell Biol.* 72 (2003) 714-725.
42. A. Ewald, U. Kossner, U. Scheer, M. Dabauvalle, A biochemical and immunological comparison of nuclear and cytoplasmic pore complexes, *J. Cell Sci.* 109 (1996) 1813-1824.

43. K. Bodoor, S. Shaikh, D. Salina, W. H. Raharjo, R. Bastos, M. Lohka et al.,
Sequential recruitment of NPC proteins to the nuclear periphery at the end of
mitosis, *J.Cell Sci.* 112 (1999) 2253-2264.
44. K. M. Khoo, M. K. Han, J. B. Park, S. W. Chae, U. H. Kim, H. C. Lee et al.,
Localization of the cyclic ADP-ribose-dependent calcium signaling pathway in
hepatocyte nucleus, *J.Biol.Chem.* 275 (2000) 24807-24817.

Figure 1

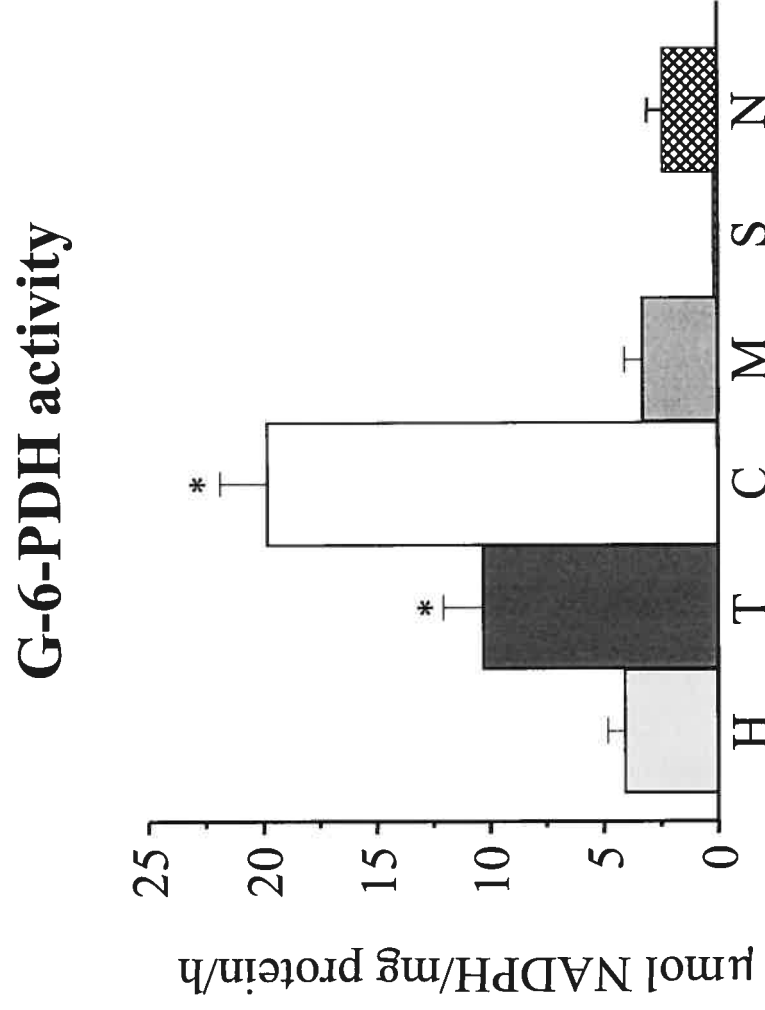


Figure 2

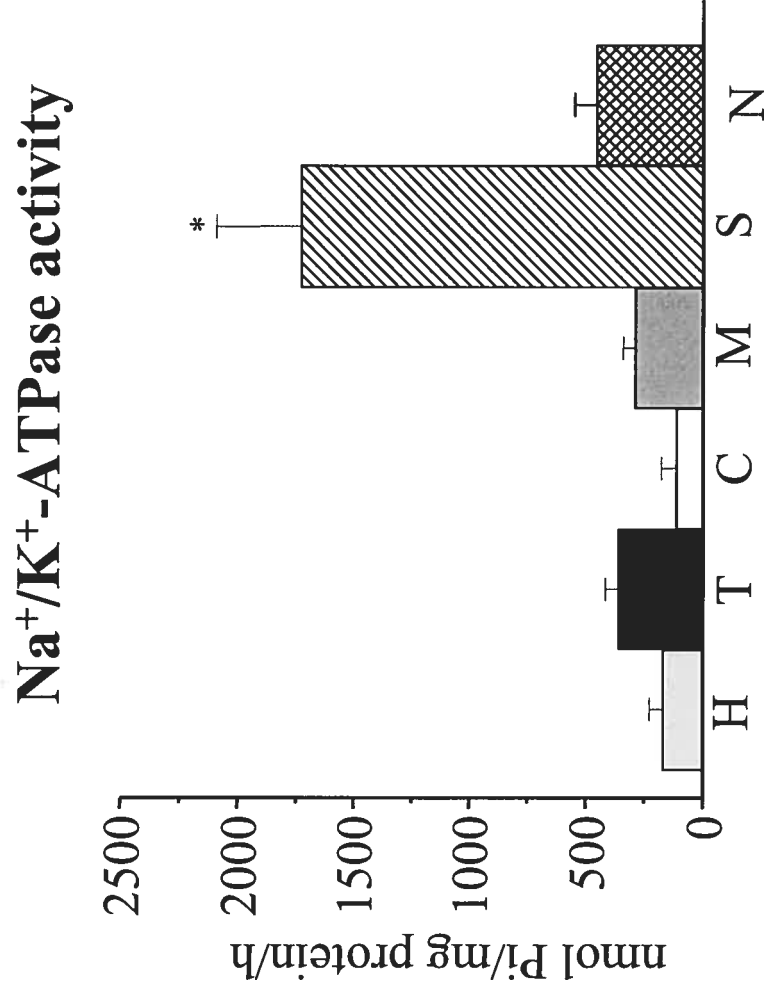
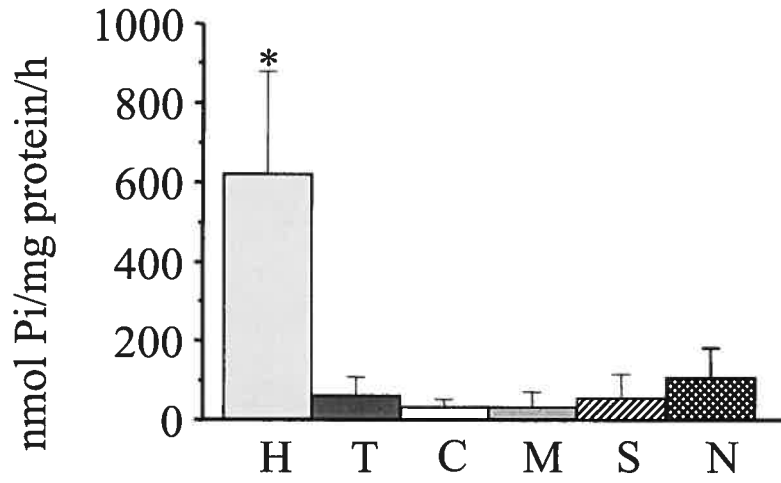
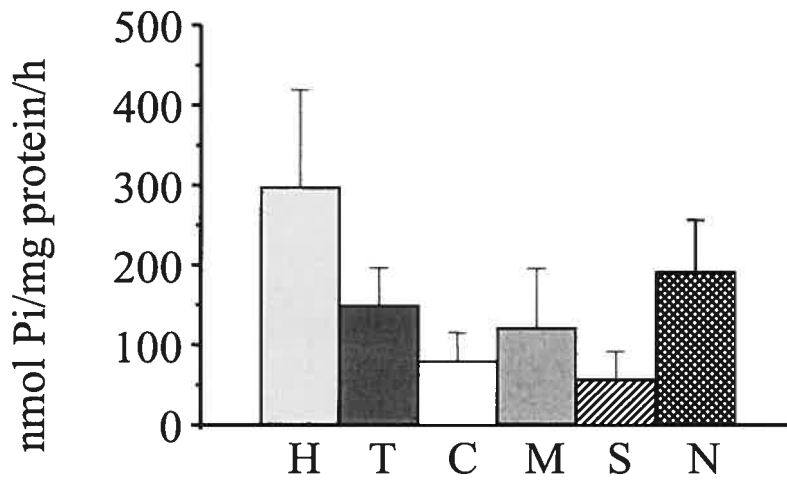


Figure 3

A Mitochondrial Ca²⁺-ATPase activity



B Sarcolemmal Ca²⁺-ATPase activity



C SERCA activity

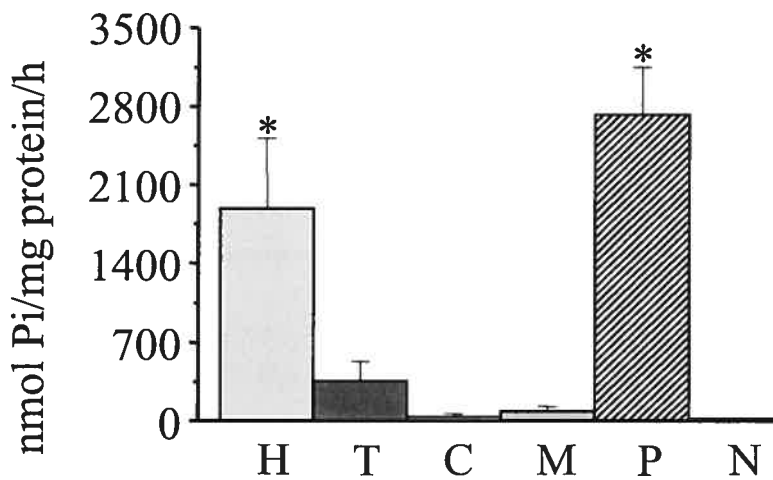


Figure 4

Enzymatic ATPase activity

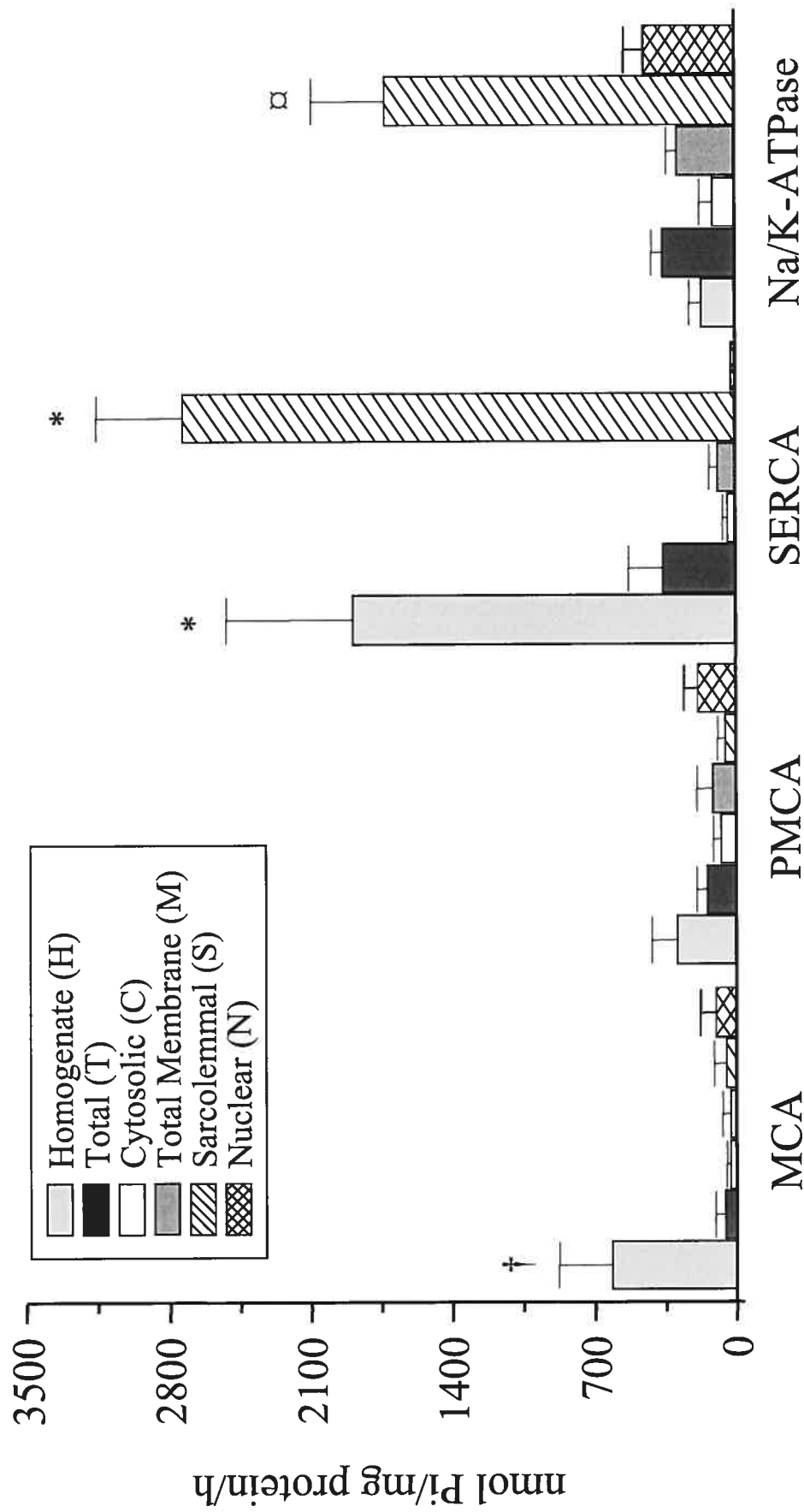
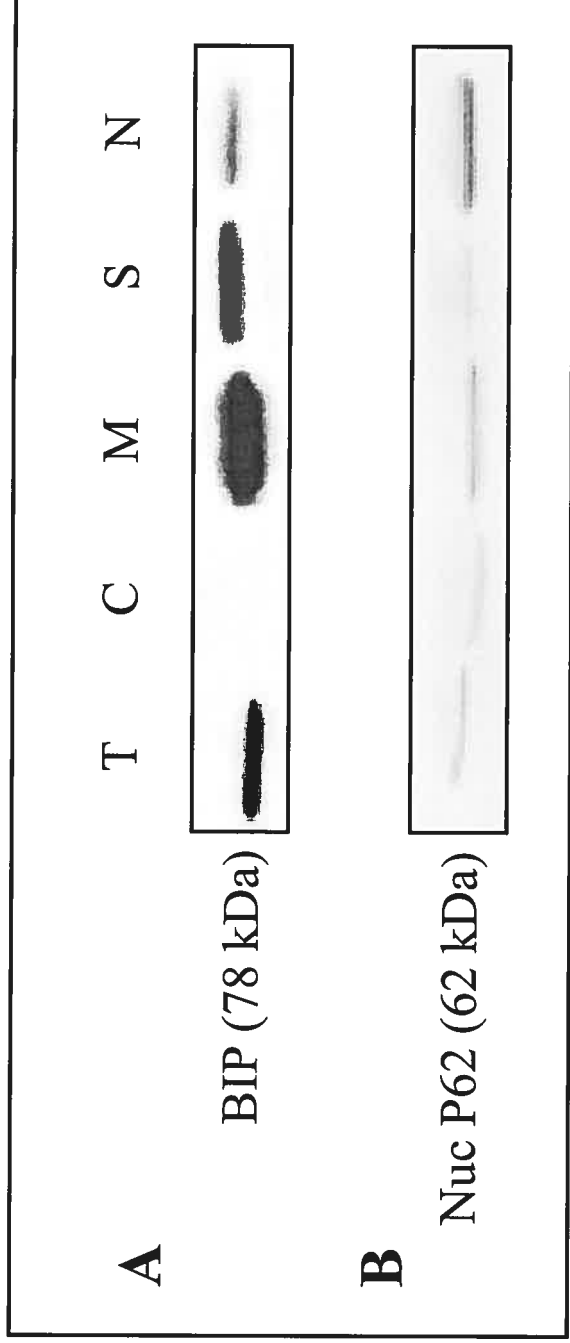


Figure 5



**SUBCELLULAR LOCALIZATION OF SEX STEROID HORMONE
RECEPTORS IN MOUSE HEART**

Eric Lizotte,^{1,2} Bruce G Allen¹ and Céline Fiset^{1,2}

¹Research Center, Montreal Heart Institute
²Faculty of Pharmacy, Montreal University
Montreal, Quebec, Canada

Short title: Sex Steroid Hormone Receptors in the Heart

Corresponding author: Dr. Céline Fiset

Research Center, Montreal Heart Institute

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

Tel : 514-376-3330 (Ext. 3025)

Fax : 514-376-1355

E-mail : celine.fiset@icm-mhi.org

Key Words: mouse, heart, sex steroid hormone, receptor, ovariectomy.

ABSTRACT

To understand the action of sex hormones on the heart it is essential to determine whether the sex steroid hormone receptors are present in this tissue. This study examined the subcellular localization of estrogen ($ER\alpha$, $ER\beta$), progesterone (PgR-A, PgR-B) and androgen (AR) receptors in the mouse heart. $ER\alpha$ was found to be most abundant in the sarcolemma and nucleus. $ER\beta$ and AR were found in the cytosol and nucleus whereas PgR-A and PgR-B were localized almost exclusively in the cytosol. Comparison of the levels of these receptors between ventricles and atria revealed higher levels of $ER\alpha$, AR, PgR-A and lower PgR-B in ventricles compared to atria, whereas $ER\beta$ were similar in both heart chambers. Moreover, no gender differences were observed either in the subcellular localization or in the abundance of these receptors between ventricles and atria. However, following ovariectomy, there was a significant increase in the levels of sarcolemmal $ER\alpha$ and cytosolic PgR-A. These results indicate that gender differences in cardiovascular diseases are not associated with gender differences in the localization or level of expression of the different sex steroid hormone receptors. Nevertheless, the presence in the heart of these receptors that are functional and responsive to hormonal variations could influence heart functions and contributes to sex differences in heart diseases.

INTRODUCTION

Although cardiovascular diseases are the leading cause of mortality for both men and women throughout most of the industrialized world [3,5,23,34,36], there are significant gender-based differences in the incidence of a wide variety of cardiovascular diseases, including coronary artery disease [3-5,7,14,21,27], hypertension [35], sudden death [1,35] and cardiac arrhythmias [17-19,28,33]. However, these gender differences are abrogated by the onset of menopause. With this observation came the assumption that the higher risk of heart disease in post-menopausal women could be related to the reduction of estrogen levels. As a result, the role of estrogen on cardiovascular function has been the focus of considerable attention. In fact, until recently, it was believed that hormone replacement therapy could reduce the incidence of heart diseases by as much as 50% in postmenopausal women [20,22]. However, in recent years, the beneficial effects of female sex steroid hormones on the cardiovascular system have been questioned. Indeed, newer epidemiological studies, HERS (Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study) and WHI (Women Health Initiative), have shown no benefit from estrogen replacement therapy in postmenopausal women [11,16]. This controversy has led to the need for better experimental studies evaluating the role of sex steroid hormones on cardiovascular diseases. Thus, to have a better understanding and interpretation of these contradictory results, it is important to further improve our knowledge on the mechanistic aspects of sex steroid hormone action and how hormone replacement therapy could affect cardiovascular diseases. To achieve this goal, we must first determine whether these sex steroid hormone receptors are present in the male and female heart.

For sex steroid hormones to have an effect, they must react with their receptors. In fact, all the sex steroid hormones act as ligand for their specific estrogen (ER α , ER β), progesterone (PgR-A, PgR-B) or androgen (AR) receptors. Grohé *et al.* have shown that rat cardiac myocytes and cardiac fibroblasts contain estrogen receptors [15]. The presence of estrogen receptors (ER) was identified in both atrial and ventricular myocytes: both ER α and ER β were present in the vascular endothelium, smooth muscle, and myocardium of rat and human of both genders [2,27]. Estrogen receptors have been found in the plasma membrane, the cytosol or the nucleus [10]. One might predict that gender-based differences in cardiovascular diseases could be related to differences in the expression levels of one or more of the different sex steroid hormone receptors. Knowing that the subcellular localization of sex steroid hormone receptors can differ between tissues and that their nongenomic and genomic effects depend on their subcellular distribution, determining their subcellular localization will help us to better understand the role and mechanisms of action of sex steroid hormones on the heart [26,32]. Consequently, the aims of the present study were: 1) to determine the presence of the different sex steroid hormone receptors in the mouse heart, 2) to establish their subcellular localization in the ventricles and atria of mice of both genders, and 3) to evaluate the responsive nature of these sex steroid hormone receptors to variations in hormonal concentrations.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Animal handling followed the Canadian Council Animal Care guidelines and conformed with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health. Male and female CD1 mice (Charles River laboratories, St-Constant, Quebec, Canada) were anesthetized with isoflurane and sacrificed by cervical dislocation. Hearts were quickly removed and placed on ice-cold tyrode solution containing (in mM) 130 NaCl, 5.4 KCl, 1 MgCl₂, 0.33 Na₂HPO₄, 10 Hepes, 5.5 glucose and 1 CaCl₂ (pH 7.4). Ventricles and atria were then separated, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. Animal handling followed the guidelines of the Canadian Council of Animal Care.

Ovariectomy

Mice of 21 days of age were anesthetized using a I.P injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). A small (1 cm) incision was made through the skin and the back muscle walls in parallel with the animal body line. The ovaries were then located and silk thread (Ethicon 5.0) was tied around the oviduct, including the ovarian blood vessels. The oviduct was sectioned and the ovary removed. To close the incision, the back muscle walls were sutured with a nylon thread (Ethicon 4.0) while the skin was sutured with stainless steel wound clips (MikRon Autoclip). Throughout this procedure, the temperature of the mice was maintained at 37°C with a heating pad. Sham-operated mice were treated in a similar way, but the ovaries and oviduct were not removed.

Protein fractions

The five different protein fractions (total, cytosolic, total membrane, sarcolemmal and nuclear) examined in this study were prepared using subfractionation techniques that we reported in a separate paper (Lizotte et al. 2005. Analytical Biochemistry, submitted). These fractionation protocols produced highly enriched protein fractions that contained only minimal cross-contaminations.

Western blots

Equal quantities of protein were separated by SDS-PAGE electrophoresis. This technique was performed using a 4% acrylamide stacking gel followed by a 5-15% gradient separating gel. The proteins were electrophoretically transferred onto nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech Inc, San Francisco, Ca) for 1½ hours at 350 mV. The non-specific binding sites of the membranes were blocked by incubation for 1½ hours at room temperature in TBS buffer containing 0.1% Tween 20 and 5% non-fat dried milk (TBST-NFDM 5%). Afterward, the membranes were incubated overnight in TBST-NFDM 1% at 4°C with polyclonal antibodies generated against either the C-terminal amino acids 586-600 of rat ER α (1:10 000; Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA), the N-terminal amino acids 1-150 of human ER β (1:7 500; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), the C-terminal amino acids of human AR (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) or an internal domain of human PgR (for isoform A, 1:500 and isoform B, 1:200; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). The membranes were washed again and immune complexes were visualized by enhanced

chemiluminescence. Ponceau S was used to confirm uniformity of the protein transfer to nitrocellulose membranes.

RESULTS

SEX STEROID HORMONE RECEPTORS

Ventricular subcellular localization of sex steroid hormone receptors. Western blot analysis were carried out on subcellular fractions isolated from female mouse ventricles using specific antibodies directed against ER α , ER β , AR, PgR-A and PgR-B to establish the subcellular distribution of these receptors (Fig.1). ER α (66 kDa) was detected predominantly in the sarcolemmal fraction and was also found in the nuclear fraction. In the cytosolic fraction, there was only a very faint band possibly resulting from the intracellular trafficking of this receptor. ER β (60 kDa) was more abundant in the cytosolic and nuclear fractions compared to the total fraction. In contrast, there was absolutely no ER β detected in the sarcolemma. Our results showed that AR (112 kDa) was more abundant in the cytosolic and nuclear fractions compared to the total protein fraction. Finally, PgR-A (82 kDa) and PgR-B (118 kDa) were almost exclusively detected in the cytosol with only low levels detected in the nucleus compared to the total protein fraction. We also examined the subcellular localization of these receptors in the male mouse ventricles (Fig.1) and found that sex steroid hormones receptors have the same pattern of expression in male and female mouse ventricles.

Comparison of ventricular and atrial expression of sex steroid hormone receptors. We then determined the subcellular distribution of the different sex steroid hormone receptors in the atria. Our results showed that in atria the subcellular localization of the sex steroid hormone receptors did not differ from their distribution in the ventricles. Indeed, in the atria ER α was also found in the sarcolemmal protein fraction whereas the other sex

steroid hormones receptors were in the cytosolic protein fraction (data not shown). The isolation of a nuclear fraction from atria was technically not feasible (requiring approximately 100 pairs of atria for one nuclear fraction of 50 μ g) precluding the determination of the expression of the different receptors in this protein fraction of the mouse atria. Since it has been reported that the expression levels of the sex steroid hormone receptors can differ between tissues [24], we also compared the relative abundance of the sex steroid hormones receptors between the ventricles and the atria. Using sarcolemma for ER α or cytosol for ER β , AR, PgR-A and PgR-B, which are the protein fractions with the most abundant expression levels of these receptors, we compared their expression levels in both heart chambers (Fig.2). Our results indicate that in the heart the subcellular localization of the sex steroid hormone receptors are cell-type specific. Indeed, the expression levels of ER α , AR and PgR-A were higher in ventricles compared to the atria, whereas PgR-B was lower in ventricle than atria. ER β expression levels were similar between ventricles and atria.

Comparison of the expression level between both genders. In the following set of experiments, we compared the relative abundance of the different sex steroid hormone receptors between both genders. In Figure 3, Western blot analysis of ventricular proteins from sarcolemmal origin showed no gender-specific difference in the expression levels of ER α . Our results also showed that ER β , AR, PgR-A and PgR-B expression levels were similar in male and female cytosolic protein fractions. Furthermore, no gender differences were observed for the abundance of ER α , ER β and AR in nuclear fraction isolated from

ventricular tissues. Similarly, in the sarcolemma and cytosol from the atria, no gender-based differences were found in the expression levels of the different receptors examined.

Sexual Maturity. Next, we evaluated the effect of hormonal variations on the expression levels of these receptors. It is possible that after sexual maturity an increase in hormone levels could influence the expression of sex steroid hormone receptors and/or influence translocation of these receptors. Therefore, after completion of the expression studies on the receptors in the 2-3 month-old mouse ventricles, additional Western blot analysis were carried out to compare the subcellular localization and expression levels of the different sex steroid hormone receptors between ventricles of 2-3-month old mice (after reaching sexual maturity) and 37-day old mice (before reaching sexual maturity). We found that there was no difference in the subcellular localization or in the expression of the sex steroid hormone receptors between these two age groups. Furthermore, no translocation was detected before or after sexual maturity (data not shown).

Responsive Nature of Sex Steroid Hormone Receptors. Knowing that there is no difference related to sexual maturity in the subcellular localization or expression of the sex steroid hormone receptors, we then determined the ability of the cardiac cells to respond to drastic changes in sex steroid hormone levels. To do so, we examined the effects of ovariectomy on the level of expression of the sex steroid hormone receptors in both the ventricles and the atria of female mice. As expected, the ovariectomized mice were significantly heavier (28.0 ± 0.3 g) compared to the sham-operated mice (26.3 ± 0.3 g, $p < 0.05$). Furthermore, the surgery resulted in a drastic and significant reduction of the

uterine weight in the ovariectomized mice (10.6 ± 0.7 mg) compared to the sham-operated mice (130.6 ± 7.2 mg, $p < 0.005$). The effects of ovariectomy upon the expression levels of the different receptors were evaluated by Western blot analysis at one, three and six weeks post-surgery (Fig.4). Six weeks post-surgery, the ventricular expression levels of sarcolemmal ER α and cytosolic PgR-A were markedly increased compared to the sham-operated group whereas the expression levels of ER β , AR and PgR-B were similar, between the sham-operated and the ovariectomized female mice. In the nuclear fraction, the levels of ER α , ER β or AR did not differ between the sham-operated group and the ovariectomized female mouse group (data not shown). Interestingly, in the atria the levels of all sex steroid hormone receptors were similar between sham-operated and ovariectomized mice (data not shown). Finally, we investigated the possibility of altered subcellular localization following ovariectomy. Our results showed that the localization was not altered and thus, could not explain the increased levels of ER α and PgR-A in the ventricles of ovariectomized female mice (data not shown).

DISCUSSION

In this study, using subcellular protein fractions, we showed that sex steroid hormones receptors exhibit different subcellular localizations in mouse heart. Moreover, the subcellular distribution of the sex steroid hormone receptors in both the ventricles and the atria of mice were similar. Furthermore, a comparison of the levels of these receptors between ventricles and atria of mouse, revealed higher levels of ER α , AR, PgR-A and lower PgR-B in ventricles compared to atria, whereas ER β were similar in both heart chambers. In addition, no gender-specific differences were observed either in the subcellular localization or in the abundance of these receptors in both heart chambers. These results show that gender-based differences in cardiovascular diseases are not associated with gender differences in the subcellular localization or the levels of expression of the different sex steroid hormone receptors. However, following ovariectomy, there was a significant increase in the levels of sarcolemmal ER α and cytosolic PgR-A in female mouse ventricles. Whereas the ovariectomy was without any effect on the expression of the receptors in the atria. These results suggest that although the sex steroid hormone receptors are present in both males and females, the responsive nature of these receptors to hormonal level may be different between males and females and between heart chambers. The presence in the mouse heart of sex steroid hormone receptors that are functional and responsive to hormonal variations could influence the heart function and contributes to explain sex differences seen in the incidence of cardiovascular diseases.

Relation to Previous Studies

Concerning ER α expression, other groups have found findings similar to those presented here. Indeed, in study using cell cultures, ER α was localized in the sarcolemma and in the nucleus where acute (non-genomic) effects were assumed to be due to the presence of ER α on the plasma membrane (eg: NO production) [10]. Similarly, another group has reported that ER α was predominantly found in the sarcolemmal and the nuclear fractions [25]. Consistent with our findings demonstrating that ER β were present in the cytosolic and nuclear fractions without any detection in the sarcolemma, studies realized on rabbit uterus also found ER β in the nucleus and cytosol [8]. In line with our results, Francavilla *et al.* also reported that AR was detected in the cytosol and in the nuclei of liver of both male and female rats [13]. Finally, results obtained for PgR-A and PgR-B showing that these receptors were almost exclusively detected in the cytosolic fraction with only minimal expression in the nucleus were similar to those previously reported by Sheridan *et al.* in baboon cardiomyocytes. In their study, progesterone receptors localized mainly to the cytosol, with only 1% of the myocardial cells demonstrating nuclear localization [31].

Comparison of the expression levels of sex steroid hormone receptors between both heart chambers

The gender differences in the prevalence of some heart diseases are sometimes heart chamber-specific. For instance, depending of the type of cardiac arrhythmia, the female gender may have proarrhythmic or antiarrhythmic effects. In fact, women appear to be more vulnerable to torsades de pointes, a polymorphic ventricular tachyarrhythmia

[6,18]. Men, on the other hand, have a higher incidence of atrial fibrillation and supraventricular tachycardia compared to women [17]. Moreover, other studies have shown that subcellular localization can differ between tissues of the same species [24]. For example, in the rabbit there are difference in the subcellular distribution of ER β between uterus and ovary. In the uterus, ER β is found in both cytosolic and nuclear fractions whereas in the ovary, ER β is almost exclusively found in the cytosol [24].

In the uterus, stimulating PgR-A with progesterone blocks gene activation of PgR-B [9]. Furthermore, stimulating ER α with estrogen increases levels of progesterone receptors in myometrial cells [29]. In agreement with these reports, we found that in atria the expression levels of ER α are lower than in the ventricles, which leads to lower levels of PgR-A. The lower levels of PgR-A expression, which normally inhibit PgR-B, results in higher levels of PgR-B expression in the atria.

Sex Steroid Hormone Receptors and hormonal variations

Since the expression of PgR-A is related to that of ER α it was not surprising to find in the present study that the expression levels of ER α and PgR-A were both markedly increased following ovariectomy. Moreover, these findings are consistent with data from another study where the expression levels of ER α were upregulated in confluent MCF7 cells growing in steroid deprived serum [12]. In addition, another group has shown that ER α regulates progesterone receptors [30]. Indeed, in myometrium when ER α mRNA and protein expression was enhanced, there was a parallel increase in progesterone receptor expression levels [29]. Although we found that hormonal

deficiency induced by ovariectomy increased the expression level of ER α and PgR-A, we showed that a gradual increase in hormonal levels, as the one seen with sexual maturity (puberty), does not affect the subcellular distribution or the expression levels of the sex steroid hormones receptors. These findings suggest that sex steroid hormone receptors could respond to hormonal variations under certain conditions and could then influence heart functions and contributes to sex-related differences in some heart diseases. It is worth mentioning that a low level of estrogen does not necessarily means a higher expression levels of ER α and PgR-A in the ventricle since the males exhibit low level of estrogen and still present levels of expression of these receptors similar to what is observed in the intact females. Additional regulatory mechanisms may therefore be operative.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by operating grants to C. Fiset from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Quebec Heart and Stroke Foundation (QHSF), the Foundation of the Montreal Heart Institute. C.F. is a research scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and B.G.A. is a research scholar from the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC). The authors are grateful to Chantale St-Michel for technical assistance.

FIGURE LEGEND

Figure 1. Subcellular localization of sex steroid hormone receptors in different proteins fractions of mouse ventricles. Fractions from total (lane 1), cytosolic (lane 2), total membrane (lane 3), sarcolemmal (lane 4) and nuclear (lane 5) proteins (100 µg of protein/lane) derived from mouse ventricles of both genders were subjected to immunoblotting. Membranes were probed with either anti-ER α (67 kDa), anti-ER β (60 kDa), anti-AR (112 kDa), anti-PgR-A (82 kDa) or anti-PgR-B (118 kDa).

Figure 2. Comparison of the expression levels of sex steroid hormone receptors between ventricles and atria. Sarcolemmal protein fractions from ventricles (lane 1) and atria (lane 2) derived from mouse heart were subjected to immunoblotting. Membranes were probed with anti-ER α . Cytosolic protein fractions from ventricles (lane 1) and atria (lane 2) derived from mouse heart were subjected to immunoblotting. Membranes were probed with anti-ER β , anti-AR, anti-PgR-A or anti-PgR-B. Protein loaded for each lane was 10 µg for ER α and ER β and 50 µg for AR, PgR-A and PgR-B.

Figure 3. Comparison of the expression levels of sex steroid hormone receptors in ventricles between genders. Fractions from male (lane 1) and female (lane 2) sarcolemmal proteins (100 µg of protein/lane) for ER α and cytosolic proteins (100 µg of protein loaded/lane) for ER β , AR, PgR-A and PgR-B or male (lane 3) and female (lane 4) nuclear proteins for ER α , ER β and AR

derived from mouse ventricles of both genders were subjected to immunoblotting. Membranes were probed with either anti-ER α , anti-ER β , anti-AR, anti-PgR-A or anti-PgR-B.

Figure 4 Responsive nature of sex steroid hormone receptors following ovariectomy. Following 1, 3 or 6 weeks post-surgery: sarcolemmal or cytosolic protein fractions (100 μ g of protein/lane) were obtained from sham operated or ovariectomized mice. Sarcolemmal proteins for ER α , cytosolic proteins for ER β , AR, PgR-A, PgR-B and nuclear proteins for ER α , ER β and AR were subjected to immunoblotting. Membranes were probed with either anti-ER α , anti-ER β , anti-AR, anti-PgR-A or anti-PgR-B.

REFERENCES


1. Albert C, McGovern B, Newell JB. Sex differences in cardiac arrest survivors. *Circulation* 1996;93:1170-1176.
2. 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.
3. Barrett-Connor E. Sex differences in coronary heart disease:why are women so superior? The 1995 ancel keys lecture. *Circulation* 1997;95:252-264.
4. Barrett-Connor E, Bush TL. Estrogen replacement and coronary heart disease. *Cardiovasc Clin* 1989;19:159-172.
5. Barrett-Connor E, Bush TL. Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA* 1991;265:1861-1687.
6. 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. *Am J Cardiol* 1997;79:178-181.
7. Collins P, Stevenson JC, Mosca L. Spotlight on gender. *Cardiovasc Res* 2002;53:535-537.

8. Conneely OM, Lydon J.P. Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids* 2000;65:571-577.
9. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, O'Malley BW. Reproductive functions of progesterone receptors. *Endocrin Soc* 2002;339-355.
10. Dan P, Cheung JCY, Scriven DRL, Moore EDW. Epitope-dependent localization of estrogen receptor α , but not β , in en face arterial endothelium. *Am J Physiol* 2003;284:H1295-H1306.
11. Fletcher SW, Colditz GA. Failure of estrogen plus progestin therapy for prevention. *JAMA* 2002;288:366-368.
12. Flouriot G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, Reid G, Sonntag-Buck V, Gannon F. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J* 2000;19:4688-4700.
13. Francavilla A, Di Leo A, Eagon PK, Polimeno L, Guglielmi F, Fanizza G, Barone M, Stariz TE. Effect of spironolactone and potassium canrenoate on cytosolic and nuclear androgen and estrogen receptors of rat liver. *Gastroenterology* 1987;93:681-686.

14. Grodstein F, Stampfer MJ, Colditz GA. Postmenopausal hormone therapy and mortality. *New Engl J Med* 1997;336:1769-1775.
15. Grohé C, Kahlert S, Löbber K, Vetter H. Expression of oestrogen receptor α and β in rat heart: role of local oestrogen synthesis. *J Endocrinol* 1998;156:R1-R7.
16. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA* 1998;280:605-613.
17. Kadish AH. The effects of gender on cardiac electrophysiology and arrhythmias. In: Zipes DP & Jalife J, eds. *Cardiac Electrophysiology: From cell to bedside*, Philadelphia: W.R. Saunders Company, 1995:1268-1275.
18. Kawasaki R, Machado C, Reinoehl J. Increased propensity of women to develop torsades de pointes during complete heart block. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1995;6:1032-1038.
19. Larsen JA, Kadish AH. Effects of gender on cardiac arrhythmias. *J Cardiovascular Electrophysiol* 1998;9:655-664.
20. Levin ER. cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids* 2002;67:471-475.

21. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *New Engl J Med* 1999;340:1801-1809.
22. Mikkola TS, Clarkson TB. Estrogen replacement therapy, atherosclerosis, and vascular function. *Cardiovasc Res* 2001;53:605-619.
23. Miyagawa K, Rösch J, Stanczyk F, Hermsmeyer K. Medroxyprogesterone interferes with ovarian steroid protection against coronary vasospasm. *Nature Medicine* 1997;3:324-327.
24. Monje P., Boland R. Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta isoforms in rabbit uterus and ovary. *J Cell Biochem* 2001;82:467-479.
25. Monje P., Zanello S, Holick M, Boland R. Differential cellular localization of estrogen receptor α in uterine and mammary cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001;181:117-129.
26. Rollerova E, Urbancikova M. Intracellular estrogen receptors, their characterization and function (Review). *Endocrine Regulations* 2000;34:203-218.
27. Rossouw JE. Hormones, genetic factors, and gender differences in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2002;53:550-557.

28. Rubart M, Von Der Lohe E. Sex steroid and cardiac arrhythmia: More questions than answers. *J Cardiovascular Electrophysiol* 1998;9:655-667.
29. Sakaguchi H, Fujimoto J, Aoki I, Tamaya T. Expression of estrogen receptor α and β in myometrium of premenopausal and postmenopausal women. *Steroids* 2003;68:11-19.
30. Savouret J-F, Rauch M, Redeuilh G, Sar S, Chauchereau A, Woodruff K, Parker MG, Milgrom E. Interplay between estrogens, progestins, retinoic acid and AP-1 on a single regulatory site in the progesterone receptor gene. *J Biol Chem* 1994;269:28955-28962.
31. Sheridan P, McGill HC. The nuclear uptake and retention of a synthetic progestin in the cardiovascular system of the baboon. *Endocrinology* 1984;114:2015-2019.
32. Taylor AH, Al-Azzawi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *Journal of Molecular Endocrinology* 2000;24:145-155.
33. Thompson LP, Weiner CP. Long-term estradiol replacement decreases contractility of guinea pig coronary arteries to the thromboxane mimetic U46619. *Circulation* 1997;95:709-714.
34. Wenger NK, Speroff L, Packard B. Cardiovascular health and disease in women. *New Engl J Med* 1993;329:247-256.



35. White CR, Darley-Usmar V, Oparil S. Gender and cardiovascular disease. Recent insights. *Trends Cardiovascular Medicine* 1997;7:94-100.

36. Williams JK, Adams MR. Estrogens, progestins and coronary artery reactivity. *Nature Medicine* 1997;3:273-274.

Figure 1

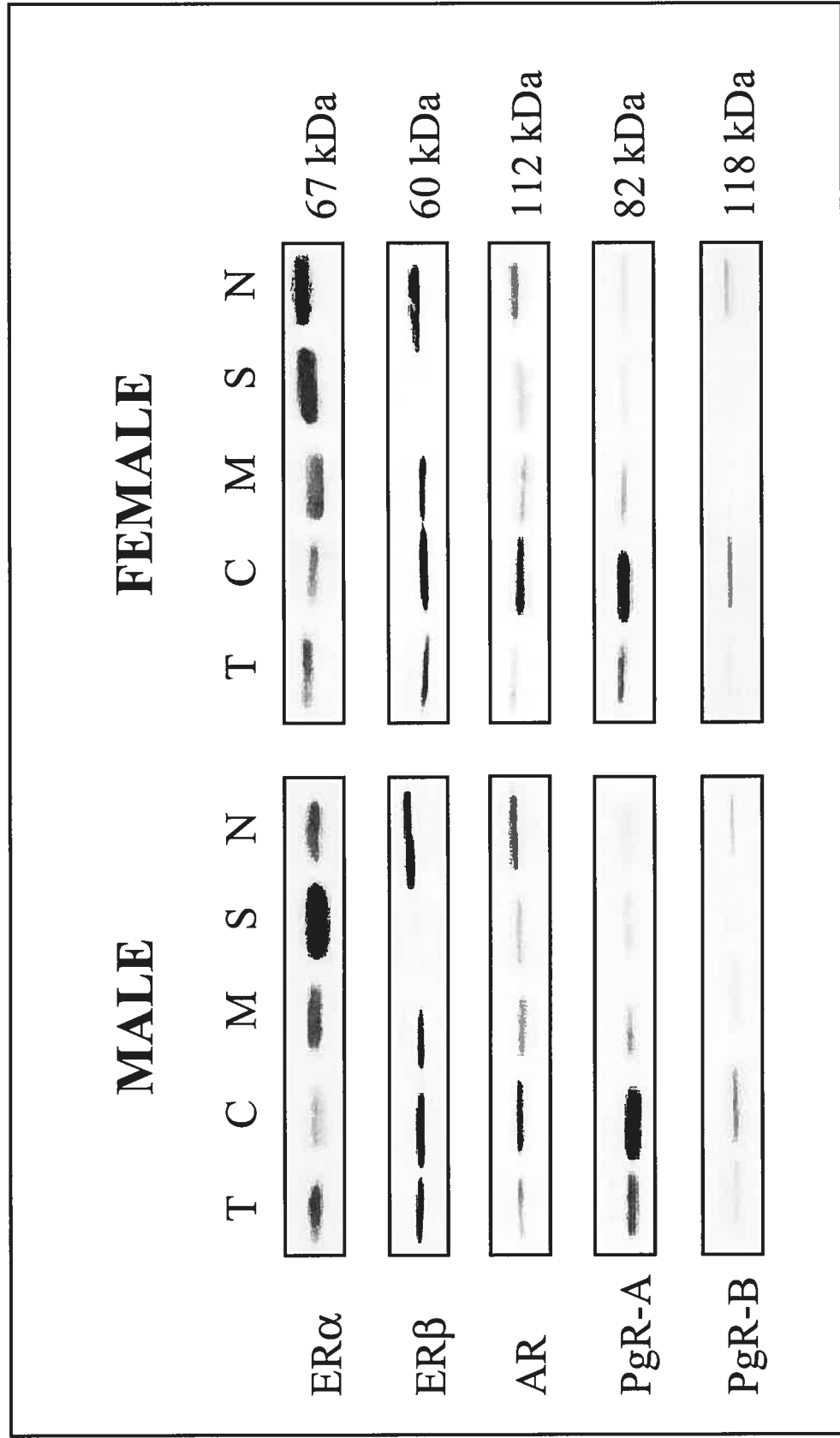


Figure 2

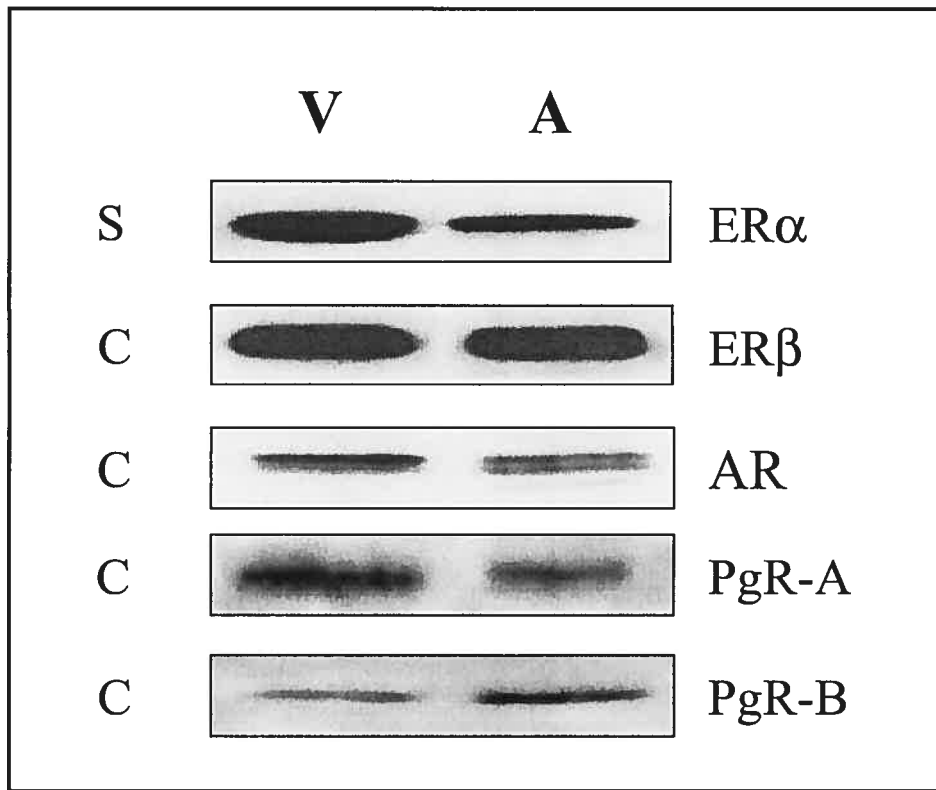


Figure 3

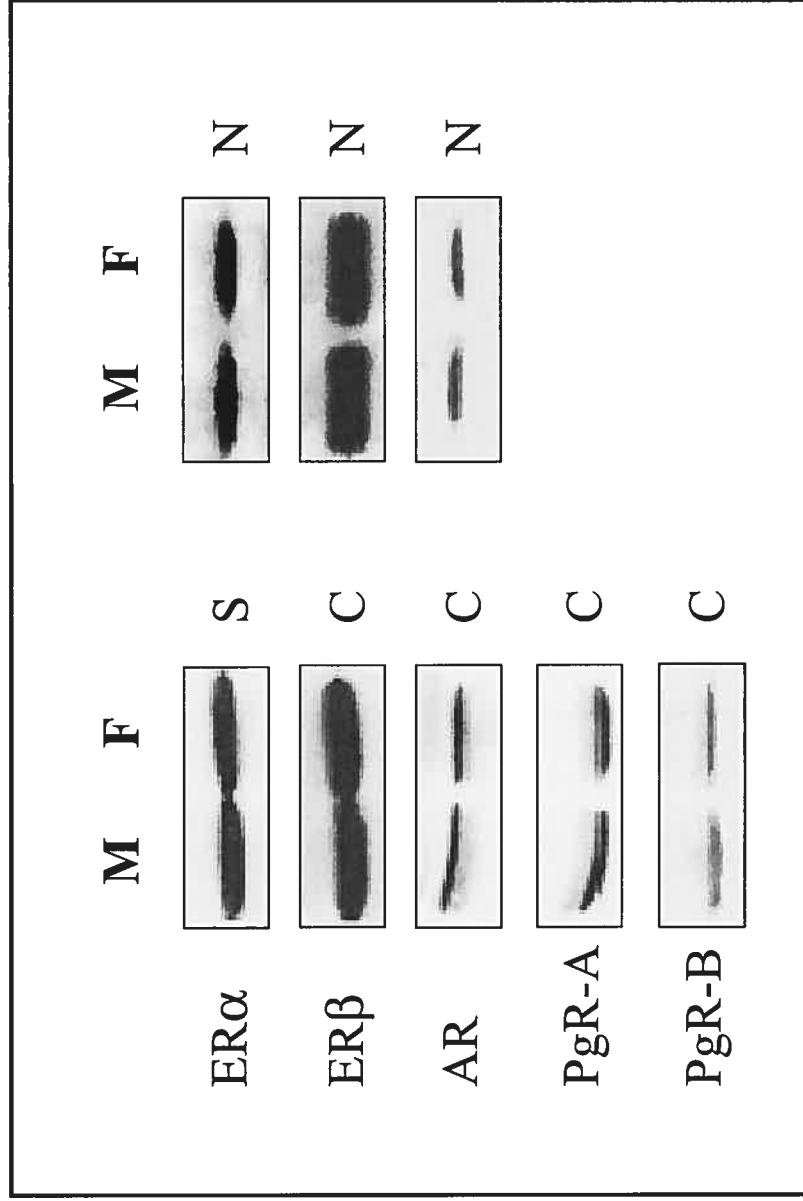
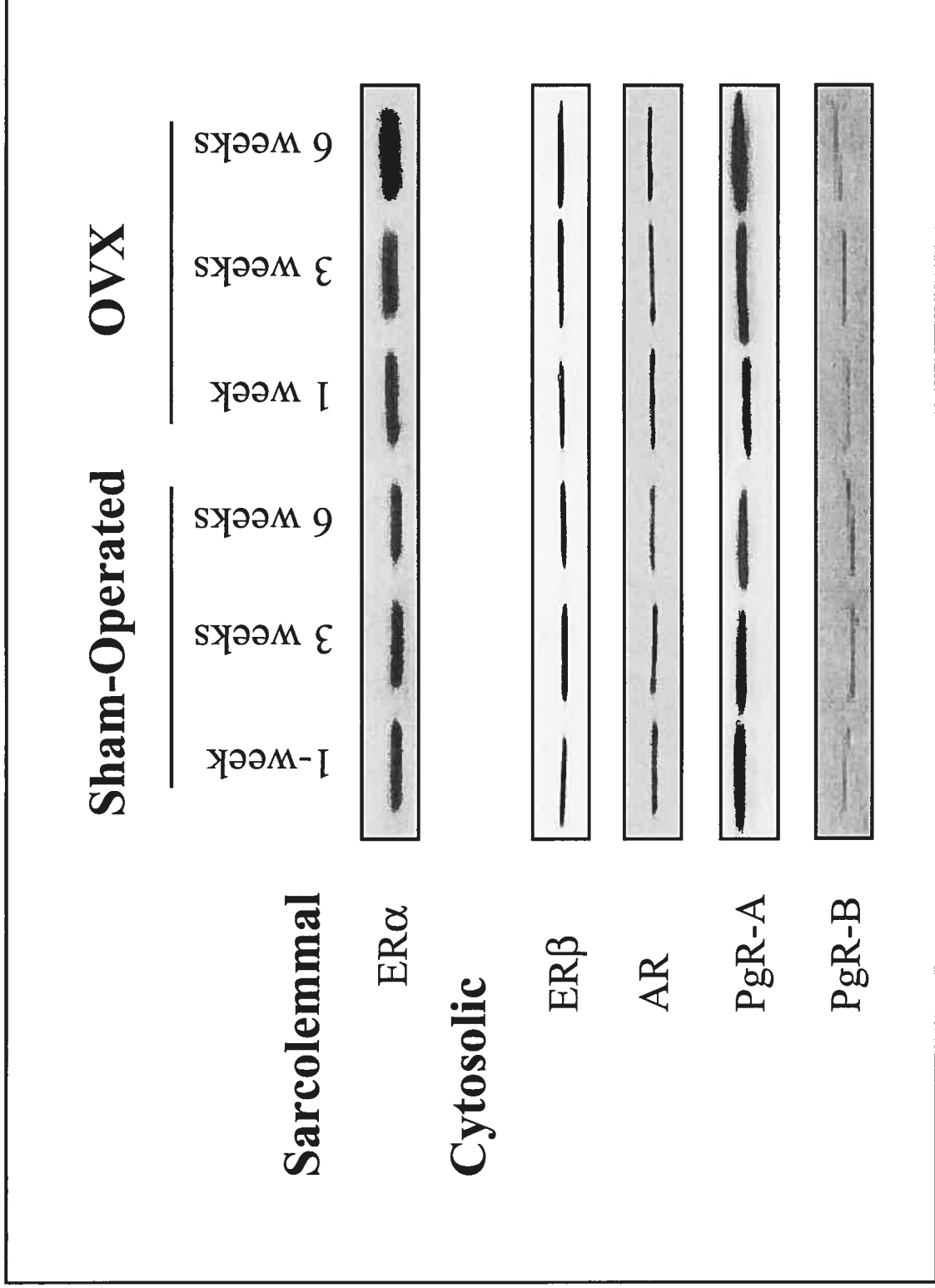


Figure 4



DISCUSSION

Évaluation des fractions protéiques

Dans cette étude nous avons voulu évaluer la présence des récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes dans le coeur de souris. Par la suite nous avons déterminé la localisation souscellulaire de ces récepteurs. Par contre, avant de faire cette localisation, il nous a fallu évaluer les différentes fractions protéiques obtenues à partir de deux protocoles de fractionnement protéiques distincts pour en évaluer la pureté. Un des protocoles nous a permis d'isoler différentes fractions protéiques suivantes : totales, cytosoliques, membranaires totales et sarcolemmales (Figure 10) tandis que l'autre protocole mène à l'obtention de la fraction protéique nucléaire (Figure 11).

Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PDH)

L'activité de la G-6-PDH (marqueur spécifique du cytosol)¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ nous a confirmé que la fraction cytosolique est bel et bien enrichie comparé à l'homogénat. Pour ce qui est de la fraction nucléaire, elle ne contient qu'une proportion minime de cette enzyme. La présence de cette enzyme dans la fraction nucléaire est probablement à la synthèse de cette protéine au niveau du réticulum endoplasmique ainsi que dans l'espace périnucléaire.^{178,179} En effet, la présence ou non d'une protéine nucléaire est un phénomène hautement régulé.

Protein Isolation Protocol

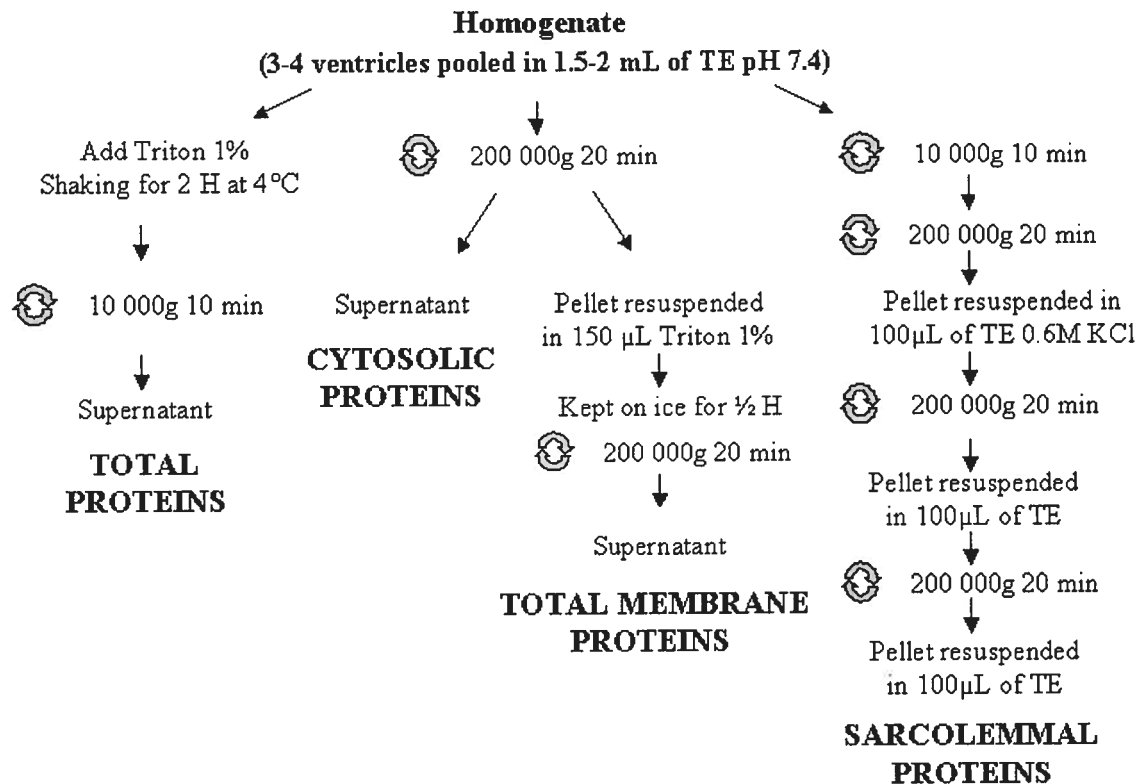
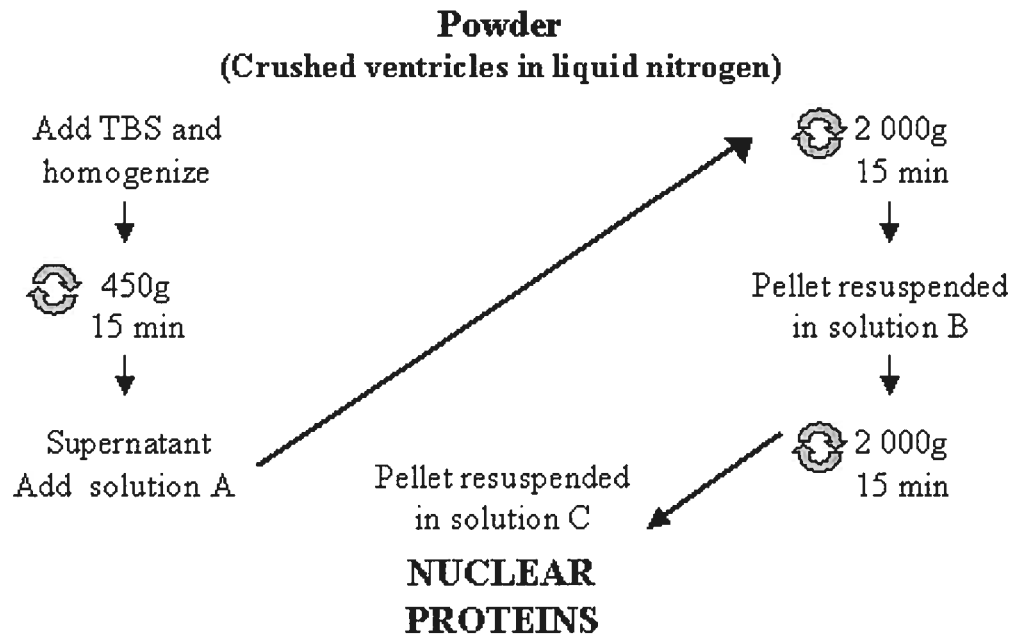


Figure 10 : Représentation schématique du protocole d'isolation de différentes fractions protéiques

Protocole d'isolation de différentes fractions protéiques à partir d'homogénéat de tissus (ventricules ou oreillettes) de souris. L'homogénéat est divisé en trois tubes où le premier, avec l'aide de Triton X-100, permet d'obtenir la fraction protéique totale. Le deuxième tube est centrifugé à 200 000 g, où le surnageant est considéré comme la fraction protéique cytosolique tandis que le culot, avec un traitement au triton, permet l'isolation de la fraction membranaire totale. Le dernier tube, avec l'usage de KCl, permet l'obtenir la fraction protéique sarcolemmale.

Nuclei Isolation Protocol



Buffer-A Isotonic homogenizing solution

Buffer-B Hypertonic solution (higher density of nuclei)

Buffer-C Isotonic storage solution

Figure 11 : Représentation schématique du protocole d'isolation de fraction nucléaire

Le tissu cardiaque est concassé dans l'azote liquide et réduit en poudre. L'usage d'une solution hypertonique permet de réduire la taille des noyaux et d'augmenter la densité de ces derniers. Ceci permet donc d'isoler une fraction protéique nucléaire.

Na⁺/K⁺-ATPase

L'activité de l'isoforme 2A de la Na⁺/K⁺-ATPase sensible à la ouabaïne (marqueur spécifique pour le sarcolemme)¹⁸⁰⁻¹⁸² nous a démontré un enrichissement important de la fraction sarcolemmale comparativement à l'homogénat. Des études réalisées antérieurement ont utilisé le culot de la centrifugation de 10 000 g pour obtenir

ultérieurement une fraction sarcolemmale.¹⁸³⁻¹⁸⁶ Normalement dans notre protocole de fractionnement protéique, suite à la centrifugation de 10 000 g, le surnageant est recueilli et centrifugé à 200 000 g pour obtenir un culot de protéines sarcolemmales. Donc pour valider notre technique par rapport aux études antérieures, nous avons testé l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase sur les protéines sarcolemmales obtenues, en suivant les étapes d'isolation protéiques, avec le culot à 10 000 g comparé au surnageant de cette centrifugation. La quantité d'activité de la Na^+/K^+ -ATPase sensible à la ouabaine détectée dans la fraction sarcolemmales obtenue à partir du culot de 10 000 g est quasi inexistante (résultat non présenté dans l'article). Donc notre protocole d'isolation de fraction sarcolemmale, à partir du surnageant de la centrifugation de 10 000 g fonctionne adéquatement.

Ca^{2+} -ATPase

L'activité de la Ca^{2+} -ATPase nous a permis de comparé trois types de pompes calciques et donc trois types de membranes dans les différentes fractions souscellulaires. La pompe Ca^{2+} -ATPase est présente dans trois types de système membranaire : la Ca^{2+} -ATPase mitochondriale (MCA), la Ca^{2+} -ATPase de la membrane plasmique (PMCA) et la Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarco-endoplasmique (SERCA). L'activité de la MCA (marqueur spécifique pour les mitochondries) démontre une présence significativement plus élevée dans l'homogénat comparativement aux autres fractions protéiques. Un point important est qu'on devrait s'attendre à une augmentation de la pompe calcique mitochondriale dans la fraction membranes totales. L'absence de Ca^{2+} -ATPase mitochondriale dans cette fraction protéique est probablement due a une dissociation ou

un découplage de la F_1F_0 -ATPase suite au traitement de cette fraction avec du triton X-100.¹⁸⁷ Il est donc possible que le triton X-100 soit un détergent non-ionique trop puissant ou bien qu'il soit présent en trop fortes concentrations dans nos étapes de solubilisation de préparations membranaires. Cette solubilisation des protéines membranaires pourrait dissocier les deux sous-unités de la pompe MCA et en affecter le bon fonctionnement.

L'activité de la PMCA (marqueur spécifique pour la membrane sarcolemmale) démontre une déplétion de cette pompe dans les différentes fractions protéiques. Deux raisons possibles existent pour expliquer ce résultat. Premièrement, dans les cellules musculaires, la contribution relative de la PMCA est négligeable.¹⁸⁸ Deuxièmement, des études ont démontrées que le Na_3VO_4 inhibe l'activité de la PMCA de façon irréversible^{189,190} et que ces effets sont comparables entre les cellules intactes et les préparations de PMCA isolées et purifiées.^{189,190} Donc pour évaluer l'enrichissement de marqueur pour le sarcolemme il est préférable de se fier aux résultats obtenus avec la Na^+/K^+ -ATPase. Ce dernier est un bon marqueur de la membrane plasmique, dans les cellules musculaires, par rapport à la PMCA.

L'activité de la SERCA (marqueur spécifique pour le réticulum sarco-endoplasmique qui est considéré comme le réticulum endoplasmique lisse) démontre une présence plus élevée dans l'homogénat et la fraction protéique sarcolemmale comparé aux autres fractions protéiques. Comparativement à l'homogénat, il y a donc une déplétion significative du réticulum sarco-endoplasmique dans les fractions protéiques excepté pour la fraction sarcolemmale. En effet, la fraction sarcolemmale démontre un

enrichissement de 8 fois en réticulum sarcoplasmique comparé à la fraction protéique totale. Il est possible que le réticulum endoplasmique soit précipité avec le sarcolemme lors de l'isolation protéique. Ceci serait possiblement dû à la distance relativement faible entre le sarcolemme et le réticulum sarco-endoplasmique. En effet, la présence de tubules-t augmente significativement la proximité entre le SR et la membrane plasmique et par le fait même pourrait possiblement augmenter l'attraction entre le SR et la membrane plasmique. Le degré de contamination de la fraction protéique sarcolemmale peut varier selon les différentes techniques d'isolation et de purification.¹⁹¹

Le réticulum sarcoplasmique est séparé en deux parties distinctes soit le réticulum sarcoplasmique longitudinale (LSR) et le réticulum sarcolasmique jonctionnel (JSR).¹⁹² Une technique que nous aurions pu utiliser est celle du « calcium phosphate loading ». Cette technique permet de remplir les vésicules de calcium et à l'aide de gradient de sucrose discontinu permet la séparation en trois fractions distinctes selon leur densité, soit le LSR, le JSR et la membrane plasmique.^{193,194} Par contre, un désavantage de cette technique est que la quantité finale de protéines sarcolemmales obtenues est très réduite comparé a notre technique de fractionnation souscellulaire.

GRP (BIP) 78

Après avoir déterminé la présence de SR dans notre fraction protéique sarcolemmale, nous avons tenté d'évaluer la présence de réticulum endoplasmique rugueux dans cette fraction protéique. La présence de RER dans cette fraction pourrait contaminer notre fraction par des protéines en synthèse dû au RER. Nous avons donc

testé nos fractions par un immunobuvardage avec le GRP (BIP) 78. Ce dernier (marqueur spécifique pour le réticulum endoplasmique autant lisse que rugueux)¹⁹⁵ démontre un enrichissement élevé de cette protéine dans la fraction membranes totales par rapport à la fraction totale. Ce résultat dénote la sédimentation élevée du réticulum endoplasmique dans cette fraction protéique. La fraction nucléaire contient seulement une bande de très faible intensité. Le fait que la membrane nucléaire externe est une extension de la membrane du réticulum endoplasmique peut donc expliquer la présence d'une faible bande dans la fraction nucléaire.¹⁹⁶ De plus, comparant la fraction protéique totale à la fraction protéique sarcolemmale, on remarque un enrichissement de 1.5 fois en réticulum endoplasmique totale (lisse et rugueux). Par contre, on observe un enrichissement de 8 fois en réticulum sarco-endoplasmique (considéré comme du réticulum endoplasmique lisse) entre les deux mêmes fractions protéiques. L'enrichissement en réticulum endoplasmique lisse contre-balance donc la déplétion en réticulum endoplasmique rugueux dans la fraction protéique sarcolemmale (Figure 12). Ceci est donc important puisqu'il prouve qu'il n'y a pas de protéines en synthèse qui pourrait contaminer notre fraction sarcolemmale.

Dans notre étude, le tampon d'homogénéisation contient 1 mM EDTA avec l'addition de 0.6 M KCl pour obtenir la fraction sarcolemmale. Selon des études antérieures, la perte de réticulum endoplasmique rugueux peut être expliquée par le fait que la présence de 0.5mM EDTA provoque la précipitation de 50% du réticulum endoplasmique qui est associé à des mitochondries et que seulement 35% du réticulum endoplasmique rugueux contient encore des ribosomes attachés à sa membrane.^{197,198} De plus, des études ont démontré que l'addition de 0.5 M de KCl au tampon

d'homogénéisation provoque une perte presque complète des ribosomes du ER menant à une densité plus faible.¹⁹⁹⁻²⁰¹ Donc avec une centrifugation de 200 000 g le tampon d'homogénéisation nous permet de précipiter le sarcolemme avec une déplétion importante du réticulum endoplasmique rugueux. Cette déplétion de réticulum endoplasmique rugueux est importante puisque nous ne voulons pas avoir de protéines en synthèse qui pourraient venir contaminer et fausser nos résultats.

Tableau descriptif des fractions totale et sarcolemmal pour l'activité de SERCA et BIP 78

	ER total	ER rugueux	ER lisse
SERCA	↑ 8X	≈	↑ 8X
BIP 78	↑ 1.5X	↓ 6X	↑ 8X

Figure 12 : Tableau descriptif de l'activité de la SERCA et BIP 78 entre les fractions sarcolemmale et totale

Ce tableau compare entre les fractions totale et sarcolemmal, l'activité de la SERCA et de BIP 78. En effet, l'activité de la SERCA (marqueur du ER lisse) dans la fraction sarcolemmal démontre une activité 8 fois supérieure à la fraction totale. En supposant que la quantité de ER rugueux ne varie entre ces deux fractions protéiques on devrait s'attendre à obtenir, dans la fraction sarcolemmal, une activité de ER totale (ER lisse + ER rugueux) d'environ 8 fois supérieur à la fraction totale. Par contre, l'activité de BIP 78 (marqueur de ER lisse et de ER rugueux) démontre une activité seulement 1.5 fois supérieur dans la fraction sarcolemmal par rapport à la fraction totale. Sachant que dans la fraction sarcolemmal nous avons 8 fois plus de ER lisse (résultat de la SERCA) mais seulement 1.5 fois plus de ER totale (résultat de BIP 78) comparé à la fraction totale on doit donc avoir une diminution importante de ER rugueux d'environ 6 fois moins dans la fraction sarcolemmal par rapport à la fraction totale.

NUC P62

Finalement l'immunobuvardage de la nucléoporine p62 (marqueur spécifique de la membrane du noyau)^{178,179,202,203} démontre un enrichissement important de la fraction nucléaire comparé à la fraction totale. Ainsi, les marqueurs spécifiques des fractions cytosoliques, sarcolemmales et nucléaires se retrouvent dans leurs fractions protéiques respectives démontrant que ces fractions protéiques sont effectivement enrichies et ne contiennent que très peu de contaminations provenant d'autres organelles. Nous pouvons donc dire que notre technique de fractionnement souscellulaire fonctionne adéquatement et nous permet d'obtenir des fractions protéiques enrichies. La seule problématique à notre technique d'isolation protéique est dans la fraction sarcolemmale où elle contient un enrichissement significatif de réticulum sarco-endoplasmique mais une déplétion importante de réticulum endoplasmique rugueux.

Les récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes

Localisation souscellulaire ventriculaire

Après avoir évalué le degré d'enrichissement et/ou de contamination de nos différentes fractions protéiques, nous avons utilisé ces fractions protéiques enrichies afin d'examiner la distribution souscellulaire des différents récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes dans les ventricules de souris. Utilisant des anticorps dirigés contre ER α , ER β , AR, PgR-A et PgR-B, la localisation souscellulaire des ces récepteurs a été réalisée par analyse Western blot sur les différentes fractions protéiques obtenues à partir de ventricules de souris femelles. Nos résultats corroborent d'autres études faites

précédemment sur différents tissus où la localisation souscellulaire varie selon les différents récepteurs étudiés.^{75,86,112,119,142,154,163}

Comme études complémentaires, nous pourrions faire aussi de l'immunofluorescence avec la microscopie confocale dans le but d'évaluer la localisation souscellulaire de ces récepteurs et de confirmer, par le fait même, les essais enzymatiques. En effet, la colocalisation des récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes avec des marqueurs spécifiques de différents organelles intracellulaires aurait pu être faite. Par exemple la colocalisation de ER α avec le wheat germ agglutinin (WGA) (marqueur spécifique pour les tubules-t et la membrane plasmique) aurait pu faire la distinction entre la présence de ER α au niveau du sarcolemme ou au niveau du réticulum sarcoplasmique. Nous aurions pu aussi utiliser la cavéoline-3 comme marqueur pour la membrane plasmique. En effet, des études faites dans des cellules endothéliales ont démontré une localisation de ER α au niveau des cavéoles. De plus, la cavéoline-1 permet d'augmenter l'activité transcriptionnelle de ER α .^{171,204} La distinction entre la membrane plasmique et le réticulum sarcoplasmique aurait pu aussi être obtenue avec l'usage d'un marqueur spécifique pour le réticulum endoplasmique comme le GRP (Bip) 78. De plus, la colocalisation avec la Nuc P62 (marqueur spécifique pour le noyau) aurait été intéressante pour colocaliser les récepteurs présent au niveau nucléaire. Ainsi, la technique de microscopie confocale aurait permis de confirmer nos essais enzymatiques et notre localisation souscellulaire. De plus, une technique récente de déconvolution aurait aussi pu être utilisée pour améliorer les résultats de microscopie confocale. Cette technique permet d'augmenter le niveau de résolution en diminuant la fluorescence non

spécifique et le bruit de fond (background). Ceci permet donc d'obtenir des images et des résultats beaucoup plus précis. Une technique encore plus précise aurait été de faire de la microscopie électronique lors de la localisation souscellulaire des récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes.

De plus, lors de l'isolation des protéines membranaires totales nous faisons l'usage de Triton X-100 dans notre protocole ce qui permet de solubiliser les membranes. Or, lors de cette solubilisation, la centrifugation à 200 000 g permet d'obtenir le surnageant qui est considéré comme la fraction membranes totales. Par contre, le culot obtenu contiendrait logiquement toutes les membranes résistantes aux détergents (DRM) comme les cavéoles et les radeaux lipidiques (lipid rafts). Il aurait donc été intéressant de déterminer la présence de ER α dans ce culot et par le fait même d'évaluer la présence de cavéoles dans ce culot via l'immunobuvardage avec l'anticorps dirigé contre la cavéoline-3. Cette fraction pourrait probablement s'appeler la fraction cavéolaires enrichies.

Finalement nous aurions pu regarder la localisation souscellulaire de ces récepteurs dans diverses lignées de souris transgéniques telle : ER α knock-out (ERKO), ER β knock-out (BERKO), ER α et ER β knock-out (DERKO), AR knock-out (ARKO) et PgR knock-out (PRKO). En effet, ces souris transgéniques auraient pu servir, en premier lieu, de control négatif pour vérifier la localisation souscellulaire des récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes. C'est-à-dire que, par exemple, la bande de 66 kDa représentant ER α ne devrait plus être présente chez la souris ERKO. De plus, serait-il

possible de voir un changement de localisation souscellulaire de ces récepteurs dans ces différents types de souris transgéniques. Par exemple, on pourrait peut-être retrouver ER β dans la membrane plasmique chez des souris ERKO. En effet, une étude produit par Razandi *et al.* (1999) ont démontré que dans des cellules de la lignée CHO (Chinese Hamster Ovary) transfectées avec l'ADN codant pour ER α et ER β , autant ER α que ER β se retrouvait au niveau de la membrane plasmique.¹⁴⁷ De plus, s'il existe des changements dans la localisation souscellulaire, il est aussi possible que les niveaux d'expression de ces récepteurs varient entre les différentes lignées de souris transgéniques.

Comparaison entre ventricules et oreillettes

Des études antérieures rapportées par Kadish *et coll.* ont démontré qu'il existe des différences entre les hommes et les femmes au niveau des arythmies.³¹ En effet, les femmes ont des intervalles QT corrigés plus long,^{35,41,47,53} ce qui les rend plus vulnérable aux Torsades de Pointes (une arythmie ventriculaire polymorphe).^{41,47} De plus, les femmes ont une incidence plus élevée d'arythmies de réentré comparé aux hommes.³¹ Par contre, les hommes ont plus d'incidence de fibrillation auriculaire, de tachycardie supraventriculaire et d'arrêt cardiaque par rapport aux femmes.³¹

Est-il possible que la spécificité des différentes d'arythmies, entre hommes et femmes, soit due à une différence de localisation souscellulaire des récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes entre les ventricules et les oreillettes? Récemment, des études ont démontré que la localisation souscellulaire de ces récepteurs peut varier selon

les tissus d'une même espèce.⁴ Par exemple, chez le lapin, il y a une différence de localisation souscellulaire de ER β entre l'utérus et les ovaires. Dans l'utérus, ER β est retrouvé dans les fractions cytosolique et nucléaire tandis que dans les ovaires on retrouve ER β presque exclusivement dans le cytosol.⁴ La localisation souscellulaire des récepteurs est donc spécifique au type cellulaire.

Au niveau des oreillettes, nos résultats ont démontré une similarité de localisation entre les ventricules et les oreillettes pour chacun des différents récepteurs étudiés. Par contre, dans notre étude, l'isolation de fraction nucléaire provenant d'oreillettes n'a pu être obtenue pour des raisons techniques. En effet, l'isolation d'une fraction nucléaire provenant des oreillettes de souris aurait nécessité environ 100 paires d'oreillettes. Malgré la similarité de localisation souscellulaire de ces récepteurs entre les ventricules et les oreillettes, une différence dans les niveaux d'expression pourrait contribuer à expliquer les différences entre les sexes au niveau des diverses arythmies.

Nous avons donc évalué les niveaux d'expression de ces récepteurs entre les ventricules et les oreillettes de souris. Nous avons déterminé que les niveaux d'expression de ER α , AR et PgR-A étaient plus élevés dans les ventricules. Par contre, l'inverse se produit pour les niveaux d'expression de PgR-B. Ces différences dans les niveaux d'expression des récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes, entre les ventricules et les oreillettes peuvent être expliquées, en partie, par le fait que ER α réagit souvent en parallèle avec PgR-A. En effet, une étude a démontré que la stimulation de ER α avec les oestrogènes augmente les niveaux de récepteurs pour la progestérone dans

les cellules du myomètre.¹¹⁴ Par contre, les niveaux plus élevés de PgR-B dans les oreillettes peuvent être expliqués par les niveaux plus faibles de PgR-A dans ce tissu. En effet, Conneely *et coll.* ont démontré que dans l'utérus, la stimulation de PgR-A avec la progestérone inhibe l'activation de PgR-B.⁸² Donc les niveaux plus élevés de PgR-B retrouvés dans les oreillettes sont probablement dus au fait qu'il y a des niveaux plus faibles de PgR-A dans les oreillettes. C'est-à-dire qu'il y a moins d'inhibition de PgR-A exercée sur les PgR-B.

Comparaison entre mâles et femelles

Sachant donc qu'il existe, autant au niveau des ventricules que dans les oreillettes de souris femelles, une différence dans la localisation souscellulaire entre les différents récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes, nous avons examiné cette localisation dans le coeur de souris mâles. Taylor *et coll.* ainsi que d'autres études ont démontré que les récepteurs aux oestrogènes dans les tissus humains peuvent se retrouver autant chez les hommes que chez les femmes.^{21,25,139,154} Nos résultats démontrent une similarité dans la distribution souscellulaire des différents récepteurs entre les mâles et les femelles. De plus, les niveaux d'expression de ces différents récepteurs entre les mâles et les femelles sont similaires autant dans les ventricules que dans les oreillettes. Donc les différences d'incidence entre les sexes dans les maladies cardiovasculaires ne peut être expliquer par une différence de localisation souscellulaire ou une différence dans les niveaux d'expression des différents récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes.

Donc l'absence de dimorphisme sexuelle dans la localisation souscellulaire et dans les niveaux de ces récepteurs amène beaucoup plus de questions que de réponses. En effet, si les niveaux d'expression de ces récepteurs entre les mâles et femelles sont égaux, il doit y avoir des voies de signalisation différentes ou bien des seconds messagers plus sensibles pour un sexe donné. Il est donc possible que les différences entre les sexes au niveau des maladies cardiovasculaires soient dues non pas à une différence dans la localisation ou les niveaux des récepteurs mais plutôt à une différence dans le fonctionnement du mécanisme de signalisation de ces récepteurs.

Dans des études ultérieures, il serait intéressant de comparer la présence de récepteur ER α au niveau de la membrane plasmique par rapport à la présence de ce dernier seulement dans les cavéoles. Il y a peut être une différence, entre les sexes, dans la localisation de ces récepteurs au niveau des cavéoles, ce qui pourrait contribuer à expliquer la différence d'incidence des maladies cardiovasculaires entre les mâles et les femelles. Peut-être y a-t-il plus de ER α dans les cavéoles chez les souris femelles comparé aux mâles. Il est possible que le fait d'avoir plus de ER α dans les cavéoles amèneraient les ER α à être plus sensibles à répondre à une stimulation et par le fait même d'être plus ou moins fonctionnel selon le cas. Une différence dans la présence ou la fonctionnalité des ER α dans les cavéoles pourrait possiblement être impliquée dans la différence d'incidence des maladies cardiovasculaires entre les hommes et les femmes.

Une seconde possibilité qui pourrait expliquer la différence d'incidence des maladies cardiovasculaires entre les sexes, serait dans la voie de signalisation des

récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes. Par exemple, il se pourrait qu'une différence existe entre les mâles et les femelles au niveau des niveaux d'expression des HSP (protéines de choc thermique). Les HSP sont des protéines permettant de maintenir les récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes en un état inactif. Il y a plusieurs HSP présent aux niveau du cœur tel : HSP27, HSP60, HSP70, HSP72 et HSP90. Les taux plus élevés de HSP pourraient amener ces récepteurs à être plus résistants ou bien moins sensibles à une stimulation par leurs hormones respectives. En effet une étude récente a démontré que les coeurs de rats mâles avaient plus de HSP27 et de HSP90 que les cœur de rats femelles tandis que le contraire se produit pour les HSP72 où les niveaux d'expression de ce dernier est plus élevé chez les femelles que les mâles. Par contre, les niveaux de HSP60 ne varient pas entre les sexes au niveau du cœur de rat.²⁰⁵ De plus, comme directions futures, nous pourrions donc évaluer les niveaux d'expression de ces quatre différents HSP au niveau des ventricules ainsi que dans les oreillettes de souris mâles et femelles.

De plus, Noble *et coll.* ont démontré que, suite à l'exercice, les niveaux de HSP70 sont plus augmentés chez les rats mâles que chez les femelles. Par contre, chez les femelles ovariectomisées ayant fait de l'exercice, les niveaux de HSP70 deviennent similaires aux mâles post-exercice.²⁰⁶ De plus, une étude récente a démontré qu'un traitement hyperthermique fait augmenter les niveaux de HSP72 beaucoup plus chez les rats mâles que les femelles. Par contre, chez les femelles ovariectomisées ayant subit un traitement hyperthermique, les niveaux de HSP72 sont similaires aux mâles hyperthermique. Finalement, dans cette étude les niveaux de HSF-1 (facteur de

transcription d'une protéine de choc thermique) phosphorylée fluctuent parallèlement aux variations des niveaux de HSP72.²⁰⁷ Il serait donc intéressant d'évaluer, dans notre étude, les niveaux de HSF-1.

Il y a présentement 5 kinases connues pour phosphoryler les protéines de choc thermique : la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA), la protéine kinase C (PKC), MAPKAP kinase-2, MAPKAP kinase-3 et MAPKAP kinase-5/PRAK.²⁰⁸ Sachant que la phosphorylation de HSP27 sert donc à déterminer l'activité de phosphorylation de ces différentes kinases, il aurait été intéressant d'évaluer les niveaux de ces différentes kinases. Selon l'étude de Boivin *et coll.*, les PKC ϵ sont retrouvés au niveau de la membrane plasmique dans les cardiomyocytes ventriculaires de rats.²⁰⁹ Nous savons que chez le rat, les oestrogènes augmentent l'expression des différents PKC autant au niveau des cellules musculaires lisses du muscle utérin²¹⁰ qu'au niveau de la pituitaire²¹¹ C'est-à-dire qu'il y a une redistribution des PKC du cytosol vers la membrane plasmique. De plus, Westel *et coll.* ont démontré qu'une altération dans l'activité des PKC peut moduler la réponse des récepteurs aux oestrogènes dans différents types cellulaires *in vitro*.²¹¹ En effet, un bloqueur des PKC permet d'augmenter les niveaux de récepteurs aux oestrogènes. Donc, les PKC pourraient possiblement affecter ces récepteurs soit par une phosphorylation de ces derniers amenant un changement conformationnelle ou bien une modification dans la voie de dégradation ubiquitine-protéasome. De plus, un point intéressant est que dans différentes lignées cellulaires négatives pour les récepteurs aux oestrogènes, les niveaux d'activité de PKC sont plus élevés que pour les lignées cellulaires positives pour ces récepteurs.²¹¹ Donc, pris conjointement ces études

démontrent que les PKC et les récepteurs aux oestrogènes peuvent agir comme système de rétroaction où chacun peut réguler l'autre.

Nous avons parlé préalablement que les oestrogènes peuvent augmenter les niveaux de PKC, mais ils peuvent aussi permettre l'activation rapide de PI3K, AKT, ERK et p38 au niveau de la membrane plasmique.²¹² Sachant que les différentes MAPKAP kinases peuvent être activées par p38, JNK ou bien ERK1/2 et que les MAPKAP kinases peuvent phosphoryler les HSP27 il aurait été intéressant d'évaluer ces différentes voies de signalisation pour tenter d'expliquer les différences d'incidence des maladies cardiovasculaires entre les mâles et les femelles et ceci autant au niveau des ventricules que des oreillettes.

Variations hormonales

Ensuite, nous avons évalué l'effet d'une variation hormonale sur la localisation et les niveaux d'expression de ces récepteurs. En effet, il est possible qu'après la maturité sexuelle, une augmentation des niveaux hormonaux pourrait influencer l'expression de ces récepteurs et/ou influencer une translocation de ces récepteurs et être responsable de la différence d'incidence de maladies cardiovasculaires entre les hommes et les femmes. Par contre, nous avons démontré avec une analyse par Western Blot qu'il n'y a pas de différence entre les souris âgées de 2-3 mois (après maturité sexuelles) et des souris âgées de 37 jours (avant la maturité sexuelle) autant pour la localisation souscellulaire que les niveaux d'expression entre les souris des deux différents groupes d'âges. De plus, aucune translocation n'a été détectée entre les différentes périodes du développement sexuel (avant et après la maturité sexuelle). Il est possible que les changements hormonaux,

entre les deux groupes d'âge, se fait de façon très graduelle et donc n'affecte ni la localisation souscellulaire, ni les niveaux d'expression des récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes.

Par la suite, nous avons déterminé la capacité des cellules cardiaques de répondre à un changement drastique des niveaux hormonaux. Pour ce faire, nous avons examiné les effets de l'ovarectomie sur les niveaux cellulaires de ces récepteurs dans les ventricules et les oreillettes de souris femelles. Le gain pondéral et l'atrophie de l'utérus dans les souris ovariectomisées nous permet de confirmer que la chirurgie a bien fonctionné. En effet, en retirant la source majeure d'oestrogènes et de progestérone, par l'ovarectomie, on reproduit le phénomène de ménopause chez la souris comme celle que l'on retrouve chez les femmes ménopausées chirurgicalement. Les niveaux de récepteurs ont été évalués par Western blot où seulement l'expression ventriculaire de ER α sarcolemmal et de PgR-A cytosolique étaient plus élevées dans le groupe ovariectomisé comparativement au groupe contrôle. De plus, nos résultats n'ont démontré aucun changement dans la localisation souscellulaire suite à l'ovarectomie ce qui aurait pu expliquer cette augmentation des niveaux d'expression des récepteurs ER α et PgR-A dans les ventricules (résultats non présentés).

Ces résultats corroborent d'autres études qui démontrent que les niveaux de ER α peuvent être régulés dans les cellules MCF-7 non-confluentes en croissance dans un sérum sans stéroïdes.⁷³ De plus, les récepteurs de la progestérone peuvent être régulés par ER α .⁸³ En effet, dans le myomètre, lorsque les niveaux d'ARNm et de protéines de ER α

sont augmentés, il y a une augmentation parallèle des niveaux d'expression des récepteurs à la progestérone.¹¹⁴ En ce qui a trait à l'ARNm, nous aurions pu évaluer les niveaux d'ARNm pour ces différents récepteurs. Une étude récente a démontré qu'il n'y a pas toujours une relation linéaire entre les niveaux de protéines et les niveaux d'ARNm. En effet, les différences entre les niveaux de protéines et d'ARNm peuvent être attribuées à (1) la stabilité de l'ARNm, (2) l'efficacité de la traduction de l'ARNm, (3) le processus post-traductionnel (tel que les interactions protéines-protéines) et (4) les fluctuations dans la stabilité ou la dégradation des protéines. Donc toutes ces étapes pourraient être des voies intéressantes à évaluer lors d'études ultérieures.²¹²

Par ailleurs, nous aurions pu évalué les niveaux des protéines de choc thermique tel : HSP27, HSP60, HSP70, HSP72 et HSP90. En effet, une étude a démontré, dans des plaquettes porcines, que les niveaux de HSP70 et de HSP90 étaient augmentés chez les femelles ovariectomisées.²⁰ De plus, une autre étude sur les tissus de rats a démontrée une diminution des niveaux cardiaques de HSP72 chez les femelles ovariectomisées.²⁰⁵ Sachant que les HSP maintiennent les récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes dans un état inactif, il est possible que les niveaux plus bas de HSP amènent une diminution de récepteur inactif. Ceci pourrait amener une augmentation de la transcription via un mécanisme qui est ligand-indépendant.

D'un autre coté, nous aurions pu évaluer l'effet de l'ovariectomie sur les différentes voies de signalisations intracellulaires tels que : PKC, PKA, MAPK, ERK, JNK, P38, etc (Figure 13). Dans des ostéoblastes murines en culture, une étude a

démontré que chez les sujets ovariectomisés, les niveaux de ERK étaient augmentés par rapport à des sujets intacts.²¹³ De plus, une autre étude a démontré qu'au niveau de la glande pituitaire, les oestrogènes peuvent augmenter les niveaux de PKC.²¹⁰ En effet, comme discuté précédemment, les résultats ont démontré que les PKC et les récepteurs aux oestrogènes peuvent former un système de rétroaction où chacun peut influencer l'autre.²¹¹ Il serait donc intéressant de déterminer les niveaux d'expression de ces différentes kinases, d'évaluer l'effet de l'ovariectomie sur ces dernières et tenter de corréler ces résultats avec les résultats obtenus sur les différents récepteurs suite à l'ovariectomie pour mieux comprendre le mécanisme des voies de signalisation des récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes.

La voie classique des hormones sexuelles stéroïdiennes médie un effet génomique où leurs récepteurs, une fois liées à leurs hormones spécifiques transloquent du cytosol vers le noyau ce qui expliquerait la présence de ER α et ER β au niveau du cytosol et du noyau. De plus, ER α se retrouve aussi au niveau de la membrane plasmique. Cette localisation produit des effets non-génomiques tel : l'activation de phospholipase C ou de flux calciques ainsi que la génération d'AMPc et d'IP3. Les mécanismes génomiques et non-génomiques ont toujours été vus comme des mécanismes séparés. Par contre, une étude à soulever l'hypothèse que ces deux mécanismes peuvent avoir une synergie et donc potentialiser la transcription.²¹⁴ Il est donc important de comprendre les mécanismes d'action des récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes avec leurs hormones spécifiques.

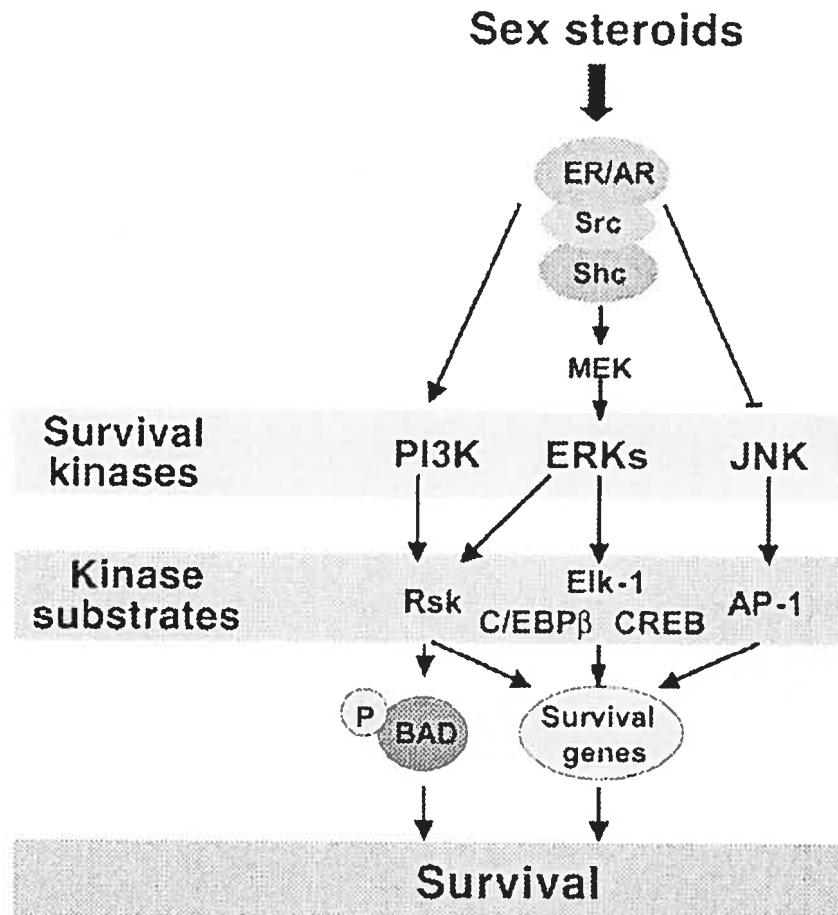


Figure 13 : Représentation schématique des voies de signalisation des hormones sexuelles stéroïdiennes sur la survie cellulaire

Les hormones sexuelles stéroïdiennes une fois liées à leurs récepteurs spécifiques peuvent interagir avec différentes kinases tels : PI3K, ERK, JNK. Ces kinases deviennent actives et vont phosphoryler leurs différents substrats respectifs tels : Rsk, Elk-1, AP-1, C/EBP β , CREB. Une fois les substrats phosphorylés, ils interagissent avec des protéines spécifiques à la survie cellulaire. Donc les hormones sexuelles stéroïdiennes permettent via ces voies de signalisation de médier des effets anti-apoptotiques.

On pourrait penser que ER β a un rôle de récepteur substitut. En effet, comme discuter auparavant, nous aurions pu faire la localisation de ces récepteurs dans des souris transgéniques ERKO qui sont déficientes en ER α . Le fait que cette lignée de souris

transgéniques n'a pas de ER α amène-t-il une translocation de la localisation souscellulaire de ER β vers la membrane plasmique? De plus, si ER β est retrouvé au niveau de la membrane plasmique dans la lignée de souris transgénique ERKO, nous aurions pu évalué l'effet de l'ovarectomie sur les niveaux de ER β au niveau de la membrane plasmique et déterminer si elle sont aussi capables de répondre à une chute drastique des niveaux d'oestrogènes.

Remplacement Hormonal

Finalement, nous aurions pu évaluer l'effet d'un traitement de remplacement aux oestrogènes sur les niveaux d'ARNm et les niveaux de récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes dans les cœurs de souris mâles et femelles. Des études ont démontré qu'un traitement aux oestrogènes provoque une augmentation des niveaux de ER, PgR, GAPDH et cyclophiline dans les tissus utérins.^{116,215} De plus, ces études ont déterminé que les androgènes stabilisent l'ARNm des AR dans les cellules cancéreuses prostatiques.^{116,215} Il est donc possible que les oestrogènes aient un effet sur la stabilité de l'ARNm des ER et PgR. Selon ces études, les oestrogènes augmenteraient la transcription de PgR et augmenteraient la stabilité post-transcriptionnelle de l'ARNm de ER.^{116,215} Une autre étude a démontré que les traitements aux oestrogènes augmente les niveaux d'ARNm de ER dans l'endomètre mais les diminue dans le foie de *Xenopus laevis*.⁷² Il est donc possible que la régulation des niveaux de récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes diffère selon le type cellulaire tout comme la localisation souscellulaire de ces récepteurs.

CONCLUSION

En utilisant des marqueurs pour différentes organelles intracellulaires, nous avons établi que nos différentes fractions protéiques, obtenues par différentes techniques de fractionnement, sont effectivement enrichies avec seulement des contaminations minimales. Avec ces fractions protéiques, nous avons évalué la localisation souscellulaire des divers récepteurs aux hormones sexuelles stéroïdiennes dans les ventricules et les oreillettes en les comparant entre les souris mâles et femelles. Nous avons aussi démontré une différence dans les niveaux d'expression de ces récepteurs entre les ventricules et les oreillettes. De plus, nous avons déterminé que les cellules cardiaques femelles sont capables de répondre à une chute drastique des taux d'oestrogènes suite à l'ovarectomie. Nos résultats démontrent que les différences d'incidence des maladies cardiovasculaires ne peuvent pas être dues à une différence, entre les mâles et les femelles, au niveau de la localisation souscellulaire ou bien dans les niveaux d'expression de ces récepteurs. Les résultats obtenus, suite à l'ovarectomie, suggèrent que l'augmentation de ER α sarcolemmal et de PgR-A cytosolique sont des mécanismes compensatoires à l'état de déficience en oestrogènes. Par contre, des études additionnelles sont nécessaires car il reste plusieurs questions nécessitant des réponses en regard à l'interaction entre les hormones, le sexe et les fonctions du système cardiovasculaire.

Comme ces études étaient réalisées dans le cadre de mon projet de maîtrise, j'ai dû m'arrêter ici. Par contre, la réalisation de ce projet a permis de soulever de nombreuses questions, toutes aussi intéressantes les unes que les autres. En effet, les mécanismes intracellulaires tels : les kinases (PKC, MAPK, ERK, JNK, PI3K, P38, etc) ainsi que les protéines de choc thermique (HSP90, HSP72, HSP70, HSP60, HSP27, etc)

seraient des voies intéressantes à étudier. Des différences dans la signalisation intracellulaire seraient peut-être responsable de la spécificité de la réponse aux hormones sexuelles stéroïdiennes par rapport au sexe masculin ou féminin. Dans les tissus qui répondent aux hormones sexuelles stéroïdiennes, il doit y avoir une coordination entre les mécanismes de transcription et les mécanismes post-transcriptionnelles. Les connaissances des mécanismes moléculaires par lesquelles les oestrogènes et la progestérone régulent l'expression de ER et PgR sont critique pour la compréhension de l'importance et de la durée des actions des hormones sexuelles stéroïdiennes. Ces connaissances sont critiques puisque le but ultime d'un traitement de remplacement hormonal est d'activer des effets désirables comme la survie des ostéoblastes sans activer des effets indésirables tel que la prolifération de cellules cancéreuses du sein.

BIBLIOGRAPHIE

1. Jensen J., Nilas L., Christiansen C. Influence of menopause on serum lipids and lipoproteins. *Maturitas* 1990; 12:321-331.
2. Trépanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res* 2001; 89(5):437-444.
3. Nadal A., Diaz M., Valverde M.A. The estrogen trinity: membrane, cytosolic and nuclear effects. *News Physiol Sci* 2001; 16:251-255.
4. Monje P., Boland R. Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta isoforms in rabbit uterus and ovary. *J Cell Biochem* 2001; 82:467-479.
5. Grohé C, Kahlert S, Löbber K, Vetter H. Expression of oestrogen receptor α and β in rat heart: role of local oestrogen synthesis. *J Endocrinol* 1998; 156:R1-R7.
6. Collins P, Stevenson JC, Mosca L. Spotlight on gender. *Cardiovasc Res* 2002; 53:535-537.
7. 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.
8. de Jager T, Pelzer T, Muller-Botz S, Imam A, Muck J, Neyses L. Mechanisms of estrogen receptor action in the myocardium. *J Biol Chem* 2001; 276(30):27873-27880.
9. Jovanovic A, Jovanovic S. Estrogen and vascular system: more questions for the future. *Cardiovasc Res* 1999; 42:9-11.
10. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *New Engl J Med* 1999; 340(23):1801-1809.
11. Nathan L, Shi W, Dinh H, Mukherjee TK, Wang X, Lusis AJ, Chaudhuri G. Testosterone inhibits early atherogenesis by conversion to estradiol: Critical role of aromatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(6):3589-3593.
12. McPherson R. Is hormone replacement therapy cardioprotective? Decision-making after the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study. *Can J Cardiol* 2000; 16(suppl A):14A-19A.
13. Rosano GM, Panina G. Cardiovascular pharmacology of hormone replacement therapy. *Drugs Aging* 1999; 15(3):219-234.
14. Rosano GMC, Panina G. Oestrogens and the heart. *Thérapie* 1999; 54:381-385.
15. Mosca L, Collins P, Herrington D, Mendelsohn ME, Pasternak RC, Robertson RM, Schenck-Gustafson K, Smith SC, Taubert KA, Wenger NK. Hormone replacement

- therapy and cardiovascular disease. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 2001; 104:499-503.
16. Clarkson TB. The new conundrum: Do estrogens have any cardiovascular benefits? *Int J Fertil* 2002; 47(2):61-68.
 17. McLarty A, Mann N, Lawson W, Forster A. Womens heart health series: a mini-symposium. *Med Sci Monit* 2003; 9(6):RA103-RA110.
 18. Alexandersen P., Haarbo J., Byrjalsen I., Lawaetz H., Christiansen C. Natural androgens inhibit male atherosclerosis: a study in castrated, cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 1999; 84:813-819.
 19. Les maladies du coeur et les accidents vasculaires cérébraux chez les femmes canadiennes: Matière à réflexion. Fondation Canadienne des Maladies du Coeur, - 28 p. 1997. Ottawa.
 20. Jayachandran M, Miller VM. Ovariectomy upregulates expression of estrogen receptors, NOS, and HSPs in porcine platelets. *Am J Physiol* 2002; 283:H220-H226.
 21. Rossouw JE. Hormones, genetic factors, and gender differences in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2002; 53:550-557.
 22. Cagnacci A, Soldani R, Puccini E, Fioretti P, Benedetto Melis G. Lipid-independent therapeutic properties of transdermal 17 β -estradiol on cardiovascular diseases. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1992; 71:639-641.
 23. Gray GA, Sharif I, Webb DJ, Seckl JR. Oestrogen and the cardiovascular system: the good, the bad, and the puzzling. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 22(3):152-156.
 24. Klein R, Berlin L. Benefits and risks of hormone replacement therapy. In: Edward J.Pavlik, editor. Estrogens, progestins, and their antagonists. 1996: 3-50.
 25. Lin AL, Shain SA. Estrogen-mediated cytoplasmic and nuclear distribution of rat cardiovascular estrogen receptors. *Arteriosclerosis* 1985; 5:668-677.
 26. Barrett-Connor E. Sex differences in coronary heart disease: why are women so superior? The 1995 ancel keys lecture. *Circulation* 1997; 95:252-264.
 27. Stampfer MJ, Colditz GA, Willet WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. *New Engl J Med* 1991; 325:756-762.
 28. Levin ER. Genome and hormones: gender differences in physiology. Invited Review: cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J Appl Physiol* 2001; 91:1860-1867.

29. Prestwood KM, Pilbeam CC, Raisz LG. Treatment of osteoporosis. *Annu Rev Med* 1995; 46:249-256.
30. Liu Y, Ding J, Bush TL, Longenecker JC, Nieto FJ, Golden SH, Szklo M. Relative androgen excess and increased cardiovascular risk after menopause: A hypothesized relation. *Am J Epidemiology* 2001; 154(6):489-494.
31. Kadish AH. The effects of gender on cardiac electrophysiology and arrhythmias. In: Zipes DP, Jalife J, editors. *Cardiac Electrophysiology: From cell to bedside*. Philadelphia: W.R. Saunders Company, 1995: 1268-1275.
32. Larsen JA, Kadish AH. Effects of gender on cardiac arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998; 9:655-664.
33. Bazett H. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart* 1920; 7:353-370.
34. Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, Gwathmey JK, Green GE, Schiebinger RJ. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* 1998; 98:256-261.
35. Rautaharju PM, Zhou SH, Wong S, Calhoun HP, Berenson GS, Prineas R, Davignon A. Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Can J Cardiol* 1992; 8(7):690-695.
36. Ebert SN, Liu XK, Woosley RL. Female gender as a risk factor for drug-induced cardiac arrhythmias: Evaluation of clinical and experimental Evidence. *J Women's Health* 1998; 7(5):547-557.
37. Bidoggia H, Maciel JP, Capalozza N, Mosca S, Blaksley EJ, Valverde E, Bertran G, Arini P, Biagetti MO, Quinteiro R. Sex-dependent electrocardiographic pattern of cardiac repolarization. *Am heart J* 2000; 140:430-436.
38. Bidoggia H, Maciel JP, Capalozza N, Mosca S, Blaksley EJ, Valverde E, Bertran G, Arini P, Biagetti MO, Quinteiro R. Sex difference on the electrocardiographic pattern of cardiac repolarization: possible role of testosterone. *Am heart J* 2000; 140:678-683.
39. Brouillette J, Trépanier-Boulay V, Fiset C. Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *J Physiol* 2003; 546:403-413.
40. Bednar M, Harrigan EP, Anziano RJ, Camm AJ, Ruskin JN. The QT interval. *Prog Cardiovasc Dis* 2001; 43(5, Suppl.1):1-45.
41. 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. *Am J Cardiol* 1997; 79:178-181.

42. 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. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:93-99.
43. Wolbrette D, Naccarelli G, Curtis A, Lehmann M, Kadish AH. Gender differences in arrhythmias. *Clin Cardiol* 2002; 25:49-56.
44. Moss AJ. Measurement of the QT interval and the risk associated with QTc interval prolongation: A review. *Am J Cardiol* 1993; 72:23B-25B.
45. Corbi GM, Carbone S, Ziccardi P, Giugliano G, Marfella R, Nappo F, Paolisso G, Esposito K, Giugliano D. FFAs and QT intervals in obese women with visceral adiposity: Effects of sustained weight loss over 1 year. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2080-2083.
46. 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.
47. Kawasaki R, Machado C, Reinoehl J. Increased propensity of women to develop torsades de pointes during complete heart block. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1995; 6:1032-1038.
48. Saba S, Zhu W, Aronovitz M, Estes M, Wang PJ, Mendelsohn ME, Karas RH. Effects of estrogen on cardiac electrophysiology in female mice. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2002; 13:276-280.
49. 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.
50. Rubart M, Von Der Lohe E. Sex steroid and cardiac arrhythmia: More questions than answers. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998; 9:655-667.
51. Moss AJ, Schwartz P, Crampton RS. The long QT syndrome prospective longitudinal study of 328 families. *Circulation* 1991; 84:1136-1144.
52. Kopecky S, Gersh B, McGoorn M. The natural history of lone atrial fibrillation. *New Engl J Med* 1987; 317:669-674.
53. Reinoehl J, Frankovich D, Machado C, Kawasaki R, Baga JJ, Pires LA, Steinman RT, Fromm BS, Lehmann MH. Probucol-associated tachyarrhythmic events and QT prolongation: importance of gender. *Am Heart J* 1996; 131:1184-1191.
54. Merri M, Benhozín J, Alberti M, Locati E, Moss AJ. Electrocardiographic quantitation of ventricular repolarization. *Circulation* 1989; 80:1301-1308.

55. Hanley P, Zinsmeister A, Clements I. Gender-related differences in cardiac response to supine exercise assessed by radionuclide angiography. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13:624-629.
56. Haissaguerre M, Gaita F, Fischer B. Elimination of atrioventricular nodal reentrant tachycardia using discrete slow potentials to guide application of radiofrequency energy. *Circulation* 1992; 85:2162-2175.
57. Mitrani R, Kein L, Hackett F. Radiofrequency ablation of atrioventricular node reentrant tachycardia: Comparison between fast (anterior) and slow (posterior) pathway ablation. *J Am Coll Cardiol* 1993; 21:432-441.
58. Stramba-Badiale M, Spagnolo D, Bosi G, Schwartz PJ. Are gender differences in QTc present at birth? *Am J Cardiol* 1995; 75:1277-1278.
59. Petterson K, Gustafsson JA. Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiol* 2001; 63:165-192.
60. Laudanski K, Cudnoch-Jedrzejewska A. Effects of ovariectomy on the regulation of cardiovascular functions in female Wistar rats. *Med Sci Monit* 2001; 7(6):1188-1192.
61. Hewitt SC, Korach KS. Progesterone action and responses in the β ERKO mouse. *Steroids* 2000; 65:551-557.
62. Bonkhoff H, Aumuller G, Remberger K. Differential Expression of 5 α -reductase isoenzymes in the human prostate and prostatic carcinomas. *The Prostate* 1996; 29:261-267.
63. Takeda H, Chodak G, Mutchnik S, Nakamoto T, Chang C. Immunohistochemical localization of androgen receptors with mono- and polyclonal antibodies to androgen receptor. *J Endocrinol* 1990; 126:17-25.
64. Abalain JH, Quemener E, Carre JL, Simon B, Amet Y, Mangin P, Floch HH. Metabolism of androgens in human hyperplastic prostate: Evidence for a differential localization of the enzymes involved in the metabolism. *J Steroid Biochem* 1989; 34(1-6):467-471.
65. Fannon SA, Vidaver RM, Marts SA. Genome and Hormones: Gender differences in physiology historical perspectives: An abridged history of sex steroid hormone receptor action. *J Appl Physiol* 2001; 91:1854-1859.
66. McCrohon J.A., Death A.K., Nakhla S., Jessup W., Handelsman D.J., Stanley K.K., Celmaj D.S. Androgen receptor expression is greater in macrophages from male than from female donors: a sex difference with implications for atherogenesis. *Circulation* 2000; 101:224-226.

67. Schleicher G, Stumpf WE, Gurley JM, Drews U. Differential nuclear binding of (3H) testosterone and its metabolites to androgen and estrogen receptors in brain, pituitary, heart, kidney and accessory sex glands of the mouse: An autoradiographic study. *J Steroid Biochem* 1989; 33(4A):581-587.
68. Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Jones M, Davis S. The role of local estrogen biosynthesis in male and female. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11:184-188.
69. Grumbach MM, Auchus RJ. Estrogen: Consequences and implications of human mutations in synthesis and action. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(12):4677-4694.
70. McTernan PG, Anwar A, Eggo MC, Barnett AH, Stewart PM, Kumar S. Gender differences in the regulation of P450 aromatase expression and activity in human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24(7):875-881.
71. Luconi M, Gianni F, Baldi E. Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *J Steroid Biochem Molec Biol* 2002; 80:369-381.
72. Mohamed MK, Abdel-Rahman AA. Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. *Eur J Endocrinol* 2000; 142:307-314.
73. Flouriot G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, Reid G, Sonntag-Buck V, Gannon F. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J* 2000; 19:4688-4700.
74. Molenda HA, Griffin AL, Auger AP, McCarthy MM, Tetel MJ. Nuclear receptor coactivators modulate hormone-dependent gene expression in brain and female reproductive behavior in rats. *Endocrinology* 2002; 143(2):436-444.
75. Francavilla A, Di Leo A, Eagon PK, Polimeno L, Guglielmi F, Fanizza G, Barone M, Starlz TE. Effect of spironolactone and potassium canrenoate on cytosolic and nuclear androgen and estrogen receptors of rat liver. *Gastroenterology* 1987; 93:681-686.
76. Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us. *Endocr Rev* 1999; 20:358-417.
77. Ihionkhan CE, Chambliss KL, Gibson LL, Hahner LD, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen causes dynamic alterations in endothelial estrogen receptor expression. *Circ Res* 2002; 91:814-820.

78. Wang X, Barber DA, Lewis DA, McGregor CGA, Sieck GC, Fitzpatrick LA, Miller VM. Gender and transcriptional regulation of NO synthase and ET-1 in porcine aortic endothelial cells. *Am J Physiol* 1997; 273(42):H1962-H1967.
79. Ginsburg GS, Douglas PS. Why cardiologists should be interested in estrogen. *Am J Cardiol* 1996; 78:559-561.
80. Lundeen SG, Carver JM, McKean M, Winneker RC. Characterization of the ovariectomized rat model for the evaluation of estrogen effects on plasma cholesterol levels. *Endocrinology* 1997; 138(4):1552-1558.
81. Karas RH, Van Eickels M., Lydon J.P., Roddy S., Kwoun M., Aronovitz M., Baur W.E., Conneely OM, O'Malley BW, Mendelsohn ME. A complex role for the progesterone receptor in the response to vasculature injury. *J Clin Invest* 2001; 108:611-618.
82. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, O'Malley BW. Reproductive functions of progesterone receptors. *Endocrin Soc* 2002;339-355.
83. Savouret J-F, Rauch M, Redeuilh G, Sar S, Chauchereau A, Woodruff K, Parker MG, Milgrom E. Interplay between estrogens, progestins, retinoic acid and AP-1 on a single regulatory site in the progesterone receptor gene. *J Biol Chem* 1994; 269(46):28955-28962.
84. The Writing Group for the PEPI Trial. Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women: The postmenopausal Estrogen/Progestin Intervention (PEPI) Trial. *JAMA* 1995; 273:199-208.
85. Nabulski M, Folsom AR, White A, Patsch W, Heiss G, Wu KK, Szklo M. Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *New Engl J Med* 1993; 328:1069-1075.
86. 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. *J Histochem Cytochem* 1991; 39:927-936.
87. Hickey GT, Krasnow JS, Beattle WG, Richards J. Aromatase cytochrome P450 in rat ovarian granulosa cells before and after luteinization: adenosine 3', 5'-monophosph-dependent and independent regulation cloning and sequencing of rat aromatase cDNA and 5' genomic DNA. *Mol Endocrinol* 1990; 4:3-12.
88. Klebanoff R, Miller VT, Fernhall B. Effects of exercise and oestrogen therapy on lipid profiles of postmenopausal women. *Med Sci Sports Exerc* 1998; 30:1028-1034.

89. Shinoda M, Latour MG, Lavoie J-M. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Int J Obes* 2002; 26:335-343.
90. Zhou S, Zilberman Y, Wassermann K, Bain SD, Sadovsky Y, Gazit D. Estrogen modulates estrogen receptor α and β expression, osteogenic activity and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice. *J Cell Biochem* 2003; Suppl 36:144-155.
91. Manson JE. Postmenopausal hormone therapy and atherosclerotic disease. *Am Heart J* 1994; 128(6 Pt2):1337-1343.
92. Rossouw JE. Hormone replacement therapy and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10:429-434.
93. Barrett-Connor E, Grady D. Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations. *Annu Rev Public Health* 1998; 19:55-72.
94. Writing group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. Principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288:321-333.
95. Grohé C, Kahlert S, Löbberk K, Stimpel M, Karas RH, Vetter H, Neyses L. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett* 1997; 416:107-112.
96. Grady D, Rubin SM, Petitti DB, Fox CS, Black D. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Annu Intern Med* 1992; 117:1016-1037.
97. Furberg CD, Vittinghoff E, Davies MP, Herrington D, Simon JA, Wenger NK, Hulley S. Subgroup interactions in the heart and estrogen/progestin replacement study. Lessons learned. *Circulation* 2002; 105:917-922.
98. Michels KB, Manson JE. Postmenopausal hormone therapy. A reversal of fortune. *Circulation* 2003; 107:1830-1833.
99. Manson JE, Martin KA. Clinical Practice. Postmenopausal hormone-replacement therapy. *New Engl J Med* 2001; 345:34-40.
100. Fletcher SW, Colditz GA. Failure of estrogen plus progestin therapy for prevention. *JAMA* 2002; 288:366-368.
101. Nelson HD. Assessing benefits and harms of hormone replacement therapy. *JAMA* 2002; 288:882-884.

102. Sullivan JM, El-zeky F, Vander Zwaag R, Ramanathan KB. Effect on survival of estrogen replacement therapy after coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol* 1997; 79:847-850.
103. Solomon CG, Dluhy RG. Rethinking postmenopausal hormone therapy. *New Engl J Med* 2003; 348(7):579-580.
104. Simon JA, Hsia J, Cauley JA, Richards C, Harris F, Fong J, Barrett-Connor E, Hulley SB. Postmenopausal hormone therapy and risk of stroke. The heart and estrogen-progestin replacement study (HERS). *Circulation* 2001; 103:638-642.
105. Tolbert T, Oparil S. Hormone replacement therapy and stroke. *Circulation* 2001; 103:620-622.
106. O'Keefe JH, Kim SC, Hall RR, Cochran VC, Lawhorn SL, McCallister BD. Estrogen replacement therapy after coronary angioplasty in women. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:1-5.
107. Mikkola TS, Clarkson TB. Estrogen replacement therapy, atherosclerosis, and vascular function. *Cardiovasc Res* 2001; 53:605-619.
108. Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocrin Rev* 1990; 11:201-220.
109. Wyckoff MH, Chambliss KL, Mineo C, Yuhanna IS, Mendelsohn ME, Mumby SM, Shaul PW. Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through Gai. *J Biol Chem* 2001; 276(29):27071-27076.
110. Takeyama J, Suzuki T, Inoue S, Kaneko C, Nagura H, Harada N, Sasano H. Expression and cellular localization of estrogen receptors α and β in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(5):2258-2262.
111. Scott REM, Wu-Peng XS, Pfaff DW. Regulation and expression of progesterone receptor mRNA isoforms A and B in the male and female rat hypothalamus and pituitary following oestrogen treatment. *J Neuroendocrinol* 2002; 14:175-183.
112. Jenster G, Van der Korput HAGM, Vroonhoven C, Van der Kwast TH, Trapman J, Brinkmann AO. Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Mol Endocrinol* 1991; 5:1396-1404.
113. Jenster G, Trapman J, Brinkmann AO. Nuclear import of the human androgen receptor. *Biochem J* 1993; 293:761-768.
114. Sakaguchi H, Fujimoto J, Aoki I, Tamaya T. Expression of estrogen receptor α and β in myometrium of premenopausal and postmenopausal women. *Steroids* 2003; 68:11-19.

115. Sjogren J, Li M, Bjorntorp P. Androgen hormone binding to adipose tissue in rats. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1244:117-120.
116. Ing NH, Ott TL. Estradiol up-regulates estrogen receptor- α messenger ribonucleic acid in sheep endometrium by increasing its stability. *Biol Reprod* 1999; 60:134-139.
117. Ing NH, Tornesi MB. Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. *Biol Reprod* 1997; 56:1205-1215.
118. Jankowski M, Rachelska G, Donghao W, McCann SM, Gutkowska J. Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(20):11765-11770.
119. Conneely OM, Lydon J.P. Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids* 2000; 65:571-577.
120. Green S, Walter P, Kumar V. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erbA. *Nature* 1986; 320:134-139.
121. Kuiper GGJM, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93:5925-5930.
122. Bain DL, Franden MA, McManaman JL, Takimoto GS, Horwitz KB. The N-terminal region of the human progesterone A-receptor. *J Biol Chem* 2000; 275(10):7313-7320.
123. Rehberger P, Rexin M, Gehring U. Heterotetrameric structure of the human progesterone receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 89:8001-8005.
124. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lydon J.P., De Mayo FJ. Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 179:97-103.
125. Collins P, Webb C. Estrogen hits the surface. *Nature Medicine* 1999; 5(10):1130-1131.
126. Gustafsson JA. Estrogen receptor α - a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* 1999; 163:379-383.
127. Karas RH, Schulten H, Pare G, Aronovitz M, Ohlsson C, Gustafsson JA, Mendelsohn ME. Effects of estrogen on the vascular injury response in estrogen receptor α, β (double) knockout mice. *Circ Res* 2001; 89:534-539.

128. Graham J.D., Yeates C., Balleine R.L., Harvey S.S., Milliken J.S., Bilous A.M., Clarke C.L. Progesterone receptor A and B protein expression in human breast cancer. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1996; 56:93-98.
129. Cotroneo MS, Lamartiniere CA. Pharmacologic, but not dietary, genistein supports endometriosis in a rat model. *Toxicol Sci* 2001; 61:68-75.
130. McGowan EM, Clarke C.L. Effect of overexpression of progesterone receptor A on endogenous progestin-sensitive endpoints in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 1999; 13:1657-1671.
131. 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; 94:1402-1407.
132. Gustafsson JA. An Update on Estrogen Receptors. *Semin Perinatol* 2000; 24(1):66-69.
133. Roe BE, Chiu KM, Arnaud CD. Selective Estrogen Receptor Modulators and Postmenopausal Health. *Adv Intern Med* 2000; 45:259-278.
134. Paech K, Webb P, Kuiper GGJM. Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science* 1997; 277:1508-1510.
135. Kuiper GGJM, Gustafsson JA. The novel estrogen receptor-beta subtype: Potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett* 1997; 410:87-90.
136. Iafrazi MD, Karas RH, Aronovitz M, Kim S, Sullivan TRJ, Lubahn D, O'Donnell TFJ, Korach KS, Mendelsohn ME. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor α -deficient mice. *Nature Medicine* 1997; 3:545-548.
137. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* 1997; 138(11):4613-4621.
138. Pelletier G, Labrie C, Labrie F. Localization of oestrogen receptor α , oestrogen receptor β and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrinol* 2000; 165:359-370.
139. Taylor AH, Al-Azzawi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol* 2000; 24:145-155.
140. Grohé C, Kahlert S, Löbbert K, Meyer R, Linz KW, Karas RH, Vetter H. Modulation of hypertensive heart disease by estrogen. *Steroids* 1996; 61:201-204.

141. Scheuer J, Malhotra A, Schaible TF, Capasso J. Effects of gonadectomy and hormonal replacement on rats hearts. *Circ Res* 1987; 61:12-19.
142. Sheridan P, McGill HC. The nuclear uptake and retention of a synthetic progestin in the cardiovascular system of the baboon. *Endocrinology* 1984; 114(6):2015-2019.
143. Rollerova E, Urbancikova M. Intracellular estrogen receptors, their characterization and function. *Endocr Regul* 2000; 34:203-218.
144. Enmark E, Gustafsson JA. Oestrogen receptors-an overview. *J Intern Med* 1999; 246:133-138.
145. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240:889-894.
146. Pennie WD, Aldridge TC, Brooks AN. Differential activation by xenoestrogens of ER α and ER β when linked to different response elements. *J Endocrinol* 1998; 158:R11-R14.
147. Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 1999; 13:307-319.
148. Delaunay F, Petterson K, Tujague M, Gustafsson JA. Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors α and β . *Mol Pharmacol* 2000; 58:584-590.
149. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Petterson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001; 81(4):1535-1565.
150. Hodges YK, Tung L, Yan XD, Graham J.D., Horwitz KB, Horwitz LD. Estrogen receptors α and β . Prevalence of estrogen receptor α mRNA in human vascular smooth muscle and transcriptional effects. *Circulation* 2000; 101:1792-1798.
151. Figtree GA, McDonald D, Watkins H, Channon KM. Truncated estrogen receptor α 46-kDa isoform in human endothelial cells. Relationship to acute activation of nitric oxide synthase. *Circulation* 2003; 107:120-126.
152. Monje P., Zanello S, Holick M, Boland R. Differential cellular localization of estrogen receptor β in uterine and mammary cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 181:117-129.
153. Valverde MA, Parker MG. Classical and novel steroid actions: a unified but complex view. *Trends Biochem Sci* 2002; 27(4):172-173.

154. Dan P, Cheung JCY, Scriven DRL, Moore EDW. Epitope-dependent localization of estrogen receptor α , but not $-\beta$, in en face arterial endothelium. *Am J Physiol* 2003; 284:H1295-H1306.
155. Levin ER. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids* 2002; 67:471-475.
156. Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 2001; 276(40):36869-36872.
157. Kousteni S, Chen JR, Bellido T, Han L, Ali AA, O'Brien CA, Plotkin L, Fu Q, Mancino AT, Vertino AM, Powers CC, Stewart SA, Ebert R, Parfitt AM, Weinstein RS, Wen Y, Jilka RL, Manolagas SC. Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. *Science* 2002; 298:843-846.
158. Kelly MJ, Levin ER. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12(4):152-156.
159. Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem* 2003; 278(4):2701-2712.
160. Miller G. Divorcing estrogen's bright and dark sides. *Science* 2002; 298:723-724.
161. Razandi M, Alton G, Pedram A, Ghonshani S, Webb P, Levin ER. Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor α at the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 2003; 23(5):1633-1646.
162. Nadal A., Ropero AB, Fuentes E, Soria B. The plasma membrane estrogen receptor: nuclear or unclear? *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22(12):597-599.
163. Peters CA, Barrack ER. A new method for labeling and autoradiographic localization of androgen receptors. *J Histochem Cytochem* 1987; 35:755-762.
164. Stumpf WE. Steroid hormones and the cardiovascular system: direct actions of estradiol, progesterone, testosterone, gluco- and mineralcorticoids, and soltriol (vitamin D) on central nervous regulatory and peripheral tissues. *Experientia* 1990; 46:13-25.
165. Tanaka M, Nishi M, Morimoto M, Sugimoto T, Kawata M. Yellow fluorescent protein-tagged and cyan fluorescent protein-tagged imaging analysis of glucocorticoid receptor and importins in single living cells. *Endocrinology* 2003; 144(9):4070-4079.
166. Pemberton LF, Paschal BM. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* 2005; 6:187-198.
167. Freedman ND, Yamamoto KR. Importin γ and importin α / importin β are nuclear import receptors for the glucocorticoid receptor. *Mol Biol Cell* 2004; 15:2276-2286.

168. Kumar S, Chaturvedi NK, Nishi M, Kawata M, Tyagi RK. Shuttling components of nuclear import machinery involved in nuclear translocation of steroid receptors exit nucleus via exportin-1/CRM-1 independent pathway. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1691:73-77.
169. Matsuura Y, Stewart M. Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. *Nature* 2004; 432:872-877.
170. Severs NJ, Slade AM, Powell T, Twist VW, Jones GE. Morphologic analysis of the isolated calcium tolerant cardiac myocyte. *Cell Tissue Res* 1985; 240:159-168.
171. Schlegel A, Wang C, Katzenellenbogen BS, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1 potentiates estrogen receptor α (ER α) signaling. *J Biol Chem* 1999; 274(47):33551-33556.
172. Zysow BR, Kauser K, Lawn RM, Rubanyi GM. Effects of estrus cycle, ovariectomy, and treatment with estrogen, tamoxifen, and progesterone on apolipoprotein (a) gene expression in transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1741-1745.
173. Picard F, Deshaies Y, Lalonde J, Samson P, Labrie C, Bélanger A, Labrie F, Richard D. Effects of the estrogen antagonist EM-652.HCl on energy balance and lipid metabolism in ovariectomized rats. *Int J Obes* 2000; 24:830-840.
174. Gottardis MM, Robinson SP, Satyaswaroop PG, Jordan VC. Contrasting actions of tamoxifen on endometrial and breast tumor growth in the athymic mouse. *Cancer Res* 1988; 48:812-815.
175. Cohen P, Rosemeyer MA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Methods Enzymol* 1975; 41:208-214.
176. Matsubara S. Simultaneous demonstration of acid phosphatase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in mouse hepatocytes. A novel electron-microscopic dual staining enzyme-cytochemistry. *Eur J Histochem* 2002; 46(3):237-242.
177. Duffieux F, Roy JV, Michaels PAM, Opperdoes FR. Molecular characterization of the first two enzymes of the pentose-phosphate pathway of trypanosoma brucei. *J Biol Chem* 2000; 275(36):27559-27565.
178. Guihard G, Proteau S, Rousseau E. Does the nuclear envelope contain two types of ligand-gated Ca²⁺ release channels? *FEBS Lett* 1997; 414:89-94.
179. Guihard G, Proteau S, Payet MD, Escande D, Rousseau E. Patch-clamp study of liver nuclear ionic channels reconstituted into giant proteoliposomes. *FEBS Lett* 2000; 476:234-239.
180. Nakanishi T, Jarmakani JM. Developmental changes in myocardial mechanical function and subcellular organelles. *Am J Physiol* 1984; 246(15):H615-H625.

181. Cantley LC, Cantley LG, Josephson L. A characterization of vanadate interactions with (Na,K)-ATPase. *J Biol Chem* 1978; 253(20):7361-7368.
182. Cornelius F. Functional reconstitution of the sodium pump. Kinetics of exchange reactions performed by reconstituted Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1071:19-66.
183. Seiler S, Fleischer S. Isolation of plasma membrane vesicles from rabbit skeletal muscle and their use in ion transport studies. *J Biol Chem* 1982; 257(22):13862-13871.
184. Rao CV, Mitra S. Gonadotropin and prostaglandins binding sites in nuclei of bovine corpora lutea. *Biochim Biophys Acta* 1979; 584:454-466.
185. Rao CV, Ireland JJ, Roche JF. Decrease of various luteal enzyme activities during prostaglandin F-2 α -induced luteal regression in bovine. *Mol Cell Endocrinol* 1984; 34:99-105.
186. Giacobino J-P, Chmelar M. Comparison of plasma membranes and endoplasmic reticulum fractions obtained from whole white adipose tissue and isolated adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 1975; 406:68-82.
187. Tada M, Yamamoto T, Tonomura Y. Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum. *Am Physiol Soc* 1978; 58(1):1-79.
188. Ji Y, Loukianov E, Periasamy M. Analysis of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport and Ca²⁺-ATPase enzymatic properties using mouse cardiac tissue homogenates. *Anal Biochem* 1999; 269:236-244.
189. Tiffert T, Lew VL. Kinetics of inhibition of the plasma membrane calcium pump by vanadate in intact human red cells. *Cell Calcium* 2001; 30(5):337-342.
190. Carafoli E. The Ca²⁺ pump of the plasma membrane. *J Biol Chem* 1992; 267(4):2115-2118.
191. Sacchetto R, Margreth A, Pelosi M, Carafoli E. Colocalization of the dihydropyridine receptor, the plasma-membrane calcium ATPase isoform 1 and the sodium/calcium exchanger to the junctional-membrane domain of transverse tubules of rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 1996; 237:483-488.
192. Langer GA, Frank JS, Philipson KD. Ultrastructure and calcium exchange of the sarcolemma, sarcoplasmic reticulum and mitochondria of the myocardium. *Pharmac Ther* 1982; 16:331-376.
193. Lucas-Héron B, Loirat MJ, Ollivier B. Comparative biochemical study of sarcolemma and sarcoplasmic reticulum fractions isolated from mouse skeletal and cardiac muscles. *Comp Biochem Physiol* 1987; 88B(2):421-427.

194. Allen BG, Katz S. Calreticulin and calsequestrin are differentially distributed in canine heart. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32:2379-2384.
195. Delphino A, Piselli P, Vismara D, Vendetti S, Colizzi D. Cell surface localization of the 78 kDa glucose regulated protein (GRP78) induced by thapsigargin. *Mol Memb Biol* 1998; 15:21-26.
196. Bole DG, Dowin R, Doriaux M, Jamieson JD. Immunocytochemical localization of BIP to the rough endoplasmic reticulum: Evidence for protein sorting by selective retention. *J Histochem Cytochem* 1989; 37(12):1817-1823.
197. Sabatini DD, Tashiro Y, Palade GE. On the attachment of ribosomes to microsomal membranes. *J Mol Biol* 1966; 19:503-524.
198. Meier P, Spycher MA, Meyer UA. Isolation and characterization of rough endoplasmic reticulum associated with mitochondria from normal rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1981; 646:283-297.
199. Amar-Costesec A, Wibo M, Thinès-sempoux D, Beaufay H, Berthet J. Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. Modifications of microsomal components induced by digitonin, EDTA, and pyrophosphate. *J Cell Biol* 1974; 62:717-745.
200. Shore G, Tata JR. Two fractions of rough endoplasmic reticulum from rat liver. *J Cell Biol* 2003; 72:714-725.
201. Cascarano J, Montisano DF, Pickett CB, James TW. Rough endoplasmic reticulum-mitochondrial complexes from rat liver. *Exp Cell Res* 1982; 139:39-50.
202. Ewald A, Kossner U, Scheer U, Dabauvalle M. A biochemical and immunological comparison of nuclear and cytoplasmic pore complexes. *J Cell Sci* 1996; 109:1813-1824.
203. Bodoor K, Shaikh S, Salina D, Raharjo WH, Bastos R, Lohka M, Burke B. Sequential recruitment of NPC proteins to the nuclear periphery at the end of mitosis. *J Cell Sci* 1999; 112:2253-2264.
204. Chambliss KL, Yuhanna IS, Mineo C, Liu P, German Z, Sherman TS, Mendelsohn ME, Anderson RG, Shaul PW. Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into functional signaling module in caveolae. *Circ Res* 2000; 87:E44-E52.
205. Voss MR, Stallone JN, Li M, Cornelussen RNM, Knuefermann P, Knowlton AA. Gender differences in the expression of heat shock proteins: the effect of estrogen. *Am J Physiol* 2003; 285:H687-H692.
206. Paroo Z, Haist JV, Karmazyn M, Noble EG. Exercise improves postischemic cardiac function in males but not females. *Circ Res* 2002; 90:911-917.

207. Shinohara T, Takahashi N, Ooie T, Ichinose M, Hara M, Yonemochi H, Saikawa T, Yoshimatsu H. Estrogen inhibits hyperthermia-induced expression of heat-shock protein 72 and cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in femal rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37:1053-1061.
208. Chevalier D, Thorin E, Allen BG. Simultaneous measurement of ERK, p38, and JNK MAP kinase cascades in vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000; 44:429-439.
209. Boivin B, Allen BG. Regulation of membrane-bound PKC in adult cardiac ventricular myocytes. *Cell Signal* 2003; 15:217-224.
210. Ruzycky AL, Kulick A. Estrogen increases the expression of uterine protein kinase C isozymes in a tissue specific manner. *Eur J Pharmacol* 1996; 313:257-263.
211. Migliaccio S, Washburn TF, Fillo S, Rivera H, Teti A, Korach KS, Wetsel WC. Modulation of estrogen receptor levels in mouse uterus by protein kinase C isozymes. *Endocrinology* 1998; 139:4598-4606.
212. Bjorling DE, Beckman M, Clayton MK, Wang ZY. Modulation of herve growth factor in peripheral organs by estrogen and progesterone. *Neuroscience* 2002; 110(1):155-167.
213. Kousteni S, Han L, Chen JR, Almeida M, Plotkin LI, Bellido T, Manolagas SC. Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *J Clin Invest* 2003; 111:1651-1664.
214. Vasudevan N, Kow LM, Pfaff DW. Early membrane estrogenic effects required for full expression of slower genomic actions in a nerve cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(21):12267-12271.
215. Farnell YZ, Ing NH. Estradiol and a selective estrogen receptor modulator affect steroid hormone receptor messenger RNA levels and turnover in explant cultures of sheep endometrium. *In Vitro Cell Dev Biol Animal* 2002; 38:595-600.

ANNEXE

Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens

Judith Brouillette, Katy Rivard, Eric Lizotte, Céline Fiset*

Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Rue Bélanger Est, Montréal, Québec, Canada H1T 1C8
Faculty of Pharmacy, University of Montreal Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Received 4 June 2004; received in revised form 14 September 2004; accepted 16 September 2004

Available online 21 October 2004

Time for primary review 14 days

Abstract

Objective: Gender differences in mouse cardiac repolarization have been reported to be due to the stimulatory action of androgens on the ultrarapid delayed rectifier K^+ current (I_{Kur}) and its underlying Kv1.5 channel. To confirm the regulation of ventricular repolarization by androgens, the present study compared two strains of mice (CD-1 and C57BL/6) that present different androgen levels.

Methods and results: Measurement of testosterone levels in different strains of mice (CD-1, C57BL/6, C3H and FVB) revealed that male C57BL/6 mice had very low levels of testosterone, whereas males of the other strains displayed normal testosterone levels. Furthermore, whole-cell voltage clamp recordings in isolated ventricular myocytes showed that the current density of I_{Kur} in male C57BL/6 mice was similar to that in female mice but smaller with respect to male CD-1 mice. Androgen replacement in male C57BL/6 mice as well as in castrated male CD-1 mice shortened ventricular repolarization, increased I_{Kur} current density, and increased expression of Kv1.5 channels.

Conclusion: Strain and gender differences observed in mouse cardiac repolarization can be explained by different androgen levels. As a consequence, androgens are major regulatory factors in cardiac repolarization and special attention should be paid to the hormonal status of the animal when studying hormonal regulation of cardiac repolarization.

© 2004 European Society of Cardiology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Mouse heart; Ventricular repolarization; Mouse strain; K^+ current; Kv1.5

1. Introduction

In earlier studies, we demonstrated that CD-1 mice exhibited sex-specific differences in cardiac repolarization and that male mice subjected to castration presented a cardiac phenotype resembling that of female mice [6,25]. Indeed, both females and castrated male mice displayed longer action potential duration (APD) and QTc intervals compared to males. This prolonged repolarization was associated with a specific decrease in the density of the ultrarapid delayed rectifier K^+ current (I_{Kur}) and of its

underlying K^+ channel isoform, Kv1.5. These results strongly suggested that gender difference in repolarization might be due to the action of androgens.

Previous studies have reported different blood testosterone levels in different strains of mice [1,23]. In these reports, the CD-1 mouse, the strain used in our studies and one of the most commonly used strain, exhibits vigorous reproductive activity and aggressive behaviours associated with physiological levels of testosterone. In contrast, the C57BL strains were considered as being chronically androgen deficient as indicated by subnormal levels of serum testosterone [1]. Since the C57BL strain could be viewed as a naturally occurring mouse model with low androgen levels, we took advantage of this particularity to further confirm the role of male sex hormones in the regulation of ventricular repolarization.

* Corresponding author. Tel.: +1 514 376 3330 3025; fax: +1 514 376 1355.

In the present study, we postulated that since male C57BL/6 mice have low level of androgen, they should exhibit similar ventricular repolarization than their female counterparts and delayed repolarization compared to the male CD-1 mice. In addition, we also tested the hypothesis that androgen replacement in male C57BL/6 mice as well as in orchietomized male CD-1 mice would shorten ventricular repolarization, as a result of a higher expression of I_{Kur} and Kv1.5. Findings obtained in this study confirm these hypotheses and provide strong evidence that male sex hormones regulate cardiac repolarization.

2. Methods

2.1. Animals

Animal handling followed the Canadian Council Animal Care guidelines and conformed with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health. Adult CD-1 ($n=59$), C57BL/6 ($n=35$), C3H ($n=18$), FVB ($n=18$) mice of both sexes were used.

2.2. Dihydrotestosterone (DHT) replacement

Mice were treated with subcutaneous DHT pellet (7.5 mg/pellet, 90-day release) (Innovative Research of America, FL, USA). This DHT dosage regimen has been selected to evoke physiological concentrations (see Results).

2.3. Measurements of androgen levels

Testosterone and DHT levels were assessed by radioimmunoassay (Diagnostic Systems Laboratories, TX, USA) and ELISA (American Laboratory Products, NH, USA) following the manufacturer's instructions.

2.4. Myocytes isolation

Animals were heparinized, anaesthetized by inhalation of isoflurane and then sacrificed by cervical dislocation. Single myocytes were then isolated from the right ventricular free wall using the protocol we described previously [6,25].

2.5. Electrophysiological recordings

The whole-cell voltage and current recording methods, data acquisition, voltage-clamp protocols and analysis methods have been described previously [5]. Pipettes had resistances in the range 1.5–4 M Ω when 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). Voltage-clamp currents were low-pass

filtered at 1 kHz with a four-pole Bessel analog filter, digitized at 4–10 kHz. All experiments were carried out at room temperature (20–22 °C). To measure I_{Kur} we applied 100 μ M 4-aminopyridine (4-AP, which blocks I_{Kur}) [5,9,18,25] in combination with an inactivating prepulse (which blocks I_{to}) and recorded the 4-AP-resistant K⁺ current, or I_{ss} . We then measured I_{Kur} by subtracting currents recorded in the absence or presence of 4-AP ($I_{Kslow} - I_{ss}$). The description and validation of these pharmacological and biophysical methods has been recently published [5].

2.6. Western blot analysis

Protocols used for protein isolation and Western blots analysis were identical to those previously reported [6]. Proteins were prepared from mouse ventricles (3 pooled hearts/sample) homogenized in Tris-EDTA (TE) buffer (pH: 7.4) containing protease inhibitors (Leupeptin, Aprotinin, Benzamide, Phenylmethyl sulfonyl fluoride [PMSF], and Na₃VO₄). The homogenate was centrifuged at 10,000 \times g. The supernatant was ultracentrifuged three times at 200,000 \times g for 20 min. The pellet was resuspended in TE buffer containing the protease inhibitors and 0.6 M KCl to dissolve contractile proteins. The pellet corresponds to the sarcolemmal-enriched proteins. Proteins were separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were then blotted with anti-Kv1.5 (1:500; Upstate, Lake Placid, NY, USA). 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).

2.7. ECG recordings

Mice were anaesthetized with pentobarbital (65 mg/kg, ip) and placed on heating pads to maintain their body temperature at 37 °C. Platinum electrodes were positioned and lead I surface ECG were acquired using the Biopac System MP100 at a rate of 2 kHz. The signal was amplified, filtered at 100 Hz (low pass) and 60 Hz (notch filter). Recordings were analyzed using AcqKnowledge 3.7 program by two observed in a blinded fashion. QT intervals were corrected for the heart rate (QTc) using the correction formula for mice $QTc = QT / (RR/100)^{1/2}$ [19] where RR corresponds to the time between two consecutive R waves.

2.8. Statistical analysis

Values are presented as mean \pm S.E.M. and n refers to the number of different cells. An unpaired Student's t -test or one-way analysis of variance (ANOVA) with a Tukey post test were used when appropriate. For the comparison of androgen levels, the nonparametric tests Kruskal–Wallis with a Dunns post test, or Mann–Whitney were used.

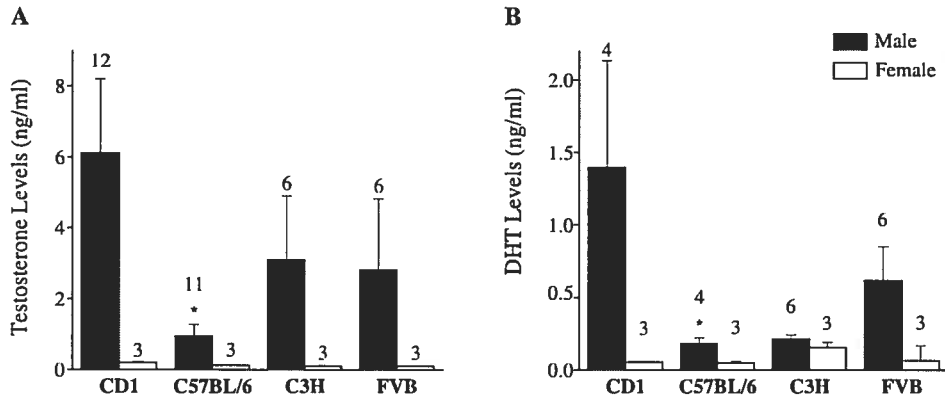


Fig. 1. Comparison of androgen levels between four different mouse strains. (A) Mean serum testosterone levels measured in 2- to 3-month-old CD-1, C57BL/6, C3H and FVB mice of both sexes. (B) Mean serum DHT levels measured in 2- to 3-month-old CD-1, C57BL/6, C3H and FVB mice of both sexes. Numbers on the top of each bar represents number of mice studied (* $p=0.03$ vs. male CD-1 mice).

P-values smaller than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

Fig. 1 shows testosterone and DHT levels in male and female CD-1, C57BL/6, C3H and FVB mice. Females of all strains had similar low levels of both androgens. The male CD-1, C3H and FVB mice had normal levels of testosterone within the physiological range observed in men, which varied from 3 to 11 ng/ml [4]. In contrast, the male C57BL/6 mice had low plasma testosterone concentrations. Moreover, the male C57BL/6 and C3H mice had low levels of DHT while the male of the CD-1 and FVB strains had normal DHT levels.

We used two strains of mice (CD-1 and C57BL/6) that present different androgen levels to further assess the association between androgen level and cardiac repolariza-

tion. We compared electrophysiological properties of C57BL/6 and CD-1 mice of both sexes. More precisely, we focused on I_{Kur} based on the fact that the relatively prolonged ventricular repolarization of female and orchietomized male CD-1 compared to normal male CD-1 mice is associated with a specific decrease in this K^+ current [6,25]. Fig. 2 presents typical examples as well as mean data for the current density of I_{Kur} recorded in ventricular myocytes isolated from male and female CD-1 and C57BL/6 mice. I_{Kur} was measured as the 4-AP-sensitive (100 μ M) current elicited by 500 ms voltage step ranging from -110 to $+50$ mV from a holding potential of -80 mV (for more details, see Ref. [5]). The current density of I_{Kur} at $+30$ mV was similar for male and female C57BL/6 mice (25.6 ± 2.6 and 24.5 ± 3.7 pA/pF, respectively). However, in male CD-1 mice, I_{Kur} density of 37.5 ± 3.3 pA/pF was significantly higher than that in male C57BL/6 mice (25.6 ± 2.6 pA/pF, $p < 0.05$). Consistent with previous results [25], I_{Kur} density in male CD-1 mice was significantly higher than that

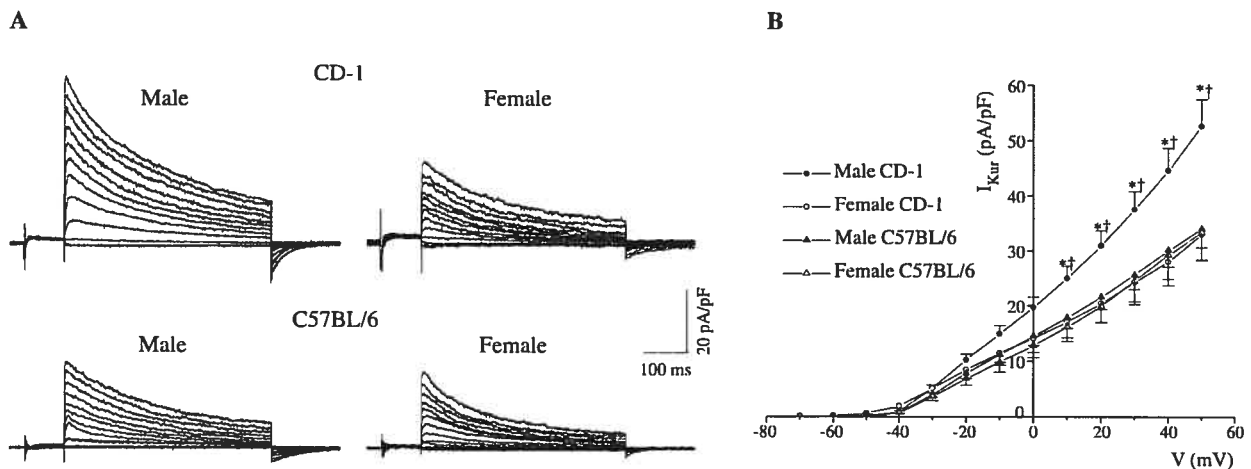


Fig. 2. Comparison of I_{Kur} density between CD-1 and C57BL/6 mice of both sexes. (A) Superimposed current records corresponding to I_{Kur} , or the 4-AP-sensitive K^+ current, in male and female CD-1 and C57BL/6 mouse ventricular myocytes. (B) Mean $I-V$ relationships for I_{Kur} obtained in male CD-1 ($n=18$), female CD-1 ($n=14$), male C57BL/6 ($n=49$) and female C57BL/6 ($n=21$) mice (* $p < 0.05$ vs. male C57BL/6; † $p < 0.05$ vs. female CD-1).

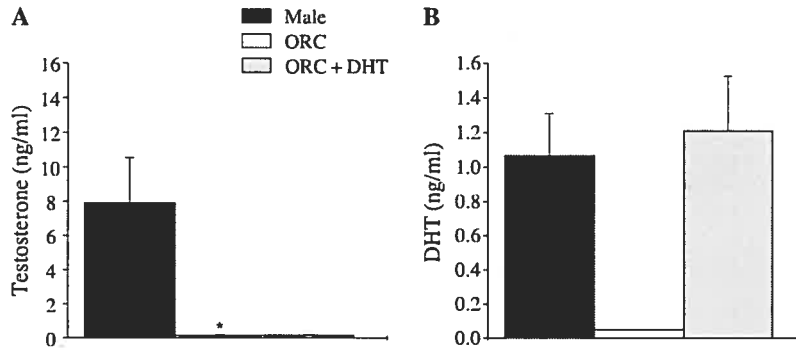


Fig. 3. Comparison of male sex hormones between three groups of male CD-1 mice: intact, castrated and DHT-treated castrated males. (A) Mean serum testosterone levels in male CD-1 ($n=9$), ORC ($n=3$) and ORC+DHT ($n=3$) mice (* $p<0.05$ vs. intact males). (B) Mean serum DHT levels in male CD-1 ($n=10$), ORC ($n=5$) and ORC+DHT ($n=5$) mice.

obtained in female CD-1 mice (at +30 mV, 24.2 ± 3.9 pA/pF, $p<0.05$). In addition, we also compared the activation and inactivation kinetics of I_{Kur} between male C57BL/6 and CD-1 mice and found no strain difference for these parameters (data not shown).

Androgen regulation of cardiac repolarization was examined using chronic DHT treatment. DHT was favoured over testosterone as the androgenic compound because it

cannot be converted into estrogens, as opposed to testosterone, hence avoiding a potential confounding factor. Castrated male mice were treated with a subcutaneous implant of DHT. Fig. 3A and B presents DHT and testosterone levels in three groups of male CD-1: intact, ORC, and DHT-treated ORC mice. The bar graphs show that castration leads to a complete loss of both male sex hormones levels and that DHT treatment restores physiological concentrations of

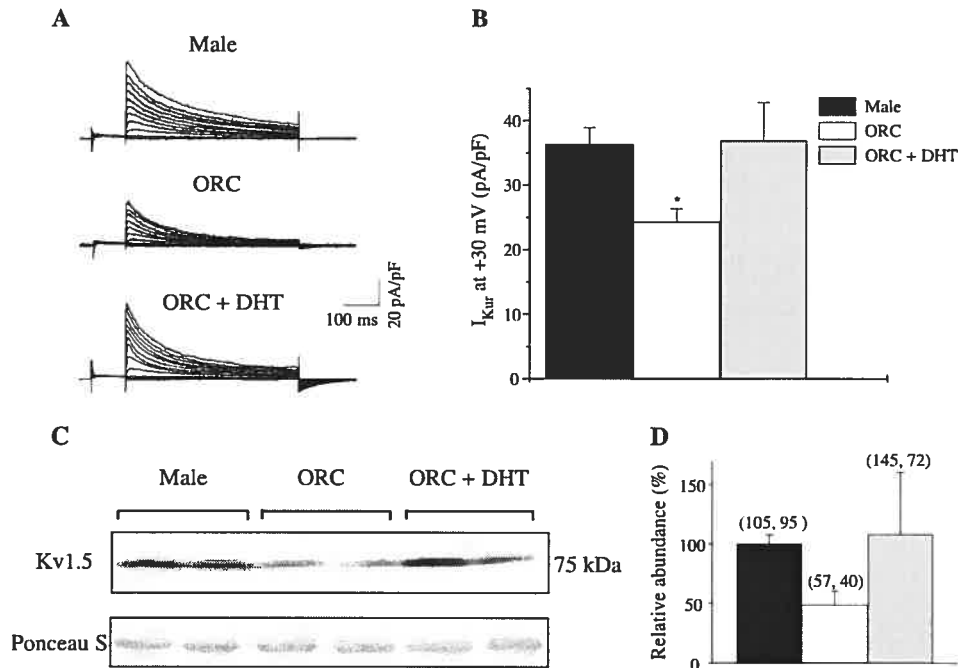


Fig. 4. Effect of castration and DHT treatment on the density of ventricular I_{Kur} and Kv1.5 in male CD-1 mice. (A) Typical examples of I_{Kur} in 4- to 5-month-old intact, ORC and ORC+DHT male CD-1 mouse ventricular myocytes. (B) Mean peak current density measured at +30 mV for I_{Kur} obtained in male CD-1 ($n=38$), ORC ($n=58$) and ORC+DHT ($n=24$) myocytes (* $p<0.05$ vs. intact and DHT-treated males). (C) Sarcolemmal-enriched proteins from ventricles of intact males (lanes 1–2), ORC (lanes 3–4) and ORC+DHT (lanes 5–6) CD-1 mice subjected to immunoblotting (100 μ g protein/lane). For these experiments, two samples per group were studied but for each of these samples, proteins were extracted from three different mice. Thus results presented in this figure represent a total of six control mice, six ORC mice and six DHT-treated ORC mice. Membranes were probed with anti-Kv1.5 (75 kDa). The lower panel represents the Ponceau S staining of the membrane used to analyze Kv1.5. (D) Bar graphs showing mean values (\pm standard deviation) of the relative abundance of Kv1.5 protein expression determined by densitometry. Relative abundance was calculated with value for intact male CD-1 mice as a reference of 100%. The numbers in parenthesis represent the individual values.

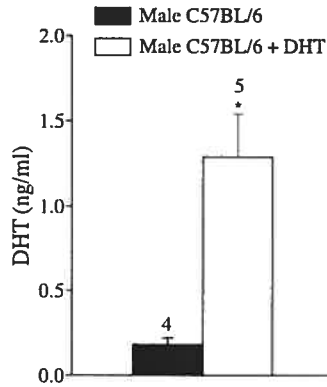


Fig. 5. DHT levels in male C57BL/6 mice treated or not with DHT. Mean serum DHT levels in 2- to 3-month-old male C57BL/6 ($n=4$) and in male C57BL/6 mice treated with a DHT pellet ($n=5$), $*p=0.008$.

DHT but not those of testosterone. These results are consistent with the fact that DHT cannot be converted into testosterone. Fig. 4A presents I_{Kur} (or the 4-AP-sensitive current) recorded in ventricular myocytes isolated from intact, ORC, and DHT-treated ORC male mice. As illustrated in Fig. 4B, the density of I_{Kur} was smaller in ORC mice compared to both intact male and DHT-treated

animals. Fig. 4C shows the results of a Western Blot analysis performed on sarcolemmal-enriched proteins isolated from ventricles of each group. Kv1.5, the K^+ channel underlying I_{Kur} , was present in all groups but displayed higher expression in both intact and DHT-treated male mice. The bands depicted on the lower panel correspond to proteins of the same membrane used to study Kv1.5. The proteins, coloured with Ponceau S, were equally loaded ruling out the possibility that unequal loading could account for the observed difference in Kv1.5 protein expression. We measured Kv1.5 density for each of the three groups studied by densitometry. These results are presented in Fig. 4D. Altogether these results strongly suggest that treatment with DHT in ORC male CD-1 mice shortens repolarization by up-regulating Kv1.5 and increasing I_{Kur} density.

We then examined the possibility that DHT replacement would also accelerate ventricular repolarization in male C57BL/6 mice by a similar effect on I_{Kur} and Kv1.5. Because male C57BL/6 mice have low androgen levels, the presence of the androgen receptor in their cardiac tissues was not definitive. Thus, using Western Blot analysis, we first verified the presence of these receptors in ventricles of male C57BL/6 mice (data not shown). Given that these mice had androgen receptors in their ventricle and should

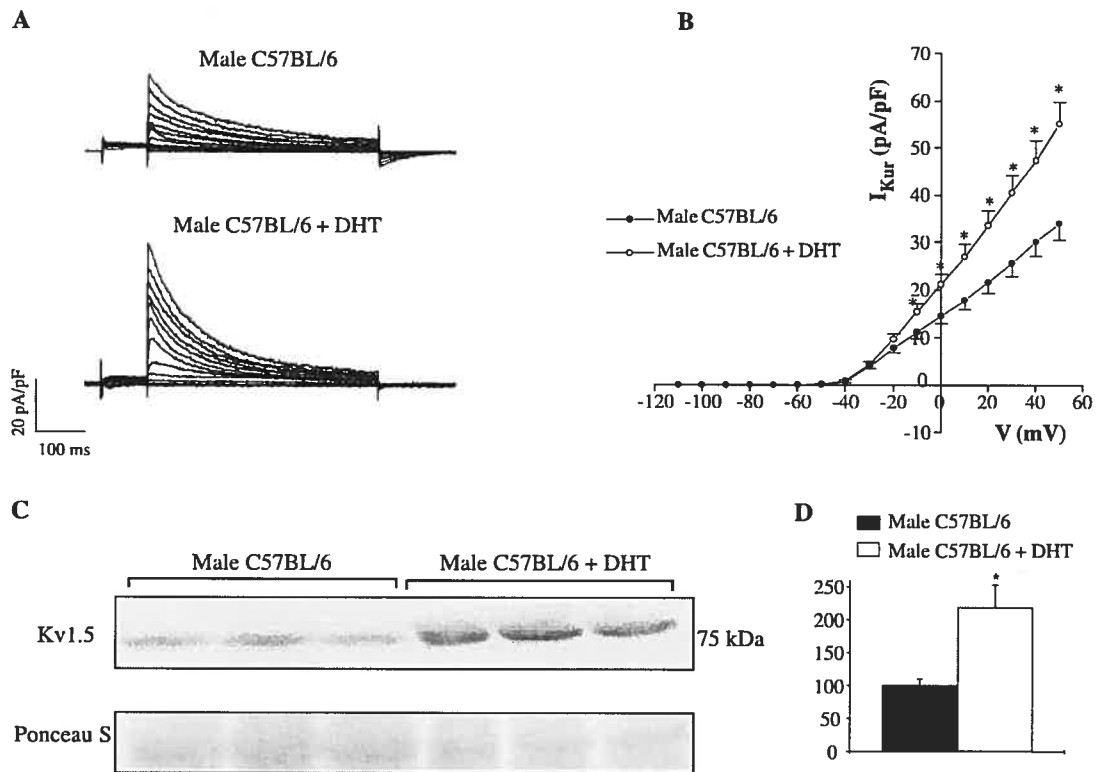


Fig. 6. Effect of DHT treatment on the density of ventricular I_{Kur} and Kv1.5 in male C57BL/6 mice. (A) Typical examples of I_{Kur} recorded from ventricular myocytes isolated from male C57BL/6 and male C57BL/6+DHT mice. (B) Mean $I-V$ relationships for I_{Kur} obtained in male C57BL/6 ($n=32$) and male C57BL/6+DHT ($n=49$) mice ($*p<0.05$). (C) Sarcolemmal-enriched proteins from ventricles of male C57BL/6 (lanes 1–3) and C57BL/6+DHT (lanes 4–6) mice were subjected to immunoblotting (3 pooled ventricles/lane; 100 μ g protein/lane). Membranes were probed with anti-Kv1.5 (75 kDa). The lower panel represents Ponceau S staining of the same membrane used to study Kv1.5. (D) Bar graphs comparing relative abundance of Kv1.5 protein expression determined by densitometry. Relative abundance was calculated with value for intact male C57BL/6 mice as a reference of 100% ($*p=0.01$).

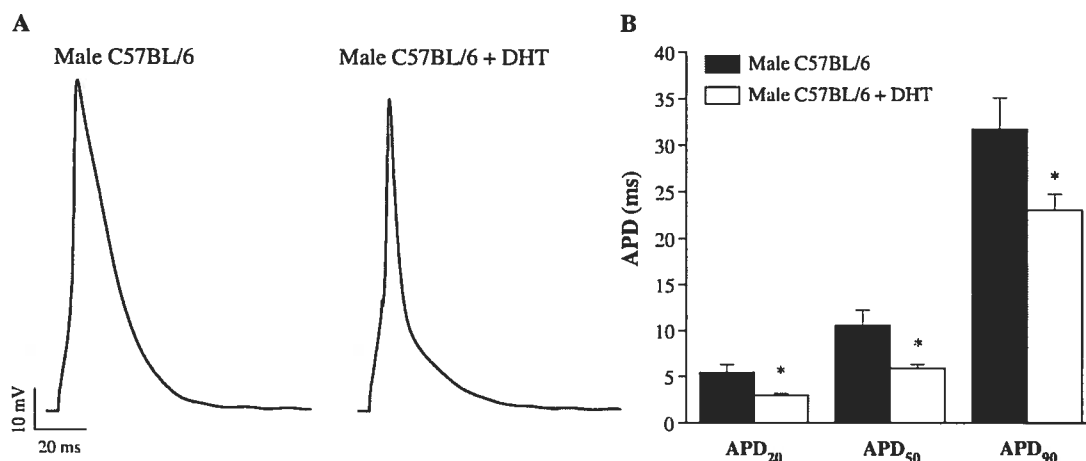


Fig. 7. Effect of DHT treatment on APD recorded in male C57BL/6 mice. (A) Typical examples of action potential recorded in ventricular myocytes isolated from male C57BL/6 and male C57BL/6+DHT mice. Action potentials were evoked by injection of brief (2–5 ms) stimulus currents (0.4–0.7 nA) at rates of 1 to 4 Hz. For the examples shown in this figure, resting membrane potential were -79 mV for the male C57BL/6 and -76 mV for C57BL/6+DHT; for the corresponding groups, the mean resting potential was -75 ± 1 and -74 ± 1 mV, respectively; $p=0.6$. (B) Bar graph showing the mean APD (\pm S.E.M.) at 20%, 50%, and 90% repolarization in male C57BL/6 ($n=41$) and male C57BL/6+DHT ($n=39$) mouse myocytes ($*p<0.05$). APD₂₀, male C57BL/6: 5 ± 0.9 ms; +DHT: 3 ± 0.2 ms; $p=0.008$; APD₅₀, male C57BL/6: 10 ± 2 ms; +DHT: 6 ± 0.5 ms; $p=0.01$; APD₉₀, male C57BL/6: 32 ± 3 ms; +DHT: 23 ± 2 ms; $p=0.02$.

therefore be able to respond to an androgen treatment, we implanted DHT pellets in male C57BL/6 mice. The bar graphs presented in Fig. 5 show that physiological concentrations of DHT were reestablished by DHT replacement in male C57BL/6 mice. We then measured the current density of I_{Kur} in ventricular myocytes of these mice. The superimposed current traces presented in Fig. 6A correspond to I_{Kur} recorded in male C57BL/6 mice treated or not with DHT. Fig. 6B shows that mean current density of I_{Kur} was significantly larger in DHT-treated animals (e.g., at +30 mV, male C57BL/6: 25.6 ± 2.6 , +DHT: 40.6 ± 3.7 pA/pF, $p<0.001$). In addition, I_{Kur} density was significantly different between male C57BL/6 mice treated with DHT and female C57BL/6 mice. In fact, the density of I_{Kur} in DHT-

treated male C57BL/6 mice very much resembles that measured in male CD-1 mice (at +50 mV: 55 ± 5 , 53 ± 5 pA/pF, respectively). To verify whether this increase in I_{Kur} was due to a corresponding increase in the expression of Kv1.5 in ventricles of DHT-treated mice, Western Blot analysis was carried out in ventricular tissues isolated from C57BL/6 mice treated or not with DHT. Fig. 6C shows that the expression level of Kv1.5 in DHT-treated mice is much higher compared with intact male C57BL/6 mice. Fig. 6D shows that when we quantify Kv1.5 density for each of the two groups studied, we found that the increase in Kv1.5 in DHT-treated male C57BL/6 was statistically significant ($p=0.01$). Similar to the findings obtained with the DHT-treated ORC CD-1 mice, these results also indicate that

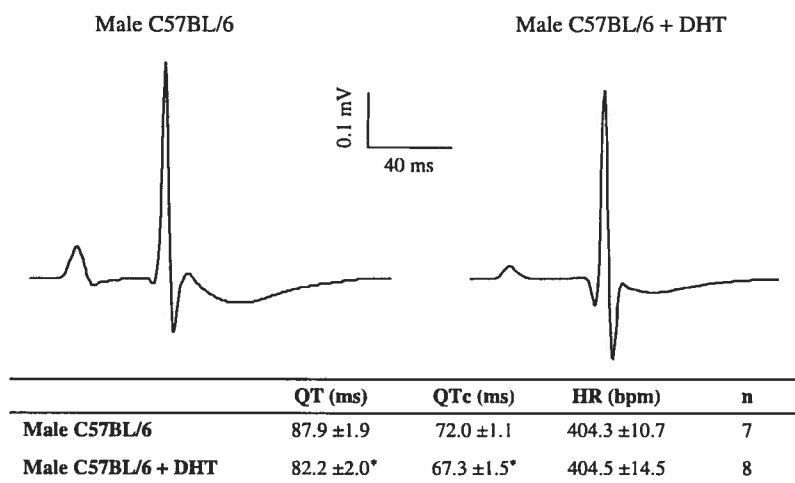


Fig. 8. Effect of DHT treatment on QT intervals of male C57BL/6 mice. Examples of lead I surface ECG obtained from 2- to 3-month-old male C57BL/6 mice treated or not with DHT. Lower panel: table comparing mean QT, QTc and heart rate (HR) in male C57BL/6 and male C57BL/6+DHT mice ($*p<0.05$). n represents the number of mice studied.

treatment with DHT significantly affects I_{Kur} and Kv1.5 in C57BL/6 mice. Ventricular action potentials (AP) were then recorded in both groups. Fig. 7A depicts examples of action potential recordings obtained in C57BL/6 mice treated or not with DHT. In line with the larger density of I_{Kur} , the action potential were significantly shorter in the DHT-treated group compared with the intact males, as shown in Fig. 7B. Fig. 8 presents examples of lead I surface ECG recordings obtained in one control and one DHT-treated male C57BL/6 mice. We were particularly interested in the measurement of the QT interval, which reflects ventricular repolarization. As shown by the examples, the QT interval was shorter in male C57BL/6 mice treated with DHT compared to control male C57BL/6 mice. The lower panel of Fig. 8 presents mean data for QT, QTc and heart rate and shows that QT and QTc intervals were significantly shorter in the DHT-treated group compared to the controls.

4. Discussion

4.1. Summary of main findings

The major findings of this study are: (1) male C57BL/6 mice display similar ventricular repolarization as their female counterparts but show delayed repolarization with respect to male CD-1 mice, which have androgen levels of about six to seven times higher than C57BL/6 levels, and (2) androgen replacement in male C57BL/6 mice as well as in orchietomized male CD-1 mice shortened ventricular repolarization, associated with higher expression of Kv1.5 and larger I_{Kur} current density. These results are consistent with an action of androgens on protein expression, implying an effect of androgens either on transcription, translation, trafficking, or a combination of all of these factors. These results provide convincing evidence that male sex hormones regulate cardiac repolarization in mice.

4.2. Choice of the mouse strains

To assess the association between androgen levels and cardiac repolarization, two strains of mice were selected. CD-1 mice were selected because of (1) normal levels of both male sex hormones, (2) being mentioned by others as a good strain for endocrinological or reproductive studies involving physiological levels of androgens [1] and, (3) our use in previous studies on gender differences and the effects of androgen deficiency on cardiac repolarization. C57BL/6 mice were chosen because of their low plasma testosterone levels. However, when we also checked for the DHT level we found that not only the C57BL/6 males had low level of DHT but also the males of the C3H line. The explanation for the low DHT level in this line of mice was unknown. We decided to measure DHT levels in 4- to 5-month-old C3H mice and found that the DHT level was more than six-fold higher in the older C3H mice (data not shown). It is possible

that the enzyme responsible for the conversion of the testosterone into DHT, the 5 α -reductase, is more abundant or effective in older C3H mice. We repeated this experience for the C57BL/6 mice and found that DHT levels remained low even in the 4- to 5-month-old mice (data not shown). Therefore, since the concentrations of both androgens were found to be low in the male C57BL/6 mice (2- to 3- and 4- to 5-month-old animals), this strain represented a better model to study the effect of low levels of androgen on ventricular repolarization.

4.3. Relation to previous studies

Findings presented here along with data reported by other groups demonstrate that the presence of androgens is associated with faster repolarization [6,10,17,20]. Furthermore, this notion is supported by many clinical studies documenting that ventricular repolarization can be affected under various situations in which there is a chronic change in male sex hormones including normal development, pathological conditions, castration, and steroid treatment [3,10,15,21,26].

Since our initial observation showing gender-related difference in murine repolarization [25], other laboratories have also examined repolarization in male and female mouse ventricles [7,29]. Wu and Anderson [29] documented longer action potential at 90% of repolarization in female compared to male ventricular myocytes. Moreover, they reported that in females I_{to} was smaller and I_{sus} larger. These results differ somewhat from our findings. Indeed, under our experimental conditions, the only current that was smaller in female CD-1 mice was I_{Kur} and as for the C57BL/6 mice, all the K^+ currents were similar for both genders. Many reasons could explain this apparent discrepancy between these studies. First, Wu and Anderson used a different strain of mice (C57BL/6J males crossed with 129SVE females). The animals were studied at 10–12 months of age as opposed to our studies where young adults (2–3 months) were used. They isolated left ventricular myocytes without specification of the origin of the cells (e.g., endocardial, epicardial or a mixed sample of both types of cells). Finally, the methods of separation of the K^+ currents were different. For example, I_{Kslow} (composed of I_{Kur} and I_{ss}) or what they designated as I_{sus} was measured as the residual current recorded at the end of the depolarizing pulse (450 ms), during which I_{Kur} significantly inactivates.

Very recently, another study examining gender difference in mouse ventricle was published by Brunet et al. [7]. In line with our results, they reported that I_{Kur} (or $I_{Kslow,1}$) was smaller in CD-1 females. However, as opposed to our findings, they were unable to detect sex difference in the expression levels of Kv1.5. This inconsistency could possibly be due to different experimental conditions. The present paper, however, provides strong evidence for the up-regulation of Kv1.5 by androgens. Indeed, both castrated CD-1 and normal C57BL/6 displayed higher expression of

Kv1.5 when they were treated with DHT. This is consistent with the well-known genomic action of androgens [16]. Of note, 14 out of 15 consecutive nucleotides of the androgen response element (ARE) are present in the 5' -flanking region of the mouse Kv1.5 coding region [18]. Therefore, our observation showing that male CD-1 mice have high levels of androgens compared to females and present higher Kv1.5 density than females is in accordance with these observations.

Drici et al. reported sex differences in the occurrence of polymorphic ventricular arrhythmias in mice but did not observe any significant sex differences in electrophysiological parameters measured by optical mapping. They postulated that differences in the expression of cardiac ionic channels can account for these sex-dependent polymorphic ventricular arrhythmias, yet they did not observe any significant difference in the mRNA expression of different K⁺ channels including Kv1.5 [8]. This absence of difference may be explained by the use of Northern blots which may not be sensitive enough to detect a sex difference in Kv1.5 expression.

4.4. Male sex hormones concentrations

Others investigators have measured testosterone levels in male C57BL/6 mice [1,12]. Even if the male mice studied belonged to the same strain (C57BL/6) and were of similar age (2- to 3-month-old) than those studied in the present paper, there was clearly some inter-study variability between these reports. It is likely that this disparity can be attributed to differences in the experimental conditions or the techniques used (ELISA or RIA). Thus, it seems difficult to compare results obtained in different studies with the same strain and therefore, it is crucial for strain comparison to compare them under the same experimental conditions as it was the case in the present study.

An important factor that has to be considered when measuring sex hormones is the age of the animal. Different groups have studied the effect of age on testosterone levels in mice. Krishnamurthy et al. [13] studied wild-type CSV129 male mice from postnatal day 7 to 70. Testosterone levels were already substantial at day 7, stayed stable until day 35, reached a peak at day 42, returned to similar baseline mean testosterone levels at days 56 and 63 before reaching another peak at day 70. This study shows that for a given strain of mice, under similar experimental conditions, there are week-to-week fluctuations in testosterone levels, even during adulthood period. Jones et al. [12] studied two groups of male C57BL/6 mice with mean age of 74 and 151 days old. Mean testosterone levels were higher in the older group but there was no mention whether or not this difference was statistically significant. Finally, Shapiro et al. [23] showed that testosterone levels were similar between mature male CD1 mice (98 days) and old mice (515 days). In keeping with this last study, we found no

difference in testosterone or DHT levels between 2- to 3-month-old and 4- to 5-month-old male CD-1 mice (data not shown). Similarly, the testosterone and DHT values of the C57BL/6 male mice were also comparable between the two age groups.

4.5. Effect of estrogen on cardiac repolarization

The present study focused on the regulation of I_{Kur} by male sex hormones based on the observation that the gender difference observed in this current was abolished following castration. However, female sex hormones have also been implicated in the regulation of K⁺ currents in a variety of tissues including uterus, smooth and cardiac muscles [2,24,28]. Most of the studies focusing on cardiac K⁺ channels show that acute administration of estrogen decreased K⁺ current density [2,27]. This inhibitory effect of estrogen has been reported for the transient outward (I_{to}) [2] and the slow delayed rectifier (I_{Ks}) K⁺ currents [27]. Theoretically, this action of estrogen could contribute to explain why females have longer cardiac repolarization than males. However, the concentration of estrogen used to elicit such effect exceeded the physiological concentration range. Furthermore, results from our group and other laboratories demonstrated that mouse and rat I_{to} display no gender difference [7,14,25]. In addition to its fast action, long-term effects of estrogen on cardiac repolarization have also been studied. Saba et al. [22] studied the effect of ovariectomy and estrogen treatment on mouse ECG parameters. Neither ovariectomy nor estrogen administration affected QT interval. Another group reported prolongation of QT interval and APD in a transgenic mice model lacking estrogen receptors (ERKO) [11]. The authors suggested that this prolongation was due to increased Ca²⁺ currents but no study was undertaken to verify the implication of K⁺ currents in this phenotype. In summary, estrogens are potential regulators of cardiac repolarization but more studies are required to delineate their functional roles.

4.6. Limitations of the study

This study provides important information about gender and strain differences in cardiac repolarization of murine models. However, the fact that mouse and human ventricles share some but not all components of repolarizing K⁺ currents may prevent direct extrapolation of these findings to the human situation. Indeed, although I_{Kur} is an important repolarizing K⁺ current in mouse ventricular myocytes, this current is prominent in atrial but not in ventricular myocytes of humans. Nevertheless, these studies are relevant for many reasons. First, similar to human, mouse displays gender differences in ventricular repolarization. Moreover, mouse cardiac K⁺ currents/channels can be regulated by variations in male sex steroid hormones levels and as mentioned earlier, growing clinical evidence also suggests that androgens regulate cardiac repolarization in humans. Thus, the

mouse could be viewed as a useful model to study the general mechanisms of sex-related differences in cardiac repolarization. Furthermore, access to transgenic mice that lack sex steroid hormones receptors provides a valuable tool to further study the actions of these hormones and receptors on cardiac repolarization. It is also possible that in humans the density of different repolarizing K^+ currents such as I_{Kr} and I_{Ks} may be similarly modified by sex steroid hormones. On that matter, ongoing studies in our laboratory are aimed at exploring the cellular and molecular mechanisms underlying gender difference in human repolarization.

In conclusion, this study provides useful insight into how androgens influence basic cardiac electrophysiology. Indeed, our results strongly suggest that there is a clear association between androgen levels and $I_{Kur}/Kv1.5$ density in adult mouse ventricular myocytes. Moreover, it appears that special attention should be paid to the hormonal status of the strain of mice (or of any other animal models) used when studying hormonal regulation of cardiac repolarization. For similar reasons, it would also be important to ascertain that the animals studied have reached sexual maturity.

Acknowledgements

This study was supported by operating grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC). C. Fiset is a Research Scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). J. Brouillette is a recipient of a CIHR Studentship. The authors are thankful to M.A. Lupien, V. Trépanier-Boulay and M.A. Gillis for skilled technical assistance. We also wish to thank the Hematology department of the MHI for analysis of DHT samples.

References

- [1] Bartke A. Increased sensitivity of seminal vesicles to testosterone in a mouse strain with low level of testosterone. *J Endocrinol* 1974;60:145–8.
- [2] Berger F, Borchard U, Hafner D, Pütz I, Weis TM. Effects of 17 β -estradiol on action potential and ionic currents in male rat ventricular myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1997;356:788–96.
- [3] Bidoggia H, Maciel JP, Capalozza N, Mosca S, Blaksley EJ, Valverde E, et al. Sex difference on the electrocardiographic pattern of cardiac repolarization: possible role of testosterone. *Am Heart J* 2000;140:678–83.
- [4] Braunstein B. Testes. In: Greenspan FS, Baxter JD, editors. *Basic and Clinical Endocrinology*. Norwalk, CT: Paramount Publishing Business and Professional Group; 1994. p. 391–402.
- [5] Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C. Functional properties of K^+ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)* 2004 [Published online as].
- [6] Brouillette J, Trépanier-Boulay V, Fiset C. Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *J Physiol (Lond)* 2003;546:403–13.
- [7] Brunet S, Aimond F, Li H, Guo W, Eldstrom J, Fedida D, et al. Heterogeneous expression of repolarizing, voltage-gated K^+ in adult mouse ventricles. *J Physiol (Lond)* 2004;103–20.
- [8] Drici MD, Baker L, Plan P, Barhanin J, Romey G, Salama G. Mice display sex differences in halothane-induced polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2002;106:497–503.
- [9] 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 (Lond)* 1997;504:557–63.
- [10] Hara M, Danilo Jr P, Rosen MR. Effects of gonadal steroids on ventricular repolarization and on the response to E4031. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;285:1068–72.
- [11] 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;110:135–40.
- [12] Jones R, Pugh P, Hall J, Channer K, Jones T. Altered circulating hormone levels, endothelial function and vascular reactivity in the testicular feminised mouse. *Eur J Endocrinol* 2003;148:111–20.
- [13] Krishnamurthy H, Babu PS, Morales CR, Sairam MR. Delay in sexual maturity of the follicle-stimulating hormone receptor knockout male mouse. *Biol Reprod* 2001;65:522–31.
- [14] Leblanc N, Chartier D, Gosselin H, Rouleau JL. Age and gender differences in excitation-contraction coupling of the rat ventricle. *J Physiol (Lond)* 1998;511:533–48.
- [15] Lehmann MH, Timothy KW, Frankovich D, Fromm BS, Keating M, Locati EH, et al. Age-gender influence on the rate-corrected interval and the QT-heart rate relation in families with genotypically characterized long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:93–9.
- [16] Litwack G, Schmidt TJ. Biochemistry of hormones: II. Steroid hormone. In: Devlin TM, editor. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. New York: Wiley-Liss; 1997. p. 893–918.
- [17] Liu XK, Katchman A, Whitfield BH, Wan G, Janowski EM, Woosley RL, 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.
- [18] London B, Guo W, Pan X, Lee JS, Shusterman V, Rocco CJ, et al. Targeted replacement of Kv1.5 in the mouse leads to loss of the 4-aminopyridine-sensitive component of $I_{K,slow}$ and resistance to drug-induced QT prolongation. *Circ Res* 2001;88:940–6.
- [19] Mitchell GF, Jeron A, Koren G. Measurement of heart rate and QT interval in the conscious mouse. *Am J Physiol* 1998;274:H747–51.
- [20] Pham TV, Sosunov EA, Anyukhovskiy EP, Danilo Jr P, Rosen MR. Testosterone diminishes the proarrhythmic effects of dofetilide in normal female rabbits. *Circulation* 2002;106:2132–6.
- [21] Rautaharju PM, Zhou SH, Wong S, Calhoun HP, Berenson GS, Prineas R, et al. Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Can J Cardiol* 1992;8:690–5.
- [22] Saba S, Zhu W, Aronovitz MJ, Estes III NAM, Wang PJ, Mendelsohn ME, et al. Effects of estrogen on cardiac electrophysiology in female mice. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2002;13:276–80.
- [23] Shapiro BH, Niedermeyer TM, Babalola GO. Serum androgen levels in senescent Cr1:CD-1(IRC)BR mice: effects of castration and testosterone treatment. *J Gerontol* 1989;44:B15–9.
- [24] Song M, Helguera G, Eghbali M, Zhu N, Zarei M, Olcese R, et al. Remodeling of Kv4.3 potassium channel gene expression under the control of sex hormones. *J Biol Chem* 2001;276:31883–90.
- [25] Trépanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res* 2001;89:437–44.
- [26] Valverde ER, Biagetti MO, Bertran GR, Arini PD, Bidoggia H, Quinteiro RA. Developmental changes of cardiac repolarization in

- rabbits: implications for the role of sex hormones. *Cardiovasc Res* 2003;57:625–31.
- [27] Waldegger S, Lang U, Herzer T, Suessbrich H, Binder K, Lepple-Wienhues A, et al. Inhibition of minK protein induced K^+ channels in *xenopus* oocytes by estrogens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1996;354:698–702.
- [28] White RE, Darkow DJ, Falvo Lang JL. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BK_{Ca} channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ Res* 1995;77:936–42.
- [29] Wu Y, Anderson ME. Reduced repolarization reserve in ventricular myocytes from female mice. *Cardiovasc Res* 2002;53:763–9.