

2M U. 3005.1

Université de Montréal

**Expression ventriculaire des récepteurs aux oestrogènes  
et aux androgènes dans le cœur de souris**

par

Annie Tremblay

Université de Montréal

Faculté de Pharmacie

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

Mars 2002



©Annie Tremblay, 2002

QV

705

U58

2002

V.011

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Expression ventriculaire des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes  
dans le cœur de souris

présenté par :  
Annie Tremblay

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Huy Ong  
Dr Céline Fiset  
Dr Angelino Calderone

président-rapporteur  
directrice de recherche  
membre du jury

## RÉSUMÉ

Les connaissances actuelles concernant les différences reliées au sexe dans l'incidence des maladies cardiovasculaires et l'activité électrique cardiaque suggèrent fortement l'implication des hormones sexuelles (oestrogènes et androgènes) au niveau cardiaque. Les effets physiologiques de ces hormones sont médiés par les récepteurs aux oestrogènes  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) et  $\beta$  (ER $\beta$ ) ainsi que par le récepteur aux androgènes (AR). L'objectif premier de ce projet était de démontrer la présence et de comparer la localisation sous cellulaire de ER $\alpha$ , ER $\beta$  et AR dans les ventricules de souris adultes mâles et femelles. Le second objectif consistait à déterminer l'effet de la gonadectomie sur l'expression de ces récepteurs. Les résultats obtenus par immunobuvardage Western, immunofluorescence et microscopie confocale démontrent que la localisation sous cellulaire est différente pour chacun des récepteurs, mais similaire chez les deux sexes. ER $\alpha$ , l'isoforme du ER le plus abondant au niveau du muscle cardiaque, est principalement membranaire alors qu'ER $\beta$  et AR sont cytosoliques. De plus, l'abondance de chacun des récepteurs au niveau ventriculaire est similaire chez les mâles et les femelles. L'ovarectomie n'affecte pas l'expression de ER $\alpha$ , ER $\beta$  et AR, quelque soit la période de récupération allouée après la chirurgie (1, 3, 6 ou 8 semaines); par contre, l'orchidectomie entraîne une diminution marquée de l'expression de ER $\beta$  et AR, mais non de ER $\alpha$ , et ce, dès la première semaine après la chirurgie. Une meilleure connaissance de la localisation sous cellulaire des récepteurs hormonaux dans le cœur de souris permettra d'aborder de façon plus précise les mécanismes moléculaires de l'action des hormones sexuelles au niveau cardiaque. La régulation apparemment différente de l'expression des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes dans ce tissu suggère des rôles physiologiques distincts selon le sexe, lesquels pourraient contribuer aux différences mâles-femelles observées au niveau des maladies cardiaques.

**Mots-clés :** sexe, récepteurs aux oestrogènes, récepteurs aux androgènes, cœur, souris

## ABSTRACT

There are significant gender-based differences in the incidence of a wide variety of cardiovascular diseases and in cardiac electrophysiology strongly suggest the implication of sex hormones on cardiac physiology. Physiological effects attributed to sex hormones are mostly mediated by their receptors, which are the estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER $\beta$ ) and the androgen receptor (AR). To provide evidence that those receptors are expressed in adult mouse ventricles of both sexes, to determine their subcellular localization as well as the effect of gonadectomy on their expression level, we used Western blot analysis, immunofluorescence and confocal microscopy techniques. Results showed that sex hormone receptors, differ with respect to their subcellular localization. ER $\alpha$  is mainly localized in the membrane fraction while ER $\beta$  and AR are localized mainly in the cytosol. Subcellular localization and expression level are similar between males and females. However, gonadectomy affects receptor expression in a different manner in male and female ventricles. Neither ER $\alpha$ , ER $\beta$  or AR expression is affected by ovariectomy independently of the time of recovery (1, 3, 6 or 8 weeks) allowed after surgery. In contrast, ER $\beta$  and AR, but not ER $\alpha$ , are expressed at lower level in castrated male ventricles 1 week after the surgery. The characterization of subcellular localization of sex hormone receptors will allow further investigations of molecular mechanisms implicated in hormonal regulation in adult mouse heart. The apparently different regulation of sex hormone receptors in male and female hearts suggest gender-dependent physiological roles that could account for the gender-based differences observed in the incidence of cardiovascular diseases.

**Keywords :** gender, estrogen receptor, androgen receptor, mouse, heart

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier ma directrice, le Dr Céline Fiset, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir ainsi permis de participer à plusieurs projets intéressants et enrichissants. J'aimerais aussi remercier tous les autres membres de l'équipe du Dr Fiset pour leur soutien, soit Chantale St-Michel, Véronique Trépanier-Boulay, Judith Brouillette, ainsi que Éric Lizotte, pour son aide concernant les dernières expériences d'essais enzymatiques  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases.

Je tiens aussi à remercier les membres de mon comité aviseur, le Dr Angelino Calderone et le Dr Bruce G. Allen, pour leurs conseils scientifiques et techniques inestimables. Je voudrais aussi remercier plus spécialement le Dr Allen pour son appui plus qu'indispensable tant pour l'élaboration et la mise au point des protocoles d'immunobuvardage Western, de fractionnement sous cellulaire et d'essais enzymatiques pour les pompes ATPases que pour l'interprétation des résultats.

J'aimerais aussi remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à ma formation, entre autres Louis-Robert Villeneuve pour son aide précieuse au niveau des techniques d'immunofluorescence et de microscopie confocale, Isabelle Mercier et Benoît Boivin pour leur support, autant technique et scientifique qu'amical ☺, ainsi que Robert Clément pour m'avoir transmis une partie de son expertise concernant les chirurgies sur les petits animaux.

Pour terminer, j'aimerais remercier chaleureusement ma famille et mes amis, qui ont été présents pour moi lorsque j'en avais le plus besoin, m'ont aidée, supportée et encouragée à travers les moments plus difficiles. À vous tous, merci infiniment!

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Remerciements.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des sigles et des abbréviations.....	ix
Liste des figures et des tableaux.....	xi
Chapitre 1- Introduction.....	13
1.1    Épidémiologie: Différences entre les sexes.....	13
1.1.1    Maladies cardiovasculaires.....	13
1.1.2    Arythmies cardiaques.....	14
1.2    Ménopause et hormonothérapie.....	17
1.2.1    Changements hormonaux reliés à la ménopause.....	17
1.2.2    Avantages et inconvénients de l'hormonothérapie.....	20
1.2.3    Hormonothérapie et système cardiovasculaire.....	21
1.2.4    Androgènes et hormonothérapie.....	22
1.3    Mécanismes d'action des hormones sexuelles : Voie génomique et non-génomique.....	24
1.4    Récepteurs aux hormones sexuelles : structure, fonction et localisation.....	26
1.4.1    Structure générale.....	26
1.4.2    Récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes.....	27
1.4.3    Localisation tissulaire.....	29
1.4.4    Localisation sous cellulaire : importance des récepteurs membranaires.....	31
1.4.5    La progestérone et ses récepteurs.....	34
1.5    Complexité de la régulation par les hormones sexuelles.....	35
1.6    Contexte et Objectifs de l'étude.....	38
Chapitre 2- Matériel et Méthodes.....	39
2.1    Modèle animal.....	39

2.2	Isolation protéique .....	40
2.3	Essais enzymatiques .....	41
2.3.1	Activité de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sensible à la ouabaïne .....	41
2.3.2	Activité de la pompe $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du réticulum sarco/endoplasmique .....	41
2.3.2.1	Dosage du phosphate inorganique .....	42
2.3.3	Activité de l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase .....	43
2.4	Immunobuvardage Western.....	44
2.5	Isolation des myocytes ventriculaires.....	44
2.6	Immunofluorescence et microscopie confocale .....	45
2.7	Analyses statistiques.....	46
Chapitre 3- Résultats .....		47
3.1	Modèle de la souris ovariectomisée.....	47
3.2	Fractionnement sous cellulaire .....	50
3.2.1	Activité de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase .....	50
3.2.2	Activité de la pompe $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du réticulum sarco/endoplasmique .....	52
3.2.3	Activité de l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase .....	55
3.3	Récepteurs aux hormones sexuelles .....	57
3.3.1	Localisation sous cellulaire et abondance relative des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes chez les mâles et les femelles .....	57
3.3.2	Effet de la gonadectomie sur le niveau d'expression des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes .....	58
Chapitre 4- Discussion .....		63
4.1	Efficacité du fractionnement sous cellulaire .....	63
4.1.1	Composition des fractions T et MT.....	64
4.1.2	Composition des fractions C et S .....	67
4.2	Localisation sous cellulaire des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes au niveau ventriculaire chez les souris adultes mâles et femelles.....	70

4.2.1	Implication de l'absence de dimorphisme sexuel dans l'expression des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes au niveau ventriculaire chez la souris adulte.....	75
4.2.2	Implication d'un effet de la gonadectomie dépendant du sexe sur l'expression des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes au niveau ventriculaire chez la souris adulte .....	76
4.3	Les modèles appliqués à l'étude de la régulation hormonale.....	79
4.3.1	Le modèle de la souris gonadectomisée .....	79
4.3.2	Les modèles transgéniques .....	82
	Conclusion .....	84
	Perspectives.....	85
	Bibliographie.....	86
	Annexe 1 .....	I
	Clark R.B., Tremblay A., Melnyk P., Allen B.G., Giles W.R., Fiset C. T-tubule localization of the inward-rectifier K <sup>+</sup> channel in mouse ventricular myocytes: a role in K <sup>+</sup> accumulation <i>J Physiol</i> 2001, 537.3, 979-992	
	Annexe 2 .....	II
	Trépanier-Boulay V., St-Michel C., Tremblay A., Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle <i>Circulation Research</i> 2001, Aug 31; 89 (5): 437-44	

## LISTE DES SIGLES ET DES ABBRÉVIATIONS

$\alpha$ ERKO :	souris knockout pour ER $\alpha$
$\beta$ ERKO:	souris knockout pour ER $\beta$
[ <sup>3</sup> H]-E <sub>2</sub>	17 $\beta$ -oestradiol marqué au tritium
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
AF-1 :	" <i>activation function-1</i> "; fonction d'activation-1
AF-2 :	" <i>activation function-2</i> "; fonction d'activation-2
AMPc :	adénosine mono phosphate cyclique
AP1 :	" <i>activating protein 1</i> "
AR :	récepteur aux androgènes
ARE :	" <i>androgen response element</i> "; élément de réponse aux androgènes
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
BSA :	albumine sérique de bœuf
CBP:	" <i>CREB binding protein</i> "; protéine liant le CREB
CREB:	" <i>cAMP response element binding protein</i> "; protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc
DHT :	dihydrotestostérone
E <sub>2</sub> :	17 $\beta$ -oestradiol
EAD :	" <i>early after depolarisation</i> "; dépolarisation précoce
ECG :	électrocardiogramme
eNOS:	NO synthase endothéliale
ER $\alpha$ :	récepteur aux oestrogènes $\alpha$
ER $\beta$ :	récepteur aux oestrogènes $\beta$
ERE :	" <i>estrogen response element</i> "; élément de réponse aux oestrogènes
FITC :	fluorescéine
GR :	récepteur aux glucocorticoïdes
HAT:	histone acétyltransférase
HDL:	" <i>High Density Lipoprotein</i> "; lipoprotéine de haute densité
HERS:	" <i>Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study</i> "
HRT :	" <i>hormone replacement therapy</i> "; hormonothérapie de remplacement
HSP :	" <i>heat shock protein</i> "; protéine de choc thermique
LDL:	" <i>Low Density Lipoprotein</i> "; lipoprotéine de faible densité
M :	molaire
mL :	millilitre
mM :	millimolaire
ms:	milliseconde
MAPK:	" <i>mitogen activated protein kinase</i> "
MCV :	maladies cardiovasculaires

$\mu\text{L}$ :	microlitre
$\mu\text{M}$ :	micromolaire
NcoR:	" <i>nuclear receptor corepressor</i> "; corépresseur des récepteurs nucléaires
nm :	nanomètres
NO :	monoxide d'azote
OVX:	souris ovariectomisée
PBS :	" <i>phosphate buffered saline</i> "
PKA :	protéine kinase A
PKC :	protéine kinase C
PR :	récepteur à la progestérone
QT :	intervalle QT
QTc :	intervalle QT corrigé
rpm :	rotations par minute
RHS :	récepteurs aux hormones sexuelles
s :	seconde
Sh :	" <i>sham-operated</i> "
SMRT:	" <i>silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors</i> "
SRC-1:	" <i>steroid receptor coactivator 1</i> "
TBS :	" <i>Tris buffered saline</i> "
TdP :	Torsades de Pointes

## LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

### Chapitre 1- Introduction

Figure 1.1:	Intervalle QT et potentiel d'action ventriculaire cardiaque.....	15
Figure 1.2 :	Développement des Torsades de Pointes .....	16
Figure 1.3 :	Modifications du milieu hormonal reliées à la ménopause .....	17
Figure 1.4 :	Modèle classique de l'action des hormones sexuelles .....	24
Figure 1.5 :	Schéma de la synthèse des hormones sexuelles.....	25a
Figure 1.6 :	Schéma représentant l'action hormonale endocrine, paracrine, autocrine et intracrine.....	26
Figure 1.7 :	Structure schématique d'un facteur de transcription .....	27
Figure 1.8 :	Classification de Mannheim concernant les effets non-génomiques des hormones sexuelles.....	33
Tableau 1.1 :	Redistribution des sites de sécrétion d'androgènes à la ménopause.....	19

### Chapitre 3- Résultats

Figure 3.1 :	Paramètres d'évaluation de l'efficacité de l'ovarectomie .....	48
Figure 3.2 :	Activité de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase .....	51
Figure 3.3 :	Activité des pompes $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase .....	54
Figure 3.4 :	Activité de l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase et immunobuvardage Western contre la PCNA .....	56
Figure 3.5 :	Localisation ventriculaire des récepteurs chez les mâles et les femelles .....	59
Figure 3.6 :	Localisation sous cellulaire de $\text{ER}\alpha$ par immunofluorescence et microscopie confocale.....	60
Figure 3.7 :	Abondance relative des récepteurs chez les souris mâles et femelles .....	61
Figure 3.8 :	Effet de la gonadectomie sur l'expression des récepteurs.....	62
Tableau 3.1 :	Concentrations de $17\beta$ -oestradiol chez les souris et chez l'humain.....	49

Tableau 3.1b : Rapport poids du cœur/ poids du corps chez les souris témoins, sham et OVX à 1, 3 et 6 semaines post-chirurgie .....	50a
Tableau 3.2 : Activité de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase .....	52
Tableau 3.3 : Activités des pompes $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.....	53
Tableau 3.4 : Activité glucose-6-phosphate-déshydrogénase .....	55

#### **Chapitre 4- Discussion**

Figure 4.1 : Représentation schématique du protocole de fractionnement sous cellulaire .....	66
Figure 4.2 : Proximité de la membrane sarcolemmale et du réticulum sarcoplasmique jonctionnel .....	68

# CHAPITRE 1- INTRODUCTION

## 1.1 Épidémiologie: Différences entre les sexes

### 1.1.1 Maladies cardiovasculaires

Depuis déjà une cinquantaine d'années, les différences entre les sexes au niveau de l'incidence des maladies cardiovasculaires (MCV) représentent un phénomène bien établi.<sup>1</sup> Ces maladies se développent environ 10 ans plus tard chez les femmes que chez les hommes, bien qu'elles constituent pour les deux sexes la principale cause de mortalité au Canada et dans la majorité du monde industrialisé.<sup>2; 2a</sup> Chez les femmes pré-ménopausées, l'incidence des MCV telles que l'hypertension, l'athérosclérose, les troubles coronariens et l'infarctus du myocarde, est plus faible que chez les hommes du même âge. Par contre, après la ménopause, l'incidence de ces états pathologiques augmente et devient similaire ou supérieure à celle observée chez les hommes.<sup>3-6</sup> Le sexe féminin représenterait donc un facteur protecteur au niveau de l'incidence des MCV. Cette protection contre les maladies cardiovasculaires chez les femmes pré-ménopausées a souvent été associée à la présence d'oestrogènes.<sup>7;8</sup> C'est pourquoi l'hormonothérapie de remplacement ("*Hormone Replacement Therapy*"; HRT) chez les femmes post-ménopausées a tout d'abord été considérée cardioprotectrice.

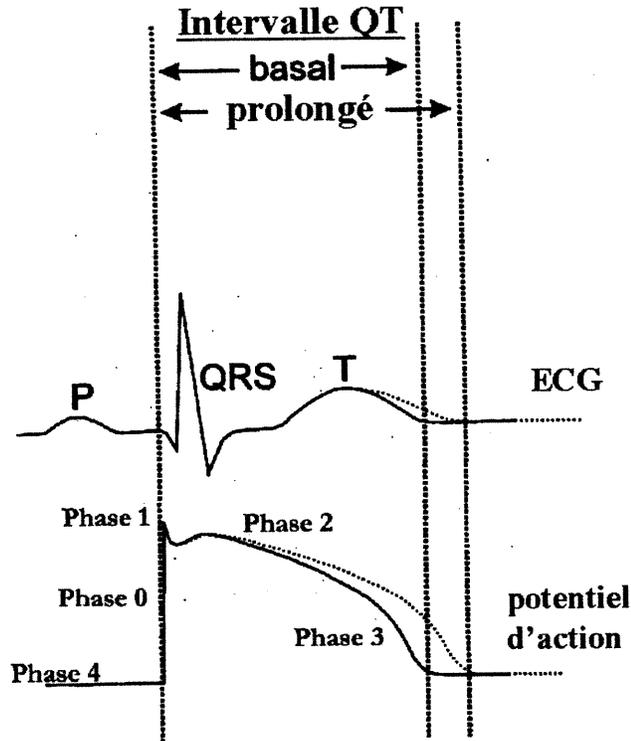
En effet, quelques études cliniques ont démontré une diminution d'environ 50% de l'incidence des MCV ainsi qu'une baisse d'environ 25% de la mortalité associée à ces maladies lors de la prise d'HRT par des femmes post-ménopausées.<sup>9;10</sup> Par contre, l'étude HERS ("*Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study*") n'a pas démontré d'effets protecteurs de l'HRT chez des femmes post-ménopausées présentant des maladies coronariennes établies.<sup>11</sup> Les auteurs de cette étude ont cependant précisé que des études cliniques de plus grande envergure, avec un nombre plus grand de participantes et une sélection plus appropriée, étaient nécessaires afin d'établir hors de tout doutes le rôle protecteur ou néfaste de l'HRT au niveau cardiovasculaire.<sup>12</sup> En attendant la réalisation de ces études, l'Association Américaine pour les Maladies du Cœur ("*American Heart*

*Association*"; AHA) ne recommande plus, et ce depuis juillet 2001, l'utilisation de l'HRT visant comme bénéfique principal le traitement ou la prévention des MCV chez les femmes post-ménopausées.<sup>13</sup> De façon parallèle, il est aussi nécessaire de réaliser des projets de recherche fondamentale concernant les effets cardiaques des oestrogènes afin de permettre une meilleure compréhension des facteurs de risques de MCV chez les femmes ainsi que le développement de traitements plus appropriés.<sup>2</sup>

Bien que l'attention ait été principalement dirigée vers l'implication des oestrogènes dans les différences reliées au sexe, il est important de se rappeler que les androgènes ont aussi un rôle potentiel à ce niveau. Vers la fin des années 80, les androgènes ont été identifiés comme un facteur de risque menant au développement de MCV. Pourtant, dans les années 90, des études cliniques et expérimentales ont suggéré des effets neutres ou bénéfiques des androgènes sur le développement et les manifestations cliniques de l'athérosclérose chez l'homme.<sup>14;15</sup> Il a aussi été démontré que l'hyperandrogénisme associé à l'obésité, l'hirsutisme ou au syndrome ovarien polycystique était corrélé à un risque accru de développer des maladies coronariennes.<sup>16</sup> Les androgènes semblent donc, eux aussi, jouer un rôle au niveau du système cardiovasculaire.

### **1.1.2 Arythmies cardiaques**

Comme il a été observé dans les autres MCV, il existe aussi des différences reliées au sexe quant à l'incidence de certaines arythmies ainsi que dans les propriétés électrophysiologiques cardiaques.<sup>17</sup> Les différences à l'électrocardiographie entre les hommes et les femmes ont été documentées pour la première fois par Bazett en 1920.<sup>18</sup> Il est maintenant reconnu que les femmes ont un rythme cardiaque basal plus rapide ainsi qu'un intervalle QT corrigé (QTc) de 10 à 20 ms plus long que celui des hommes du même âge.<sup>17;17a;19;20</sup> L'intervalle QT est un paramètre de l'électrocardiogramme (ECG) représentant la durée du potentiel d'action ventriculaire et reflétant la durée de la période de repolarisation ventriculaire.<sup>21</sup>



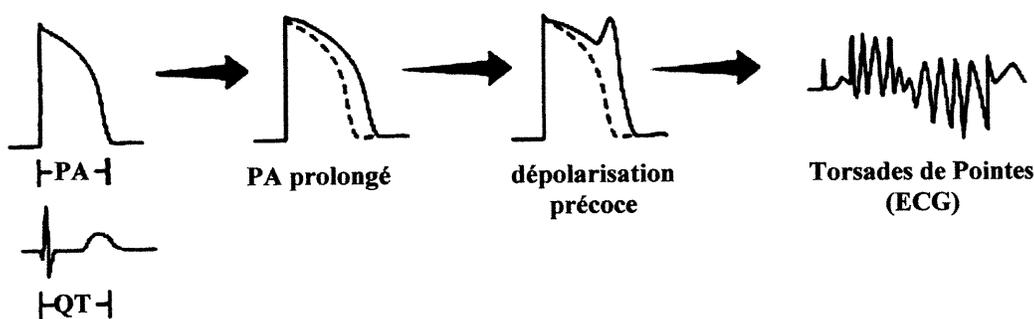
**Figure 1.1: Intervalle QT et potentiel d'action ventriculaire cardiaque**

L'intervalle QT sur l'ECG correspond à la durée du potentiel d'action ventriculaire et représente la durée de la repolarisation ventriculaire. Le prolongement de l'intervalle QT reflète une repolarisation ventriculaire plus lente, se traduisant par un allongement de la durée du potentiel d'action ventriculaire.

*Roden DM. Ionic mechanisms for prolongation of refractoriness and their proarrhythmic and antiarrhythmic correlates. Am J Cardiol 1996;78:12-60. (adaptation)*

La prolongation du QTc chez la femme est associée à un retard de repolarisation ventriculaire (comparativement aux hommes), favorisant donc le développement d'une arythmie ventriculaire polymorphique appelée Torsades de Pointes (TdP).<sup>17;19;22-26</sup> En effet, la TdP est directement associée à un allongement de l'intervalle QT et à une repolarisation ventriculaire plus lente.<sup>25</sup> Cette arythmie, souvent soudaine et létale, peut survenir à cause de défauts génétiques congénitaux, comme dans le cas du syndrome du long QT, mais principalement, lors d'un déséquilibre électrolytique (hypomagnésémie, hypokaliémie) ou de la prise de médicaments prolongeant l'intervalle QT, comme les antiarythmiques de classe IA (quinidine, procaïnamide, disopyramide) et III (sotalol, dofétilide, azimilide), les

antihistaminiques (terfénadine), les antibiotiques (érythromycine) et les antidépresseurs.<sup>9;17a;19;23;25;27</sup> La prolongation excessive du QT par un ou plusieurs facteurs, comme par exemple l'administration de sotalol à une femme, peut entraîner le déclenchement de dépolarisations précoces ("early after-depolarizations"; EAD) menant au développement des TdP.<sup>22</sup> Donc, contrairement à ce qui est observé au niveau de l'incidence des autres MCV, le sexe féminin n'est pas associé à un effet cardioprotecteur concernant l'incidence de ce type d'arythmie cardiaque.



**Figure 1.2 : Développement des Torsades de Pointes**

Plusieurs facteurs, tels le sexe féminin, la bradycardie, l'hypokaliémie, l'hypomagnésémie ou certains agents pharmacologiques entraînent un ralentissement de la repolarisation ventriculaire, caractérisé par une augmentation de la durée de potentiel d'action (PA) ventriculaire. Cette repolarisation ventriculaire ralentie favorise l'apparition de dépolarisations précoces, pouvant déclencher des Torsades de Pointes. Le dernier tableau de la figure 2 représente un tracé électrocardiographique de Torsades de Pointes.

*Ebert SN, Liu XK, Woosley RL. (1998) Female Gender as a Risk Factor for Drug-Induced Cardiac Arrhythmias: Evaluation of Clinical and Experimental Evidence. Journal of Women's Health; 7:547-557. (adaptation)*

Comme c'est le cas pour l'incidence des autres MCV, les androgènes semblent aussi jouer un rôle au niveau des propriétés électrophysiologiques cardiaques. En effet, les différences entre les sexes au niveau du QT apparaissent à la puberté. L'intervalle QT est long chez les enfants des deux sexes, et avec l'apparition des hormones sexuelles dans la circulation sanguine, le QT reste long chez la jeune fille alors qu'il raccourcit chez le jeune garçon.<sup>28;29</sup> Il conviendrait donc plutôt d'employer l'expression "QT raccourci" chez l'homme, plutôt que "QT prolongé" chez la femme.

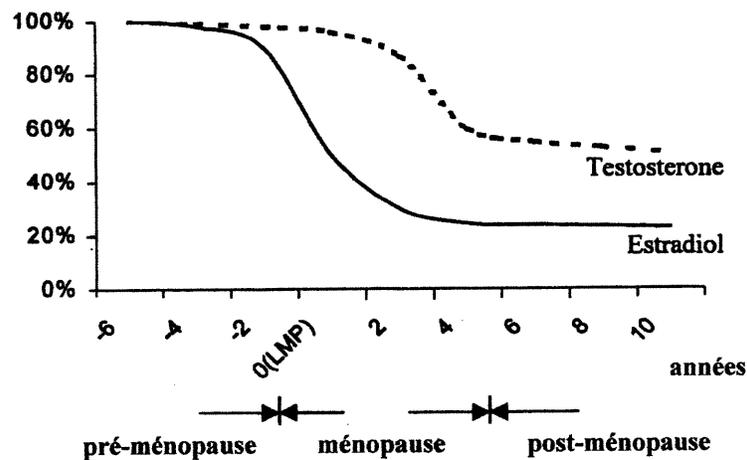
De ce fait, les androgènes semblent être associés à un raccourcissement de l'intervalle QT et, conséquemment, à une repolarisation ventriculaire plus rapide. L'hypothèse d'un effet possiblement protecteur des androgènes sur la repolarisation ventriculaire est supportée par des données épidémiologiques. En effet, la diminution de la concentration d'androgènes circulants, chez des hommes castrés chimiquement pour un cancer de la prostate, entraîne un prolongement de l'intervalle QT reflétant un ralentissement de la repolarisation ventriculaire chez ces derniers.<sup>30</sup> Dans le même ordre d'idées, chez des femmes souffrant d'une hyperplasie des glandes surrénales induisant une augmentation de la concentration d'androgènes dans la circulation sanguine, l'intervalle QT est diminué et la repolarisation ventriculaire est plus rapide.<sup>30</sup> Des données électrocardiographiques, épidémiologiques et expérimentales suggèrent fortement un mécanisme dépendant des hormones sexuelles et impliquant des altérations dans l'expression de canaux ioniques cardiaques comme base de la propension à un QT plus long relié à une incidence plus élevée de TdP chez les femmes. Bien que des indices indirects suggèrent que les androgènes jouent un rôle protecteur à ce niveau chez l'homme, il est nécessaire de poursuivre la recherche fondamentale dans ce domaine pour permettre une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les différences reliées au sexe et ainsi permettre un traitement plus approprié des arythmies cardiaques, tant pour les hommes que pour les femmes.<sup>17a</sup>

## **1.2 Ménopause et hormonothérapie**

### **1.2.1 Changements hormonaux reliés à la ménopause**

La ménopause constitue la cessation de l'activité ovulatoire ainsi que des menstruations. La femme est considérée ménopausée lorsqu'une période d'un an sans menstruation s'est écoulée. Cette condition, caractérisée par une diminution drastique de la sécrétion d'oestrogènes par les ovaires, survient environ vers l'âge de 50 ans et donne lieu à plusieurs symptômes indésirables, notamment des bouffées de chaleur accompagnées de sueurs abondantes, une sécheresse vaginale, des troubles de l'humeur pouvant même aller

jusqu'à la dépression, une prise de poids ainsi qu'une perte de masse osseuse (ostéoporose).<sup>7</sup> Le passage à la ménopause entraîne plusieurs modifications du milieu hormonal chez la femme, caractérisées par trois phases distinctes. Ces phases sont appelées pré-ménopause, ménopause et post-ménopause. À la ménopause, la chute de la concentration circulante d'oestrogènes est plus drastique que la diminution de la concentration d'androgènes circulants. Liu et coll., (2001) ont récemment soulevé l'hypothèse que la phase de ménopause soit donc caractérisée par un excès d'androgènes relativement aux oestrogènes, correspondant à la période d'augmentation du risque de MCV chez les femmes.<sup>16</sup>



**Figure 1.3 : Modifications du milieu hormonal liées à la ménopause**

Représentation schématique des changements de la concentration circulante d'oestrogènes et d'androgènes durant la pré-ménopause, la ménopause et la post-ménopause. La chute drastique de la concentration d'oestrogènes est bien établie, tandis que la chute des androgènes est moins bien caractérisée, principalement durant la phase de ménopause. LMP=last menstrual period

*Liu, Y., Ding, J., Bush, T. L., Longenecker, J. C., Nieto, F. J., Golden, S. H., and Szklo, M. (2001) Relative Androgen Excess and Increased Cardiovascular Risk after Menopause: A Hypothesized Relation. American Journal of Epidemiology 154(6), 489-494. (adaptation)*

Normalement, la cessation de la production ovarienne d'oestrogènes chez la femme en ménopause est accompagnée d'une augmentation de la production d'androgènes par les ovaires. En effet, il y a une redistribution de la contribution relative des sites de sécrétion

d'androgènes entre les phases de pré-ménopause et de ménopause, tel que présenté au tableau 1.1.

	pré-ménopause		ménopause	
	niveau	site de sécrétion (pourcentage relatif)	niveau moyen	site de sécrétion (pourcentage relatif)
Oestradiol	5-35 ng/dl	ovaires	3 ng/dl	Ovaires (diminution)
Testostérone	35-42 ng/dl	conversion périphérique (50%) glandes surrénales (25%) ovaires (25%)	35-42 ng/dl	conversion périphérique (40%) Glandes surrénales (10%) Ovaires (50%)

**Tableau 1.1 : Redistribution de la contribution relative des sites de sécrétion d'androgènes à la ménopause**

Les ovaires, durant la pré-ménopause, ne sont responsables que de 25% de la sécrétion d'androgènes contre 50% à la ménopause. De plus, les glandes surrénales ne produisent plus que 10% des androgènes durant la phase de ménopause contre 25% durant la pré-ménopause.<sup>16</sup> L'ablation chirurgicale des ovaires chez les femmes empêche donc l'augmentation de la sécrétion ovarienne d'androgènes lors de la chute des oestrogènes. Cette condition entraîne donc aussi une chute d'environ 50% de la concentration d'androgènes circulants comparativement à la condition de ménopause normale.<sup>132</sup>

Cette théorie concernant l'excès d'androgènes chez la femme en ménopause correspond aux données épidémiologiques disponibles et suggère fortement que les androgènes aussi bien que les oestrogènes possèdent un rôle important, autant au niveau de la physiopathologie que de la physiologie du système cardiovasculaire. En effet, il est possible que l'effet néfaste des androgènes au niveau du risque de MCV ne soit que contrecarré par les oestrogènes chez la femme pré-ménopausée et que l'effet des androgènes prenne le dessus lors de la chute drastique des oestrogènes endogènes lors de la ménopause, coïncidant avec le risque accru de développer des MCV chez les femmes post-ménopausées. De plus, cette hypothèse n'est pas incompatible avec les conclusions de

l'étude HERS, stipulant que l'HRT ne procurait pas de cardioprotection chez les femmes post-ménopausées souffrant de maladies coronariennes établies, puisque la moyenne d'âge des femmes dans cette étude était de 66,7 ans.<sup>13</sup> Chez ces femmes, probablement déjà dans leur phase de post-ménopause, les effets néfastes de l'excès relatif d'androgènes, débutant à la phase de ménopause, sont sans doute déjà présents. L'hypothèse soulevée par Liu et coll. (2001) permet donc de soupçonner une interrelation entre les oestrogènes et les androgènes au niveau de l'incidence des MCV. Mais des études à long-terme, débutant avant la chute des niveaux d'oestrogènes (pré-ménopause) et tenant compte des niveaux d'androgènes autant que d'oestrogènes, sont nécessaires afin de vérifier cette hypothèse.<sup>16</sup>

### **1.2.2 Avantages et inconvénients de l'hormonothérapie**

Le remplacement oestrogénique chez les femmes ménopausées entraîne l'atténuation significative des effets néfastes associés à cette condition, soit les bouffées de chaleur, les troubles de l'humeur, la sécheresse vaginale et les sueurs abondantes. L'HRT procure donc plusieurs effets bénéfiques aux femmes ménopausées, et la question de la prise d'oestrogènes ou non lors de l'apparition de la ménopause se pose pour toutes les femmes. Pour le praticien, la prescription d'HRT à une femme requiert une analyse particulière des bénéfices par rapport aux risques encourus. En effet, les bénéfices établis concernant la qualité de vie et la prévention de l'ostéoporose doivent être comparés aux risques de cette thérapie, notamment un risque accru de développer un cancer du sein et/ou de l'utérus ainsi qu'un risque plus élevé de thromboembolie veineuse et de maladies de la vésicule biliaire.<sup>12;7;44</sup>

Avant la ménopause, les oestrogènes naturels sont responsables de la capacité des os à retenir le calcium et les autres minéraux afin de favoriser la construction d'un squelette solide en inhibant la résorption osseuse. La diminution radicale du taux d'oestrogènes sanguin à la ménopause entraîne une période de perte osseuse rapide et augmente la susceptibilité aux fractures. En fait, plus de 50% de la perte osseuse chez les femmes post-ménopausées survient durant les premières années suivant l'apparition de la ménopause. L'HRT aide donc à prévenir l'ostéoporose chez les femmes post-ménopausées.<sup>7;40;41</sup> Une

diminution de 25 à 50% du risque de fractures a été démontrée chez les femmes post-ménopausées prenant des oestrogènes à cause d'une augmentation de la densité osseuse.<sup>42;43</sup> Cet effet protecteur cesse avec l'arrêt de la prise d'oestrogènes.<sup>7</sup> De plus, l'utilisation d'HRT pourrait aussi être profitable dans le traitement et la prévention de la maladie d'Alzheimer, de l'incontinence, du cancer du colon et de la dépression.<sup>7;44</sup>

### 1.2.3 Hormonothérapie et système cardiovasculaire

Malgré l'incertitude concernant les effets bénéfiques ou néfastes de l'HRT au niveau cardiovasculaire, un nombre substantiel d'effets positifs des oestrogènes sur certains facteurs de risques associés au développement des MCV ont été rapportés. Les mécanismes proposés pour la possible cardioprotection des oestrogènes incluent des modifications du profil lipidique, de l'hémostasie, du métabolisme des carbohydrates ainsi que de la réactivité et du tonus vasculaires.<sup>31</sup>

L'administration d'oestrogènes chez les femmes post-ménopausées améliore le profil lipidique en diminuant de 10% le niveau plasmatique de "*Low Density Lipoprotein*" (LDL) et en augmentant de 10% le niveau de "*High Density Lipoprotein*" (HDL). Les taux de LDL et de HDL constituent deux déterminants majeurs du risque de développement de MCV. L'effet des oestrogènes sur le niveau de lipides plasmatiques varie selon la méthode d'administration. La voie d'administration transdermale produit moins d'effet sur le taux circulant de HDL que la voie orale en raison de l'absence du phénomène de premier passage hépatique associé avec la dégradation de la lipase hépatique qui augmente le taux circulant de HDL.<sup>31</sup>

Les oestrogènes modifient de façon positive plusieurs facteurs hémostatiques normalement prédisposants pour le développement de MCV. En plus des changements favorables au niveau du métabolisme et de l'oxydation des lipoprotéines, de la perméabilité des cellules endothéliales pour les LDL, de la régulation de l'expression des cytokines et des molécules d'adhésion cellulaire, de la migration et de la prolifération des cellules musculaires lisses et endothéliales, et de l'agrégation plaquettaire,<sup>1;4-6;10;32-39</sup> les oestrogènes

entraînent une diminution du taux de fibrinogène, contribuant ainsi à retarder la formation de plaques athérosclérotiques et à réduire les risques de thrombose.<sup>31</sup>

Un autre mécanisme associé avec un rôle possiblement cardioprotecteur des oestrogènes consiste en une action bénéfique sur le métabolisme des carbohydrates. Les individus ayant des taux de glucose sanguin plus élevés que la normale, souffrant de résistance à l'insuline ou présentant une augmentation des niveaux circulants d'insuline ont plus de risques de développer des MCV. Les femmes post-ménopausées ont une augmentation du taux d'insuline et l'HRT provoque une diminution de la libération d'insuline après les repas ainsi qu'une augmentation de la sensibilité à l'insuline reliée à un taux de glucose sanguin plus faible, contribuant ainsi à une diminution de risques de MCV.<sup>31</sup>

Les oestrogènes affectent aussi de façon positive la réactivité et le tonus vasculaire. En effet, les oestrogènes induisent une vasodilatation en augmentant la production de prostacycline dans la paroi vasculaire, la production de thromboxane A<sub>2</sub> par les plaquettes, la production de monoxyde d'azote (NO) par la NO synthase endothéliale ainsi que par une action antagoniste au niveau des canaux calciques vasculaires. De plus, la prise d'oestrogènes inhibe la vasoconstriction dépendante du calcium et de l'endothéline-1. Ces effets vasodilatateurs des oestrogènes contribueraient à diminuer certains facteurs de risques de MCV.<sup>31</sup>

#### **1.2.4 Androgènes et hormonothérapie**

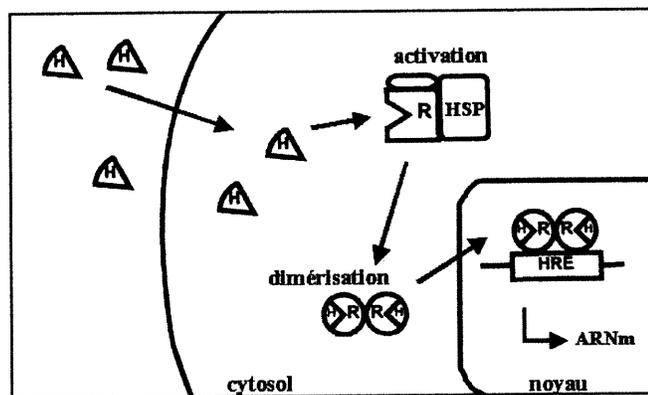
En plus des inconvénients relatifs à la perte des oestrogènes endogènes, les femmes post-ménopausées éprouvent aussi certains symptômes désagréables nuisant à leur qualité de vie, tels la perte de la libido et parfois une fatigue chronique, qui peuvent être éliminés par l'ajout de testostérone à l'hormonothérapie.<sup>132</sup> La thérapie de remplacement aux androgènes chez les femmes post-ménopausées, bien qu'encore très controversée, commence à devenir de plus en plus répandue. En effet, dans quelques pays, notamment les États-Unis et le Royaume-Uni, l'utilisation de la testostérone en combinaison avec les

oestrogènes comme thérapie de remplacement chez les femmes post-ménopausées est approuvée officiellement, même si des guides concernant une utilisation sécuritaire de la testostérone chez la femme manquent aux praticiens. De plus, en Australie et au Royaume-Uni, la supplémentation de testostérone chez les femmes est même utilisée afin de traiter le légendaire syndrome prémenstruel. Des préparations de testostérone sous forme d'implants sous-cutanés, ainsi que par voie orale et transdermale sont aussi présentement utilisées dans le cadre d'études cliniques.<sup>132</sup> Jusqu'à maintenant, il a été démontré que l'ajout d'androgènes à l'HRT procurait une amélioration plus importante de la densité osseuse que l'HRT traditionnelle. Il y a évidemment des inconvénients majeurs à l'utilisation d'androgènes avec l'HRT. Ceux-ci incluent le développement d'acné modéré à sévère, d'hirsutisme et d'alopécie androgénique.<sup>132</sup> Étant donné que l'utilisation d'androgènes chez les femmes semble déjà avoir pris de l'ampleur dans certains pays, il y a donc un immense besoin d'études cliniques et de recherche fondamentale sur les effets des androgènes chez la femme. Il est logique de supposer que l'HRT idéale reproduirait en tout point chez la femme post-ménopausée le milieu hormonal retrouvé chez les jeunes femmes, ce qui inclue aussi une faible concentration d'androgènes circulants. Mais, pour l'instant, compte tenu du manque de connaissances scientifiques à ce niveau, il est très important de demeurer prudent et d'effectuer les études nécessaires avant de songer à l'ajout de testostérone à l'HRT de façon généralisée. De plus, l'effet anabolisant des androgènes et les risques associés au développement d'hypertrophie ventriculaire ne sont pas à négliger.<sup>73;74;127</sup> Pourtant, certaines données expérimentales confirment le rôle potentiel pour les androgènes au niveau cardiovasculaire et cardiaque suggéré par les données épidémiologiques. En effet, de la même manière que les oestrogènes, les androgènes entraînent aussi une vasodilatation médiée par l'activation et l'augmentation de l'expression de la NO synthase endothéliale.<sup>87</sup> Cette vasodilatation par les androgènes coïncide avec des effets bénéfiques observés au niveau de la tension artérielle chez les hommes : les hommes hypertendus ont un taux d'androgènes plus faible que celui retrouvé chez les hommes normotendus et l'angine de poitrine peut être traitée avec des injections aiguës de testostérone.<sup>147</sup> Par contre, il a aussi été démontré que la dihydrotestostérone (DHT) a un effet proathérogénique en augmentant l'adhésion des monocytes aux cellules

endothéliales par une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules.<sup>148</sup> Cet effet proathérogénique pourrait être en partie responsable de l'incidence plus élevée de maladies coronariennes chez les hommes en comparaison aux femmes pré-ménopausées.<sup>87</sup>

### 1.3 Mécanismes d'action des hormones sexuelles : Voie génomique et non-génomique

Bien qu'une interaction directe entre les hormones sexuelles (HS) et l'ADN soit stéréochimiquement possible,<sup>45</sup> les effets des HS sont principalement médiés par la liaison à leurs récepteurs respectifs, soit les récepteurs aux oestrogènes (ER) pour les oestrogènes et le récepteur aux androgènes (AR) pour les androgènes. Ces récepteurs sont des facteurs de transcription régulant l'expression de certaines protéines en contrôlant la transcription des gènes codant pour ces protéines.<sup>46</sup> Ceci correspond à l'effet génomique, qui constitue le modèle classique de l'action des HS.



**Figure 1.4 : Modèle classique de l'action des hormones sexuelles**

Le modèle classique de l'action des hormones sexuelles, correspondant à l'effet génomique, stipule qu'en absence de ligand, le récepteur est séquestré dans un complexe inhibiteur composé de plusieurs protéines. La liaison de l'hormone entraîne la libération de ces protéines inhibitrices, les protéines de choc thermique ("*heat shock proteins*"; HSP), un changement dans la conformation du récepteur, permettant la dimérisation ainsi que la liaison haute-affinité du complexe récepteur-ligand avec son élément de réponse sur l'ADN des gènes cibles, au niveau de l'élément de réponse aux hormones ("*Hormone Response Element*"; HRE).

Weigel, N. W. and Zhang, Y. *Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. Journal of Molecular Medicine* 76, 469-479. 2001. (adaptation)

Considéré comme le seul mécanisme d'action des HS dans les années 80, ce modèle stipule qu'en absence de ligand, le récepteur est séquestré dans un complexe inhibiteur composé de plusieurs protéines. La liaison de l'hormone entraîne la libération de ces protéines inhibitrices, les protéines de choc thermique ("heat shock proteins"; HSP), un changement dans la conformation du récepteur, permettant la dimérisation ainsi que la liaison haute-affinité du complexe récepteur-ligand avec son élément de réponse sur l'ADN des gènes cibles. Les séquences d'ADN impliquées dans la liaison avec les ER sont appelées éléments de réponse aux oestrogènes ("*Estrogen Response Element*"; ERE) et celles reliées au AR, sont appelées élément de réponse aux androgènes ("*Androgen Response Element*"; ARE).<sup>47</sup>

Plusieurs données expérimentales obtenues dans différents types cellulaires démontrent l'existence d'effets médiés par les HS ne pouvant être expliqués par le modèle génomique classique.<sup>45</sup> Ces effets non-génomiques semblent dus à des récepteurs des HS localisés au niveau de la membrane plasmique et possèdent les caractéristiques suivantes : 1) trop rapides (secondes à minutes) pour être reliés à des modifications au niveau de l'ARN messager (ARNm) et de la synthèse protéique, 2) peuvent être observés même dans des cellules hautement spécialisées n'accomplissant pas de synthèse protéique (par exemple les spermatozoïdes), 3) peuvent être produits par des hormones couplées à des protéines de haut poids moléculaire comme l'albumine sérique bovine (BSA), empêchant ainsi l'entrée de l'hormone dans la cellule, 4) ne sont pas bloqués par des inhibiteurs de la synthèse d'ARNm (actinomycine-D) ou de protéines (cycloheximide).<sup>48</sup>

Les hormones sexuelles peuvent agir de plusieurs manières sur les cellules cibles, dépendamment de leur lieu de synthèse. L'E<sub>2</sub> peut être synthétisé localement par certaines cellules grâce à l'enzyme P450 aromatisase qui aromatisse les précurseurs androgéniques en oestrogènes. (Figure 1.5; p. 25a) Les oestrogènes provenant de la production périphérique sont biologiquement actifs localement, impliquant une action paracrine, autocrine ou intracrine.<sup>87,130</sup>

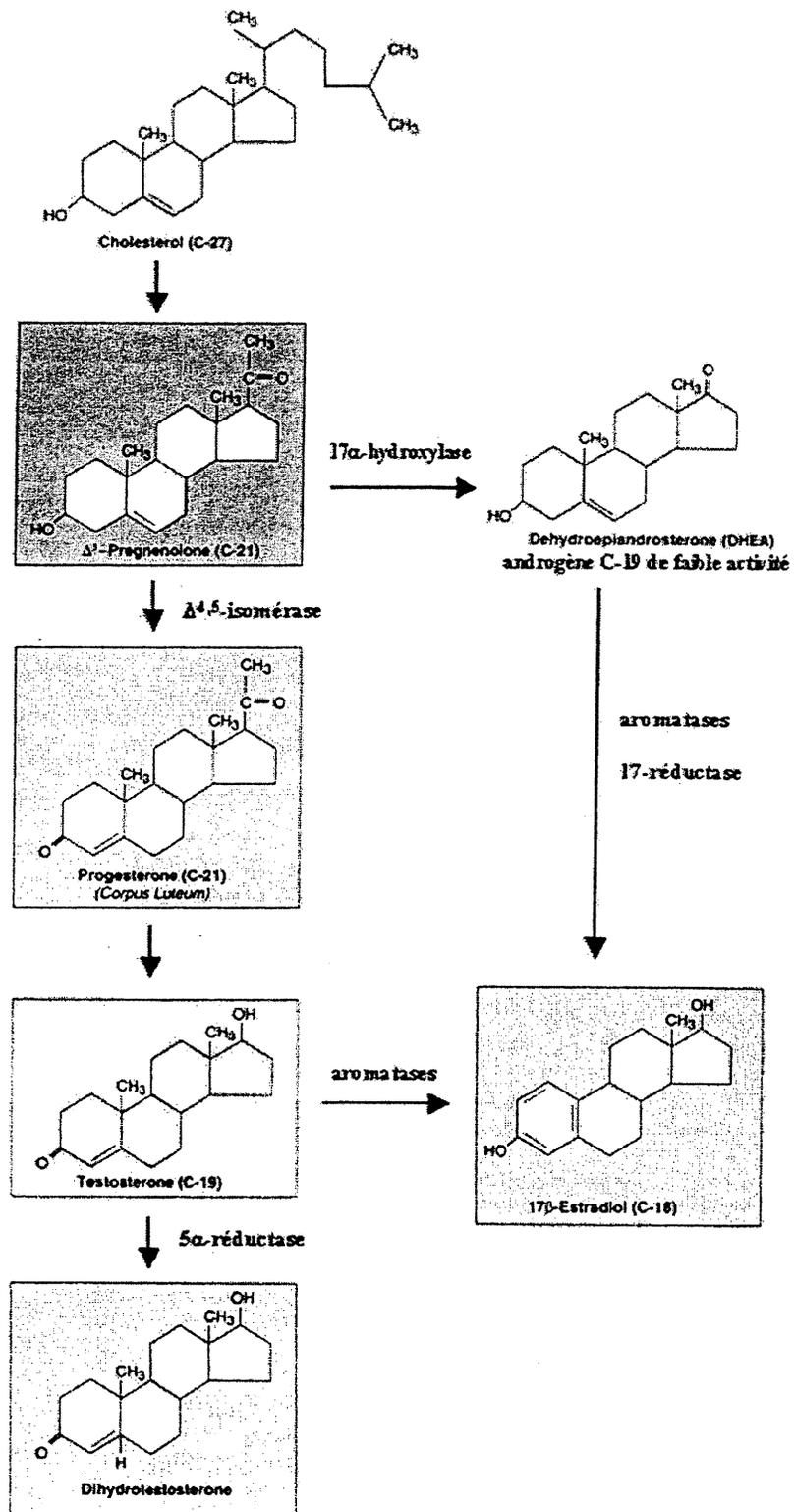
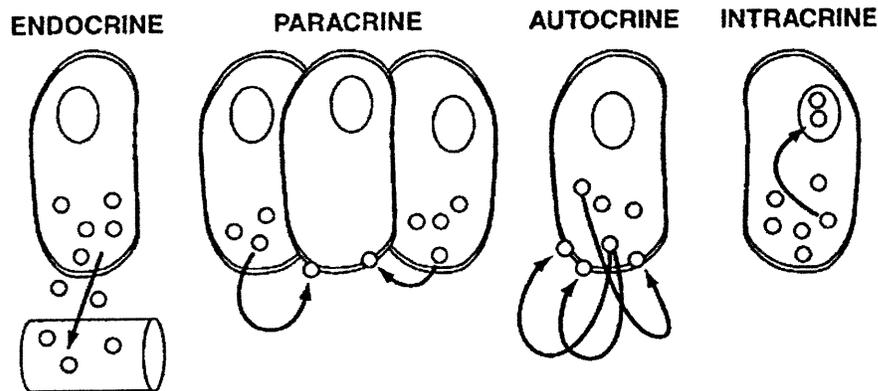


Figure 1.5 : Schéma de la synthèse des hormones sexuelles



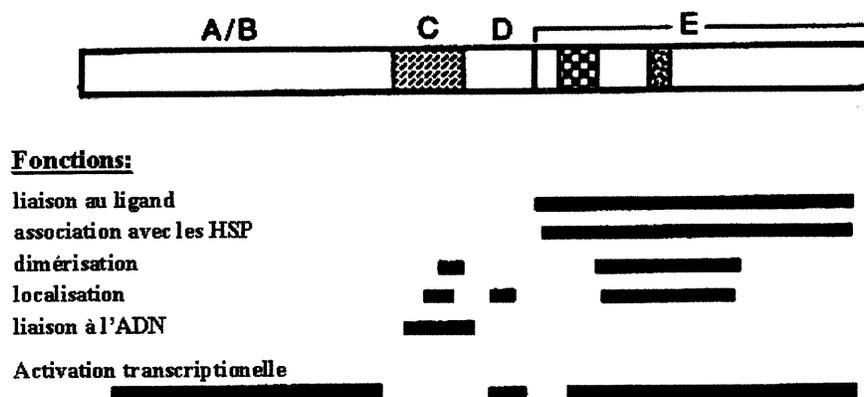
**Figure 1.6 : Schéma représentant l'action hormonale endocrine, paracrine, autocrine et intracrine**

## 1.4 Récepteurs aux hormones sexuelles : structure, fonction et localisation

### 1.4.1 Structure générale

Les ERs et AR font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires, tout comme le récepteur à la progestérone (PR), aux glucocorticoïdes (GR), aux hormones thyroïdiennes (TR) ainsi qu'aux vitamines A et D<sub>3</sub>.<sup>49-53</sup> Comme pour la plupart des facteurs de transcription, les récepteurs des HS (RHS) sont constitués de 4 domaines fonctionnels principaux (Figure 5A), soit la région N-terminale hypervariable (région A/B) contenant le domaine "*activation function-1*" (AF-1) responsable de l'activité transcriptionnelle indépendante du ligand, la région centrale hautement conservée liant l'ADN (région C), la région charnière (région D) contenant une région responsable de la localisation nucléaire, et la région C-terminale (région E/F) liant le ligand, qui comprend aussi le domaine "*activation function-2*" (AF-2) responsable de l'activité transcriptionnelle dépendante du

ligand ainsi que des régions hautement conservées responsables, entre autres, de la liaison avec les HSP, de la dimérisation, de la localisation nucléaire et de la transactivation.<sup>52;54;55</sup>



**Figure 1.7 : Structure schématique d'un facteur de transcription**

Structure générale d'un facteur de transcription présentant les différentes régions et leur fonction respective.

*Ing NH, O'Malley BW. The Steroid Hormone Superfamily: Molecular Mechanisms of Action. In: Weintraub BD, ed. Molecular Endocrinology: Basic Concepts and Clinical Correlations. New-York: Raven Press, Ltd., pp. 195-215. 1995.*

## 1.4.2 Récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes

En 1962, le laboratoire d'Elwood Jensen a découvert l'existence d'un ER intracellulaire et a participé de façon majeure, avec le laboratoire de Jack Gorski, à l'élaboration du modèle classique de l'action des oestrogènes.<sup>56;57</sup> Le ER a ensuite été cloné et séquencé par deux groupes en 1986.<sup>58;59</sup> Jusqu'à 1995, on a cru qu'il n'existait qu'un seul récepteur aux oestrogènes et que ce récepteur était indispensable à la survie. En 1993, une lignée de souris transgéniques knockout pour le ER a été créée,<sup>60-62</sup> et bien que cette souris ne possède pas de ER, une liaison spécifique des oestrogènes dans certains tissus a quand même pu être observée. Gustafsson et coll., en 1996, ont rapporté l'isolation du premier clone d'ADN complémentaire (ADNc) pour un second récepteur aux oestrogènes, ER $\beta$ , chez le rat.<sup>63</sup> Le ER découvert par Jensen en 1962 a alors été rebaptisé ER $\alpha$ . ER $\beta$  a ensuite été identifié chez l'humain<sup>64</sup> et la souris<sup>65</sup>. Les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  du

récepteur aux oestrogènes humain proviennent de gènes différents, soit le chromosome 6 pour ER $\alpha$  et le chromosome 14 pour ER $\beta$ , et possèdent des structures similaires.<sup>50</sup>

Il y a environ 97% d'identité de séquence entre ER $\alpha$  et ER $\beta$  dans la région liant l'ADN (région C), 60% dans les régions liant l'oestrogène (région D/E/F),<sup>50;54;66</sup> contre seulement 18% dans la région N-terminale (région A/B).<sup>54</sup> Au point de vue pharmacologique, les différences observées dans la structure des deux isoformes du récepteur aux oestrogènes ont une importance significative, car il devrait être possible de développer des ligands spécifiques pour un seul des deux récepteurs.<sup>67</sup> Une différence importante entre ER $\alpha$  et ER $\beta$  est leur réponse distinctive aux antioestrogènes synthétiques. Certains de ces ligands sont des agonistes partiels de ER $\alpha$ , mais agissent comme des antagonistes purs pour ER $\beta$ . Cette différence concorde avec la faible similitude de la région N-terminale (région A/B) et de la région liant le ligand (région E/F) entre ER $\alpha$  et ER $\beta$ .<sup>55</sup> Le développement de ligands spécifiques pour ER $\alpha$  et ER $\beta$ , conservant les effets bénéfiques des oestrogènes au niveau du système cardiovasculaire, des os et du cerveau, mais ne possédant pas les effets mitogènes et carcinogènes au niveau de la glande mammaire et de l'utérus, représente un défi majeur pour l'industrie pharmaceutique.<sup>54</sup>

Le AR, quant à lui, a été identifié en 1969 par Fang et coll.,<sup>68</sup> caractérisé au niveau du muscle squelettique (1976) et cardiaque (1978) par Krieg et coll.,<sup>69</sup> et le premier clone d'ADNc a été réalisé en 1988 par Chang et coll.<sup>70</sup> Au point de vue structural et fonctionnel, AR est très similaire aux autres membres de la famille des RHS dans la région liant l'ADN (région C), ainsi que dans la région liant l'hormone (région D/E/F) contenant un domaine AF-2. La région N-terminale (région A/B) est aussi hypervariable, donc peu conservée, et contient un domaine AF-1.<sup>71-73</sup> Chez l'humain, la région du AR liant l'ADN présente 82% d'identité de séquence avec celle du PR, 79% avec celle du GR, 59% avec celle des ER et 40-50% avec celle des autres membres de la famille des récepteurs nucléaires.<sup>74</sup> La testostérone et la dihydrotestostérone (DHT), un métabolite actif de la testostérone constituent les principaux ligands du AR, dont l'unique gène est localisé sur le chromosome X chez les mammifères.<sup>184</sup>

### 1.4.3 Localisation tissulaire

Les effets physiologiques et physiopathologiques des HS sont étudiés dans presque tous les tissus et systèmes des mammifères, comme par exemple au niveau du système reproducteur, nerveux et cardiovasculaire ainsi que dans les cellules cancéreuses, notamment au niveau de la glande mammaire, de l'utérus et de la prostate.<sup>75;76</sup> La grande variété de ces effets correspond à la distribution tissulaire des RHS. En effet, des études réalisées chez plusieurs espèces, entre autres chez le rat, la souris, le singe, et l'humain, ont permis de détecter la présence et de déterminer la localisation des RHS dans une grande variété de tissus.<sup>75;77-80</sup>

Plusieurs équipes ont démontré que l'ARNm de ER $\alpha$  était exprimé de façon prédominante dans la glande mammaire, l'utérus, les testicules, l'hypophyse, le foie, le rein, le coeur et le muscle squelettique. Selon ces mêmes études, l'ARNm de ER $\beta$  présente une distribution plus restreinte et est principalement localisé dans les ovaires et la prostate. Dans d'autres tissus comme la glande thyroïde, les glandes surrénales, les os et plusieurs régions cérébrales, l'ARNm des deux isoformes a été détecté de façon similaire.<sup>75;81;82</sup> De plus, dans les tissus exprimant les deux isoformes du récepteur aux oestrogènes une localisation spécifique selon le type cellulaire est généralement observée.<sup>81</sup>

Il y a aussi des différences entre les espèces concernant la localisation tissulaire des RHS. Chez la souris non transgénique de la lignée ERKO, l'abondance relative l'ARNm codant pour chacun des deux isoformes des ER a été déterminée dans plusieurs tissus. Dans l'utérus, le foie, et le coeur, la présence des deux isoformes des ER a été détectée, mais l'expression de ER $\alpha$  est prédominante dans ces tissus. ER $\beta$  a été détecté de façon prédominante dans les poumons des souris des deux sexes et dans les ovaires. La présence de ER $\beta$  a aussi été démontrée, mais de façon moins importante dans la prostate et le cerveau. Contrairement à ce qui a été observé chez le rat, l'ARNm codant pour ER $\beta$  n'a pas été détecté dans l'aorte, la glande mammaire, l'hypophyse, les testicules, le rein, la rate et le muscle squelettique chez la souris.<sup>82</sup>

Depuis 1977, le cœur est identifié comme un organe cible des oestrogènes.<sup>83</sup> La présence de ER fonctionnels au niveau des myocytes et des fibroblastes cardiaques de rat nouveau-nés (2 jours) a été démontrée par Grohé et coll. (1997).<sup>84</sup> Chez l'humain, au niveau cardiaque, la présence de ER $\alpha$  a été rapportée au niveau du myocarde et des fibres de Purkinje, tandis que la présence d'ER $\beta$  n'a été rapportée que dans le myocarde.<sup>85</sup> Jankowski et coll. (2001) ont démontré que l'ARNm codant pour ER $\alpha$  était peu exprimé dans les quatre compartiments cardiaques chez le rat nouveau-nés (4 jours) contrairement à l'adulte, chez qui l'expression de ER $\alpha$  est 6 à 18 fois plus élevée dans les oreillettes et 3 à 4 fois plus élevée dans les ventricules. De façon contraire à l'isoforme  $\alpha$ , l'expression de l'ARNm codant pour ER $\beta$  est à son niveau le plus élevé dans l'oreillette gauche des rats de 4 jours et son expression est de 3 à 4 fois plus faible dans les trois autres compartiments cardiaques tandis que chez le rat adulte, l'expression de ER $\beta$  est environ 20 fois plus faible dans l'oreillette gauche et 2 à 4 fois plus faible dans les autres compartiments cardiaques par rapport au rat nouveau-né.<sup>86</sup> Chez le rat, l'expression de l'ARNm codant pour ER $\alpha$  est donc plus élevée dans le cœur de l'adulte que du nouveau-né, contrairement à l'isoforme  $\beta$  qui diminue chez l'adulte par rapport au nouveau-né. Chez la souris adulte, au niveau cardiaque, il a été démontré que l'ARNm codant pour ER $\alpha$  était plus abondant comparativement à l'ARNm codant pour ER $\beta$ .<sup>82</sup> L'isoforme  $\alpha$  du récepteur aux oestrogènes semble donc prédominant au niveau du cœur de souris adulte et il semble y avoir des modifications dans l'abondance relative des deux isoformes des récepteurs aux oestrogènes durant le développement.

La distribution tissulaire du AR est aussi variée que la distribution tissulaire des ER. AR est présent au niveau de la peau, des os, de la vessie, de la glande thyroïde, des tubules rénaux, du foie, des glandes surrénales, de l'hypophyse, des cellules musculaires squelettiques, lisses et cardiaques ainsi qu'au niveau du système nerveux central.<sup>47,81</sup> Une différence importante existe entre les tissus cibles du système reproducteur et les tissus cibles non-reliés au système reproducteur. En effet, l'expression des RHS est généralement 10 à 50 fois plus faible dans les tissus cibles non-reliés au système reproducteur

comparativement au système reproducteur. De plus, il y a peu ou pas de dimorphisme sexuel concernant l'expression des RHS dans la plupart des tissus non-reproducteurs, comme par exemple dans le cœur, les os, les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires et les macrophages.<sup>82;87</sup>

#### **1.4.4 Localisation sous cellulaire : importance des récepteurs membranaires**

Tel que décrit dans les sections précédentes, les RHS sont des facteurs de transcription faisant partie de la famille des récepteurs nucléaires. Ces récepteurs ont toujours été considérés, selon le modèle classique d'activation dépendante de l'hormone, comme étant séquestrés au niveau du cytosol et/ou du noyau et liés aux HSP. Lorsqu'ils sont dans cet état non-fonctionnel, les RHS sont appelés aporécepteurs.<sup>52</sup> Lors de la liaison de l'hormone, les aporécepteurs sont libérés des HSP, dimérisent et se lient ensuite à l'ADN dans le noyau pour moduler la transcription des leurs gènes cibles. La localisation sous cellulaire des aporécepteurs a été un sujet de controverse durant environ 10 ans. Il est maintenant accepté de tous que les aporécepteurs aux minéralocorticoïdes, aux glucocorticoïdes et aux androgènes sont cytosoliques et que les aporécepteurs aux estrogènes et à la progestérone sont nucléaires.<sup>52;167;168</sup> Pourtant depuis un certain nombre d'années, des effets non-génomiques associés à des RHS membranaires ont été rapportés.

Dans l'utérus, la présence d'un ER membranaire couplé à une cascade de signalisation sous cellulaire a été rapportée pour la première fois il y a plus de 20 ans par Pietras et Szego.<sup>88;89</sup> Depuis, les indices s'accumulent concernant les effets non-génomiques des HS dans une grande variété de tissus et de types cellulaires, comme la glande mammaire, les os, l'utérus et les neurones.<sup>90-92</sup> Par exemple, dans les années 80, la liaison de  $17\beta$ -oestradiol ( $E_2$ ) marqué au tritium ( $[^3H]-E_2$ ) a été démontrée au niveau de la membrane plasmique utérine et de la membrane plasmique d'hépatocytes chez le rat, ainsi que dans des cellules mammaires cancéreuses humaines en utilisant de l' $E_2$  couplé au BSA ainsi qu'à la fluorescéine (FITC). Le complexe  $E_2$ -BSA-FITC, a été déplacé de la

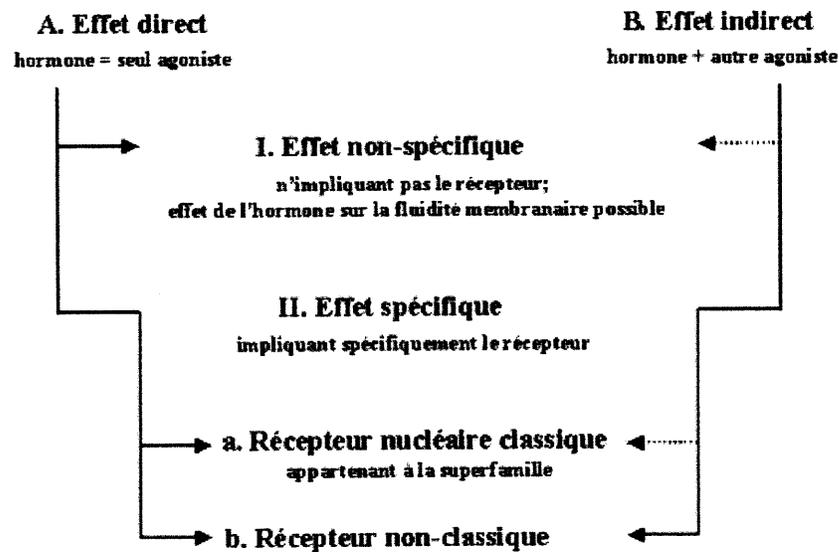
membrane plasmique par l'E<sub>2</sub>, l'E<sub>2</sub>-BSA ainsi que le tamoxifène mais pas par la progestérone, le cortisol ou la testostérone, confirmant ainsi la spécificité de la liaison membranaire.<sup>91</sup>

De plus, des altérations au niveau des courants calciques ont été rapportées entre autres dans les entérocytes (augmentation), neurones (diminution) et ostéoblastes (augmentation) de rat, ainsi que des modifications dans le niveau d'AMP cyclique (AMPc) dans des entérocytes de rat, des fibroblastes prostatiques humains, et des cellules musculaires lisses provenant de vaisseaux pulmonaires de rat, et ce, en moins de 5 minutes. Ces études prouvent que l'E<sub>2</sub> peut provoquer des réponses rapides par des voies intracellulaires associées au calcium et à l'AMPc.<sup>91</sup> Des études ont aussi démontré que l'E<sub>2</sub> peut réguler les fonctions cellulaires en altérant la conductance ionique et le potentiel membranaire. En effet, dans les neurones, l'E<sub>2</sub> provoque des dépolarisations et des hyperpolarisations en modifiant la conductance des canaux potassiques dépendant du calcium (I<sub>K-Ca</sub>), par l'altération des niveaux d'AMP et de GMP cycliques.<sup>91</sup>

L'E<sub>2</sub> induit une vasodilatation en augmentant la production de NO par la eNOS dans les cellules endothéliales vasculaires. Cette vasodilatation NO-dépendante constitue une action non-génomique de l'E<sub>2</sub> puisqu'elle est médiée par ER $\alpha$ , atténuée par des antioestrogènes et n'est pas empêchée par des inhibiteurs de la synthèse d'ARNm (actinomycine-D) ou de protéines (cycloheximide).<sup>149</sup> Dans ces mêmes cellules endothéliales, Chambliss et coll. (2000) ont démontré une localisation membranaire de ER $\alpha$  au niveau des caveolae,<sup>149</sup> et le groupe de Lisanti (1999) a démontré que l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  était augmentée par la cavéoline-1.<sup>150;151</sup> Plusieurs membres de la famille des MAP kinases sont séquestrés dans les caveolae, qui sont des invaginations de la membrane plasmique abondamment tapissées de cavéoline et servant à compartimentaliser la transduction de signaux extracellulaires.<sup>150</sup>

Les effets non-génomiques reliés aux androgènes sont moins documentés que pour les oestrogènes, mais semblent quand même possibles dans certains tissus.<sup>45a</sup> Des effets rapides de la testostérone et de la dihydrotestostérone (DHT) couplées au BSA sur les

courants calciques dans les cellules de Sertoli, entre autres, ont été rapportés et suggèrent l'implication d'un récepteur membranaire. De plus, dans plusieurs cas, ces effets sont inhibés par l'ajout d'un anti-androgène non stéroïdien, l'hydroxyflutamide, montrant l'implication potentielle du AR.<sup>45a;48;93</sup> Même si l'existence de récepteurs hormonaux membranaires est désormais acceptée de façon générale, la structure moléculaire de ces récepteurs est encore inconnue.<sup>169</sup> Une classification des effets non-génomiques des hormones sexuelles a été proposée et discutée au "*First International Meeting on Rapid Responses to Steroid Hormones*", tenu à Mannheim en 1998, et permet une description plus adéquate des effets non-génomiques observés dans les différents types cellulaires, souvent à l'aide de techniques différentes.<sup>45a</sup>



**Figure 1.8 : Classification de Mannheim concernant les effets non-génomiques des hormones sexuelles**

Falkenstein E, Norman AW and Wehling M. Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2072-2075. 2000. (adaptation)

### 1.4.5 La progestérone et ses récepteurs

La progestérone détient un rôle prédominant au niveau du système reproducteur féminin, principalement durant l'ovulation, l'implantation et la grossesse. La progestérone, sécrétée principalement par les ovaires, possède une double fonction dans les cellules cibles comme les cellules utérines et de la glande mammaire. En effet, cette hormone entraîne à la fois une stimulation de la prolifération et une inhibition de la croissance cellulaire.<sup>176, 177</sup> Les bénéfices de l'ajout de progestérone à l'HRT sont bien établis en ce qui concerne le risque de cancer de l'utérus associé avec la prise d'oestrogènes.<sup>178</sup> Pour le risque de cancer du sein, les données sont contradictoires et semblent plus difficile à interpréter. En effet, dans certaines études, la progestérone a été associée avec une effet antiprolifératif des cellules mammaires cancéreuses, alors que dans d'autres études, des résultats opposés ont été obtenus.<sup>179</sup>

Peu de données sont présentement disponibles quant aux mécanismes moléculaires de l'action de cette hormones dans les différents tissus cibles non-reliés au système reproducteur. L'action de la cette hormone est médiée par le récepteur de la progestérone (PR) existant sous deux formes, soit le PR-A (81 kDa) et le PR-B (115 kDa), qui sont produits à partir du même gène chez l'humain et leur expression est stimulée par l'E<sub>2</sub>.<sup>176</sup> Au niveau cardiovasculaire, la présence du PR a été rapportée entre autres au niveau des cellules endothéliales vasculaires<sup>180</sup> et des fibroblastes cardiaques.<sup>181</sup> Les données disponibles suggèrent que le PR-A agisse comme un activateur et le PR-B comme un répresseur de l'action de la progestérone. De plus, le PR-A semble aussi diminuer la réponse des autres récepteurs hormonaux, comme par exemple le AR, le GR et les ERs à leurs ligands respectifs.<sup>176</sup> Il apparaît maintenant clair que le rôle prédominant du PR-A soit de moduler l'action de l'E<sub>2</sub> en empêchant ER $\alpha$  d'activer la transcription.<sup>182</sup> La complexité de la régulation hormonale apparaît de plus en plus à mesure que les recherches dans ce domaine progressent, et le rôle de la progestérone au niveau du système cardiovasculaire et du cœur reste encore à être élucidé.

## 1.5 Complexité de la régulation par les hormones sexuelles

L'avancement scientifique des dernières années a permis l'élaboration d'un modèle plus complexe de la régulation hormonale comparativement au modèle classique. Tout d'abord, la découverte d'un deuxième isoforme des récepteurs aux oestrogènes, le ER $\beta$ , a forcé la communauté scientifique à réévaluer la conception des effets oestrogéniques.<sup>94</sup> En effet, sa présence abondante au niveau de l'appareil urogénital masculin a permis de porter l'attention sur les rôles physiologiques des oestrogènes chez l'homme.<sup>55</sup> De plus, la similitude au niveau de la région liant l'ADN entre ER $\alpha$  et ER $\beta$  (environ 97%) suggère que ces deux isoformes puissent réguler l'expression des mêmes gènes cibles. Cependant, leur fonction d'activation AF-1, localisée dans la région N-terminale hypervariable, sont très différentes suggérant que l'activation transcriptionnelle des gènes sous le contrôle de ces deux récepteurs puisse être différente.<sup>95</sup>

De plus, lorsqu'ils sont coexprimés *in vitro*, ER $\alpha$  et ER $\beta$  forment préférentiellement des hétérodimères.<sup>96,97</sup> Ceci indique une convergence possible entre les voies de signalisation des deux isoformes du ER. Pourtant, une constatation majeure doit être prise en considération dans l'évaluation des rôles physiologiques des hétérodimères ER $\alpha$ /ER $\beta$ . L'hétérodimère ER $\alpha$ /ER $\beta$  pourrait avoir un effet physiologique différent de celui des homodimères, mais l'évidence d'une coexpression des deux récepteurs au niveau d'une même cellule native n'a pas encore été rapportée définitivement.<sup>75</sup>

ER $\beta$  peut interagir avec son élément de réponse sur l'ADN indépendamment de la présence d'hormone et ainsi, atténuer l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$ . Il a donc été proposé que dans les tissus où les deux isoformes sont présents, la réponse à l'E<sub>2</sub> pourrait dépendre du rapport ER $\alpha$  :ER $\beta$ . En effet, Gustafsson et coll. (2000) ont proposé qu'ER $\beta$  joue un rôle de modulateur de l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  au niveau de l'utérus chez la souris.<sup>98</sup> Les RHS peuvent aussi moduler l'expression génique par des mécanismes indépendants de la liaison avec leur élément de réponse sur l'ADN, par une convergence positive ou négative avec l'activité d'autres facteurs de transcription. La transcription est

donc stimulée par le contact protéine-protéine du RHS activé avec un facteur de transcription adjacent. Ce mécanisme, appelé "*cross-talk*" transcriptionnel et démontré en 1996 par Katzenellenbogen, permet d'expliquer l'expression E<sub>2</sub>-dépendante pour des gènes ne possédant pas de ERE.<sup>99;100</sup> Par exemple, plusieurs membres de la famille des RHS, dont ER $\alpha$ , ER $\beta$  et AR, peuvent interagir avec le facteur de transcription AP1.<sup>55;101</sup> AP1 est un homo- ou hétérodimère de Jun et Fos.<sup>72</sup> Il est aussi intéressant de noter que les différences entre ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont importantes dans ce processus de transactivation avec un élément AP1, nommé voie alternative d'activation des RHS. En effet, le complexe ER $\alpha$ -AP1 stimule la transcription des gènes cibles autant en présence d'anti-oestrogènes que d'oestrogènes. Par contre, le complexe ER $\beta$ -AP1 stimule la transcription en présence d'anti-oestrogènes et inhibe la transcription en présence d'oestrogènes créant donc une situation de pharmacologie inversée.<sup>80</sup> Le rapport ER $\alpha$ :ER $\beta$  est donc probablement un déterminant majeur de la réponse oestrogénique globale.

Au niveau des myocytes cardiaques, il a récemment été démontré par le groupe de Neyses (2001) que l'activation de ER $\alpha$  et ER $\beta$  par l'E<sub>2</sub> entraînait l'activation du facteur de transcription Egr-1 ("*early growth response gene-1*") par l'activation de la voie de signalisation ERK1/2 ("*extracellular signal-regulated kinase 1/2*"), mais non de la p38 MAPK ("*mitogen activated protein kinase*"), et en impliquant l'élément de réponse au sérum ("*serum response element*"; SRE) dans le promoteur de Egr-1, mais pas l'élément de réponse AP1 ni le ERE.<sup>126</sup> Ces résultats démontrent qu'une action rapide et non-nucléaire des récepteurs aux oestrogènes peut être impliquée dans l'activation transcriptionnelle génomique de gènes importants de la physiologie cardiovasculaire, et ce, de façon indirecte par l'activation du facteur de transcription Egr-1, qui régule entre autres l'expression de la ICAM-1 ("*intercellular adhesion molecule-1*"), du PDGF- $\alpha$  ("*platelet-derived growth factor- $\alpha$* "), du TNF $\alpha$  ("*tumor necrosis factor- $\alpha$* "), du TGF $\beta$ 1 et - $\beta$ 3 ("*transforming growth factor- $\beta$ 1 and - $\beta$ 3*"), de la SOD1 ("*superoxide dismutase-1*") ainsi que l'isoforme  $\alpha$  de la chaîne lourde de la myosine. Egr-1 semble impliqué, entre autres, dans la réparation des lésions vasculaires et dans l'hypertrophie ventriculaire.<sup>126</sup>

De plus, des facteurs de croissance comme le facteur de croissance épidermique ("*epidermal growth factor*"; EGF),<sup>102-105</sup> des activateurs des protéines kinases (PKA et PKC) et les MAP kinases peuvent stimuler l'activité transcriptionnelle des RHS de manière ligand-indépendante par l'entremise de la phosphorylation, permettant ainsi au RHS de se lier à son élément de réponse sur l'ADN.<sup>55;101</sup> En effet, les RHS sont des phosphoprotéines et la modification de l'activité kinase/phosphatase intracellulaire module leur activité. Il y a donc une convergence entre les voies génomique et non-génomique reliées à l'activité des HS. Par exemple, dans plusieurs types cellulaires comme les cellules ostéoblastiques, les fibroblastes cardiaques, et certaines cellules cancéreuses cérébrales humaines, l'E<sub>2</sub> active les MAP kinases, qui elles, stimulent l'activité de différents facteurs de transcription ou facteurs de croissance, entraînant une augmentation de la concentration d'AMPc ainsi que la phosphorylation et l'activation des ER.<sup>91</sup> Pour ajouter à la complexité de la régulation hormonale, le contact du récepteur avec l'appareil transcriptionnel nécessite la présence de plusieurs cofacteurs protéiques, pouvant agir comme coactivateurs (par exemple : SRC-1, CBP/p300, calmoduline) ou comme corépresseurs (par exemple : NcoR, SMRT et BRCA1).<sup>54;55;106;107</sup> Certains de ces coactivateurs et corepresseurs peuvent moduler l'activité transcriptionnelle par l'acétylation ou la déacétylation des histones au niveau de la chromatine. L'acétylation des histones est directement liée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle. Plusieurs cofacteurs tels CBP/p300 et SRC-1 possèdent une activité histone acétyltransférase (HAT) intrinsèque permettant d'augmenter l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcriptions associés, entre autres ER et AR. Les corepresseurs, tels que NcoR et SMRT, possèdent une activité histone déacétylase, jouant le rôle contraire au niveau de l'activité transcriptionnelle.<sup>108</sup> Certains cofacteurs protéiques sont, eux aussi, des phosphoprotéines et peuvent moduler de façon indirecte l'activité transcriptionnelle de RHS par leur phosphorylation.<sup>101</sup>

## 1.6 Contexte et Objectifs de l'étude

Malgré l'importance évidente des HS au niveau de la physiologie et de la physiopathologie cardiaque soutenue par les données épidémiologiques, peu d'informations sont disponibles concernant les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces différences et les mécanismes moléculaires de l'action des HS responsables de leurs effets au niveau du muscle cardiaque lui-même. Le laboratoire du Dr Céline Fiset a récemment démontré des différences mâle-femelle importantes au niveau de la repolarisation ventriculaire chez la souris adulte. En effet, un courant potassique jouant un rôle prépondérant au niveau de la repolarisation ventriculaire chez la souris est diminué significativement chez les femelles, coïncidant avec une repolarisation ventriculaire plus lente chez ces dernières. L'expression du canal responsable de ce courant est aussi diminuée chez les femelles au niveau de l'ARNm et de la protéine (Annexe 2).<sup>109</sup> L'hypothèse soulevée par le laboratoire du Dr Fiset stipule que cette différence entre les sexes au niveau de la repolarisation ventriculaire est possiblement attribuable au milieu hormonal distinct entre les mâles et les femelles. Afin d'étudier de façon plus approfondie les mécanismes moléculaires responsables de l'action des HS au niveau cardiaque chez la souris adulte, il est primordial de connaître la localisation précise des récepteurs hormonaux dans les myocytes ventriculaires de souris adultes mâles et femelles ainsi que de développer un modèle de souris gonadectomisées dans le but de déterminer l'expression de ces récepteurs au niveau du cœur en réponse à l'ovarectomie et à l'orchidectomie et ultimement au remplacement hormonal.

L'objectif principal de ce projet de recherche était donc de déterminer la localisation sous cellulaire des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes au niveau ventriculaire chez les souris adultes mâles et femelles. Le second objectif consistait à déterminer les effets de la gonadectomie sur l'expression ventriculaire de ces récepteurs.

## CHAPITRE 2- MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Modèle animal

Des souris femelles CD1 (Charles River, St-Constant, Qc) ont été ovariectomisées (OVX) à l'âge de 37 jours, soit une semaine avant le premier cycle oestral qui survient vers le 42<sup>e</sup> jour de vie. Après anesthésie par une injection intramusculaire (i.m.) d'un mélange de kétamine (100 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg), les ovaires ont été excisés via une unique incision dorsale au niveau de la peau et une incision du feuillet musculaire à environ 2 cm de chaque côté, parallèlement à la colonne vertébrale. Suite à l'ablation des ovaires, le feuillet musculaire et la peau ont été suturés séparément. De la buprénorphine (0,1 mg/kg i.m.) a ensuite été administrée pour l'analgésie. Durant la chirurgie et le réveil, les souris ont été maintenues à une température d'environ 37°C afin de prévenir l'hypothermie. Les souris utilisées comme témoin ("*sham-operated*"; Sh) ont subi le processus de la chirurgie sans que les ovaires ne soient retirés. Une période de recouvrement de 1, 3 ou 6 semaines a été allouée avant les traitements préliminaires au 17 $\beta$ -oestradiol (E<sub>2</sub>). Le traitement sélectionné consistait en l'injection sous-cutanée (s.c.) quotidienne de 10 $\mu$ g d'E<sub>2</sub> dans 0,1 mL d'huile d'arachide durant 4, 7 ou 14 jours. Les souris témoins ont été traitées avec le véhicule seulement, soit 0,1 mL d'huile d'arachide pour une durée équivalente. Des mâles CD1 castrés à 37 jours (Charles River, St-Constant, Qc) ont aussi été utilisés.

Au moment du sacrifice, les souris ont été anesthésiées légèrement par inhalation de métoxyflurane, puis sacrifiées par dislocation cervicale. Rapidement, le sang a été prélevé par ponction intracardiaque. Le cœur et l'utérus ont ensuite été prélevés. Les ventricules ont été rapidement séparés des oreillettes et congelés dans l'azote liquide. Les utérus ont été débarrassés du tissu adipeux paramétrial et pesés avant d'être congelés dans l'azote liquide. Après coagulation, le sang a été centrifugé 20 minutes à 1500 rotations par minutes (rpm) pour séparer les éléments figurés et le sérum. Les tissus et le sérum ont été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les concentrations sériques d'E<sub>2</sub> ont été dosées par essai immunologique radioactif. (Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal) L'utilisation des souris a été réalisée selon les normes éthiques institutionnelles.

## 2.2 Isolation protéique

Les protéines ventriculaires de quatre fractions sous cellulaires devaient être isolées, soit les protéines totales (T), cytosoliques (C), membranaires totales (MT) et sarcolemmales (S). Quatre ventricules combinés ont été homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur de type polytron (PowerGen 125, Fisher Scientific, Montréal, Qc) (3 x 20 s à vitesse maximale) dans 2 mL de tampon d'homogénéisation Tris-EDTA (Tris 20mM; EDTA 1mM; pH 7.4) contenant des inhibiteurs de protéases. (0,01 mM Leupeptine, 1 mM métavanadate de sodium (NaVO<sub>3</sub>), 0,07 Unités/mL aprotinine, 0,6 mM benzamidine, 1 mM "*phenylmethylsulfonyl fluoride*" (PMSF)). L'homogénat a ensuite été divisé en trois parties égales (environ 700 µl/tube) :

- Tube 1 : Du triton X-100 (2% v/v) a été ajouté à l'homogénat. Après 2 heures d'agitation à 4°C, l'échantillon a été centrifugé 10 minutes à 10 000 g pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant a été conservé et nommé fraction T.
- Tube 2 : L'homogénat a été centrifugé à 200 000g pendant 20 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires et les membranes. Le surnageant correspond à la fraction C. Le culot a été resuspendu dans 250-300 µl de TE avec inhibiteurs de protéases et additionné de triton X-100 à une concentration finale de 1% v/v. Après 30 minutes de repos sur glace, l'échantillon a été centrifugé à 200 000g pendant 20 minutes. Le surnageant correspond à la fraction MT.
- Tube 3 : L'homogénat a été centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant a ensuite été centrifugé à 200 000g pendant 20 minutes afin de sédimenter les membranes. Le culot a été resuspendu dans 150 µl de TE contenant les inhibiteurs de protéases et 0,6 M de chlorure de potassium afin de précipiter les protéines du cytosquelette et de l'appareil contractile et centrifugé pendant 20 minutes à 200 000g. Cette

procédure a été répétée une fois avec du TE sans KCl. Le culot a ensuite été resuspendu dans du TE et nommé fraction S.

Les protéines ont ensuite été dosées suivant la méthode de Bradford (1976),<sup>110</sup> divisées en aliquots et conservées à -80°C jusqu'à l'utilisation.

## **2.3 Essais enzymatiques**

### **2.3.1 Activité de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase sensible à la ouabaïne**

Les essais colorimétriques ATPases ont été réalisés selon la méthode de Jones et Besh (1984).<sup>111</sup> La solution de réaction A contient : histidine (50 mM), EGTA (1 mM), MgCl<sub>2</sub> (3 mM), KCl (10 mM), NaN<sub>3</sub> (10 mM), NaCl (10 mM), dithiothréitol (DTT) (1 mM) et ouabaïne (1,5 mM). La solution B correspond à la solution A, mais sans la ouabaïne. Les solutions A et B ont été chauffées à 37°C, afin de permettre la dissolution complète de la ouabaïne dans la solution A. Une solution protéique (2 mg/mL) additionnée de 0,6 mg SDS/mg protéines/mL a été incubée sur glace 30 minutes à 25°C, et 10 µl de cette solution ont été ajoutés à 350 µl des solutions de réaction A et B. La réaction a été démarrée en ajoutant 40 µL d'une solution d'ATP (30 mM tris-ATP, 50 mM histidine, 3 mM MgCl<sub>2</sub>) par tube. Les échantillons ont ensuite été incubés à 37°C durant 60 minutes et la réaction a été arrêtée par l'ajout de 200 µl de SDS 10% dans chacun des tubes. L'activité de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase sensible à la ouabaïne a été obtenue par soustraction de l'activité mesurée avec ouabaïne de celle mesurée sans ouabaïne. Toutes les réactions ont été réalisées en duplicata sur des protéines des différentes fractions protéiques isolées à partir de ventricules de souris mâles incluant l'homogénat brut (H). (n=3)

### **2.3.2 Activité de la pompe Ca<sup>2+</sup>-ATPase du réticulum sarco/endoplasmique**

La solution de réaction 1A contient: histidine (50 mM), EGTA (1 mM), MgCl<sub>2</sub> (3 mM), KCl (110 mM), ouabaïne (1,5 mM), dithiothréitol (DTT, 1 mM), CaCl<sub>2</sub> (1,5 µM). Pour la solution 2A, du NaN<sub>3</sub> (10 mM) a été ajouté à la solution 1A. Pour la solution 3A,

de la thapsigargine (10 $\mu$ M) a été ajouté à la solution 2A. Trois solutions semblables ont été préparées, mais sans ajouter de CaCl<sub>2</sub>, et ont été nommées 1B, 2B et 3B respectivement. Ensuite, 10  $\mu$ L d'une solution protéique (2 mg/mL) ont été ajoutés à 350  $\mu$ L des solutions de réaction 1A, 1B, 2A, 2B, 3A et 3B. Dans chacun des tubes, de la calcimycine (ionophore A23187, 1.5  $\mu$ M) a ensuite été ajoutée. La réaction a été démarrée en ajoutant 40  $\mu$ L d'une solution d'ATP (30 mM tris-ATP, 50 mM histidine, 3 mM MgCl<sub>2</sub>) par tube. Les échantillons ont ensuite été incubés à 37°C durant 90 minutes et la réaction a été arrêtée par l'ajout de 200  $\mu$ l de SDS 10% dans chacun des tubes. Toutes les réactions ont été réalisées en duplicata sur des protéines des différentes fractions protéiques isolées à partir de ventricules de souris mâles incluant l'homogénat brut (H). (n=4).

### 2.3.2.1 Dosage du phosphate inorganique

Le phosphate inorganique généré par les réactions ATPases a été mesuré par spectrophotométrie. Tout d'abord, une courbe d'étalonnage a été réalisée en duplicata selon le tableau suivant :

tube	ddH <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 mM) ( $\mu$ l)	PO <sub>4</sub> /mL (nmol/mL)	SDS 10% ( $\mu$ l)
1	400	0	0	200
2	390	10	25	200
3	380	20	50	200
4	360	40	100	200
5	340	60	150	200
6	320	80	200	200
7	300	100	250	200
8	250	150	375	200
9	200	200	500	200
10	150	250	625	200
11	100	300	750	200

Dans chacun des tubes (courbe d'étalonnage et échantillons), 200  $\mu$ L d'une solution d'acide ascorbique 9% ont ensuite été ajoutés. Après agitation, 200  $\mu$ L d'une solution de molybdate acide contenant 1,25% de molybdate d'ammonium et 6,5% acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ont été ajoutés à des intervalles de 10 à 30 s. Après 30 minutes, l'absorbance de

chacun des échantillons a été mesurée à une longueur d'onde de 650 nm en respectant le même intervalle de temps que pour l'ajout de la solution de molybdate acide.

### 2.3.3 Activité de l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase

L'activité de l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase a été mesurée dans toutes les fraction protéiques isolées, incluant l'homogénat brut (H), selon une méthode adaptée de Cohen et Rosemeyer (1975).<sup>112</sup> L'activité de cette enzyme est mesurée en condition d'excès de glucose-6-phosphate et de  $\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm, correspondant à la formation de NADP réduit (NADPH) selon la réaction :



La solution de réaction est composée de Tris-HCl (pH 9,0) contenant 1 mM de NADP et 10 mM de glucose-6-phosphate. La réaction a été initiée par l'ajout de 10  $\mu$ L d'une solution protéique (2 mg/mL) à 1 mL de solution de réaction. L'absorbance a ensuite été mesurée à chaque 5 minutes durant 90 minutes par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 340 nm. L'activité enzymatique G6PDH a ensuite été déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Unités/mL} = \Delta A_{340} / 6.22 V$$

où  $\Delta A_{340}$  est le changement par minute de l'absorbance à 340 nm

6,22 est le coefficient de dégradation du NADPH (ce coefficient doit d'abord être divisé par le volume total de la réaction (en mL), qui dans ce cas est 1)

V est le volume de protéines ajouté (en mL)

L'activité enzymatique obtenue a ensuite été convertie en  $\mu$ mole de NADP/mg de protéine/heure en tenant compte du fait que 1 Unité correspond à la quantité d'enzyme qui réduit 1  $\mu$ mole de NADP par minute à 25°C.

## 2.4 Immunobuvardage Western

Les protéines (100 µg/puit) ont été séparées par SDS-PAGE (gel de concentration: 4%; gel de séparation: 5%-15%) coulé à l'aide d'un appareil à gradient (Hoefer) et transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Biosciences, Montréal, Qc) durant 90 minutes à 100 Volts. Les membranes ont ensuite été colorées avec une solution de Ponceau S afin de s'assurer de la qualité de la migration, du transfert ainsi que de l'égalité de la quantité de protéines chargée dans chacun des puits. Après avoir été bien rincées au TBS 1X pH 7,4, les membranes ont été incubées 2 heures dans du TBS 1X pH 7,4 additionné de 0,1% v/v de tween-20 (TBST) et de lait écrémé en poudre à 3 % m/v (TBST-lait 3%). Les membranes ont ensuite été incubées durant 12 à 14 heures à 4°C avec les anticorps primaires dilués dans du TBST-lait 1%. Des anticorps polyclonaux générés chez le lapin et dirigés contre 15 acides aminés (aa) de la région N-terminale de ER $\alpha$  (1 :2500; Upstate biotechnology, Lake Placid, USA, 06-935), 17 aa de la région C-terminale de ER $\beta$  (1:500; Upstate biotechnology, Lake Placid, USA, 06-629), 19 aa de la région C-terminale de AR (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Californie, USA, C-19) et le "*proliferating cell nuclear antigen*" entier (261 aa) (PCNA) (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Californie, USA, FL-261) ont été utilisés. Les anticorps utilisés pour détecter la présence des ERs ne présentent pas de réactivité croisée. Après 3 lavages de 10 minutes dans du TBST-lait 3%, les membranes ont ensuite été incubées 90 minutes avec un anticorps secondaire anti-immunoglobulines de lapin généré chez la chèvre et couplé à la peroxidase (1 :10 000; Santa Cruz Biotechnology, Californie, USA, sc-2004) dans du TBST-lait 3%, lavées 3 fois 10 minutes avec du TBST, et mises en contact avec les réactifs de chemiluminescence.

## 2.5 Isolation des myocytes ventriculaires

Les myocytes ventriculaires ont été isolés par dissociation enzymatique, suivant la méthode de Fiset et coll. (1997)<sup>164</sup> Brièvement, avant le sacrifice, 0,1 mL d'héparine a été injecté i.p. afin de prévenir la formation de caillots sanguins. Après le sacrifice, le cœur a

rapidement été monté par l'aorte sur la canule du système de Langendorff modifié et perfusé à un débit constant de 2 mL/min durant 5-10 minutes avec une solution de tyrode (130 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,33 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM hepes, 5,5 mM glucose, 1mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,4) préalablement oxygénée et maintenue à 37±1°C. Le cœur, encore battant, a ensuite été perfusé durant 10 minutes avec une solution de tyrode sans CaCl<sub>2</sub>, entraînant l'arrêt cardiaque. Le cœur a été digéré durant 20 minutes avec une solution de collagénase (tyrode sans CaCl<sub>2</sub> additionné de : 73,7 U/ml collagénase type 2; 0,1% BSA; 20 mM taurine; 30 µM CaCl<sub>2</sub>) puis perfusé 5 minutes avec la solution "KB" (100 mM K-glutamate, 10 mM K-aspartate, 25 mM KCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM taurine, 5 mM créatine, 0,5 mM EGTA, 20 mM glucose, 5 mM hepes, 0,1% BSA; pH 7,2). Les ventricules ont été isolés et les myocytes ventriculaires dissociés délicatement par trituration dans la solution "KB" à l'aide d'une pipette pasteur. La suspension cellulaire a ensuite été filtrée sur tamis de nylon et conservée à 4°C pour un maximum de 2 heures.

## 2.6 Immunofluorescence et microscopie confocale

Les myocytes fraîchement isolés ont été déposés sur des lamelles recouvertes de laminine (15 µg/mL), incubés 1 heure à 37°C en présence de 5% CO<sub>2</sub> et ont ensuite été fixés (2% paraformaldéhyde; pH 7.3) et perméabilisés (0,1% triton X-100) simultanément sur glace durant 20 minutes. Trois lavages au PBS 1X pH 7,4 ont suivi chacune des étapes subséquentes. Afin de prévenir le marquage non-spécifique, les cellules ont été incubées 1 heure avec du sérum normal d'âne (NDS) à 10% et ensuite mises en contact durant 12 à 14 heures avec un anticorps primaire polyclonal généré chez le lapin et dirigé contre 20 aa de la région C-terminale de ERα (1 :250; Santa Cruz Biotechnology, Californie, USA, MC-20). Les cellules ont ensuite été exposées 1 heure à un anticorps secondaire couplé à la rhodamine (TRITC) (1 :500; Jackson Immunoresearch, Mississauga, ON). Les lamelles ont ensuite été montées sur lame en utilisant 10 µl de p-phénylènediamine (1 mg/mL) dans du glycérol à 75%. Les lames ont été observées à l'aide d'un microscope Zeiss Axiovert 100M relié à un système laser Zeiss LSM 510.

## 2.7 Analyses statistiques

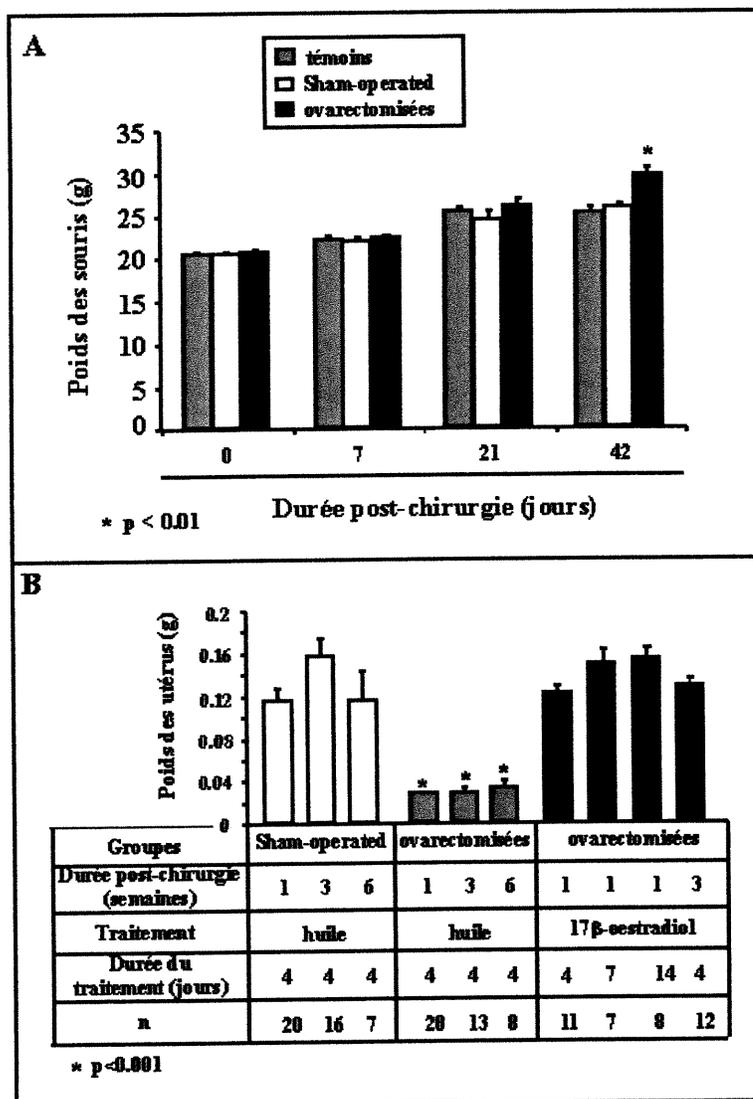
Un test d'analyse de variance simple ("*one-way ANOVA*") suivi d'un post-test de Dunnett ou de Newman-Keuls ont été réalisés, avec une valeur de p inférieure à 0,05. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism 2.0 ou Origin 5.0.

## CHAPITRE 3- RÉSULTATS

### 3.1 Modèle de la souris ovariectomisée

Il est bien établi que l'ovariectomie entraîne un gain pondéral, une atrophie marquée, mais réversible, de l'utérus ainsi qu'une chute drastique de la concentration de  $17\beta$ -oestradiol ( $E_2$ ) circulante.<sup>113;114</sup> Afin de confirmer l'efficacité de l'ovariectomie et du remplacement au  $17\beta$ -oestradiol, ces trois paramètres ont été mesurés. Nous avons observé une augmentation significative du poids corporel des souris ovariectomisées (OVX) par rapport aux souris témoins (T) et "*sham-operated*" (Sh). Le graphique présenté à la figure 1A expose la variation du poids corporel moyen (en grammes) des souris T, Sh et OVX selon la durée allouée après la chirurgie (0, 7, 21 et 42 jours). L'augmentation du poids chez les femelles OVX devient décelable et significative ( $p < 0,01$ ) seulement à 42 jours post-chirurgie, correspondant à 79 jours de vie. Les souris sont opérées à 37 jours de vie, soit avant la maturité sexuelle qui survient vers 6 à 8 semaines (42-56 jours). La souris atteint normalement son poids maximum vers l'âge de 8 semaines (56 jours), et c'est à partir de ce moment que la différence de poids entre les souris OVX et les souris T et Sh devient apparente.

Le poids de l'utérus des souris OVX est significativement plus faible que celui des souris Sh et OVX traitées au  $17\beta$ -oestradiol (OVX+E<sub>2</sub>). La figure 1B représente graphiquement le poids de l'utérus (en grammes) chez les différents groupes étudiés (Sh, OVX et OVX+E<sub>2</sub>). L'absence de stimulation oestrogénique au niveau de l'utérus chez les souris OVX a entraîné une atrophie marquée de cet organe chez ces dernières, et l'administration d'E<sub>2</sub> (OVX+E<sub>2</sub>) a ramené l'utérus à un poids similaire à celui des souris Sh.



**Figure 3.1 : Paramètres d'évaluation de l'efficacité de l'ovarectomie**

(A) Le graphique présenté montre que le poids corporel (grammes) augmente de façon significative ( $p < 0,01$ ) chez les souris ovariectomisées (OVX) en comparaison aux souris témoins (T) et "sham-operated" (Sh) du même âge. Cette différence devient apparente 42 jours après la chirurgie. (B) Le graphique présenté montre que l'atrophie marquée de l'utérus chez les OVX en raison de l'absence de stimulation oestrogénique (à 1, 3 ou 6 semaines post-chirurgie) est réversible par l'administration de 17β-oestradiol (OVX+E<sub>2</sub>) (pour 4, 7 ou 14 jours) puisque le remplacement hormonal ramène cet organe à un poids similaire à celui observé chez les souris Sh d'âge correspondant.

Les concentrations sériques d'E<sub>2</sub>, présentées à la figure 3.1 A, sont, elles aussi, significativement plus faibles chez les souris OVX que chez les souris femelles témoins et OVX+E<sub>2</sub>. La diminution de la concentration sérique d'E<sub>2</sub> est similaire pour tous les groupes OVX, quelque soit la durée allouée après la chirurgie. Les concentrations sériques d'E<sub>2</sub> produites par les traitements de 4 jours au 17β-oestradiol (OVX 1-semaine + 4-jours E<sub>2</sub> : 422±102 pM et OVX 3-semaines + 4-jours E<sub>2</sub> : 640±134 pM) sont similaires aux valeurs observées chez les souris témoins femelles (390±117 pM) et sont du même ordre de grandeur que les concentrations physiologiques moyennes observées chez la femme durant la phase folliculaire (95-580 pM), ovulatoire (253-1336 pM) et lutéale (187-804 pM) du cycle menstruel, présentées à la figure 3.1 B.

#### Concentrations sériques de 17β-oestradiol (E<sub>2</sub>)

Groupes	Moyennes ± S.E.M. (pM)	B Valeurs physiologiques d'E <sub>2</sub> humaines (pM)
Femelles (n=7)	390 ± 117	folliculaire: 95-580 ovulatoire: 253-1336 lutéale: 187-804 ménopause: 0-172 homme: 48-172
Mâles (n=8)	56 ± 7	
OVX 1-semaine (n=10)	122 ± 19	
OVX 3-semaines (n=7)	154 ± 27	
OVX 6-semaines (n=3)	133 ± 28	
OVX 8-semaines (n=6)	103 ± 22	
OVX 1-semaine + 4-jours E <sub>2</sub> (n=7)	422 ± 102	
OVX 1-semaine + 7-jours E <sub>2</sub> (n=4)	514 ± 202	
OVX 1-semaine + 14-jours E <sub>2</sub> (n=3)	1331 ± 424	
OVX 3-semaines + 4-jours E <sub>2</sub> (n=7)	640 ± 134	

**Tableau 3.1 : Concentrations de 17β-oestradiol chez les souris et chez l'humain**

(A) Les souris ovariectomisées (OVX) présentent une concentration sérique de 17β-oestradiol significativement plus basse que les souris témoins femelles et OVX traitées au 17β-oestradiol (OVX+E<sub>2</sub>). Les concentrations d'E<sub>2</sub> présentées représentent les valeurs moyennes±s.e.m. (pM). Les concentrations mesurées chez les OVX+E<sub>2</sub> recevant un traitement de 4 jours sont similaires aux concentrations mesurées chez les souris femelles témoins ainsi qu'aux concentrations physiologiques moyennes observées chez la femme à différentes phases du cycle menstruel (en B).

Le poids du cœur a aussi été mesuré chez les souris des groupes témoins (T), Sham (Sh) et OVX (X). Le rapport poids du cœur/poids corporel a été calculé, et conformément aux résultats obtenus par le groupe de Calderone (2002)<sup>173</sup> chez le rat, aucune hypertrophie ne semble présente chez les souris OVX par rapport aux souris témoins et Sham, que ce soit 1, 3 ou 6 semaines après la chirurgie puisque aucune différence significative n'a été détectée entre les trois groupes. ( $p > 0.05$ )

**Tableau 3.1b : Rapport poids du cœur/poids du corps chez les souris témoins, sham et OVX à 1, 3 et 6 semaines post-chirurgie**

Groupes	poids du coeur (g)		poids du corps/ poids du cœur ( $\times 10^3$ )	
	moyenne	s.e.m.	moyenne	s.e.m.
T1 (n=4)	0,1088	± 0,0155	4,63	± 0,58
Sh1 (n=4)	0,0938	± 0,0056	4,17	± 0,22
X1 (n=4)	0,0810	± 0,0021	3,60	± 0,10
T3 (n=3)	0,1133	± 0,0244	4,42	± 0,99
Sh3 (n=4)	0,1083	± 0,0034	4,28	± 0,11
X3 (n=3)	0,1115	± 0,0030	4,47	± 0,37
T6 (n=4)	0,1054	± 0,0036	4,17	± 0,16
Sh6 (n=3)	0,1314	± 0,0241	5,40	± 0,99
X6 (n=3)	0,0985	± 0,0036	4,51	± 0,87

$p > 0,05$  pour tous les groupes

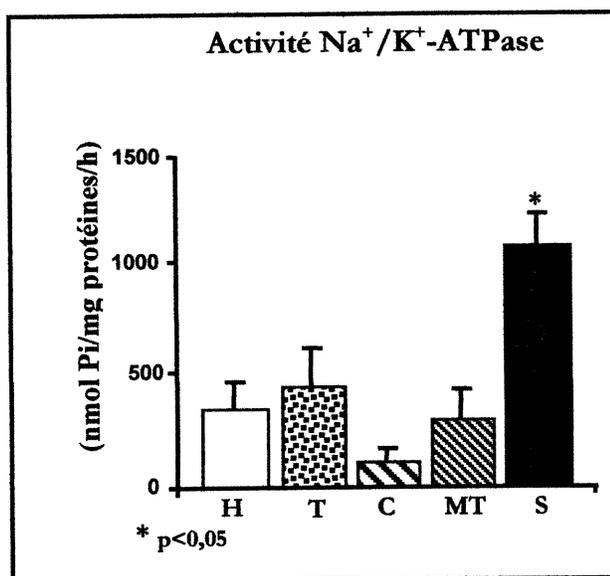
## 3.2 Fractionnement sous cellulaire

Afin de déterminer la localisation des différents récepteurs au niveau des myocytes ventriculaires, un protocole de fractionnement sous cellulaire a été mis au point. La caractérisation enzymatique des fractions obtenues a permis d'évaluer le niveau d'enrichissement et/ou de contamination des différentes fractions. Les enzymes utilisées comme marqueurs spécifiques des différents compartiments sous cellulaires sont les suivantes : la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sensible à la ouabaine (NaK) pour le sarcolemme, la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du réticulum sarco/endoplasmique (SERCA) pour le réticulum sarcoplasmique, et l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) pour le cytosol. Les pompes ATPases (NaK et SERCA) font partie de la famille des pompes de type-P, utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter des ions à travers les membranes contre le gradient électrochimique.<sup>158</sup>

### 3.2.1 Activité de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase

La pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sensible à la ouabaine (NaK) est une enzyme membranaire impliquée dans le transport actif du sodium ( $\text{Na}^+$ ) et du potassium ( $\text{K}^+$ ) à travers la membrane sarcolemmale. Cette enzyme est inhibée de façon spécifique par les glycosides cardiaques, comme la ouabaine, et est responsable de l'action inotrope positive de ces composés.<sup>115-117</sup> L'activité de la pompe NaK sensible à la ouabaine a donc été mesurée dans chacune des fractions sous cellulaires afin de déterminer l'enrichissement de chacune de ces fractions en membrane sarcolemmale par rapport à l'homogénat de ventricules de souris. Le graphique présenté à la figure 3.2 montre que la fraction S, contenant les protéines sarcolemmales, est enrichie par un facteur de 3 comparativement à l'homogénat et que la fraction C, contenant les protéines cytosoliques, présente très peu de contamination membranaire (facteur de 0,32) comparativement à l'homogénat. En effet, l'activité NaK mesurée (représentée par les valeurs moyennes  $\pm$  s.e.m. dans le tableau 3.2) est trois fois plus élevée dans la fraction S ( $1054,1 \pm 152,0$  nmol Pi/mg/h) que dans la fraction H ( $344,8 \pm 120,7$  nmol Pi/mg/h) ( $p < 0,05$ ) et plus faible dans la fraction C ( $110,0 \pm 60,4$  nmol Pi/mg/h) ( $p = \text{ns vs H}$ ). L'activité NaK moyenne mesurée dans les fractions T ( $436,8 \pm 178,2$

nmol Pi/mg/h) et MT ( $292,2 \pm 133,9$  nmol Pi/mg/h), contenant les protéines totales et membranaires totales respectivement, n'est pas significativement différente de celle mesurée dans la fraction H ( $p = \text{ns vs H}$ ).



**Figure 3.2 : Activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase**

Cette figure présente un graphique de l'activité enzymatique de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase mesurée dans toutes les fractions protéiques étudiées (présentée en nmol Pi/ mg protéines/ heure). Il y a un enrichissement d'environ 3 fois en membrane sarcolemmale dans la fraction S ( $p < 0,05$ ) par rapport à la fraction H. Il y a très peu de contamination sarcolemmale au niveau de la fraction C. Les essais enzymatiques ont été réalisés avec des protéines isolées à partir de ventricules de mâles ( $n=3$ ). (H=Homogénat; T=protéines totales; C=protéines cytosoliques; MT=protéines membranaires totales; S=protéines sarcolemmales)

**Tableau 3.2** Activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase

Fractions protéiques	Activité $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (nmol Pi/ mg de protéines/h)	Facteur d'enrichissement
Homogénat (H)	344,8 ± 120,7	1.0
Totales (T)	436,8 ± 178,2	1.27
Cytosoliques (C)	110,0 ± 60,4	0.32
Membranaires totales (MT)	292,2 ± 133,9	0.85
Sarcolemmales (S)	1054,1 ± 152,0 §	3.06

n=3; valeurs représentées par les valeurs moyennes ± sem

§ p<0,05

### 3.2.2 Activité de la pompe $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du réticulum sarco/endoplasmique

Il y a au moins trois types de pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase dans les différents compartiments des cellules musculaires cardiaques et squelettiques, soit la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase dépendante de la calmoduline localisée au niveau de la membrane plasmique (PMCA), la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  localisée au niveau du réticulum sarco/endoplasmique (SERCA) et la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mitochondriale (MCA).<sup>118</sup> Afin de distinguer entre l'activité de ces trois pompes, l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs est nécessaire. La SERCA est inhibée de façon sélective, stochiométrique et irréversible par la thapsigargine et la MCA est inhibée de façon spécifique par le sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ).<sup>119-122</sup>

Le graphique de la figure 3.3 A montre que l'activité de la MCA est présente dans toutes les fractions sous cellulaires. Même si la distribution de l'activité de la MCA semble différente entre les fractions sous cellulaires, cette activité n'est pas significativement différente par rapport à l'homogénat. Le graphique de la figure 3.3 B représente la distribution de l'activité de la PMCA dans les différentes fractions sous cellulaires. Cette activité a été détectée au niveau de la fraction H, très faiblement dans les fractions C et MT et s'est avérée indétectable dans les fractions T et S. Le graphique de la figure 3.3 C représente la distribution de l'activité de la SERCA à travers les différentes fractions sous

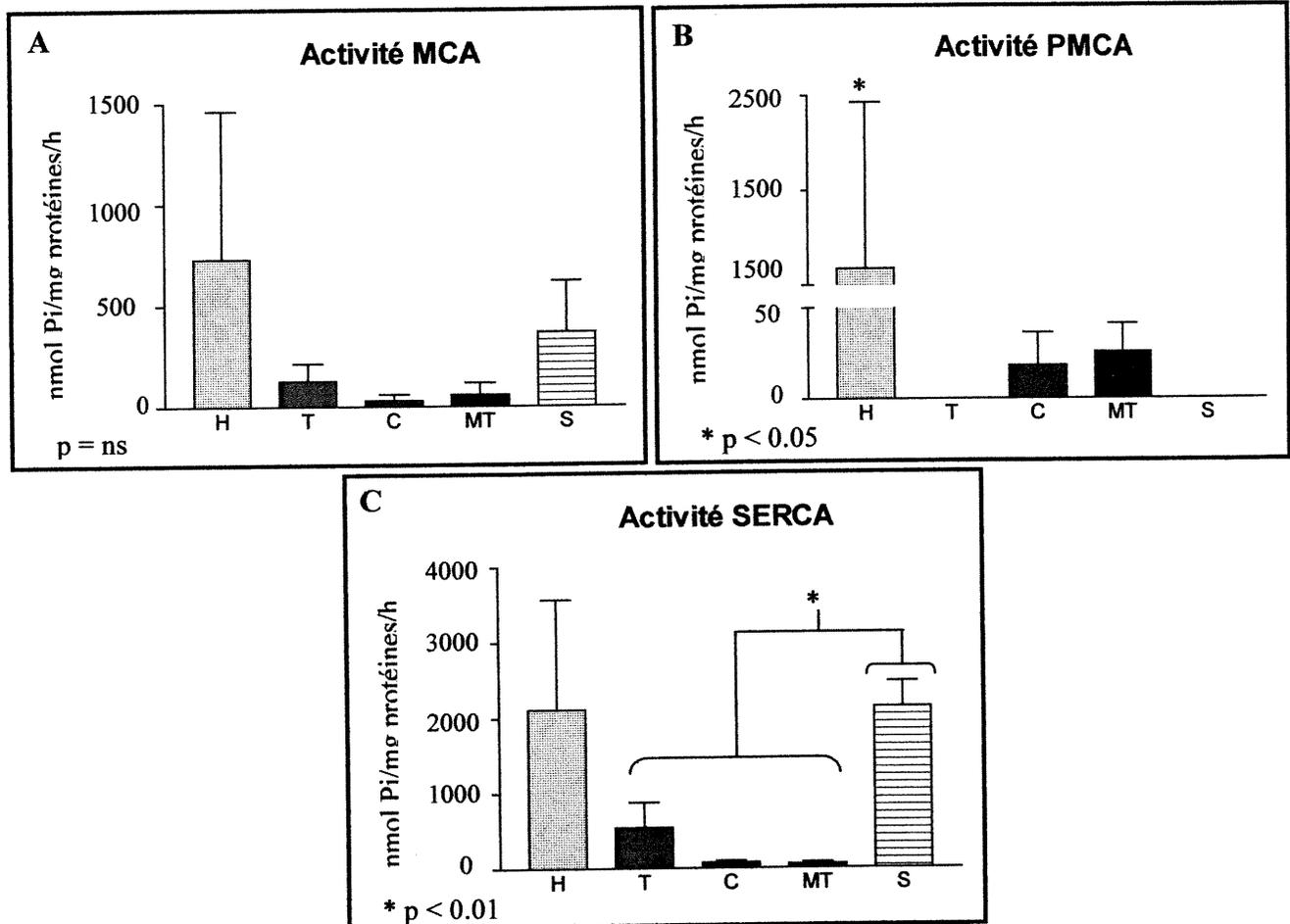
cellulaires. Cette activité est significativement plus importante dans la fraction S que dans les fractions T, C et MT ( $p < 0,01$ ). Pourtant, il n'y a pas de différence significative entre l'activité de la SERCA mesurée dans la fraction S, contenant les protéines sarcolemmales, par rapport à l'activité mesurée dans l'homogénat (H). Les valeurs mesurées pour l'activité de chacune des pompes  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sont présentées dans le tableau suivant.

Fractions protéiques	Activités $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (nmol $\text{PO}_4$ /mg protéines/h)		
	MCA	PMCA	SERCA
Homogénat (H)	730.8 ± 730.8	1589.0 ± 875.9	2110.0 ± 1462.0
Totales (T)	127.0 ± 86.6	0.0 ± 0.0	543.1 ± 335.0
Cytosoliques (C)	30.1 ± 30.1	18.0 ± 18.0	73.7 ± 24.8
Membranaires totales (MT)	58.6 ± 58.6	25.5 ± 15.2	55.6 ± 23.3
Sarcolemme (S)	365.8 ± 255.0	0.0 ± 0.0	2135.0 ± 335.0

n=4; Données représentées par la moyenne ± s.e.m.

### Tableau 3.3 : Activités des pompes $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

Ce tableau expose les valeurs de l'activité de la MCA, de la PMCA, et de la SERCA (présentées en moyennes ± s.e.m.) mesurées dans les différentes fractions sous cellulaires isolées à partir de ventricules de souris mâles (n=4). Les valeurs présentées dans ce tableau correspondent aux graphiques A, B et C de la figure 3.3.



**Figure 3.3 : Activité des pompes  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase**

(A) Ce graphique représente la distribution de l'activité de la MCA entre les différentes fractions sous cellulaires. L'activité de la MCA, présente dans toutes les fractions sous cellulaires, n'est pas significativement différente entre les fractions totales (T), cytosoliques (C), membranaires totales (MT) et sarcolemmales (S) comparativement à l'homogénat (H). (B) Ce graphique présente la distribution de l'activité de la PMCA dans les différentes fractions sous cellulaires. Il n'y aucune différence significative pour cette activité entre les différentes fractions sous cellulaires. L'axe des Y de ce graphique présente une coupure entre 50 et 1500  $\mu\text{M}$  Pi/mg/h. (C) Ce graphique montre que l'activité de la SERCA est significativement plus importante dans la fraction S que dans les fractions T, C et MT ( $p < 0.01$ ), mais il n'y a pas de différence significative pour cette activité entre l'homogénat et la fraction S.

### 3.2.3 Activité de l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase

L'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), présente uniquement dans le cytosol des cellules, est utilisée comme marqueur cytosolique et permet donc de déterminer la contamination cytosolique dans chacune des fractions sous cellulaires étudiées.<sup>124</sup> La figure 3.4 A montre que la fraction C, contenant les protéines cytosoliques, est enrichie par un facteur de 3,6 par rapport à l'homogénat et que la fraction S, contenant les protéines sarcolemmales, ne contient aucune contamination cytosolique. En effet, l'activité de la G6PDH (en  $\mu\text{mol NADPH/ mg protéines/h}$ ) mesurée dans la fraction C ( $13.951 \pm 3.211$ ) est 3,6 fois plus élevée que l'activité mesurée dans l'homogénat ( $3.860 \pm 0.485$ ) ( $p < 0,01$ ) et aucune activité n'a été détectée dans la fraction S. L'absence de contamination cytosolique dans les différentes fractions protéiques a aussi été vérifiée par immunobuvardage western à l'aide d'un anticorps dirigé contre la "*proliferating cell nuclear antigen*" (PCNA), qui est une protéine accessoire de l'ADN polymérase  $\delta$  requise pour la transcription des gènes. Dans les myocytes cardiaques adultes, il a été démontré que la PCNA n'est pas transférée dans le noyau cellulaire et se retrouve uniquement dans la fraction cytoplasmique.<sup>125</sup> La figure 3.4 B, représentant un exemple d'immunoblot contre la PCNA (100  $\mu\text{g/puit}$ ), confirme qu'il n'y a aucune contamination cytosolique dans les différentes fractions sous cellulaires et que la fraction C est enrichie en cytosol par rapport aux autres fractions. Les valeurs moyennes  $\pm$  s.e.m. ( $n=3$ ) pour l'activité de la G6PDH mesurée dans chacune des fractions sous cellulaires isolées à partir de ventricules de souris mâles sont présentées dans le tableau suivant.

**Tableau 3.4 : Activité glucose-6-phosphate-déshydrogénase**

Fractions Protéiques	Activité glucose-6-phosphate-déshydrogénase ( $\mu\text{mol NADPH/ mg protéines/h}$ )	Facteur d'enrichissement
Homogénat (H)	$3.860 \pm 0.485 \text{ §}$	1.0
Totales (T)	$9.786 \pm 0.719$	2.5
Cytosoliques (C)	$13.951 \pm 3.211 * \ddagger$	3.6
Membranaires totales (MT)	$8.601 \pm 0.671$	2.2
Sarcolemmales (S)	- †	-

$n=3$ ; Données représentées par la moyenne  $\pm$  S.E.M.

\*  $p < 0.01$  vs H, S

†  $p < 0.01$  vs T, C et MT

‡  $p < 0.05$  vs MT

§  $p < 0.05$  vs T

### **3.3 Récepteurs aux hormones sexuelles**

#### **3.3.1 Localisation sous cellulaire et abondance relative des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes chez les mâles et les femelles**

Tant chez les mâles que chez les femelles, l'analyse des fractions sous cellulaires par immunobuvardage western a montré que ER $\alpha$  (67 kDa) est localisé principalement au niveau de la fraction S tandis que ER $\beta$  (60 kDa) et AR (112 kDa) sont localisés principalement au niveau de la fraction C dans les ventricules de souris adultes. La figure 3.5 présente un exemple d'immunobuvardage western reflétant la distribution des récepteurs selon le fractionnement sous cellulaire chez les mâles (100 $\mu$ g/puit) et les femelles (ER $\alpha$  et ER $\beta$  : 50  $\mu$ g/puit; AR : 100 $\mu$ g/puit). La distribution de ER $\alpha$  selon le fractionnement sous cellulaire a aussi été vérifiée par immunobuvardage western en utilisant un second anticorps primaire dirigé, cette fois, contre la région C-terminale de ER $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, MC-20) et la distribution obtenue (résultat non-présenté) s'est avérée identique. La figure 3.6 présente un exemple typique de la localisation sous cellulaire de ER $\alpha$  dans les myocytes ventriculaires de souris mâles et femelles obtenu par immunofluorescence et microscopie confocale. Le marquage de ER $\alpha$  par immunofluorescence est similaire dans les myocytes ventriculaires des souris des deux sexes et suggère une localisation membranaire et nucléaire de ER $\alpha$ . La cellule témoin, est un myocyte ventriculaire de souris mâle n'ayant pas été en contact avec l'anticorps primaire, mais seulement l'anticorps secondaire. L'absence de fluorescence a confirmé la spécificité de l'anticorps secondaire. L'analyse par immunobuvardage western, dont un exemple est présenté à la figure 3.7, a montré que l'abondance de chacun des récepteurs étudiés est similaire entre les mâles (100  $\mu$ g/puit) et les femelles (100  $\mu$ g/puit). En effet, le niveau d'expression protéique de chacun des récepteurs est équivalent chez les deux sexes dans toutes les fractions sous cellulaires testées. Chacun des récepteurs étudiés, soit ER $\alpha$ , ER $\beta$  et AR, semble donc avoir une distribution sous cellulaire distincte dans les myocytes ventriculaires de souris adulte. De plus, la localisation sous cellulaire et le niveau

d'expression protéique de ces récepteurs sont similaires chez les deux sexes au niveau ventriculaire.

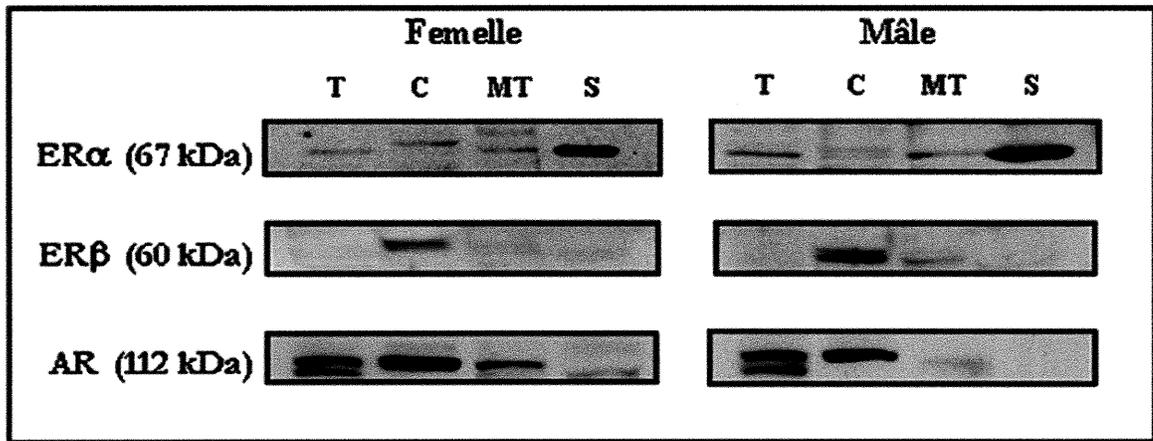
### **3.3.2 Effet de la gonadectomie sur le niveau d'expression des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes**

L'analyse par immunobuvardage western, dont un exemple est présenté à la figure 3.8 A, a montré que l'ovarectomie ne semble pas affecter l'expression des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes au niveau des ventricules chez les femelles. En effet, peu importe la durée allouée après la chirurgie (1, 3, 6 ou 8 semaines), l'expression de ER $\alpha$ , ER $\beta$  et AR ne varie pas dans la fraction protéique d'intérêt, soit la fraction S pour ER $\alpha$  et la fraction C pour ER $\beta$  et AR. Pourtant, chez les mâles, la situation est différente. En effet, l'analyse par immunobuvardage western, dont un exemple est présenté à la figure 3.8 B, a montré une diminution marquée de l'expression de ER $\beta$  et AR dans la fraction C, mais pas de ER $\alpha$  dans la fraction S, seulement une semaine après l'orchidectomie.

Il a été démontré que le AR existait sous 3 formes différentes à l'intérieur des cellules produisant un triplet protéique (110, 112 et 114 kDa) lorsque séparé par SDS-page, la bande à 110 kDa représentant le AR nouvellement synthétisé. Dix minutes suivant sa synthèse, le AR subit une première phosphorylation lui conférant la capacité de lier le ligand, générant la bande à 112 kDa. Suite à la liaison avec le ligand, une deuxième phosphorylation, générant la bande à 114 kDa, confère ensuite au AR la capacité de lier l'ADN et d'activer la transcription. Cette dernière forme du récepteur (114 kDa) est donc plus susceptible de se retrouver au niveau du noyau, fraction qui n'est pas représentée ici. Sur l'immunoblot de la figure 3.8 B, la bande à 110 kDa représente le AR natif et la bande à 112 kDa représente donc le AR phosphorylé et prêt à lier le ligand.

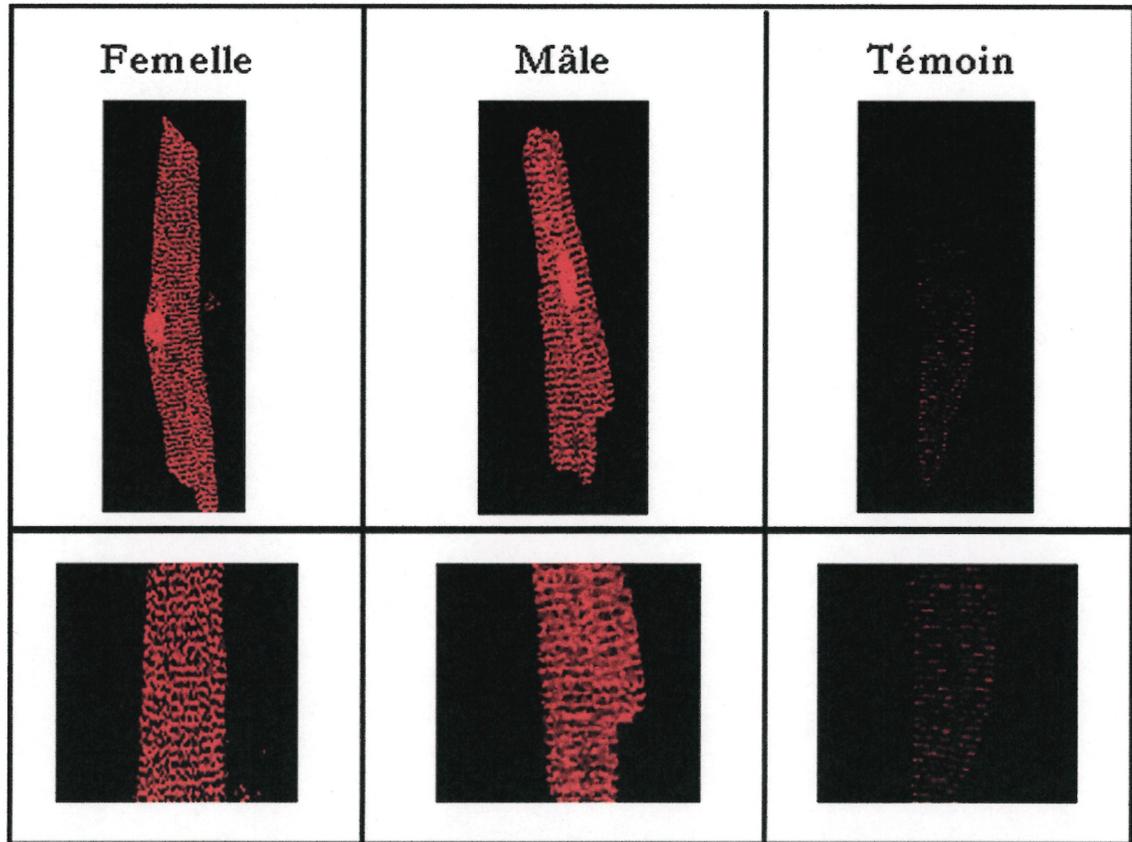
La régulation de l'expression de ER $\beta$  et AR, les récepteurs cytosoliques, est affectée différemment par la chute de la concentration d'hormone sexuelle dans la circulation sanguine chez les mâles et les femelles. Dans le cas de ER $\alpha$ , chez les souris des deux sexes, la gonadectomie n'affecte pas le niveau d'expression de ce récepteur membranaire

dans la fraction S. Les résultats présentés à la figure 3.8 B suggèrent donc une régulation plutôt androgénique de l'expression de ER $\beta$  et AR au niveau du cœur de souris.



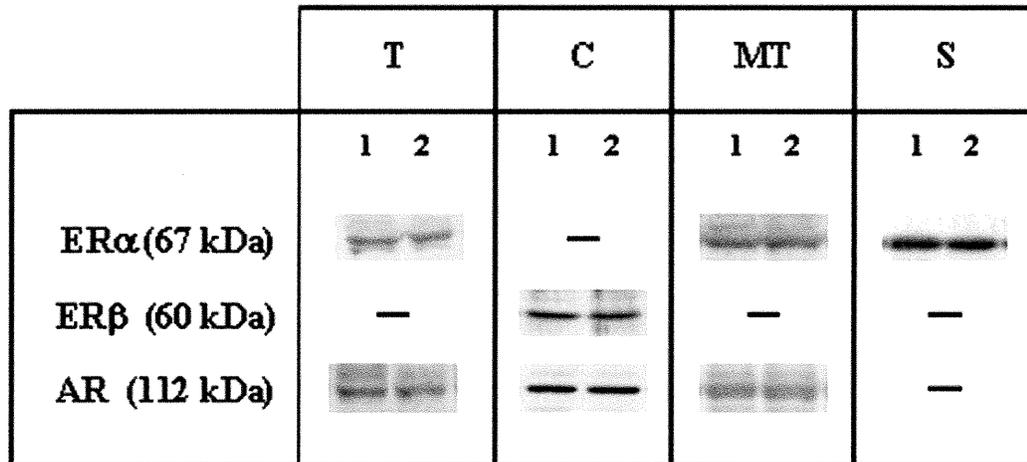
**Figure 3.5 : Localisation ventriculaire des récepteurs chez les mâles et les femelles**

Cette figure représente un exemple typique d'analyse du fractionnement sous cellulaire par immunobuvardage western avec des anticorps dirigés contre ER $\alpha$  (1 :2500, Upstate biotechnology, Lake Placid, USA), ER $\beta$  (1 :500; Upstate biotechnology, Lake placid, USA) et AR (1 :200; Santa Cruz biotechnology). L'immunoblot montre que la localisation sous cellulaire des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes est similaire dans les ventricules des souris mâles (100  $\mu$ g/puit) et femelles (ER $\alpha$  et ER $\beta$  : 50  $\mu$ g/puit; AR : 100  $\mu$ g/puit). ER $\alpha$  (67 kDa) est localisé principalement dans la fraction S alors que ER $\beta$  (60 kDa) et AR (112 kDa) sont principalement localisés dans la fraction C dans les ventricules des souris adultes des deux sexes.



**Figure 3.6 : Localisation subcellulaire de ER $\alpha$  par immunofluorescence et microscopie confocale**

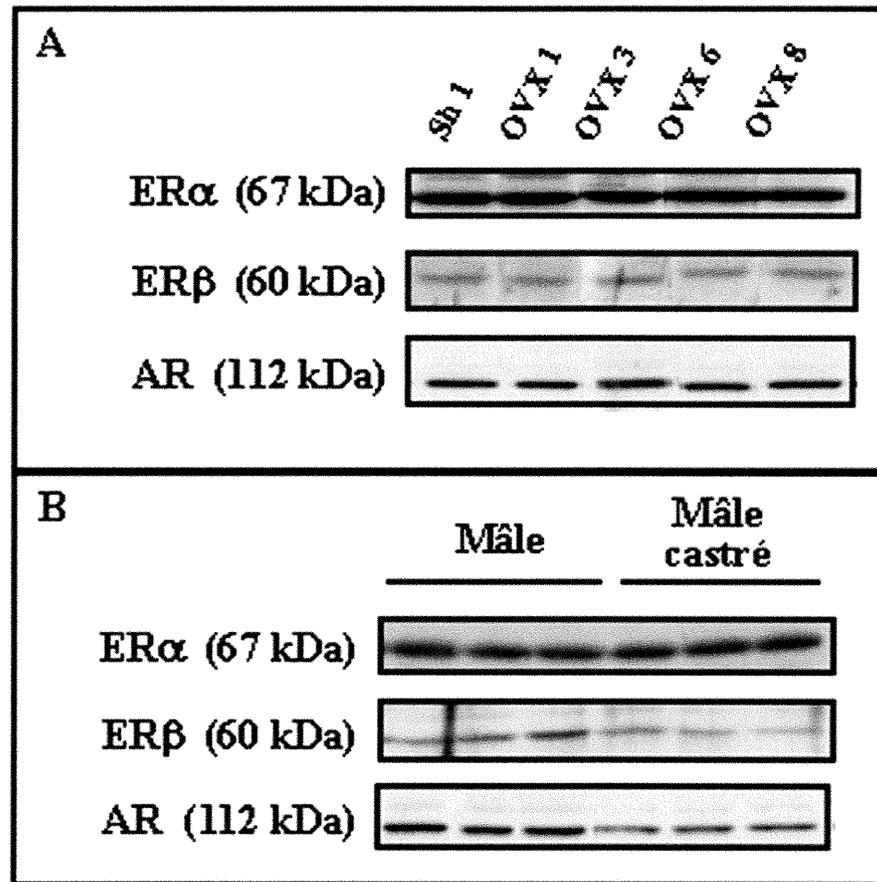
Cette figure présente un exemple typique de la localisation subcellulaire de ER $\alpha$  dans les myocytes ventriculaires des souris mâles et femelles à l'aide des techniques d'immunofluorescence et de microscopie confocale. Les myocytes ventriculaires mâles et femelles ont été marqués avec un anticorps primaire dirigé contre ER $\alpha$  (1 :50; Santa Cruz biotechnology, ) et un anticorps secondaire couplé à la rhodamine (1 :500; Jackson Immunoresearch). Pour les deux sexes, le marquage fluorescent (rouge) suit l'organisation typique des tubules-t et est présent au niveau du noyau, confirmant ainsi la localisation nucléaire et membranaire de ER $\alpha$ . L'absence de fluorescence sur la cellule témoin (myocyte ventriculaire mâle) confirme la spécificité de l'anticorps secondaire. Au bas de la figure, un agrandissement des myocytes ventriculaires présentés plus haut permet de mieux apprécier la localisation membranaire de ER $\alpha$ , tant chez les mâles que chez les femelles. Des résultats similaires ont été observés sur environ 10 cellules par préparation, sur au moins trois préparations différentes.



1= mâle  
2= femelle

**Figure 3.7 : Abondance relative des récepteurs chez les souris mâles et femelles**

L'abondance relative de chacun des récepteurs chez les mâles et les femelle a été vérifiée par immunobuvardage western (100  $\mu$ g/puit). Cette figure montre que l'abondance de ER $\alpha$  (67 kDa), ER $\beta$  (60 kDa) et AR (112 kDa) est similaire au niveau ventriculaire chez les mâles (puit 1) et femelles (puit 2) dans les différentes fractions sous cellulaires étudiées.



**Figure 3.8 : Effet de la gonadectomie sur l'expression des récepteurs**

(A) Cette figure d'immunobuvardage western (100  $\mu$ g/puit) montre que l'expression protéique de ER $\alpha$  (67 kDa) dans la fraction S ainsi que de ER $\beta$  (60 kDa) et AR (112 kDa) dans la fraction C n'est pas affectée par l'ovarectomie (1, 3, 6 ou 8 semaines post-chirurgie) au niveau ventriculaire chez les femelles. (B) Cette figure d'immunobuvardage western (100  $\mu$ g/puit) montre que l'expression protéique de ER $\alpha$  (67 kDa) dans la fraction S n'est pas affectée par l'orchidectomie au niveau ventriculaire chez les mâles. Au contraire, l'expression protéique de ER $\beta$  (60 kDa) et de AR (112 kDa), dans la fraction C, est diminuée de façon marquée par l'orchidectomie au niveau ventriculaire chez les mâles, et ce, seulement une semaine suivant la chirurgie.

## CHAPITRE 4- DISCUSSION

### 4.1 Efficacité du fractionnement sous cellulaire

Le fractionnement sous cellulaire des ventricules a permis d'étudier le niveau d'expression protéique des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes chez la souris. Afin de déterminer l'efficacité de ce protocole et ainsi permettre une interprétation juste des résultats obtenus, les différentes fractions sous cellulaires ont été caractérisées en mesurant l'activité d'enzymes appartenant à des organelles ou compartiments cellulaires précis, soit la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sensible à la ouabaïne (NaK) pour le sarcolemme, la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du réticulum sarco/endoplasmique (SERCA) pour le réticulum sarcoplasmique, et l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) pour le cytosol. L'absence de contamination cytosolique a aussi été vérifiée dans toutes les fractions par immunobuvardage western à l'aide d'un anticorps dirigé contre la PCNA ("*proliferating cell nuclear antigen*"), une protéine accessoire de l'ADN polymérase  $\delta$  requise pour la transcription des gènes, localisée uniquement au niveau du cytosol dans les myocytes cardiaques adultes.<sup>125</sup> L'absence de cette protéine cytosolique au niveau des fractions H, T et MT sur l'immunoblot est probablement due à la sensibilité moins grande de cette technique en comparaison de l'essai enzymatique G6PDH. Néanmoins, ce résultat confirme l'enrichissement de la fraction C en protéines cytosoliques par rapport aux autres fractions. Dans ce protocole de fractionnement cellulaire, le tampon ne contenait aucun détergent lors de l'homogénéisation des ventricules à l'aide du polytron. L'homogénat a ensuite été centrifugé à 200 000 g durant 20 minutes, propulsant probablement les noyaux encore intacts dans le culot. Le surnageant ainsi produit constituant notre fraction cytosolique, il est peu probable que les protéines nucléaires se soient réparties dans le cytosol suivant la lyse cellulaire. Par ailleurs, s'il en avait été ainsi, ER $\alpha$  qui est un récepteur nucléaire, se serait aussi retrouvé au niveau de la fraction cytosolique, ce qui n'est pas le cas.

### 4.1.1 Composition des fractions T et MT

Selon les résultats de caractérisation du protocole de fractionnement sous cellulaire, les fractions T et MT, ne sont enrichies en aucun marqueur enzymatique par rapport à l'homogénat ventriculaire brut. Les critères de solubilité dans le triton X-100 impliquent que la fraction protéique à solubiliser soit ultracentrifugée à 105 000 g durant 60 minutes ou encore ultrafiltrée sur filtre de 0.22 microns.<sup>183</sup> La fraction T, contenant 2% de triton et ayant subi 2 heures d'agitation à 4°C, mais n'ayant été centrifugée qu'à 10 000 g durant 10 minutes, peut être qualifiée d'extrait total partiellement solubilisé. Pour la fraction MT, une ultracentrifugation à 200 000 g durant 20 minutes a été effectuée, ce qui est équivalent à une ultracentrifugation à 105 000 g durant 40 minutes selon les tables de conversion de temps de centrifugation de la compagnie Beckman. Dans les faits, cette fraction contient donc en réalité la fraction particulière partiellement solubilisée. L'utilisation d'un détergent non-ionique dans l'isolation protéique de ces fractions pourrait avoir, même à une température de 4°C, entraîné la solubilisation de certaines protéines membranaires en dissolvant les membranes.<sup>129</sup> Les enzymes utilisées comme marqueurs du sarcolemme (NaK) et du réticulum sarcoplasmique (SERCA) sont des protéines membranaires et leur fonctionnalité pourrait avoir été affectée suite à l'altération de l'intégrité des membranes par le triton. Conséquemment, la mesure de l'activité de ces enzymes dans la fraction T pourrait être sous-estimée. Pour la fraction MT, la solubilisation n'ayant pas été adéquate, les membranes non-solubilisées ont pu être sédimentées dans le culot, entraînant avec elles certaines protéines membranaires, expliquant l'absence d'enrichissement suggéré par les essais enzymatiques.

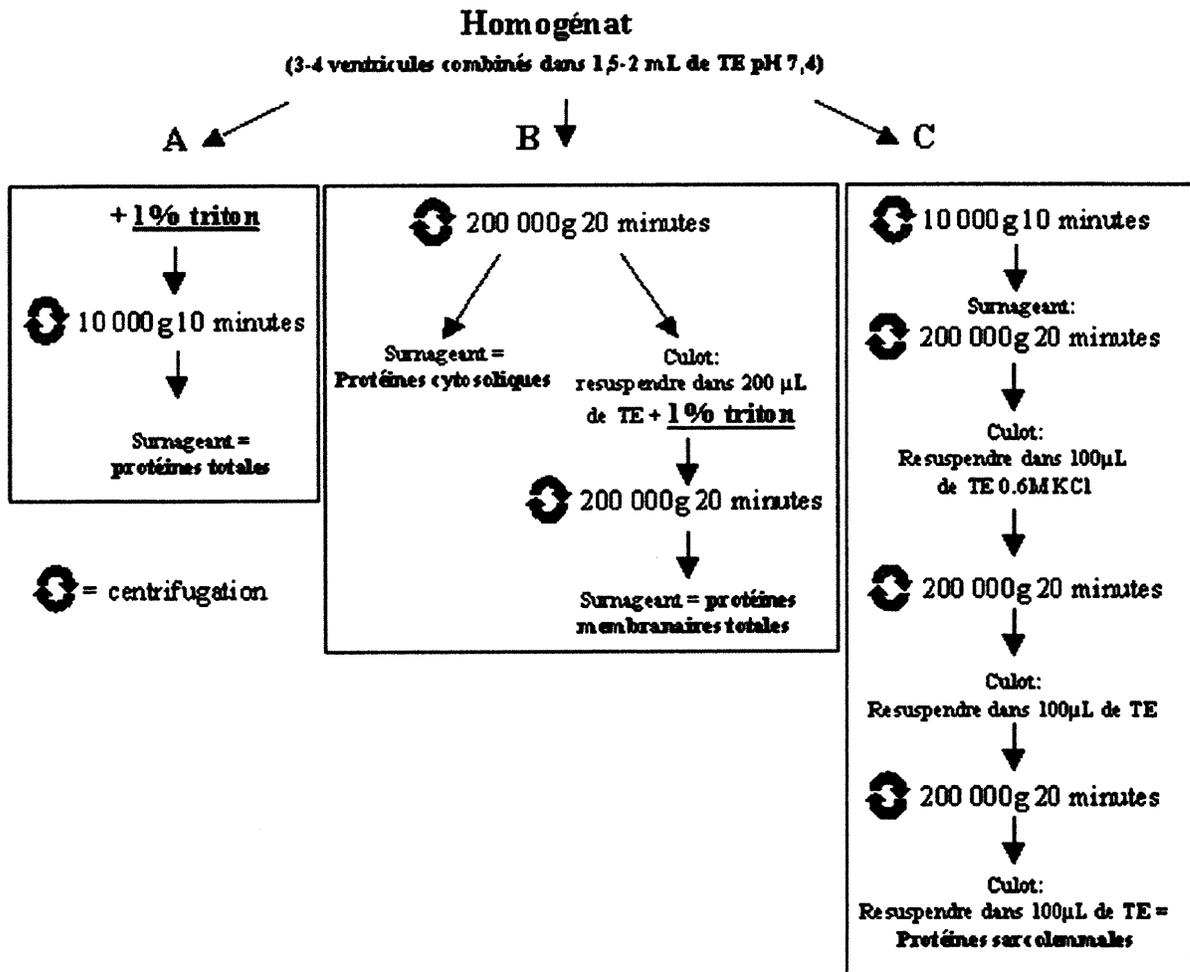
De plus, certaines protéines localisées dans les microdomaines membranaires résistants aux détergents non-ioniques ne sont pas solubilisées par l'utilisation de ces détergents.<sup>129</sup> Ces microdomaines membranaires, insolubles par les détergents non-ioniques tels que le triton X-100 et le Nonidet P-40, mesurent environ 50 nm de diamètre et sont appelés de façon générale "*lipid rafts*" (radeaux lipidiques). Ces structures lipidiques membranaires, impliquées dans la compartimentalisation de la transduction des signaux extracellulaires, peuvent être regroupées en différentes classes selon leurs propriétés : les

"rafts", les "*detergent-resistant membranes*" (membranes résistantes aux détergents; DRM) et les caveolae. Seule la présence abondante de cavéoline au niveau des caveolae différencie cette structure des DRM, qui eux n'en contiennent pas.<sup>166</sup> Pour notre fraction MT, qui devrait à l'avenir être centrifugée à 105 000g durant 60 minutes pour être considérée contenir les protéines membranaires solubles dans le triton, l'appellation protéines membranaires totales (MT) est donc erronée. En effet, cette fraction aurait plutôt du être appelée : protéines membranaires solubles dans le triton. Il en est de même pour la fraction T, qui devrait être nommée extrait total soluble, après avoir été ultracentrifugé à 100 000 g durant 60 minutes. Pourtant, afin d'éviter la confusion, les appellations T et MT employées au départ seront conservées dans ce mémoire.

Il semble y avoir une contamination cytosolique très légère au niveau de la fraction MT, ce qui n'est pas surprenant considérant que les fractions C et MT sont séparées par centrifugation différentielle et que le prélèvement du surnageant constitue une étape cruciale pour la contamination cytosolique de la fraction MT, comme on peut le voir sur la partie B du schéma de la figure 4.1. Cette contamination doit être réduite au minimum par une attention toujours particulière du manipulateur à cette étape. De plus, un lavage avec du TE avant de solubiliser avec le triton pourrait être ajouté et diminuerait sensiblement le degré de contamination.

Les microdomaines membranaires insolubles au triton, les DRM et les caveolae, se retrouvent probablement dans le culot produit par la dernière ultracentrifugation de la partie B du schéma de la figure 1. La séparation des membranes insolubles au triton contenues dans ce culot par centrifugation sur gradient de sucrose, technique permettant de séparer les membranes cellulaires selon leur densité, constituerait une amélioration considérable au protocole de fractionnement sous cellulaire. Mais un lavage préalable de ce culot avec du KCl est nécessaire, car plusieurs protéines contenues dans ces compartiments sont liées au cytosquelette, empêchant donc la flottaison du microdomaine au bon endroit dans le gradient de sucrose.<sup>166</sup> Mais comme l'utilisation de triton avant la séparation par gradient de sucrose pourrait entraîner la solubilisation de certaines protéines normalement associées à ces microdomaines, mais de manière plus faible,<sup>166</sup> l'ajout de triton pourrait aussi être

éliminé complètement et remplacé uniquement par un lavage au KCl suivi d'un gradient de sucrose.

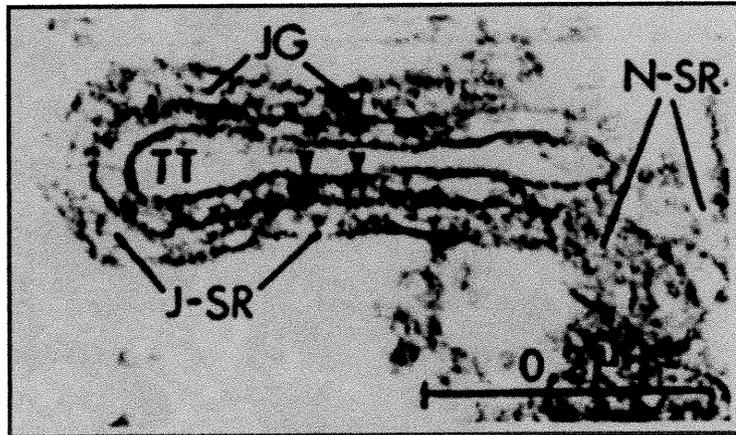


**Figure 4.1 :** Représentation schématique du protocole de fractionnement sous cellulaire

### 4.1.2 Composition des fractions C et S

Selon nos résultats, les protéines cytosoliques et membranaires, faisant partie des fractions C et S respectivement, semblent bien séparées. En effet, selon l'activité de leur marqueur enzymatique respectif, ces fractions semblent enrichies par un facteur de 3,6 pour la fraction cytosolique (C) et par un facteur de 3 pour la fraction sarcolemmale (S), par rapport à l'homogénat ventriculaire brut. De plus, il n'y a apparemment pas de contamination membranaire au niveau de la fraction C, ni de contamination cytosolique dans la fraction S. Ces deux fractions sous cellulaires constituent donc les fractions d'intérêt pour l'analyse de la localisation sous cellulaire de ER $\alpha$ , ER $\beta$  et AR.

Pourtant, une attention particulière doit être apportée à la fraction S. En effet, l'activité de la SERCA mesurée dans la fraction S n'est pas significativement différente de celle mesurée dans l'homogénat brut, mais significativement plus élevée que l'activité de la SERCA obtenue dans les fraction T, C et MT. Selon les résultats obtenus pour l'activité SERCA, la fraction S n'est apparemment pas enrichie en réticulum sarcoplasmique par rapport à l'homogénat brut, mais en contient probablement une proportion substantielle. Le réticulum sarcoplasmique (SR) est divisé en deux parties: le SR longitudinal ou "en réseau" ("*longitudinal SR*" ou "*network SR*"; LSR ou NSR) et le SR jonctionnel ("*junctional SR*"; JSR).<sup>123</sup> Tel que montré sur la figure 2 ci-dessous, le JSR est apposé directement sur la paroi intracellulaire du sarcolemme, plus précisément au niveau du système de tubules-transverses (tubules-t) qui constituent des invaginations de la membrane sarcolemmale vers l'intérieur de la cellule et font partie intégrante de cette dernière.<sup>123</sup> Une limitation assez importante de ce protocole de fractionnement réside dans la difficulté à séparer adéquatement les membranes des différentes organelles sous cellulaires, en particulier la membrane sarcolemmale et la membrane du réticulum sarcoplasmique, étant donné la très grande proximité et de ces membranes.<sup>123</sup>



**Figure 4.2 : Proximité de la membrane sarcolemmale et du réticulum sarcoplasmique jonctionnel**

Cette figure représente une coupe transversale d'un myocytes ventriculaires de souris en microscopie électronique.

*Sperelakis, N. et coll. Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab. 1974;4:163-94. (adaptation)*

À la lumière de ces résultats, il est impossible de déterminer la proportion de membrane du réticulum sarcoplasmique par rapport à la membrane sarcolemmale contenues dans la fraction S. Pour ce faire, il faudrait connaître l'activité enzymatique spécifique des pompes NaK et SERCA au niveau du muscle cardiaque chez la souris. Selon nos données actuelles, il convient donc de dire que la fraction S est une fraction enrichie en membrane sarcolemmale qui présente une contamination avec du réticulum sarcoplasmique. Afin d'obtenir une fraction ultra pure de membrane sarcolemmale, il faudra séparer ces deux compartiments membranaires en utilisant la technique du chargement calcique ("*calcium phosphate loading*") suivi d'un gradient de sucrose.<sup>118;165</sup> Ces deux techniques combinées permettront de séparer le sarcolemme, le JSR et le LSR selon leur densité. Par contre, la principale difficulté concernant de la séparation de ces compartiments membranaires à partir de cœurs de souris résidera dans le rendement très faible en protéines enrichies obtenues avec un nombre important de cœurs de ces petits mammifères comparativement aux mammifères plus gros, comme le chien, procurant plus de tissu au départ.

Selon les résultats obtenus pour la PMCA, la fraction S ne contiendrait pas de membrane sarcolemmale, car aucune activité de cette pompe n'y a été détectée. Pourtant, la PMCA n'est pas utilisée comme marqueur de la membrane sarcolemmale parce qu'elle est très peu exprimée comparativement à la SERCA. En effet, cette pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sarcolemmale représente seulement 0,01-0,1% de toutes les protéines membranaires,<sup>128; 159</sup> tandis que la SERCA représente jusqu'à 80% des protéines membranaires.<sup>123</sup> La PMCA est impliquée dans le contrôle de la concentration cytosolique des ions calciques, et ce, principalement dans les cellules non-musculaires. Elle permet la reprise des ions  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur de la cellule.<sup>159</sup> Son importance dans les cellules musculaires est donc beaucoup moindre comparativement à la SERCA ou l'échangeur  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ , mais malgré tout, cette pompe a quand même un rôle physiologique dans les cellules musculaires. De plus, la calmoduline, l'activateur principal de la PMCA, augmente l'affinité de cette pompe pour le calcium.<sup>159</sup> En absence de calmoduline, comme c'est le cas dans cet essai enzymatique, la PMCA est activée à environ 50% de son activité maximale par les phospholipides acides, les acides gras polyinsaturés, un traitement protéolytique ou par la phosphorylation par la PKA ou la PKC.<sup>128</sup> Dans la membrane cellulaire, la PMCA est possiblement entourée par suffisamment de phospholipides membranaires pour être activée à 50% de son activité maximale.<sup>128; 159</sup> Il ne faut donc pas tenir compte de l'activité enzymatique mesurée pour la PMCA pour tirer des conclusions sur la composition des fractions puisque l'activité de cette pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, probablement agissant à 50% de son activité maximale en raison de l'absence de calmoduline, a simplement été soustraite pour permettre l'obtention de l'activité de la SERCA.

De façon générale, le fractionnement sous cellulaire semble adéquat mais nécessite quand même quelques améliorations. Il y a très peu de contamination membranaire au niveau de la fraction C, enrichie par un facteur de 3,6 en cytosol rapport à l'homogénat. Il n'y a apparemment pas de contamination cytosolique au niveau de la fraction S, enrichie par un facteur de 3 en membrane sarcolemmale par rapport à l'homogénat. La fraction S n'est pourtant pas une fraction ultra pure de membrane sarcolemmale puisqu'elle contient

aussi une proportion substantielle de réticulum sarcoplasmique, probablement la plus grande partie du NSR ainsi que le JSR qui est relié aux tubules-t.<sup>123</sup>

## **4.2 Localisation sous cellulaire des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes au niveau ventriculaire chez les souris adultes mâles et femelles**

Selon nos résultats, chacun des récepteurs étudiés, soit ER $\alpha$ , ER $\beta$  et AR, possède une distribution sous cellulaire distincte dans les myocytes ventriculaires de souris adulte. De plus, la localisation sous cellulaire et le niveau d'expression protéique de ces récepteurs sont similaires chez les deux sexes au niveau ventriculaire. Conformément à ce qui est généralement accepté concernant la localisation des récepteurs hormonaux reliés au sexe à l'intérieur des cellules, nos résultats montrent que ER $\beta$  (60 kDa) et AR (112 kDa) sont principalement localisés au niveau du cytosol des myocytes ventriculaires de souris adultes des deux sexes.

Pour ER $\alpha$  (67 kDa), la localisation la plus généralement acceptée est une localisation principalement nucléaire pour le récepteur classique, et membranaire, médiant plutôt des effets non-génomiques impliquant l'activation de plusieurs cascades intracellulaires.<sup>45a</sup> L'optimisation d'une méthode d'isolation de noyaux de cœur de souris est présentement en cours dans le laboratoire du Dr Fiset. La réalisation d'un essai enzymatique pour déterminer la pureté de cette fraction sera impossible en raison du faible rendement en noyaux obtenu jusqu'à maintenant (< 1 $\mu$ g/ $\mu$ l) par rapport à la quantité de tissus nécessaire, soit 30 cœurs de souris pour n=1. Cependant, la pureté de la fraction nucléaire obtenue par ce protocole a déjà été vérifiée par le groupe de Malviya en 1996 et ce protocole est aussi utilisé régulièrement par l'équipe de Rousseau.<sup>139-142</sup> Les essais enzymatiques réalisés pour s'assurer de la pureté des noyaux comprennent : 1) un essai pour la NAD pyrophosphorylase, un marqueur enzymatique spécifique pour la membrane nucléaire interne, 2) un essai pour la mannose-6-phosphatase, un marqueur enzymatique spécifique pour la membrane nucléaire externe ainsi que 3) un essai pour la NADPH

cytochrome c réductase, un marqueur enzymatique spécifique pour les microsomes.<sup>139</sup> La fraction nucléaire produite grâce à ce protocole présente une contamination de moins de 2% en réticulum sarcoplasmique et est hautement enrichie en membranes nucléaires.<sup>139</sup> Il serait sans doute intéressant de réaliser un essai enzymatique pour la mannose-6-phosphatase afin de tester la contamination nucléaire de nos différentes fractions sous cellulaires. Néanmoins, la possibilité d'une contamination nucléaire substantielle de nos fractions, qui sont réalisées à partir de trois ou quatre cœurs de souris seulement semble, à premier abord, peu probable.

Selon les résultats obtenus par l'analyse Western de nos fractions sous cellulaires, ER $\alpha$  (67 kDa) semble localisé de façon importante dans la fraction membranaire, tandis que la présence de ce récepteur s'est avérée à peine détectable au niveau du cytosol chez la souris adulte. Selon nos connaissances, la présence d'un récepteur aux oestrogènes membranaire dans des cardiomyocytes de mammifères adultes n'a encore jamais été rapportée. Par contre, dans une très grande variété de tissus et types cellulaires dont les cardiomyocytes de rat nouveaux-nés, des effets rapides non-génomiques probablement associés à la présence de récepteurs aux oestrogènes membranaires ont été rapportés. En effet, les oestrogènes constituent le groupe d'hormones stéroïdes possédant le plus vaste éventail d'effets non-génomiques rapportés à ce jour.<sup>45a</sup> Bien que les indices de la présence d'un récepteur aux oestrogènes membranaire s'accumulent depuis maintenant plus de 20 ans, la confusion concernant ce récepteur membranaire persiste, car la structure moléculaire de ce récepteur est encore inconnue.<sup>169</sup> Conséquemment, il y a actuellement un débat concernant la structure moléculaire du récepteur aux oestrogènes membranaire (mER). Trois hypothèses ont été proposées, soit 1) un mER de structure identique au ER nucléaire (nER) classique, 2) un mER partageant seulement certains des domaines caractéristiques du nER, notamment le LBD ("*ligand-binding domain*"), ou 3) un mER complètement différent du nER.<sup>169</sup> Cette confusion existe en raison de la diversité des effets non-génomiques observés pour les oestrogènes. Il est important de préciser ici que ER $\alpha$  semble plus susceptible de correspondre au mER, car très peu d'effets non-génomiques ont été associés à ER $\beta$ .<sup>45a</sup> Des résultats obtenus récemment par Razandi et ses collaborateurs (1999) ont

montré que ER $\alpha$  et ER $\beta$ , provenant du même transcrite que les récepteurs classiques, étaient localisés au niveau de la membrane plasmique des cellules de la lignée CHO ("*Chinese Hamster Ovary*") et entraînaient, par un mécanisme associé aux protéines G, l'activation de la phospholipase C et de l'adénylyl cyclase responsables de l'augmentation de l'inositol-1,4,5-triphosphate et du niveau d'AMPc respectivement. Pourtant, la surexpression de différentes protéines dans des lignées cellulaires peut mener à une localisation sous cellulaire faussée, par exemple la localisation membranaire de protéines normalement retrouvées uniquement à l'intérieur des cellules.<sup>168</sup> Conséquemment, seuls les résultats obtenus grâce à des préparations physiologiques devraient être utilisés afin de déterminer la localisation membranaire du nER.<sup>169</sup> Dans ce même ordre d'idées, nos résultats semblent suggérer que ER $\alpha$  (et non ER $\beta$ ) constituerait l'isoforme membranaire observé dans les myocytes ventriculaires de souris adultes, et que sa structure pourrait être très similaire à l'isoforme nucléaire classique puisque son poids moléculaire est identique (67 kDa). De plus, les résultats obtenus par immunofluorescence et microscopie confocale sur des myocytes ventriculaires fraîchement isolés et confirmant la localisation nucléaire et membranaire de ER $\alpha$  dans les myocytes ventriculaires des souris procurent l'avantage de l'utilisation d'une préparation physiologique, évitant ainsi la possibilité que ce récepteur se retrouve par erreur dans la membrane à cause d'une surexpression.

La fluorescence observée pour ER $\alpha$  suit l'organisation typique des tubules-t. Pourtant, le JSR étant apposé directement sur la paroi intracellulaire du sarcolemme, notamment au niveau des tubules-t, on peut soupçonner que la fluorescence observée suivrait la même organisation dans le cas d'une localisation de ER $\alpha$  au niveau du JSR ou des tubules-t. Selon nos résultats, ER $\alpha$  est donc principalement un récepteur membranaire dans le cœur de souris adulte, mais il est impossible de déterminer plus précisément la localisation sarcolemmale ou sarcoplasmique de ce récepteur à la lumière de ces résultats. En parallèle avec l'analyse de l'expression protéique par immunobuvardage Western dans les différentes fractions sous cellulaires, l'immunofluorescence et la microscopie confocale constituent des outils intéressants pour déterminer d'une façon encore plus précise la localisation des protéines ciblées à l'intérieur de la cellule. Des anticorps spécifiques pour

chacune des organelles sous cellulaires sont maintenant disponibles et permettent de déterminer la colocalisation de différentes protéines au niveau de ces organelles. Cette technique a d'ailleurs été employée dans notre laboratoire afin de déterminer la localisation du canal potassique Kir2.1 au niveau des tubules-t des myocytes ventriculaires de souris. En effet, il y a une colocalisation entre la fluorescence observée pour le canal Kir2.1 et le WGA ("*wheat germ agglutinin*")<sup>157</sup>, une lectine marquant sélectivement les groupes d'acide sialique et de N-acétyl-glucosamine du glycocalyx présents sur la membrane sarcolemmale et les tubules-t.<sup>134,135</sup> (Annexe 1) Il serait aussi possible d'utiliser des marqueurs plus spécifiques, tels que la cavéoline-3 pour les caveolae, la nucléoporine p62 ou la lamine pour le noyau ou la protéine BiP/GRP78 pour le réticulum sarcoplasmique (Organelle Sampler Kit, BD Biosciences) afin de déterminer la colocalisation des RHS avec les différentes organelles des myocytes ventriculaires. La réalisation d'une colocalisation entre ER $\alpha$  et une protéine marquant sélectivement le réticulum sarcoplasmique ou la membrane sarcolemmale permettrait aussi de distinguer entre une localisation au niveau du SR ou du sarcolemme pour ce récepteur. De plus, la disponibilité imminente d'un logiciel de déconvolution permettra probablement d'obtenir une résolution assez grande pour distinguer entre ces deux organelles.<sup>163</sup> De plus, en raison de la plus grande résolution atteignable, l'utilisation des techniques d'immunocytochimie en microscopie électronique seraient encore plus appropriée afin de distinguer précisément la localisation de ER $\alpha$  dans les cellules ventriculaires de souris adultes. En effet, il serait probablement possible d'atteindre une résolution suffisante pour la localisation sous cellulaire de ER $\alpha$  de manière très précise, comme on peut le constater sur la figure 2.

Une localisation de ER $\alpha$  au niveau du JSR, suggérerait une implication de ce récepteur dans le couplage excitation-contraction (E-C), car le JSR est impliqué directement dans ce processus.<sup>132</sup> Cette hypothèse est soutenue par le fait que des différences entre les sexes existent dans les courants transitoires calciques au niveau du réticulum sarcoplasmique chez le rat adulte.<sup>160</sup> En effet, Leblanc et coll. (1998) ont démontré que les myocytes de rat femelle présentaient des courants transitoires calciques plus faibles que les myocytes de rats mâles du même âge. Leurs résultats suggèrent que des

différences reliées au sexe existent au niveau de la régulation calcique par le réticulum sarcoplasmique, et pourraient contribuer à expliquer la moins bonne contractilité cardiaque chez les rats femelles adultes.<sup>160</sup> De plus, il a aussi été rapporté que le tamoxifène exerçait une inhibition de la reprise du calcium par le réticulum sarcoplasmique par un mécanisme n'impliquant pas une action directe au niveau de la pompe calcique (SERCA) ni en augmentant la perméabilité de la membrane du SR au calcium.<sup>161-162</sup> La localisation de ER $\alpha$  au niveau du réticulum sarcoplasmique dans le cœur de souris suggèrerait donc que les différences reliées au sexe au niveau de la gestion des stocks d'ions calciques puissent être médiés par ER $\alpha$ .

Il ne faut pourtant pas exclure la possible localisation de ER $\alpha$  au niveau des tubules-t. Un nombre important d'études ont montré que, dans plusieurs autres types cellulaires, comme par exemple les cellules endothéliales vasculaires, l'E<sub>2</sub> peut provoquer des réponses rapides par des voies intracellulaires associées entre autres au calcium et à l'AMPc, impliquant la présence de récepteurs aux oestrogènes membranaires.<sup>91</sup> De plus, dans ces mêmes cellules endothéliales, Chambliss et coll. (2000) ont démontré une localisation membranaire de ER $\alpha$  au niveau des caveolae,<sup>149</sup> et le groupe de Lisanti (1999) a démontré que l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  était augmentée par la cavéoline-1.<sup>150;151</sup> Une localisation similaire de ER $\alpha$  au niveau des caveolae conférerait à ce récepteur une grande importance physiologique dans l'étude de la régulation hormonale de la repolarisation ventriculaire. En effet, le canal potassique Kv1.5, responsable du courant potassique I<sub>Kur</sub>, a un niveau d'expression (ARNm et protéine) plus faible dans les ventricules des souris femelles, correspondant à un potentiel d'action plus long et une repolarisation ventriculaire plus lente chez ces dernières comparativement aux mâles du même âge.<sup>109</sup> Il a été rapporté récemment par le groupe de Tamkun (2001) que le canal potassique Kv1.5 était localisé au niveau des caveolae dans des cellules Ltk<sup>-</sup> de souris.<sup>170</sup> Une colocalisation de ER $\alpha$  et de Kv1.5 dans les caveolae dans les myocytes ventriculaires de souris fraîchement isolés constituerait un indice important dans l'étude des mécanismes d'action impliqués dans la régulation hormonale de la repolarisation ventriculaire. En effet, plusieurs membres de la famille des MAP kinases sont séquestrés dans les caveolae, qui sont des invaginations de la

membrane plasmique abondamment tapissées de cavéoline et servant à compartimentaliser la transduction de signaux extracellulaires.<sup>150</sup> Il est donc important de déterminer de façon plus précise la localisation membranaire de ER $\alpha$  dans les myocytes ventriculaires des souris adultes. Considérant la probable localisation membranaire du ER $\alpha$  classique dans les myocytes ventriculaires de souris adultes, il est envisageable de supposer que des effets non génomiques de l'E<sub>2</sub>, faisant possiblement partie de la catégorie AIIa ou BIIa de la classification de Mannheim, soient possibles.

#### **4.2.1 Implication de l'absence de dimorphisme sexuel dans l'expression des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes au niveau ventriculaire chez la souris adulte**

Comme dans la plupart des tissus cibles ne faisant pas partie du système reproducteur, il y a peu ou pas de dimorphisme sexuel dans l'expression des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes au niveau cardiovasculaire chez plusieurs espèces.<sup>87</sup> Nos résultats sont en accord avec ces informations puisqu'aucun dimorphisme sexuel n'a été observé dans la localisation sous cellulaire ni dans l'abondance de ER $\alpha$ , ER $\beta$  et AR au niveau ventriculaire dans le cœur de souris. Pourtant, dans le cœur de singe, un dimorphisme sexuel dans l'expression du AR, mais pas dans l'expression de ER $\alpha$ , a été rapporté. En effet, pour ER $\alpha$ , aucune différence n'a été détectée au niveau du contenu cellulaire, ni au niveau de la distribution sous cellulaire entre le noyau et le cytosol. Pour AR, la distribution sous cellulaire varie selon le sexe : chez les femelles, le AR est localisé uniquement au niveau du cytosol tandis que chez le mâle, le AR présente une distribution cytosolique et nucléaire.<sup>136</sup> Une différence similaire dans la localisation nucléaire et cytosolique du AR a aussi été rapportée au niveau de la glande submandibulaire chez la souris ainsi qu'au niveau de l'aorte chez le rat. Dans ces deux cas, le AR est principalement localisé au noyau et un peu dans le cytosol chez les mâles et uniquement dans le cytosol chez les femelles.<sup>137,138</sup> L'ajout d'une fraction nucléaire aux fractions existantes permettra donc, entre autres, de vérifier si une telle différence entre les sexes

dans la distribution cytosolique et nucléaire des récepteurs aux oestrogènes et/ou aux androgènes existe au niveau ventriculaire chez la souris adulte.

L'absence de différence observée dans la localisation et l'abondance des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes suggère qu'une différence dans la régulation des effets médiés par ces récepteurs serait impliquée dans les différences entre les sexes au niveau de la régulation hormonale plutôt qu'une différence dans l'expression des récepteurs. De plus, il n'est pas à exclure que des différences dans l'expression ou la compartimentalisation des différentes protéines impliquées dans la modulation de l'activité de ces facteurs de transcription à différentes étapes des cascades intracellulaires induites par l'activation des RHS soient, elles aussi, impliquées dans les différences entre les sexes.

#### **4.2.2 Implication d'un effet de la gonadectomie dépendant du sexe sur l'expression des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes au niveau ventriculaire chez la souris adulte**

Il y a plusieurs changements physiologiques et hormonaux reliés à l'ablation des gonades. Certains de ces changements, comme la variation du poids corporel et du poids de l'utérus, sont maintenant utilisés comme paramètres afin de mesurer l'efficacité de cette chirurgie. Nous avons donc utilisé le gain pondéral, l'atrophie du muscle utérin ainsi que la chute de la concentration plasmatique de  $17\beta$ -oestradiol afin de confirmer l'efficacité de nos ovariectomies. Au niveau cardiovasculaire, la gonadectomie, chez des rats mâles et femelles prépubères est associée avec une fonction ventriculaire gauche diminuée, une moins bonne performance contractile, une diminution de l'activité  $Ca^{2+}$ -ATPase au niveau de la myosine ventriculaire ainsi qu'une modification de l'expression des isoenzymes des chaînes lourdes de la myosine passant de la prédominance de l'isoforme  $V_1$  vers une prédominance de l'isoforme  $V_3$ , ce qui est un marqueur d'adaptation hypertrophique. Les changements associés avec la gonadectomie post-puberté sont les mêmes que pour la gonadectomie pré-puberté pour la fonction ventriculaire et la contractilité. Dans les deux cas, la gonadectomie affecte la performance contractile du ventricule gauche de façon plus

importante chez les mâles que les femelles,<sup>113</sup> suggérant un effet prédominant des androgènes à ce niveau. La fonction cardiaque est modulée par plusieurs facteurs hormonaux, neuraux et humoraux circulants ou locaux ainsi que par des modifications de l'équilibre électrolytique, du volume et de la pression sanguine.<sup>31,174</sup> En retour, le cœur sécrète aussi des peptides biologiquement actifs, contribuant ainsi à l'homéostasie corporelle.<sup>174</sup> Il a été démontré que l'E<sub>2</sub> modulait le tonus et la réactivité vasculaires, entre autres en induisant la production d'oxide nitrique (NO) par la NO synthase.<sup>175</sup> Il a aussi été rapporté que la concentration circulante d'endothéline-1, un peptide vasoconstricteur, était augmentée chez les femmes post-ménopausées, et que l'expression d'endothéline-1 était inhibée par l'E<sub>2</sub> dans les cellules endothéliales vasculaires.<sup>173</sup> Les modifications observées par Scheuer et coll. au niveau de la performance contractile suite à l'ovarectomie sont donc possiblement attribuables à des effets indirects causés par la chute de la concentration d'oestrogène circulante sur la vasculature. Mais de manière générale, l'ablation des gonades entraîne des modifications de la physiologie du système cardiovasculaire différentes entre les mâles et les femelles, suggérant une régulation hormonale distincte selon le sexe.

Nos résultats corroborent l'hypothèse d'une régulation hormonale distincte selon le sexe. La présence et l'abondance similaires des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes dans les ventricules des souris mâles et femelles ainsi que les effets de la gonadectomie sur l'expression des récepteurs, différents selon le sexe, suggèrent aussi fortement que les différences reliées au sexe dans la physiologie cardiaque ne relèvent pas simplement d'un dimorphisme sexuel dans l'expression des récepteurs médiant l'effet des hormones sexuelles, mais plutôt dans la régulation effectuée par ces récepteurs en réponse à un milieu hormonal différent entre les mâles et les femelles.

Chez le rat, au niveau de l'utérus, l'ovarectomie entraîne une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour ER $\alpha$ <sup>143;144</sup> et une disparition complète de l'ARNm codant pour l'isoforme  $\beta$ .<sup>144</sup> Au niveau cardiovasculaire, Mohamed et Abdel-Rahman (2000) ont démontré à l'aide de la technique du RT-PCR quantitatif que l'ovarectomie

n'entraînait aucun changement significatif de l'expression de l'ARNm codant pour ER $\alpha$  dans l'aorte thoracique et l'aorte abdominale chez les rates. Au niveau du cœur, les auteurs ont détecté une diminution non-significative de l'expression de l'ARNm codant pour ER $\alpha$ , et ce jusqu'à 12 semaines suivant l'ovarectomie. Dans cette publication, aucune mention n'est faite à propos de ER $\beta$ .<sup>46</sup> Le groupe de Calderone (2002) a aussi démontré que, chez les rates adultes, l'ovarectomie n'entraînait pas de modification de l'expression protéique de ER $\alpha$  et de ER $\beta$  au niveau du ventricule gauche trois semaines après la chirurgie.<sup>173</sup> Nos résultats sont donc en accord avec ceux des autres groupes concernant l'effet de l'ovarectomie sur l'expression ventriculaire des récepteurs hormonaux reliés au sexe : chez les femelles, la diminution de la concentration circulante d'E<sub>2</sub> suite à l'ablation bilatérale des ovaires ne semble pas affecter le niveau d'expression ventriculaire de ER $\alpha$ , de ER $\beta$  ou de AR.

Chez le rat, l'orchidectomie entraîne une élimination du signal d'hybridation *in situ* pour ER $\beta$  dans la prostate,<sup>144</sup> et pour AR dans le système reproducteur. La perte du AR dans le système reproducteur chez le rat a été observée seulement trois jours après l'orchidectomie et a été renversée dans les 15 minutes suivant l'administration d'androgènes.<sup>145</sup> Chez les souris mâles knockout pour le récepteur à la FSH (FORKO), présentant une diminution de 35% de la concentration d'androgènes dans la circulation sanguine par rapport aux souris mâles non-transgéniques de la même lignée, une diminution importante de l'ARNm codant pour AR a été observée au niveau des testicules.<sup>154</sup> Contrairement à l'effet inversé de l'ovarectomie sur l'expression des récepteurs aux oestrogènes entre le système reproducteur, principalement l'utérus (augmentation), et le cœur (absence de réponse ou diminution), le AR semble réagir de la même manière dans ces deux systèmes chez les mâles suite à la castration. Dans un même ordre d'idées, nos résultats ont démontré que, dès la première semaine, l'orchidectomie entraînait une diminution importante du niveau de l'expression ventriculaire de ER $\beta$  et de AR, mais non de ER $\alpha$ , suite à la diminution de la concentration circulante d'androgènes. L'absence de modifications dans l'expression et l'abondance des récepteurs hormonaux après l'ovarectomie chez les femelles *versus* la diminution marquée et rapide de

l'expression cytosolique de ER $\beta$  et AR chez les mâles suite à l'orchidectomie corroborent l'hypothèse d'une régulation hormonale distincte selon le sexe. De plus, nos résultats suggèrent un rôle important des androgènes dans la régulation hormonale au niveau ventriculaire chez la souris, correspondant avec la modulation apparemment plus androgénique de la durée de l'intervalle QT chez l'humain. Un dimorphisme sexuel dans la distribution cytosolique et nucléaire du AR entre les mâles et les femelles sera probablement présent et semble aussi correspondre avec une prépondérance de la régulation androgénique au niveau cardiaque. En effet, ces récepteurs sont des facteurs de transcription et leur effet sur la transcription est localisé au noyau.

### **4.3 Les modèles appliqués à l'étude de la régulation hormonale**

#### **4.3.1 Le modèle de la souris gonadectomisée**

L'étude de la régulation hormonale est possible en évaluant les conséquences de l'inhibition de l'action ou de la sécrétion d'une hormone par comparaison à une condition contrôle. Une méthode fréquemment utilisée pour réduire ou abolir complètement la production et les effets des hormones sexuelles est l'ablation des gonades. Ces modèles, bien que présentant aussi quelques inconvénients en raison des changements physiologiques associés avec la gonadectomie, permettent quand même la comparaison d'une condition contrôle avec une condition de réduction importante de l'activité hormonale.<sup>76</sup>

Scheuer et ses collaborateurs (1987) ont démontré que l'orchidectomie entraînait une diminution du poids corporel chez les rats mâles et que l'ovarectomie entraînait une augmentation du poids corporel chez les femelles. La perte des hormones sexuelles entraînée par la gonadectomie influence donc le poids corporel de façon inverse chez les rats mâles et femelles. Dans les deux cas, l'administration de testostérone n'a pas empêché la diminution du poids corporel chez les mâles castrés ou son augmentation chez les femelles ovariectomisées. Par contre, chez les femelles, l'administration d'E<sub>2</sub> a empêché

l'augmentation du poids corporel entraînée par l'ovarectomie.<sup>113</sup> Conformément aux observations réalisées entre autres par Scheuer et ses collaborateurs (1987) chez le rat, les souris OVX présentent une diminution importante de la concentration sérique d'E<sub>2</sub>, une atrophie marquée du muscle utérin, réversible par l'administration d'E<sub>2</sub>, ainsi qu'un gain pondéral significatif décelable à 42 jours post-OVX. Il a été démontré que le gain pondéral chez les souris OVX était causé principalement par la polyphagie induite par l'absence d'E<sub>2</sub> menant au développement d'une quantité plus importante de tissu adipeux.<sup>76</sup> Ce phénomène peut constituer un facteur confondant dans l'étude des effets de la suppression oestrogénique. En effet, le tissu adipeux contient des aromatasés permettant la synthèse périphérique d'E<sub>2</sub> à partir de l'aromatation des androgènes circulants provenant principalement de la sécrétion surrénalienne.<sup>156</sup> Pourtant, la diminution de la concentration sérique d'E<sub>2</sub> similaire pour tous les groupes OVX quelque soit la durée allouée après la chirurgie, soit 1, 3, 6 ou 8 semaines, exclue la possibilité que le gain pondéral observé à 42 jours post-OVX ait constitué un facteur confondant dans cette étude.

Chez plusieurs espèces incluant l'humain, l'enzyme P450 aromatasé a quand même un rôle physiologique important au niveau des tissus cibles périphériques eux mêmes. Par exemple, chez la femme post-ménopausée, la production d'oestrogènes est assurée par les tissus périphériques, principalement le tissu adipeux, mais aussi par l'enzyme P450 aromatasé présente dans les cellules de la peau, les cellules osseuses, les cellules musculaires lisses vasculaires et aortiques, ainsi que plusieurs régions cérébrales. Les oestrogènes provenant de la production périphérique sont biologiquement actifs localement, impliquant une action paracrine, autocrine ou intracrine.<sup>87;130</sup>

Il serait donc utile de doser le taux d'androgènes circulant chez les souris femelles témoins (pré- et post-ménopausées) ainsi que chez les souris OVX afin de déterminer si la condition d'excès androgénique est reproduite chez la souris par la condition de ménopause et si l'ablation chirurgicale des ovaires entraîne une diminution de la concentration d'androgènes circulants comparativement à cette condition. L'hypothèse de l'influence prédominante milieu hormonal dans son ensemble, donc du rapport oestrogènes/androgènes, proposée par Liu et coll. (2001) est soutenue au niveau

moléculaire par plusieurs études. De façon générale, un relâchement de la spécificité des effets dépendants du sexe concernant la sensibilité des tissus non reliés au système reproducteur en réponse aux oestrogènes et aux androgènes comparativement aux tissus reproducteurs a été observé.<sup>87</sup> De plus, l'interaction physiologique des oestrogènes et des androgènes dans plusieurs tissus cibles a été démontrée par Krietmann et Bayard en 1979.<sup>171</sup> Plus récemment, le groupe de Trifiro (2000) a démontré que ER $\alpha$  et AR pouvaient former des hétérodimères et ainsi modifier l'activation transcriptionnelle de chacun des récepteurs, suggérant la présence d'un niveau de contrôle supplémentaire dans la régulation hormonale impliquant l'importance du rapport oestrogènes/androgènes.<sup>172</sup>

Le milieu hormonal dans son ensemble, donc aussi le rapport oestrogènes/androgènes, apparemment contrôlé localement par l'aromatase dans les tissus périphériques, joue un rôle au niveau de la physiologie cellulaire autant chez les hommes que chez les femmes,<sup>133</sup> et pourrait aussi être impliqué dans les différences entre les sexes observées au niveau de l'incidence des MCV.<sup>16</sup> En effet, il a été démontré par le groupe de Kumar (2000), qu'il y avait des différences reliées au sexe dans la régulation de l'expression et de l'activité de l'enzyme P450 dans le tissu adipeux humain.<sup>156</sup> L'activité de cette enzyme est beaucoup plus importante chez les femmes pré- et post-ménopausées comparativement aux hommes. Une différence similaire dans l'expression et/ou l'activité de la P450 aromatase au niveau du coeur de souris pourrait aussi contribuer aux différences dans la régulation hormonale observées entre le coeur des souris mâles et femelles. Grohé et ses collaborateurs (1998) ont démontré la présence de plus importante de l'enzyme P450 aromatase au niveau des cardiomyocytes de rat nouveau-nés femelles comparativement aux mâles.<sup>131</sup> Dans ces cellules, la synthèse d'E<sub>2</sub> par cette enzyme à partir de la testostérone est suffisante pour activer ER $\alpha$  et ER $\beta$ , ce qui influence l'expression de la NO synthase inductible (iNOS) de manière dépendante du sexe.<sup>131</sup> En effet, l'activation transcriptionnelle d'un plasmide rapporteur contenant un élément de réponse aux oestrogènes contrôlant l'expression du gène de la luciférase de drosophile (ERE-Luc) a été stimulée par l'administration de précurseurs androgéniques de façon plus importante dans les cellules femelles. L'activation de gènes endogènes, soit ER $\alpha$  et iNOS, est aussi plus

importante chez les femelles suite à l'administration de précurseurs androgéniques. Le fait que l'expression des récepteurs aux oestrogènes ne soit pas modifiée au niveau cardiaque suite à l'ovarectomie pourrait suggérer que le cœur, dans des conditions physiologiques normales, ne soit pas directement affecté par les modulations hormonales endogènes. Pourtant à la lumière des données disponibles et considérant une possible condition d'excès androgénique relatif à la ménopause suffisant pour permettre l'activation des ERs, il est tentant de supposer que l'absence de modification du niveau d'expression protéique des récepteurs hormonaux cardiaques suite à l'ovarectomie chez les femelles soit plutôt associée à une activité de régulation locale des concentrations d'E<sub>2</sub> par l'aromatase de manière plus importante chez ces dernières, permettant aussi de protéger le cœur contre les variations oestrogéniques associées au cycle menstruel et à la grossesse chez la femme. Cependant, avant de considérer cette spéculation comme une hypothèse plausible, la présence et le dimorphisme sexuel de l'aromatase devraient être vérifiés dans des myocytes cardiaques adultes, car il semble y avoir des différences dans la régulation hormonale entre les cellules de nouveau-nés et d'adultes. En effet, Jankowski et coll. (2001) ont montré qu'il y avait des modifications dans l'abondance relative des deux isoformes des récepteurs aux oestrogènes durant le développement.<sup>86</sup> De plus, les concentrations d'androgènes chez les femelles ovariectomisées devrait aussi être mesuré afin de déterminer le rapport oestrogènes/androgènes chez ces dernières.

### 4.3.2 Les modèles transgéniques

Parmi les lignées de souris transgéniques permettant d'étudier les rôles des hormones sexuelles dans différentes pathologies ainsi que dans différents tissus, on retrouve les souris knockout pour les récepteurs aux oestrogènes ( $\alpha$ ERKO,  $\beta$ ERKO),<sup>62;152</sup> la souris knockout pour le récepteur de l'hormone folliculo-stimulante (FORKO)<sup>154</sup> ainsi que la souris présentant une mutation dans le récepteur aux androgènes (Tfm; "*testicular feminized mice*")<sup>155</sup>. Cette dernière exprime une variante tronquée du AR, le rendant non fonctionnel, correspondant au syndrome d'insensibilité aux androgènes (AIS; *androgen insensitivity syndrome*) rapporté chez l'humain.

Il existe aussi une souris knockout pour l'enzyme P450 aromatasase (souris ne possédant pas le gène CYP19, responsable de la production de cette enzyme) (ArKO).<sup>153</sup> Au niveau du milieu hormonal, cette souris présente un niveau indétectable d'oestrogènes tandis que le niveau d'androgènes est beaucoup plus élevé.<sup>50</sup> Ce phénotype la rend donc très intéressante pour l'étude de la régulation androgénique au niveau du cœur.<sup>16</sup> De façon générale, le phénotype de ces souris transgéniques permet de mieux comprendre les rôles physiologiques des hormones sexuelles et leurs mécanismes d'action dans les tissus cibles.<sup>75</sup> De plus, la possibilité de comparer les résultats obtenus grâce à ces différentes lignées de souris avec les résultats obtenus dans des conditions de suppression de l'action hormonale permettra de mieux comprendre les mécanismes de la régulation hormonale dans son ensemble.

## CONCLUSION

*"One of the challenging problems confronting biological scientists has been the manner in which hormones serve as regulators of biochemical processes in tissues of higher animals."*

E.V. Jensen and E.R. DeSombre, 1973<sup>146</sup>

Malgré l'avancement spectaculaire de la science dans ce domaine depuis les 40 dernières années, la citation de Jensen est toujours d'actualité. Maintenant, les outils technologiques et la biologie moléculaire permettent de pousser encore plus loin la compréhension de la régulation hormonale chez les mammifères.<sup>75</sup> Pourtant, jusqu'à maintenant, peu de renseignements sont disponibles quant aux mécanismes de la régulation hormonale dans le cœur. Étant donné l'utilisation répandue de la souris comme modèle en recherche cardiovasculaire, il est primordial de caractériser les mécanismes sous-jacents aux différences mâles-femelles observées au niveau cardiaque chez la souris. La possibilité que l'influence hormonale distincte entre les mâles et les femelles soit impliquée dans ces différences constitue une hypothèse très plausible. Pourtant, ces différences ne semblent pas attribuables à un dimorphisme sexuel au niveau de l'expression des récepteurs aux oestrogènes et aux androgènes entre le cœur des souris mâles et femelles. Par contre, une différence liée au sexe dans la régulation de l'activité de ces récepteurs au niveau cardiaque, pourrait être impliquée. La caractérisation de la localisation sous cellulaire des RHS dans les ventricules de souris constitue donc un premier pas dans l'étude des mécanismes d'action reliés à la régulation hormonale dans le cœur de souris. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les différences entre les sexes permettra de traiter ou prévenir plus efficacement les différentes maladies cardiovasculaires, notamment les arythmies cardiaques, tant chez les hommes que chez les femmes.

## Perspectives

Étant donné le peu d'information disponible concernant la régulation hormonale au niveau du cœur et l'impact de l'acquisition de ces connaissances au niveau de la santé humaine en général et, plus particulièrement, au niveau de la compréhension des différences reliées au sexe dans la physiologie et la physiopathologie cardiovasculaire, il est important de poursuivre ce projet. Comme la seule présence de ces récepteurs ne peut garantir leur fonctionnalité de façon non-équivoque, il est nécessaire d'évaluer la fonctionnalité de ER $\alpha$ , ER $\beta$  et AR dans le cœur des souris des deux sexes. Des résultats préliminaires concernant la fonctionnalité de ces récepteurs ont été obtenus dans le laboratoire du Dr Fiset et la poursuite de cet aspect du projet est présentement en cours. De plus, la disponibilité imminente des souris transgéniques knockout pour les récepteurs aux oestrogènes (ERKO) dans le laboratoire du Dr Fiset facilitera l'étude plus approfondie des mécanismes moléculaires de la régulation hormonale de la repolarisation ventriculaire cardiaque.

## BIBLIOGRAPHIE

1. JOVANOVIC A AND JOVANOVIC S. Estrogen and vascular system: more questions for the future. *Cardiovasc.Res.* 42:9-11, 1999.
2. FONDATION CANADIENNE DES MALADIES DU CŒUR. Les maladies du coeur et les accidents vasculaires cérébraux chez les femmes canadiennes: Matière à réflexion, 28 p. 1997. Ottawa.
- 2a. AMERICAN HEART ASSOCIATION. 2002 Heart and Stroke Statistical Update. Dallas, Tex.: American Heart Association; 2001.
3. MCPHERSON R. Is hormone replacement therapy cardioprotective? Decision-making after the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study. *Can J Cardiol* 16(suppl A), 14A-19A. 2000.
4. ROSANO GMC AND PANINA G. Oestrogens and the heart. *Thérapie* 54:381-385, 1999.
5. ROSANO GM AND PANINA G. Cardiovascular pharmacology of hormone replacement therapy. *Drugs Aging* 15:219-234, 1999.
6. CAGNACCI A, SOLDANI R, PUCCINI E, FIORETTI P AND BENEDETTO M.G. Lipid-independent therapeutic properties of transdermal 17 $\beta$ -estradiol on cardiovascular diseases. *Acta Obstet Gynecol Scand* 71:639-641, 1992.
7. KLEIN R AND BERLIN L. Benefits and risks of hormone replacement therapy. In: Edward J.Pavlik, ed. Estrogens, progestins, and their antagonists. volume 1:3-50. 1996.
8. JENSEN J., NILAS L. AND CHRISTIANSEN C. Influence of menopause on serum lipids and lipoproteins. *Maturitas* 12, 321-331. 1990.

9. LEHMANN MH, HARDY S, ARCHIBALD D, QUART B AND MACNEIL DJ. Sex difference in risk of torsade de pointes with *d,l*-sotalol. *Circulation* 94:2534-2541. 1996.
10. GRADY D, RUBIN SM, PETITTI DB, FOX CS, BLACK D, ET AL. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 117:1016-1037. 1992.
11. HEART AND ESTROGEN/PROGESTIN REPLACEMENT STUDY (HERS) RESEARCH GROUP. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA* 280, 605-613. 1998.
12. MOSCA L. The role of Hormone Replacement Therapy in the prevention of Postmenopausal Heart Disease. *Archives of Internal Medicine* 160, 2263-2272. 2000.
13. MOSCA L., COLLINS P., HERRINGTON D.M., MENDELSON M.E., PASTERNAK R C., ROBERTSON R.M., SCHENK-GUSTAFSSON K., SMITH S.C.JR, TAUBERT K.A. AND WENGER N.K. Hormone Replacement Therapy and Cardiovascular Disease: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation* 104, 499-503. 2001.
14. ALEXANDERSEN P., HAARBO J. AND CHRISTIANSEN C. The relationship of natural androgens to coronary heart disease in males: a review. *Atherosclerosis* 125, 1-13. 1996.
15. ALEXANDERSEN P., HAARBO J., BYRJALSEN I., LAWAEZT H. AND CHRISTIANSEN C. Natural Androgens Inhibit Male Atherosclerosis: A Study in Castrated, Cholesterol-fed Rabbits. *Circulation Research* 84, 813-819. 1999.
16. LIU Y., DING J., BUSH T.L., LONGENECKER J.C., NIETO F.J., GOLDEN S.H. AND SZKLO M. Relative Androgen Excess and Increased Cardiovascular Risk

- after Menopause: A Hypothesized Relation. *American Journal of Epidemiology* 154(6), 489-494. 2001.
17. LARSEN JA AND KADISH AH. Effects of gender on cardiac arrhythmias. *J Cardiovascular Electrophysiol* 9:655-664. 1998.
  - 17a. WOLBRETTE D, NACCARELLI G, CURTIS A, LEHMANN M AND KADISH A. Gender differences in arrhythmias. *Clinical Cardiology* 25: 49-56. 2002.
  18. BAZETT H. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart* 7:353-370. 1920.
  19. LEHMANN MH, TIMOTHY KW, FRANKOVICH D, FROMM BS, KEATING M, LOCATI EH, TAGGARD RT, TOWBIN JA, MOSS AJ, SCHWARTZ PJ AND 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.* 29:93-99. 1997.
  20. CHRISTENSEN G, WANG Y AND CHIEN KR. Physiological assessment of complex cardiac phenotypes in genetically engineered mice. *Am J Physiol* H2513-H2524. 1997.
  21. BEDNAR M., HARRIGAN E.P., ANZIANO R.J., CAMM A.J. AND RUSKIN J.N. The QT interval. *Progress in Cardiovascular Diseases* 43(5, suppl. 1), 1-45. 2001.
  22. EBERT SN, LIU XK AND WOOSLEY RL. Female Gender as a risk factor for drug-induced cardiac arrhythmias: Evaluation of clinical and experimental Evidence. *Journal of Women's Health* 7:547-557. 1998.
  23. RUBART M AND VON DER LOHE E. Sex steroid and cardiac arrhythmia: More questions than answers. *J Cardiovascular Electrophysiol* 9:655-667. 1998.

24. BURKE JH, EHLERT FA, KRUSE JT, PARKER MA, GOLDBERGER JJ AND KADISH AH. Gender-specific differences in the QT interval and the effect of autonomic tone and menstrual cycle in healthy adults. *Am J Cardiol* 79:178-181. 1997.
25. MAKKAR RR, FROMM BS, STEINMAN RT, MEISSNER MD AND LEHMANN MH. Female gender as a risk factor for torsades de pointes associated with cardiovascular drugs. *JAMA* 270:2590-2597. 1993.
26. KOPECKY S, GERSH B AND MCGOON M. The natural history of lone atrial fibrillation. *New Engl J Med* 317:669-674. 1987.
27. MOSS AJ, SCHWARTZ P AND CRAMPTON RS. The long QT syndrome prospective longitudinal study of 328 families. *Circulation* 84:1136-1144. 1991.
28. STRAMBA-BADIALE M, SPAGNOLO D, BOSI G AND SCHWARTZ PJ. Are gender differences in QTc present at birth? *Am J Cardiol* 75:1277-1278. 1995.
29. RAUTAHARJU PM, ZHOU SH, WONG S, CALHOUN HP, BERENSON GS, PRINEAS R AND DAVIGNON A. Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Canadian Journal of Cardiology* 8:690-695. 1992.
30. BIDOGGIA H., MACIEL J.P., CAPALOZZA N., MOSCA S., BLAKSLEY E.J., VALVERDE E., BERTRAN G., ARINI P., BIAGETTI E.J. AND QUINTEIRO R.A. Sex differences on the electrocardiographic pattern of cardiac repolarization: Possible role of testosterone. *American Heart Journal* 140, 678-683. 2000.
31. CONTRERAS I. AND PARRA D. Therapy Update: Estrogen replacement therapy and prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *Am J Health-Syst Pharm* 57, 1963-1971. 2000.
32. LAMON-FAVA S. Complete and Selective Estrogenic Effects on Lipids and Cardiovascular Disease. *Current Atherosclerosis Report* 2, 72-75. 2000.

33. PLU-BUREAU G. Risque cardiovasculaire et traitement hormonal substitutif de la ménopause. *Thérapie* 54:375-380. 1999.
34. BARRETT-CONNOR E AND GRADY D. Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations. *Annual Review of Public Health* 19:55-72. 1998.
35. BARRETT-CONNOR E AND BUSH TL. Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA* 265:1861-1687. 1991.
36. NABULSKI M, FOLSOM AR, WHITE A, PATSCH W, HEISS G, WU KK AND SZKLO M. Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *New Engl J Med* 328:1069-1075. 1993.
37. SUBBIAH MT. Mechanisms of cardioprotection by estrogens. *P.E.S.B.M.* 217:23-29. 1998.
38. STAMPFER MJ AND COLDITZ GA. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiological evidence. *Prev Med* 20:47-63. 1991.
39. GINSBURG GS AND DOUGLAS PS. Why cardiologists should be interested in estrogen. *Am J Cardiol* 78:559-561. 1996.
40. RIGGS BL AND MELTON LJ. The prevention and treatment of osteoporosis. *New Engl J Med* 327:620-627. 1992.
41. BELCHETZ PE. Hormonal treatment of postmenopausal women. *New Engl J Med* 330:1062-1071. 1994.
42. SPEROFF L, ROWAN J, SYMONS J, GENANT H AND WALBORN W. The comparative effect on bone density, endometrium and lipids of continuous hormones as replacement therapy (CHART study). *JAMA* 276:1397-1403. 1996.

43. THE WRITING GROUP FOR THE PEPI TRIAL. Effects of hormone therapy on bone mineral density. *JAMA* 276:1389-1396. 1996.
44. HOIBRAATEN E, ABDELNOOR M AND SANDSET PM. Hormone Replacement Therapy with Estradiol and Risk of Venous Thromboembolism: A Population-based Case-control Study. *Thromb Haemost* 82:1218-1221. 1999.
45. WEHLING M. Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annual Reviews of Physiology* 59, 365-393. 1997.
- 45a. FALKENSTEIN E, TILLMAN HC, CHRIST M, FEURING M AND WEHLING M. Multiple Actions of Steroid Hormones-A Focus on Rapid, Nongenomic Effects. *Pharmacological Reviews*, 52 (4): 513-555. 2000.
46. MOHAMED MK AND ADBEL-RAHMAN AA. Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. *European Journal of Endocrinology* 142:307-314. 2000.
47. CHANG C., SALTZMAN A., YEH S., YOUNG W., KELLER E., LEE H., WANG C. AND MIZOKAMI A. Androgen Receptor: An Overview. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 5(2), 97-125. 1995.
48. REVELLI A., MASSOBRIO M. AND TESARIK J. Nongenomic Actions of Steroid Hormones in Reproductive Tissues. *Endocrine Reviews* 19(1), 3-17. 1998.
49. WISEMAN H. AND DUFFY R. Steroids, Steroid receptors and Disease: New advances in the understanding of the role of steroids and steroid receptors in disease. *Biochemical Society Transactions* 29(part 2), 205-209. 2001.
50. ENMARK E AND GUSTAFSSON JA. Oestrogen receptors-an overview. *Journal of Internal Medicine* 246:133-138. 1999.

51. CARSON-JURICA M.A., SCHRADER W.T. AND O'MALLEY B.W. Steroid Receptor Family: Structure and Functions. *Endocrine Reviews* 11(2), 201-220. 1990.
52. ING NH AND O'MALLEY BW. The Steroid Hormone Superfamily: Molecular Mechanisms of Action. In: Weintraub BD, ed. *Molecular Endocrinology: Basic Concepts and Clinical Correlations*. New-York: Raven Press, Ltd., 195-215. 1995.
53. EVANS RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-894. 1988.
54. HALL J.M., COUSE J.F. AND KORACH K.S. Minireview: The multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 276(40), 36869-36872. 2001.
55. NILSSON S., MAKELA S., TREUTER E., TUJAGUE M., THOMSEN J., ANDERSSON G., ENMARK E., PETTERSSON K., WARNER M. AND GUSTAFSSON J.A. Mechanisms of Estrogen Action. *Physiological Reviews* 81(4), 1536-1554. 2001.
56. JENSEN E.V. AND JACOBSEN H.I. Basic guides to mechanism of estrogen action. *Recent Progress in Hormone Research* 18, 387-414. 1962.
57. TOFT D. AND GORSKI J. A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 55, 1574-1581. 1966.
58. GREENE G.L., GILNA P., WATERFIELD M., BAKER A., HORT Y. AND SHINE J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231, 1150-1154. 1986.

59. GREEN S, WALTER P, KUMAR V, KRUST A, BORNERT JM, ARGOS P AND CHAMBON P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erbA. *Nature* 320:134-139. 1986.
60. KARAS RH, HODGIN JB, KWOUN M, KREGE JH, ARONOVITZ M, MACKEY W, GUSTAFSSON JA, KORACH KS, SMITHIES O AND MENDELSON ME. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor  $\beta$ -deficient female mice. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 96:15133-15136. 1999.
61. COUSE JF AND KORACH KS. Exploring the role of sex steroids through studies of receptor deficient mice. *Journal of Molecular Medicine* 76:497-511. 1998.
62. LUBAHN DB, MOYER JS, GOLDING TS, COUSE JF, KORACH KS AND SMITHIES O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 90:11162-11166. 1993.
63. KUIPER GGJM, ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, NILSSON S AND GUSTAFSSON JA. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 93:5925-5930. 1996.
64. MOSSELMAN S., POLMAN J. AND DIKEMA R. ER $\beta$ : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters* 392, 49-53. 1996.
65. TREMBLAY G.B., TREMBLAY A., COPELAND N.G., GILBERT D.J., JENKINS N.A., LABRIE F. AND GIGUÈRE V. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor  $\beta$ . *Molecular Endocrinology* 11, 353-365. 1997.
66. KUIPER GGJM, CARLSSON B, GRANDIEN K, ENMARK E, HAGGBLAD J, NILSSON S AND GUSTAFSSON JA. Comparison of the ligand binding specificity and

transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-870. 1997.

67. GUSTAFSSON JA. Estrogen receptor  $\beta$  - a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* 163:379-383. 1999.
68. FANG S., ANDERSON K.M. AND LIAO S. Receptor proteins for androgens: on the role of specific proteins in selective retention of  $17\beta$ -hydroxy- $5\alpha$ -androstane-3-one by rat ventral prostate *in vivo* and *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* 244, 6584-6595. 1969.
69. KRIEG M., SMITH K. AND BARTSCH W. Demonstration of a Specific Androgen Receptor in Rat Heart Muscle: Relationship between Binding, Metabolism, and Tissue Levels of Androgens. *Endocrinology* 103(5), 1686-1694. 1978.
70. CHANG C., KOKONTIS J. AND LIAO S.T. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptor. *Science* 240, 324-326. 1988.
71. BRINKMANN A.O., BLOK L.J., DERUITER P.E., DOESBURG P., STEKETEE K., BERREVOETS C.A. AND TRAPMAN J. Mechanisms of androgen receptor activation and function. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 69, 307-313. 1999.
72. MACLEAN H.E., WARNE G.L. AND ZAJAC J.D. Localization of Functional Domains in the Androgen Receptor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 62(4), 233-242. 1997.
73. ROY A.K. AND CHATTERJEE B. Androgen Action. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 5(2), 157-176. 1995.
74. JANNE O.A., PALVIMO J.J., KALLIO P. AND MEHTO M. Androgen Receptor and Mechanism of Androgen Action. *Annals of Medicine* 25, 83-89. 1993.

75. COUSE J.F. AND KORACH K.S. Estrogen Receptor Null Mice: What Have We Learned and Where Will They Lead Us? *Endocrine Reviews* 20(3), 358-417. 1999.
76. DAVIDGE S.T., ZHANG Y. AND STEWART K.G. A comparison of ovariectomy models for estrogen studies. *American Journal of Physiology* 280, R904-R907. 2001.
77. GUSTAFSSON JA. An Update on Estrogen Receptors. *Seminars in Perinatology* 24:66-69. 2000.
78. ROE BE, CHIU KM AND ARNAUD CD. Selective Estrogen Receptor Modulators and Postmenopausal Health. *Advances in Internal Medicine* 45:259-278. 2000.
79. KUIPER GGJM AND GUSTAFSSON JA. The novel estrogen receptor-beta subtype: Potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett* 410:87-90. 1997.
80. PAECH K, WEBB P, KUIPER GGJM, ET AL. Differential ligand activation of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP1 sites. *Science* 277:1508-1510. 1997.
81. PELLETIER G. Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histol Histopathol* 15(4), 1261-1270. 2000.
82. COUSE JF, LINDZEY J, GRANDIEN K, GUSTAFSSON JA AND KORACH KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor- $\beta$  (ER $\beta$ ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER $\alpha$ -knockout mouse. *Endocrinology* 138:4613-4621. 1997.
83. STUMPF WE, SAR M AND AUMÜLLER G. The heart: A target organ for estradiol. *Science* 196:319-321. 1977.

84. GROHÉ C, KAHLERT S, LÖBBERT K, STIMPEL M, KARAS RH, VETTER H AND NEYSES L. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Letters* 416:107-112. 1997.
85. TAYLOR AH AND AL-AZZAWI F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *Journal of Molecular Endocrinology* 24:145-155. 2000.
86. JANKOWSKI M., RACHELSKA G., DONGHAO W., MCCANN S.M., AND GUTKOWSKA J. Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(20), 11765-11770. 2001.
87. MANOLAGAS S.C. AND KOUSTENI S. Perspective: Nonreproductive Sites of Action of Reproductive Hormones. *Endocrinology* 142(6), 2200-2204. 2001.
88. PIETRAS RJ AND SZEGO CM. Endometrial cell calcium and oestrogen action. *Nature* (253), 357-359. 1975.
89. PIETRAS RJ AND SZEGO CM. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* (265), 69-72. 1977.
90. COLLINS P. AND WEBB C. Estrogen hits the surface. *Nature Medicine* (5), 1130-1131. 1999.
91. BRUBAKER KD AND GAY CV. Evidence for Plasma Membrane-Mediated Effects of Estrogen. *Calcified Tissue International* 64, 459-462. 1999.
92. LEVIN ER. Cellular Functions of the Plasma membrane Estrogen Receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 10(9), 374-377. 1999.
93. GORCZYNSKA E. AND HANDELSMAN D.J. Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. *Endocrinology* 136, 2052-2059. 1995.

94. GIGUÈRE V., TREMBLAY A., AND TREMBLAY G.B. Estrogen receptor  $\beta$ : Re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling. *Steroids* 63, 335-339. 1998.
95. KATZENELLENBOGEN B.S. AND KORACH K.S. A New Actor in the Estrogen Receptor Drama-Enter ER $\beta$ . *Endocrinology* 138, 861-862. 1997.
96. COWLEY S.M., HOARE S., MOSSELMAN S. AND PARKER M.G. Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  Form Heterodimers on DNA. *The Journal of Biological Chemistry* 272(32), 19858-19862. 1997.
97. PETTERSSON K., GRANDIEN K., KUIPER G.G.J.M. AND GUSTAFSSON J.A. Mouse Estrogen Receptor  $\beta$  Forms Estrogen Response Element-Binding Heterodimers with Estrogen Receptor  $\alpha$ . *Molecular Endocrinology* 11(10), 1486-1496. 1997.
98. WEIHUA Z., SAJI S., CHENG G., JENSEN E.V., WARNER M. AND GUSTAFSSON J.A. Estrogen receptor (ER)  $\beta$ , a modulator of ER $\alpha$  in the uterus. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 97(11), 5936-5941. 2000.
99. KATZENELLENBOGEN B.S. Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways. *Biology and Reproduction* 54, 287-293. 1996.
100. ARANDA A. AND PASCUAL A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological Reviews* 81, 1269-1304. 2001.
101. PARL FF. Estrogens, Estrogen Receptor and Breast Cancer. *IOS Press* 1-263. 2000.
102. CULIG Z., HOBISH A., CRONAUER M.V., RADMAYR C., TRAPMAN J., HITTMAYER A., BARTSCH G. AND KLOCKER H. Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-1, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Research* 54, 5474-5478. 1994.

103. CURTIS S.W., WASHBURN T., SEWALL C., DIAUGUSTINE R., LINDZEY J., COUSE J.F. AND KORACH K.S. Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 12626-12630. 1996.
104. STOICA A., SACEDA M., DORAISWAMY V.L., COLEMAN C. AND MARTIN M.B. Regulation of estrogen receptor- $\alpha$  gene expression by epidermal growth factor. *Journal of Endocrinology* 165, 371-378. 2000.
105. IGNARD-TROWBRIDGE D.M., NELSON K.G., BIDWELL M.C., CURTIS S.W., WASHBURN T.F., MACHLACHLAN J.A. AND KORACH K.S. Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 4658-4662. 1992.
106. KLINGE C.M. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65, 227-251. 2000.
107. LI Z., JOYAL J.L. AND SACKS D.B. Calmodulin Enhances the Stability of the Estrogen Receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 276(20), 17354-17360. 2001.
108. PETERSSON K. AND GUSTAFSSON J.A. Role of Estrogen Receptor Beta in Estrogen Action. *Annual Reviews of Physiology* 63, 165-192. 2001.
109. TRÉPANIÉ-BOULAY V., ST-MICHEL C., TREMBLAY A. AND FISET C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circulation Research* 89(5), 437-444. 2001.
110. BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254. 1976.

111. JONES L.R. AND BESCH H.JR. Isolation of Canine Cardiac Sarcolemmal Vesicles. *Meth Pharmacol* 5, 1-12. 1984.
112. COHEN P. AND ROSEMEYER M.A. Glucose-6-phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocytes. *Methods Enzymol* 41, 208-214. 1975.
113. SCHEUER J., MALHOTRA A., SCHAIBLE T.F. AND CAPASSO J. Effects of Gonadectomy and Hormonal Replacement on Rat Hearts. *Circulation Research* 61, 12-19. 1987.
114. ZYSOW BR, KAUSER K, LAWN RM AND 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* 17:1741-1745. 1997.
115. STAM A.C.JR., SHELBURNE J.W., FELDMAN D. AND SONNENBLICK E.H. A myocardial sarcolemma preparation and the ouabain-sensitive (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)-ATPase. *Biochimica and Biophysica Acta* 189, 304-307. 1969.
116. GELBART A. AND GOLDMAN R.H. Correlation between microsomal (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase activity and [<sup>3</sup>H]ouabain binding to heart tissue homogenate. *Biochimica and Biophysica Acta* 481, 689-694. 1977.
117. BERS D. Isolation and characterization of cardiac sarcolemma. *Biochimica and Biophysica Acta* 555, 131-146. 1979.
118. LUCAS-HÉRON B., LOIRAT M.J. AND OLLIVIER B. Comparative Biochemical Study of Sarcolemma and Sarcoplasmic Reticulum Fractions Isolated from Mouse Skeletal and Cardiac Muscles. *Comparative and Biochemical Physiology* 88B(2), 421-427. 1987.

119. JI Y., LOUKIANOV E. AND PERIASAMY M. Analysis of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  transport and  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase enzymatic properties using mouse cardiac homogenates. *Analytical Biochemistry* 269, 236-244. 1999.
120. LYTTON J., WESTLIN M. AND HANLEY M.R. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *The Journal of Biological Chemistry* 266(26), 17067-17071. 1991.
121. KIRBY M.S., SAGARA Y., GAA S., INESI G., LEDERER W.J. AND ROGERS T.B. Thapsigargin inhibits contraction and  $\text{Ca}^{2+}$  transient in cardiac cells by specific inhibition of the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pump. *The Journal of Biological Chemistry* 267(18), 12545-12551. 1992.
122. WUYTACK F. AND RAEYMAEKERS L. The  $\text{Ca}^{2+}$ -transport ATPases from the plasma membrane. *J Bioenerg Biomembr* 24(3), 285-300. 1992.
123. LANGER G.A., FRANK J.S. AND PHILIPSON K.D. Ultrastructure and calcium exchange of the sarcolemma, sarcoplasmic reticulum and mitochondria of the myocardium. *Pharmac. Ther.* 16, 331-376. 1982.
124. MONJE P. AND BOLAND R. Characterization of membrane estrogen binding proteins from rabbit uterus. *Molecular and Cellular Endocrinology* 147:75-84. 1999.
125. MARINO T.A., CAO W., LEE J. AND COURTNEY R. Localization of proliferating cell nuclear antigen in the developing and mature rat heart cell. *Anatomical Records* 245, 677-684. 1996.
126. DE JAGER T, PELZER T, MULLER-BOTZ S, IMAM A, MUCK J AND NEYSES L. Mechanisms of Estrogen Receptor Action in the Myocardium: Rapid Gene Activation Via The Erk1/2 Pathway And Serum Response Elements *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (30): 27873–27880. 2001.

127. MARSH JD, LEHMANN MH, RITCHIE RH, GWATHMEY JK, GREEN GE AND SCHIEBINGER RJ. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* 98:256-261. 1998.
128. CARAFOLI E. The Ca<sup>2+</sup> pump of the plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 2115-2118. 1992.
129. OH P. AND SCHNITZER J.E. Isolation and subfractionation of plasma membranes to purify caveolae separately from glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein microdomains. *Cell biology: A laboratory handbook*, 2<sup>e</sup> édition, 2: 34-45. 1998.
130. LABRIE F., LUU-THE V., LIN S.X., SIMARD J., LABRIE C., EL-ALFY M., PELLETIER G. AND BÉLANGER A. Intracrinology: role of the family of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 1-16. 2000.
131. GROHÉ C, KAHLERT S, LÖBBERT K AND VETTER H. Expression of oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in rat heart: role of local oestrogen synthesis. *J Endocrinol* 156:R1-R7. 1998.
132. DAVIS S. Androgen Replacement in women: A Commentary. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84(6), 1886-1891. 1999.
133. SERALINI G. AND MOSLEMI S. Aromatase inhibitors: past, present and future. *Molecular and Cellular Endocrinology* 178(1-2), 117-131. 2001.
134. PETERS B.P., ESBIUS S., GOLDSTEIN I.J. AND FLASHNER M. Interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid. *Biochemistry* 18, 5505-5511. 1979.
135. TAKEUCHI S., TAKAGISHI Y., YASUI K., MURATA Y., TOYAMA J. AND KODAMA I. Voltage-gated K<sup>+</sup> channel, Kv4.2, localizes predominantly to the transverse-

- axial tubular system of the rat myocyte. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32, 1361-1369. 2000.
136. LIN A.L., SCHULTZ J.J., BRENNER R.M. AND SHAIN S.A. Sexual dimorphism characterizes baboon myocardial androgen receptors but not myocardial estrogen and progesterone receptors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 37(1), 85-95. 1990.
137. KYAKUMOTO S., KUROKAWA R., OHARA-NEMOTO Y. AND OTA M. Sex difference in the cytosolic and nuclear distribution of androgen receptor in mouse submandibular gland. *Journal of Endocrinology* 108(2), 267-273. 1986.
138. LIN A.L. AND SHAIN S.A. Sexual dimorphism characterizes steroid hormone modulation of rat aortic steroid hormone receptors. *Endocrinology* 119(1), 296-302. 1986.
139. HUMBERT J.P., MATTER N., ARTAULT J.C., KOPPLER P. AND MALVIYA A.N. Inositol 1,4,5-triphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-triphosphate: discrete distribution of inositol phosphate to inner and outer nuclear membranes. *The Journal of Biological Chemistry* 271(1), 478-485. 1996.
140. GUIHARD G., PROTEAU S., PAYET M.D., ESCANDE D. AND ROUSSEAU E. Patch-clamp study of liver nuclear ionic channels reconstituted into giant protéoliposomes. *FEBS Letters* 476(3), 234-239. 2000.
141. LUGNIER C., KERAVIS T., LEBEC A., PAUVERT O., PROTEAU S. AND ROUSSEAU E. Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms associated to isolated cardiac nuclei. *Biochimica and Biophysica Acta* 1472(3), 431-446. 1999.

142. GUIHARD G., PROTEAU S. AND ROUSSEAU E. Does the nuclear envelope contain two types of ligand-gated  $\text{Ca}^{2+}$  release channels? *FEBS Letters* 414(1), 89-94. 1997.
143. SHUPNIK M.A., GORDON M.S. AND CHIN W.W. Tissue specific regulation of rat estrogen receptor mRNAs. *Molecular Endocrinology* 3, 660-665. 1989.
144. SHUGHRUE P.J., MALCOLM V.L., SCRIMO P.J. AND MERCHENTHALER I. Comparative distribution of estrogen receptor- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER- $\beta$ ) mRNA in the pituitary, gonad and reproductive tract. *Steroids* 63, 498-504. 1998.
145. SAR M., LUBAHN D.B., FRENCH F.S., AND WILSON E.M. Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology* 127(6), 3180-3186. 1990.
146. JENSEN E.V. AND DESOMBRE E.R. Estrogen-receptor interactions. *Science* 182, 126-134. 1973.
147. KHAW K.T. AND BARRETT-CONNOR E. Blood pressure and endogenous testosterone in men: an inverse relationship. *Journal of Hypertension* 6, 329-332. 1988.
148. MCCROHON J.A., JESSUP W., HANDELSMAN D.J. AND CELERMAJER D.S. Androgen exposure increases human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial cell expression of vascular cell adhesion molecule-1. *Circulation* 99, 2317-2322. 1999.
149. CHAMBLISS K.L., YUHANNA I.S., MINEO C., LIU P., GERMAN Z., SHERMAN T.S., MENDELSON M.E., ANDERSON R.G. AND SHAUL P.W. Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circulation Research* 87, E44-E52. 2000.
150. OKAMOTO T., SCHLEGEL A., SCHERER P.E., AND LISANTI M.P. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes"

- at the plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 5419-5422. 1998.
151. SCHLEGEL A., WANG C., KATZENELLENBOGEN B.S., PESTELL R.G., AND LISANTI M.P. Caveolin-1 potentiates estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) signaling: caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ER $\alpha$ . *The Journal of Biological Chemistry* 274, 33551-33556. 1999.
152. KREGE J.H., HODGIN J.B., COUSE J.F., ENMARK E., WARNER M., MAHLER J.F., SAR M., KORACH K.S, GUSTAFSSON J.A, AND SMITHIES O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor- $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 15677-15682. 1998.
153. FISHER J.S., GRAVES K.H., PARLOW A.F., AND SIMPSON E.R. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6965-6970. 1998.
154. DIERICH A., SAIRAM M.R., MONACO L., FIMIA G.M., GANSMULLER A., LEMEURE M., AND SASSONE-CORSI P. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling *in vivo*. Targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13612-13617. 1998.
155. LYON M.F. AND HAWKES S.G. X-linked gene for testicular feminization. *Nature* 227, 1217-1219. 1970.
156. MCTERNAN P.G., ANWAR A., EGGO M. C., BARNETT A.H., STEWART P.M., AND KUMAR S. Gender differences in the regulation of P450 aromatase expression and activity in human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24(7), 875-881. 2000.

157. CLARK R.B., TREMBLAY A., MELNYK P., ALLEN B.G., GILES W.R. AND FISET C. T-tubule localization of the inward-rectifier  $K^+$  channel in mouse ventricular myocytes: a role in  $K^+$  accumulation. *The Journal of Physiology* 537.3, 979-992. 2001.
158. SWEADNER K.J. AND DONNET C., Structural similarities of  $Na,K$ -ATPase and SERCA, the  $Ca^{2+}$ -ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochemical Journal* 356, 685-704. 2001.
159. GUERINI D., The significance of the isoforms of plasma membrane calcium ATPase. *Cell Tissue Res* 292, 191-197. 1998.
160. LEBLANC N., CHARTIER D., GOSSELIN H. AND ROULEAU J.L. Age and gender differences in excitation-contraction coupling of the rat ventricle. *The Journal of Physiology* 511.2, 533-548. 1998.
161. KARGACIN M.E., ALI Z., WARD C.A., POLLOCK N. AND KARGACIN G.J. Tamoxifen inhibits  $Ca^{++}$  uptake by the sarcoplasmic reticulum. *Pflügers Arch-European Journal of Physiology*, 440, 573-579. 2000.
162. DODDS M.L., KARGACIN M.E. AND KARGACIN G.J., Effects of anti-oestrogens and  $\beta$ -estradiol on calcium uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum. *British Journal of Pharmacology*, 132, 1374-1382. 2001.
163. SCRIVEN D.R.L., DAN P. AND MOORE E.D.W. Distribution of Proteins Implicated in Excitation-Contraction Coupling in Rat Ventricular Myocytes. *Biophys J*, 79 (5): 2682-2691, 2000.
164. FISET C., CLARK R.B., LARSEN T.S. AND GILES W.R. A rapidly activating sustained  $K^+$  current modulates repolarization and excitation-contraction coupling in adult mouse ventricle. *J Physiol (London)*, 504 : 557-563, 1997.
165. ALLEN B.G. AND KATZ S. Calreticulin and Calsequestrin are Differentially Distributed in Canine Heart. *J Mol Cell Cardiol*, 32: 2379-2384. 2000.

166. SIMONS K. AND TOOMRE D. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews*, 1: 31-39. 2000.
167. LEVIN ER. Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *Journal of Applied Physiology*, 91: 1860-1867. 2001.
168. NADAL A, DIAZ M AND VALVERDE MA. The Estrogen Trinity: Membrane, Cytosolic, and Nuclear Effects. *News in Physiological Sciences*, 16: 251-255. 2001.
169. NADAL A, ROPERO AB, FUENTES E AND SORIA B. The plasma membrane estrogen receptor: nuclear or unclear? *Trends in Pharmacological Sciences*, 22: 597-599. 2001.
170. MARTENS JR, SAKAMOTO N, SULLIVAN SA GROBASKI TD AND TAMKUN MM. Isoform-specific localization of voltage-gated K<sup>+</sup> channels to distinct lipid raft populations: targeting of Kv1.5 to caveolae. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (11): 8409-8414. 2001.
171. KRIETMANN B AND BAYARD F. Androgen interaction with oestrogen receptor in human tissues. *J Steroid Biochem*. 11: 1589-1595. (1979)
172. PANET-RAYMOND V, GOTTLIEB B, BEITEL LK, PINSKY L AND TRIFIRO MA. Interactions between androgen and estrogen receptors and the effects on their transactivational properties. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 167: 139-150. 2000.
173. MERCIER I, PHAM-DANG M, CLEMENT R, GOSSELIN H, COLOMBO F, ROULEAU JL AND CALDERONE A. Elevated mean arterial pressure in the ovariectomized rat was normalized by ET<sub>A</sub> receptor antagonist therapy: absence of cardiac hypertrophy and fibrosis. *British Journal of Pharmacology*, 136: 685-692. 2002.
174. DUROCHER D, GREPIN C, NEMER M. Regulation of gene expression in the endocrine heart. *Recent Progress in Hormone Research*, 53: 7-23. 1998.
175. WILLIAMS, J. K., ADAMS, M. R. AND CLARKSON, T. B. Effects of estrogens on vascular tone. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 28: S29-S33. 1996.

176. GRAHAM J.D. AND CLARKE C.L. Physiological Action of Progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews*, 18(4):502-519.1997.
177. RIDER V. Progesterone and the control of uterine cell proliferation and differentiation. *Frontiers in Bioscience*, 7, d1545-1555, 2002.
178. MCCARTY JR K.S. AND MCCARTY SR K.S. Chapitre 5.7: Principles of Endocrine Therapy: Progestins, in : *Cancer Medicine*, 5<sup>e</sup> édition, Canada, 2000.
179. PRITCHARD K.I., KHAN H. AND LEVINE M. Clinical practice guidelines for the care and treatment of breast cancer: The role of hormone replacement therapy in women with a previous diagnosis of breast cancer *CMAJ*, 166 (8): 1017-1022. 2002.
180. PERROT-APPLANAT M., COHEN-SOLAL K, MILGROM E AND FINET M. Progesterone receptor expression in human saphenous veins. *Circulation*, 92 :2975-2983, 1995.
181. MERCIER I, COLOMBO F, MADER S AND CALDERONE A. Ovarian hormones induce TGF- $\beta_3$  and fibronectin mRNAs but exhibit a disparate action on cardiac fibroblast proliferation. *Cardiovascular Research* 53: 728-739. 2002.
182. MCDONNELL DP AND NORRIS JD. Connections and Regulation of the human Estrogen Receptor. *Science*, 296: 1642-1644. 2002.
183. HJELMELAND LM Solubilization of Native membrane proteins. *Methods in Enzymology*, 182: 253-264. 1990.
184. MCPHAUL MJ AND YOUNG M. Complexities of androgen action. *J Am Acad Dermatol*. 45 (suppl 3): S87-94. 2001.

## ANNEXE 1

Le canal potassique Kir2.1 est responsable du courant potassique entrant à rectification retardée ( $I_{KI}$ ). Des données d'électrophysiologie obtenues sur des myocytes ventriculaires de souris ont démontré que suite à une dépolarisation membranaire, un courant lent entrant (courant de queue;  $I_{tail}$ ) est généré. Ce courant de queue (sous-tendu par le canal potassique Kir2.1) est probablement du à une accumulation d'ions potassium au niveau des tubules-t des myocytes ventriculaires. La localisation du canal Kir2.1 au niveau des tubules-t dans les myocytes ventriculaire de souris observée par immunofluorescence et microscopie confocale corrobore ces données d'électrophysiologie. La colocalisation avec une lectine marquant les sucres hautement glycosylés présents dans la membrane plasmique, le "*Wheat Germ Agglutinin*" (WGA) apporte une preuve supplémentaire de la localisation du canal Kir2.1 au niveau des tubules-t dans les myocytes ventriculaires de souris (figure 8 de la publication présentée en annexe 1).

Au niveau des oreillettes, la situation est différente. En effet, il a aussi été démontré qu'une dépolarisation membranaire n'entraîne pas de courant de queue dans les myocytes auriculaires de souris. Les tubules-t étant presque complètement absents dans les myocytes auriculaires, le marquage du canal Kir2.1 dans les oreillettes de souris ne suit pas l'organisation caractéristique des tubules-t observée dans les ventricules. De plus, la colocalisation avec le WGA dans les oreillettes est présente presque seulement au niveau de la membrane sarcolemmale des oreillettes de souris, confirmant plus fortement ce résultat (figure 9 de la publication présentée en annexe 1).

Dans cette publication, j'ai mis au point et réalisé, avec la collaboration de M. Louis-Robert Villeneuve, les expériences d'immunofluorescence et de microscopie confocale sur des myocytes ventriculaires et auriculaires de souris. J'ai aussi participé activement à l'écriture des sections du manuscrit reliées à ces expériences, aux réponses aux reviewers et aux corrections ainsi qu'à la mise en forme des figures.

## T-tubule localization of the inward-rectifier $K^+$ channel in mouse ventricular myocytes: a role in $K^+$ accumulation

Robert B. Clark, Annie Tremblay\*†, Peter Melnyk\*‡, Bruce G. Allen\*,  
Wayne R. Giles and Céline Fiset\*†

*Departments of Physiology and Biophysics and Medicine, University of Calgary, Faculty of Medicine, Calgary, Alberta, T2N 4N1, \*Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Bélanger est, Montréal, Québec, H1T 1C8, †Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montréal, Québec and ‡Department of Pathology, McGill University, Montréal, Québec, Canada*

(Received 10 May 2001; accepted after revision 21 August 2001)

1. The properties of the slow inward 'tail currents' ( $I_{tail}$ ) that followed depolarizing steps in voltage-clamped, isolated mouse ventricular myocytes were examined. Depolarizing steps that produced large outward  $K^+$  currents in these myocytes were followed by a slowly decaying inward  $I_{tail}$  on repolarization to the holding potential. These currents were produced only by depolarizations: inwardly rectifying  $K^+$  currents,  $I_{K1}$ , produced by steps to potentials negative to the holding potential, were not followed by  $I_{tail}$ .
2. For depolarizations of equal duration, the magnitude of  $I_{tail}$  increased as the magnitude of outward current at the end of the depolarizing step increased. The apparent reversal potential of  $I_{tail}$  was dependent upon the duration of the depolarizing step, and the reversal potential shifted to more depolarized potentials as the duration of the depolarization was increased.
3. Removal of external  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$  had no significant effect on the magnitude or time course of  $I_{tail}$ .  $BaCl_2$  (0.25 mM), which had no effect on the magnitude of outward currents, abolished  $I_{tail}$  and  $I_{K1}$  simultaneously.
4. Accordingly,  $I_{tail}$  in mouse ventricular myocytes probably results from  $K^+$  accumulation in a restricted extracellular space such as the transverse tubule system (t-tubules). The efflux of  $K^+$  into the t-tubules during outward currents produced by depolarization shifts the  $K^+$  Nernst potential ( $E_K$ ) from its 'resting' value (close to  $-80$  mV) to more depolarized potentials. This suggests that  $I_{tail}$  is produced by  $I_{K1}$  in the t-tubules and is inward because of the transiently elevated  $K^+$  concentration and depolarized value of  $E_K$  in the t-tubules.
5. Additional evidence for the localization of  $I_{K1}$  channels in the t-tubules was provided by confocal microscopy using a specific antibody against Kir2.1 in mouse ventricular myocytes.

The complex structure of cardiac muscle has made interpretation of the results of early electrophysiological studies of the membrane currents in multicellular tissue difficult. One of the most important problems in multicellular tissue is the accumulation of  $K^+$  in the intercellular clefts, which are only 20–30 nm wide. These changes in the extracellular  $K^+$  concentration can distort the magnitude and time course of  $K^+$  currents (Almers, 1972; Attwell & Cohen, 1977; Attwell *et al.* 1979; Cohen & Kline, 1982). Many of these problems have been greatly reduced by the use of enzymatically isolated single cardiac cells. However, single myocytes have numerous invaginations of the sarcolemmal membrane that could act as restricted spaces in which ions might accumulate during activation of transmembrane currents. For example, adult mouse ventricular myocytes have an

extensive transverse tubule (t-tubule) system whose surface area makes up approximately 50% of the total sarcolemmal membrane of the cells (Forbes *et al.* 1984). These tubules are small, about 50–100 nm in diameter (Forbes *et al.* 1984), and hence the tubule lumen could readily accumulate ions during current flow across the t-tubule membrane.

During the course of a voltage-clamp study of the  $K^+$  currents in single adult mouse ventricular myocytes (Fiset *et al.* 1997), it was noted that outward currents produced by depolarizing voltage-clamp steps were followed by a transient inward 'tail current' ( $I_{tail}$ ) when the ventricular cell was repolarized to a holding potential near the cell's resting membrane potential ( $-80$  mV). In contrast, no inward  $I_{tail}$  were observed following

depolarizing steps in adult mouse atrial myocytes. The present study was undertaken to investigate the properties and the origin of  $I_{\text{tail}}$  in adult mouse ventricular myocytes. The results of this study show that  $I_{\text{tail}}$  is due to  $\text{K}^+$  accumulation within the t-tubule system of mouse ventricular myocytes and subsequent activation of inwardly rectifying  $\text{K}^+$  ( $I_{\text{K1}}$ ) channels.

## METHODS

### Isolation of adult mouse ventricular myocytes and electrophysiological methods

Ventricular myocytes were isolated from adult male Swiss-Webster or CD-1 mice (6–9 weeks of age) by enzymatic dissociation, as described previously (Fiset *et al.* 1997). The animals were heparinized, anaesthetized by inhalation of methoxyflurane and then killed by cervical dislocation. After perfusion of the heart with enzyme solutions, the ventricular tissue was triturated gently with a Pasteur pipette for 10–15 min. Rod-shaped single myocytes were then collected and stored in Kraft-Brühe (KB) solution at 4 °C until use 2–6 h later. During cell isolation solutions were maintained at  $37 \pm 1$  °C and were equilibrated with 100%  $\text{O}_2$ . Isolated cells were placed into a recording chamber (volume  $\sim 200$   $\mu\text{l}$ ) on the stage of an inverted microscope (Diaphot; Nikon, Tokyo, Japan) and superfused with a Hepes-buffered Tyrode solution at 1–2  $\text{ml min}^{-1}$ . All experiments were carried out at a room temperature (RT) of 20–22 °C. Whole-cell voltage-clamp recordings were made with a patch-clamp amplifier (EPC-7; List-Medical Electronics, Darmstadt, Germany). Patch pipettes had resistances in the range 1.5–4  $\text{M}\Omega$  when filled with pipette solution. Series resistance in the whole-cell mode was in the range 4–8  $\text{M}\Omega$ ; 80–90% series resistance compensation was always used. Voltage-clamp currents were low-pass filtered at 1–3 kHz (four-pole Bessel), digitized at 4–10 kHz with a 12 bit analog-to-digital converter (DT2821; Data Translation, Marlborough, MA, USA), and stored in a microcomputer using Cellsoft software (D. Bergman, University of Calgary). The same software controlled the programmable stimulator that generated the voltage-clamp protocols.

Membrane currents were normalized to cell capacitance ( $\text{pA pF}^{-1}$ ) when required. Capacitive currents were produced by a 5 mV depolarization from a holding potential of  $-80$  mV and integrated to determine the cell capacitance.

### Immunofluorescence analysis and confocal microscopy

Ventricular myocytes were freshly isolated from 6- to 9-week-old male mice and plated on laminin-coated coverslips ( $15$   $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) for 1 h at 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ . Cells were fixed (2% paraformaldehyde, pH 7.4, 10 min, 4 °C) and subsequently permeabilized (0.1% Triton X-100, 10 min, RT). Three washes with phosphate-buffered saline (PBS) followed each step. To prevent non-specific binding, cells were blocked with 10% normal donkey serum (NDS) for 1 h at RT. After overnight incubation with a rabbit polyclonal primary anti-Kir2.1 antibody (1:200; Alomone Laboratories, Jerusalem, Israel), cells were washed with PBS and incubated for 1 h at RT with a tetramethylrhodamine-isothiocyanate-conjugated donkey anti-rabbit antibody (1:500; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). In control experiments, the primary antibody was omitted. Cells were then washed three times with PBS and incubated for 30 min at RT with wheat germ agglutinin (WGA) conjugated to Oregon Green 488 (1:10; Molecular Probes) (Sedarat *et al.* 2000; Takeuchi *et al.* 2000). After washing the cells with PBS, coverslips were mounted on slides using 1  $\text{mg ml}^{-1}$  *p*-phenylenediamine diluted with 75% glycerol and examined using a Zeiss Axiovert 100M microscope coupled to a Zeiss LSM 510 laser scanning confocal system.

### Solutions and drugs

The Hepes-buffered Tyrode solution contained (mM): 140 NaCl, 5.4 KCl, 1  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 10 Hepes, 5.5 glucose (pH adjusted to 7.4 at RT with NaOH).  $\text{BaCl}_2$  was added to the solution at the concentrations indicated. Where indicated, NaCl was replaced by an isomolar amount of *N*-methyl-D-glucamine, and  $\text{CaCl}_2$  was replaced by  $\text{MgCl}_2$ ; the pH of this ' $\text{Na}^+$ -/  $\text{Ca}^{2+}$ -free' solution was adjusted to 7.4 with HCl. The patch pipette solution contained (mM): 110 potassium aspartate, 20 KCl, 8 NaCl, 1  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\text{CaCl}_2$ , 10 EGTA, 4  $\text{K}_2\text{ATP}$ , 10 Hepes (pH adjusted to 7.2 with KOH). Solutions were continuously gassed with 100%  $\text{O}_2$ .

### Statistical analysis

All results are presented as means  $\pm$  s.e.m. Statistical significance was determined by Student's *t* test for paired or unpaired observations, or ANOVA, where appropriate. Statistical analyses were performed using Origin 5.0 software. A probability of  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### Slow $I_{\text{tail}}$ follow depolarization of voltage-clamped mouse ventricular myocytes

Figure 1A illustrates a representative example of a family of membrane currents recorded from a voltage-clamped mouse ventricular myocyte, produced by 750 ms voltage steps over the range of membrane potentials from  $-120$  to  $+50$  mV, from a holding potential of  $-80$  mV. Several features of these currents are of note.

(1) The outward membrane currents in adult mouse ventricular myocytes, which are carried primarily by  $\text{K}^+$  (Fiset *et al.* 1997), are very large. For the cell shown in Fig. 1, the peak current produced by the step to  $+50$  mV corresponded to a current density of about 90  $\text{pA pF}^{-1}$ .

(2) Outward currents declined in two distinct phases during the depolarizing steps. It has previously been shown that there are at least two different transient components of the outward  $\text{K}^+$  current in mouse ventricular myocytes (Fiset *et al.* 1997; Nerbonne, 2000; Trépanier-Boulay *et al.* 2001).

(3) Outward currents were followed by slow, transient  $I_{\text{tail}}$  on repolarization to the holding potential. This is illustrated more clearly in Fig. 1B, which shows the family of currents at the end of the depolarizing steps and after repolarization to the holding potential, on expanded time and current scales. Note that  $I_{\text{tail}}$  followed only the depolarizing voltage steps; no 'tail currents' were associated with the inward currents produced by hyperpolarizing steps.

Figure 1C shows the current–voltage relationships for the inward and outward currents, and for  $I_{\text{tail}}$ . As shown in Fig. 1A and B,  $I_{\text{tail}}$  was not produced by steps to potentials that generated inward currents; this was true even at potentials where the magnitude of the inward and outward currents was equal. For example, the currents produced by steps to  $-120$  and  $+10$  mV were of approximately equal magnitude at the end of the steps, but  $I_{\text{tail}}$  was associated only with the  $+10$  mV step.

Figure 1C shows that the magnitude of  $I_{\text{tail}}$  increased as the magnitude of the outward current at the end of the depolarizing step increased.

Figure 2 summarizes the main properties of  $I_{\text{tail}}$ , averaged from nine different ventricular myocytes. Figure 2A shows the relationship between the current at the end of the depolarizing step ( $I_{\text{end}}$ ) and  $I_{\text{tail}}$ . The ratio  $I_{\text{tail}}/I_{\text{end}}$  varied considerably from cell to cell; for example, for 1 s steps to +30 mV, this ratio ranged from 0.2 to 1.07. The average value of this ratio was independent of membrane potential over the range -20 to +40 mV. Figure 2B summarizes the kinetic properties of  $I_{\text{tail}}$ . The time course of decay of  $I_{\text{tail}}$  (at -80 mV) was described approximately by a single exponential function. The time constant varied from cell to cell over about a threefold range (e.g. from 29.7 to 77 ms) for the same nine myocytes as above (for  $I_{\text{tail}}$  following +30 mV depolarizing steps). The average time constant was not significantly dependent upon membrane potential over the range -30 to +40 mV.

The time constant was also independent of the magnitude of  $I_{\text{tail}}$ ; Fig. 2C shows a plot of the relative amplitude of  $I_{\text{tail}}$  (normalized to  $I_{\text{tail}}$  following a +40 mV step) as a function of membrane potential from -30 mV to +40 mV. Note that although  $I_{\text{tail}}$  increased in magnitude by about 10-fold over this range of potentials, the time constant of decay did not change significantly.

It is unlikely that channel deactivation is the mechanism that is responsible for generating  $I_{\text{tail}}$  in mouse ventricular myocytes. The major part of the outward current in these cells is carried by  $K^+$ ; hence, current tails produced by deactivation would be expected to have their reversal potential near the  $K^+$  Nernst potential ( $E_K$ ), which is about -83 mV in the recording conditions used in these experiments (see Methods). Consequently, large inward  $I_{\text{tail}}$  would not be expected to occur at a holding potential of -80 mV (i.e. near  $E_K$ ). The data shown in Fig. 3 provide further evidence that channel deactivation is not responsible for  $I_{\text{tail}}$ . In these experiments, ventricular cells

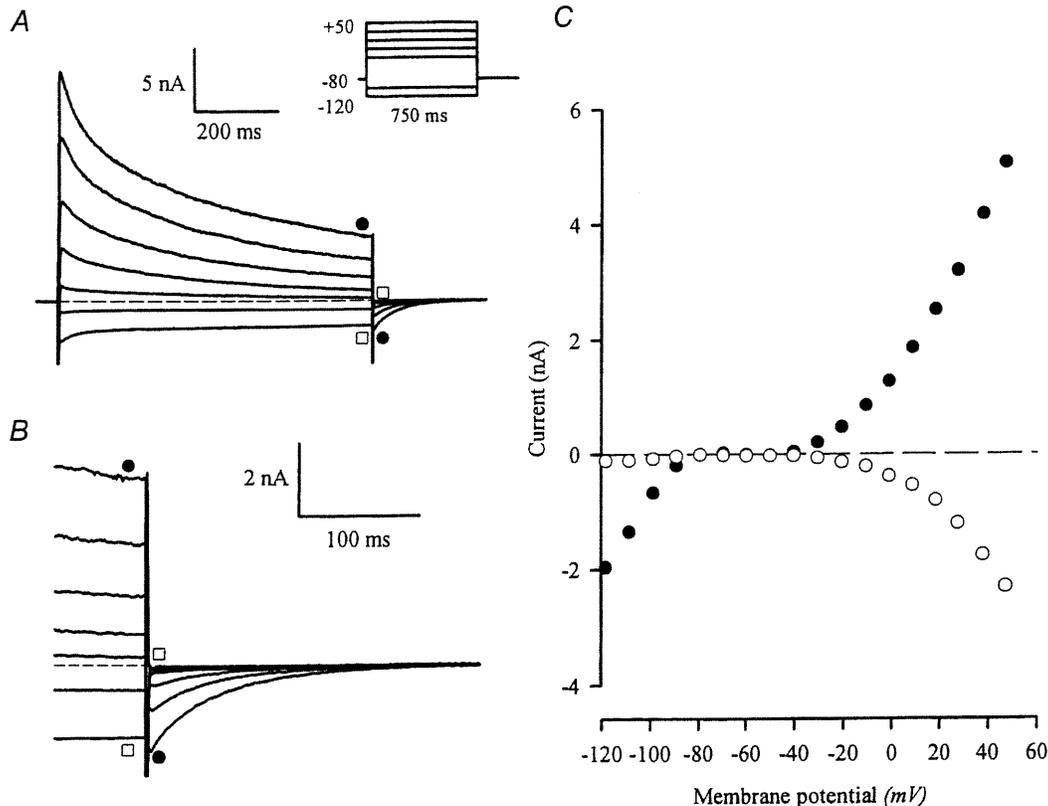


Figure 1. Slow, inward 'tail currents',  $I_{\text{tail}}$ , follow the depolarization of voltage-clamped, adult mouse ventricular myocytes

A, family of currents from a voltage-clamped, isolated mouse ventricular myocyte. The voltage-clamp protocol is shown in the inset; the holding potential was -80 mV; 0.75 s steps to potentials between -120 and 50 mV (-120, -100, -30, -10, 10, 30 and 50 mV) were applied at 0.1 Hz. Slowly decaying, inward currents followed the depolarizing (●), but not the hyperpolarizing (□), voltage-clamp steps. The dashed line indicates zero current in this, and all subsequent figures. B, currents at the end of the depolarizing steps and after repolarization to -80 mV are shown on expanded time and current scales. Note that the magnitude of the inward  $I_{\text{tail}}$  increased as the magnitude of the outward current at the end of the step increased (●). No  $I_{\text{tail}}$  followed hyperpolarizing steps (□). C, current-voltage relationship for currents obtained at the end of the voltage-clamp steps (●), and peak  $I_{\text{tail}}$  (○).

were repeatedly voltage clamped to the same potential (+20 mV), but the duration of the depolarizing step was progressively increased. Figure 3A shows that the magnitude of  $I_{\text{tail}}$  first increased, reached a maximum, and then decreased slightly as the depolarizing step was increased over the range from 10 to 285 ms. However, the magnitude of the outward current at the end of the

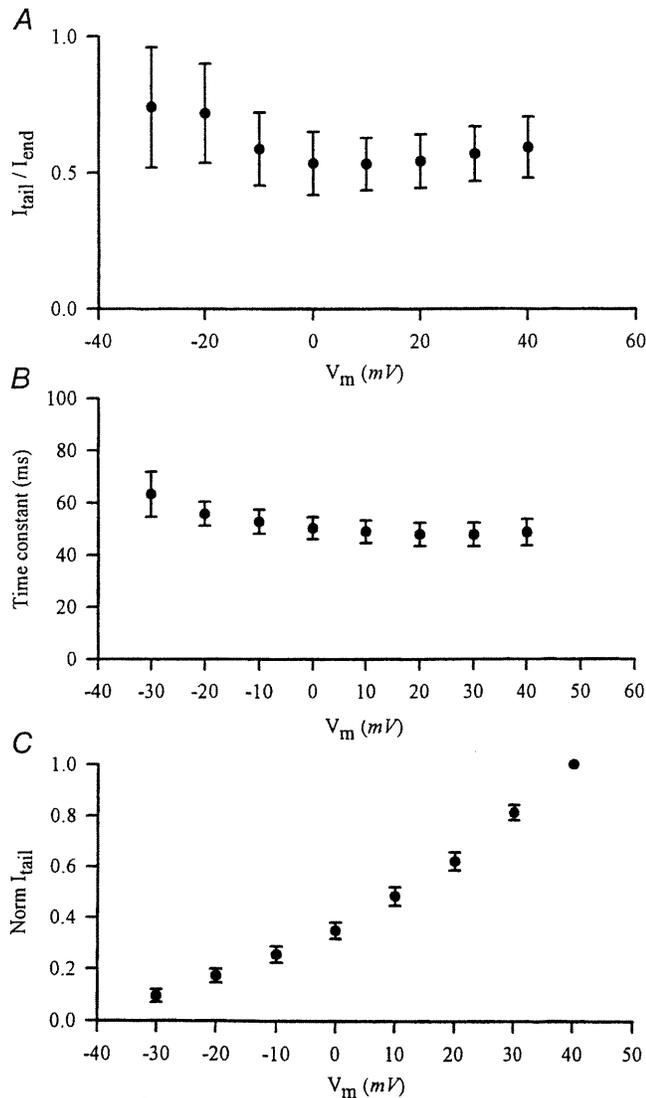


Figure 2. Summary of the properties of  $I_{\text{tail}}$

*A*, plot of the ratio of magnitude of  $I_{\text{tail}}$  to current at the end of the depolarizing step ( $I_{\text{end}}$ ) as a function of the step potential. Data (means  $\pm$  S.E.M.) were averaged from nine different ventricular myocytes. Slow  $I_{\text{tail}}$  were measured at a holding potential of  $-80$  mV. *B*, plot of the time constant of decay of  $I_{\text{tail}}$  as a function of depolarizing step potential.  $I_{\text{tail}}$  was fitted to single exponential functions. Data (means  $\pm$  S.E.M.) were averaged from nine cells (same as in *A*). *C*, normalized magnitude of  $I_{\text{tail}}$ , as a function of depolarizing step potential. Current magnitudes were normalized to  $I_{\text{tail}}$  at  $+40$  mV. Data (means  $\pm$  S.E.M.) were averaged from nine cells (same as above).

depolarizing step decreased continually as the duration of the step increased. This is shown more clearly in the plots in Fig. 3B, in which the magnitudes of the outward current at the end of the step and  $I_{\text{tail}}$  are compared for each pulse duration.  $I_{\text{tail}}$  was small during depolarizing steps of brief duration (e.g.  $< 50$  ms) where the outward current was largest. The magnitude of  $I_{\text{tail}}$  increased in parallel with step duration up to a limit of 100–150 ms, and then declined slightly for longer steps. This relationship between outward current and  $I_{\text{tail}}$  magnitudes cannot be explained by a simple channel deactivation mechanism.

#### $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchange does not generate $I_{\text{tail}}$

Slow inward  $I_{\text{tail}}$  can be generated in ventricular myocytes by the electrogenic  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  exchanger (Egan *et al.* 1989; Bouchard *et al.* 1993). The rise in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  produced during depolarization, due to the influx of  $\text{Ca}^{2+}$  through L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and/or  $\text{Ca}^{2+}$ -induced release from sarcoplasmic reticulum stores, activates the  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  antiporter. The voltage dependence of  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  exchange results in an inward current when the membrane is repolarized near  $-80$  mV (Bouchard *et al.* 1993). However, this is not likely to underlie  $I_{\text{tail}}$ . The intracellular solution contains a high concentration of EGTA (10 mM) as a  $\text{Ca}^{2+}$  buffer, so it is unlikely that intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration increases during depolarizing steps. Figure 4 shows data that make it clear that  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  exchange does not generate  $I_{\text{tail}}$ . In these experiments, currents produced by a depolarizing step (20 mV, 1 s) were recorded in control conditions and then in  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$ -free HEPES-buffered Tyrode solution (see Methods). The depolarizing step in both control and  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$ -free solutions produced  $I_{\text{tail}}$  of equal magnitude and duration upon repolarization to the holding potential of  $-80$  mV. Since  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  exchange is completely blocked in  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution (Bers *et al.* 1990), the lack of effect of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution on  $I_{\text{tail}}$  makes it improbable that  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  exchange was responsible for generating the slow  $I_{\text{tail}}$ .

#### Blocking $I_{\text{K1}}$ abolishes $I_{\text{tail}}$

Barium, at concentrations less than 1 mM, is a specific blocker of the inwardly rectifying  $\text{K}^+$  current,  $I_{\text{K1}}$ , in mouse ventricular myocytes. Figure 5 shows that 0.25 mM  $\text{BaCl}_2$  blocks both  $I_{\text{K1}}$  and  $I_{\text{tail}}$  in mouse ventricular myocytes. In the experiment shown, a depolarizing step (+20 mV, 50–200 ms duration) that produced a large outward current, and  $I_{\text{tail}}$  on repolarization, was followed by a hyperpolarizing step ( $-120$  mV, 100 ms) that activated inward  $I_{\text{K1}}$ . Application of  $\text{BaCl}_2$  completely blocked both  $I_{\text{K1}}$  and  $I_{\text{tail}}$ , but had no effect on the outward currents. In addition, the time courses of block of  $I_{\text{K1}}$  and  $I_{\text{tail}}$  as the  $\text{BaCl}_2$  solution was washed into the recording chamber were identical (data not shown). These data provide strong evidence that  $I_{\text{tail}}$  is generated by  $\text{K}^+$  flux through  $I_{\text{K1}}$  channels. As the holding potential ( $-80$  mV) was close to the nominal  $E_{\text{K}}$  under these recording conditions (see Methods), only very small  $I_{\text{K1}}$  would be

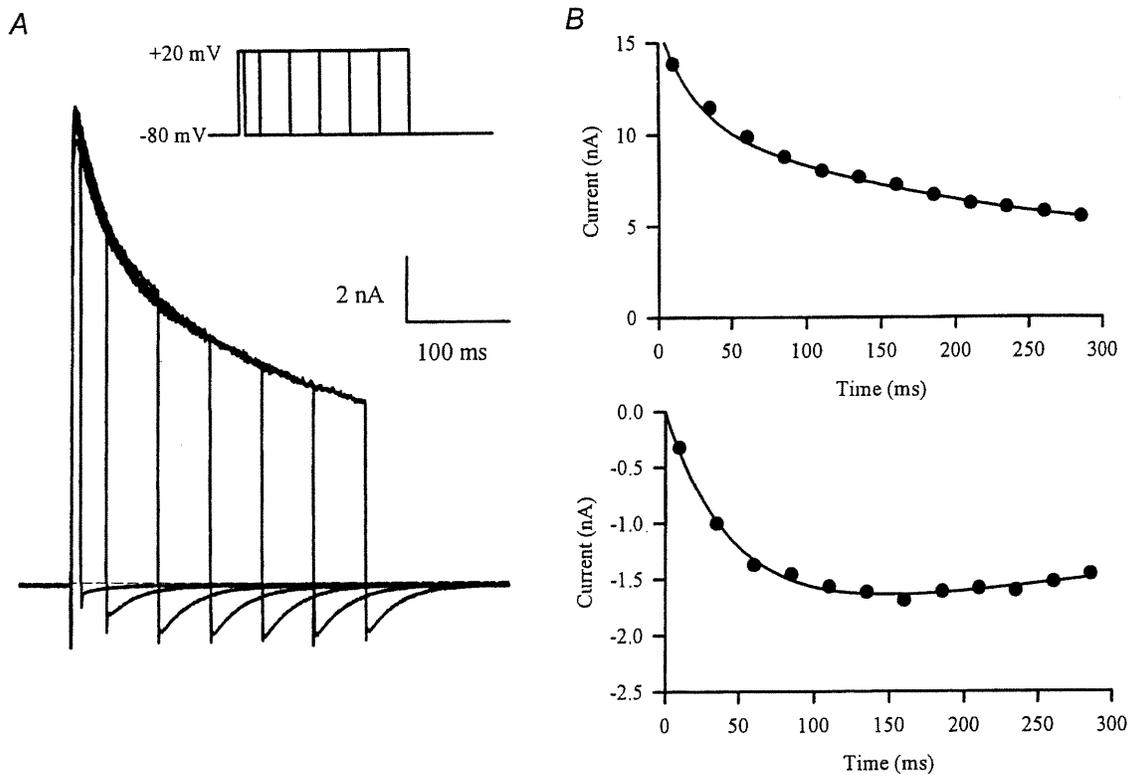


Figure 3. Effect of duration of depolarization on the magnitude of  $I_{tail}$

A, family of currents produced by a series of voltage-clamp steps (20 mV) of increasing duration (10–285 ms; inset). Note that  $I_{tail}$  increased in magnitude with increasing step duration, while the outward current at the end of each step decreased. B, plots of outward current at the end of the depolarizing step (upper graph) and  $I_{tail}$  magnitude (lower graph), as a function of depolarizing step duration.

expected to occur. The large, inward  $I_{tail}$  implies that the  $K^+$  gradient is transiently reduced by the depolarizing voltage-clamp steps, resulting in a depolarizing shift of  $E_K$ .

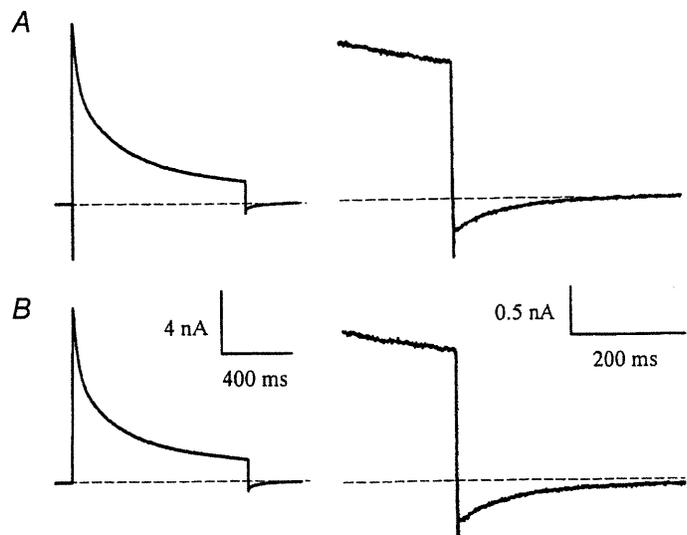
The 'reversal potential' of  $I_{tail}$  is time dependent

Figure 6A illustrates experiments designed to measure the reversal potential of  $I_{tail}$ . A depolarizing step (200 ms,

+10 mV) was followed by 1 s steps to membrane potentials between -30 and -90 mV. The  $I_{tail}$  appeared to reverse at potentials between approximately -50 and -70 mV. Figure 6A shows currents recorded from the same myocyte before and after the addition of 0.25 mM  $BaCl_2$ . The main effect of this concentration of  $BaCl_2$  was to block inward  $I_{tail}$ : this is particularly evident for the

Figure 4.  $I_{tail}$  is not generated by  $Na^+-Ca^{2+}$  exchange

A, current produced by a 20 mV, 1 s voltage-clamp step in control Hepes-buffered solution. Right panel: current is shown on expanded time and current scales. B, current in the same cell, after removing external  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$  (see Methods). Note that  $I_{tail}$  was unaffected by the removal of  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$ .



steps to  $-80$  and  $-90$  mV. In contrast, outward tail currents, especially those produced by the most positive steps in this protocol (i.e.  $-30$  and  $-40$  mV), were not changed significantly by  $\text{BaCl}_2$ . Figure 6B shows the  $\text{BaCl}_2$ -sensitive difference currents that were obtained by subtracting currents before and after the addition of  $\text{BaCl}_2$ . These difference currents, measured 'immediately' (2 ms) following the depolarizing steps, showed very pronounced inward rectification; their reversal potential was about  $-60$  mV. The outward currents produced by steps positive to  $-60$  mV were very small compared with the inward currents produced by the steps negative to  $-60$  mV. This rectification is clearly apparent from an inspection of the difference currents plotted on an expanded time scale in Fig. 6B. It is also apparent from the records in Fig. 6B that the reversal potential of the difference currents changed with time; the current at  $-70$  mV reversed direction from inward to outward about 50 ms after the end of the depolarizing step, while the current at  $-80$  mV reversed about 100 ms after the depolarizing step. Figure 6C compares peak current-voltage relationships for difference  $I_{\text{tail}}$ , measured 'immediately' (2 ms) after the end of the depolarizing step and 1 s after the end of the step. The current-voltage

relationship measured 2 ms after the end of the depolarizing step reversed at  $-62.9$  mV and had strong inward rectification, while the currents measured at 1 s reversed at  $-86.0$  mV, and had a negative slope conductance at membrane potentials positive to about  $-70$  mV. Figure 6C also shows the current-voltage relationship measured at 75 ms after the depolarizing step; the reversal potential was  $-74.5$  mV. In experiments with seven different myocytes (including that in Fig. 6), the mean reversal potential of  $\text{BaCl}_2$ -sensitive  $I_{\text{tail}}$  measured within 2 ms after the depolarizing step was  $-60.3 \pm 1$  mV, while the reversal potential measured at 1 s was  $-84.5 \pm 0.8$  mV. The latter value is very close to  $E_{\text{K}}$  under the recording conditions used in these experiments. We repeated a similar experiment measuring the reversal potential of  $I_{\text{tail}}$  using a higher extracellular  $\text{K}^+$  concentration. Figure 6D shows a representative current-voltage relationship measured at 2 ms, 75 ms and 1 s after the depolarizing step in the presence of 20 mM external  $\text{K}^+$ . For all three measurements, the current reversed at values very close to the nominal  $E_{\text{K}}$  (e.g.  $-49.5$  mV with the present recording conditions). Data averaged from four different ventricular myocytes indicate that the currents reversed at  $-47.3 \pm 2.5$ ,

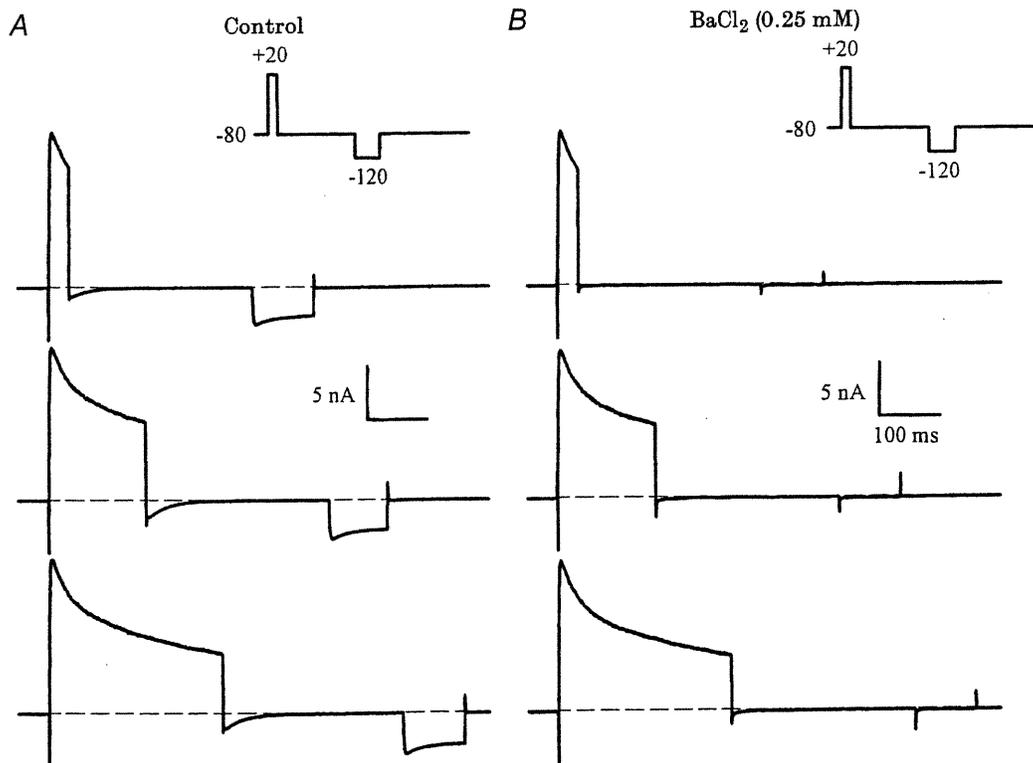
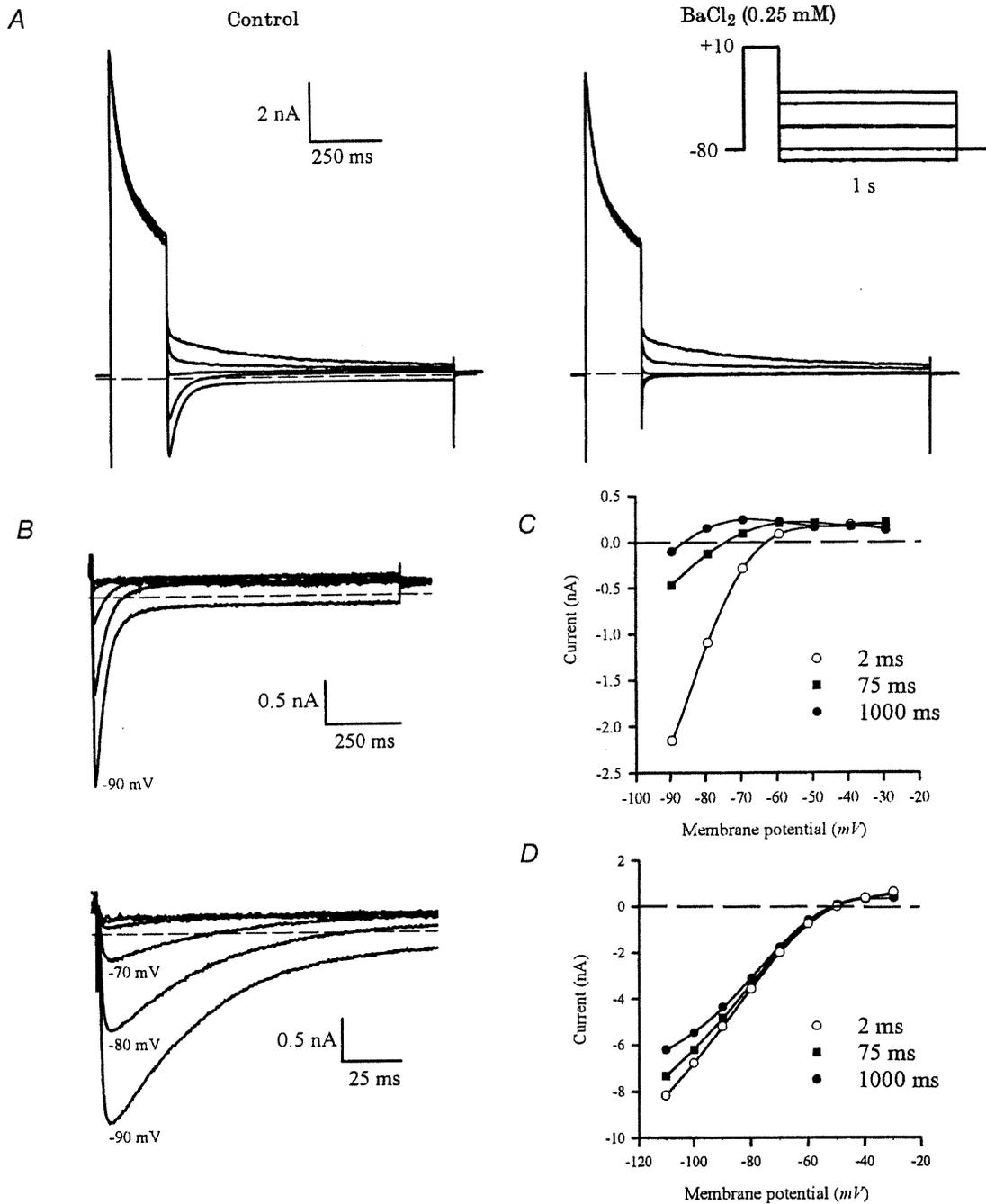


Figure 5.  $\text{Ba}^{2+}$  blocks  $I_{\text{tail}}$  and the inwardly rectifying  $\text{K}^+$  current,  $I_{\text{K1}}$ , in mouse ventricular myocytes

A, voltage-clamp currents recorded in control solution. The voltage-clamp protocol (inset) consisted of a depolarizing step to 20 mV (35, 160, 285 ms), and a hyperpolarizing step to  $-120$  mV (100 ms). The inward current produced by the hyperpolarizing step is  $I_{\text{K1}}$ . B, currents after the addition of 0.25 mM  $\text{BaCl}_2$ . Note that both  $I_{\text{tail}}$  and  $I_{\text{K1}}$  were abolished, but there was no significant effect on the outward currents.



**Figure 6.** Reversal potential of BaCl<sub>2</sub>-sensitive  $I_{tail}$

*A*, voltage-clamp currents produced by a two-step protocol (right, inset), consisting of a 200 ms depolarizing step to +10 mV, followed by a series of 1 s steps to -30, -40, -60, -80 and -90 mV. In control conditions (left panel), the tail currents reversed near -60 mV. Large, inward currents were produced by steps to -80 and -90 mV. After the addition of 0.25 mM BaCl<sub>2</sub> (right panel), the large inward  $I_{tail}$  were almost completely abolished, but there was relatively little effect on the outward  $I_{tail}$ . *B*, BaCl<sub>2</sub>-sensitive  $I_{tail}$ , obtained by subtracting currents in BaCl<sub>2</sub> from control currents. Voltage steps were from -30 to -90 mV, in 10 mV increments (-50 and -70 mV steps are not shown in *A*). The lower panel shows the initial parts of  $I_{tail}$  on an expanded time scale. Note that the currents for -70 and -80 mV are initially inward, but become net outward within about 100 ms after the end of the depolarizing step. *C*, current-voltage relationship for BaCl<sub>2</sub>-sensitive  $I_{tail}$  measured 2 ms (○), 75 ms (■) and 1 s (●) after the end of the depolarizing step. *D*, current-voltage relationship for  $I_{tail}$  measured at 2 ms (○), 75 ms (■) and 1 s (●) after the end of the depolarizing step in an extracellular solution containing 20 mM K<sup>+</sup>. Smooth curves through each set of points are fifth-order polynomial regressions: reversal potentials for each set of points were obtained from these polynomials by interpolation (see text for values).

$-50.0 \pm 1.3$  and  $-50.9 \pm 1.1$  mV, when measured at 2 ms, 75 ms and 1 s, respectively. These data show clearly that in the higher external  $K^+$ , the change in extracellular  $K^+$  concentration, and the time-dependent change in the apparent reversal potential of  $I_{tail}$  due to  $K^+$  efflux were minor.

#### Decay time course of $I_{tail}$ depends upon presence of $I_{K1}$

The data in Figs 5 and 6 suggest strongly that  $I_{tail}$  is generated by  $I_{K1}$ . These data can be explained by assuming that  $K^+$  accumulates in an extracellular space in which there is relatively restricted diffusion between this space and the 'bulk' external solution, and  $I_{tail}$  is produced by current flow through  $I_{K1}$  channels in the membranes of the restricted space. The decay of  $I_{tail}$  reflects the 'clearing' of this space of excess  $K^+$  by both the processes of diffusion, and transport of  $K^+$  into the cell cytosol through  $I_{K1}$  channels. This implies that if either of these major transport processes were impeded, the decline of  $K^+$  concentration in the restricted space would be slowed.

Figure 7 shows the results of an experiment that tests this idea by 'blocking'  $I_{K1}$  by repolarizing to a membrane potential where  $I_{tail}$  is always very small. In this experiment, the potential was  $-60$  mV; as shown in Fig. 6, at this membrane potential  $I_{tail}$  was always a small, outward current. The amount of excess  $K^+$  remaining at selected times after the end of a depolarizing step was measured using a brief (10 ms) 'test' step from  $-60$  to  $-80$  mV; this step activated a measurable  $I_{tail}$  at each time (Fig. 7A). The currents produced by this series of test steps were compared with  $I_{tail}$  produced by repolarization to the holding potential of  $-80$  mV. Figure 7B compares the time course of  $I_{tail}$  at  $-80$  mV with the time course of 10 ms test-step current amplitudes, applied between 0 and 480 ms after the end of a 300 ms depolarizing step of  $+10$  mV. The decay of  $I_{tail}$ , and therefore the decline of accumulated  $K^+$ , was very much slower when  $I_{K1}$  was inhibited by repolarizing to  $-60$  mV. The best-fit, single-exponential function fitted to  $I_{tail}$  at  $-80$  mV had a time constant of about 46 ms; the best-fit, single-exponential for the test-step currents had a time constant of 161 ms.

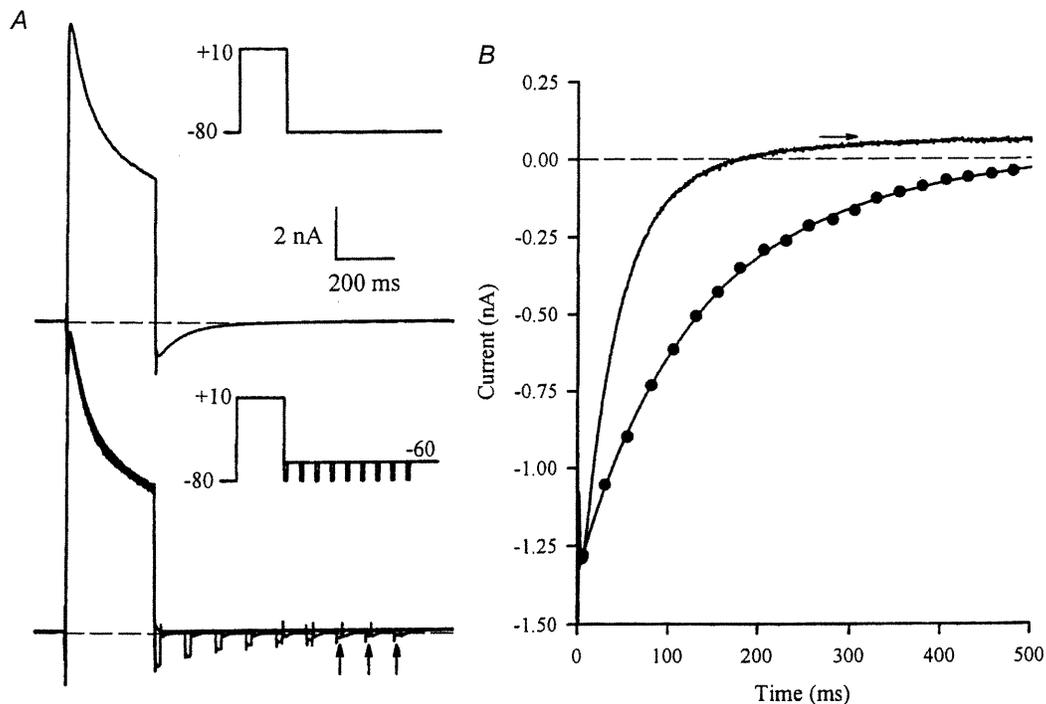


Figure 7. Time course of decay of  $I_{tail}$  depends upon current flow

A, upper panel, voltage-clamp currents produced by a 300 ms,  $+10$  mV step, from a holding potential of  $-80$  mV (inset). A large inward  $I_{tail}$  was produced on repolarization to  $-80$  mV. Lower panel, series of superimposed currents produced by the same depolarizing step, but followed at different times by a 10 ms 'test' step to  $-80$  mV, from a potential of  $-60$  mV. Currents shown were produced by test steps that were applied between 0 and 400 ms after the end of the depolarizing step, in 50 ms increments (see inset). Vertical arrows indicate currents from test steps at 300, 350 and 400 ms. Time and current scales are the same for both panels. B, comparison of the time course of  $I_{tail}$  recorded at a membrane potential of  $-80$  mV (continuous line), and the magnitude of the test step currents as a function of time after the end of the depolarizing step ( $\bullet$ ). The dotted line through the test currents is a best-fit, double-exponential function, with time constants of 112.4 and 329.3 ms. The amplitudes of the fast and slow components were  $-1.03$  and  $-0.38$  nA, respectively. The horizontal arrow indicates the level of  $I_{tail}$  (at  $-80$  mV) at 1 s after the repolarizing step; the double-exponential function was constrained to fit to this level.

A two-exponential function gave a better fit to the test current time course, with fast and slow time constants of 112.4 and 329.3 ms, respectively (Fig. 7B). Single exponential functions were fitted to both  $I_{tail}$  at -80 mV and test step currents from a potential of -60 mV. For each cell, the time constant of  $I_{tail}$  at -80 mV ( $50.7 \pm 4.1$  ms) was considerably smaller than of the test step ( $75.2 \pm 3.2$  ms  $P < 0.001$ ; Table 1).

To confirm the importance of the inward  $K^+$  flux, we repeated the protocol presented in Fig. 7, comparing two different test potentials (e.g. -80 and -120 mV). The decline of the  $I_{tail}$  proceeded faster at the more hyperpolarized potential ( $37.9 \pm 3.5$  ms at -120 mV compared to  $50.7 \pm 4.1$  ms at -80 mV,  $P = 0.03$ ). According to the idea that the slow  $I_{tail}$  results from the slow clearing of accumulated  $K^+$  by simple diffusion and inward transport of  $K^+$  through  $I_{K1}$  channels, the decay of the currents produced by this series of test steps was faster for the test pulse that produced the larger inward current ( $62.9 \pm 4.7$  ms at -120 mV compared to  $75.2 \pm 3.2$  ms at -80 mV,  $P = 0.03$ ), hence carrying away more  $K^+$  per test pulse.

Table 1. Comparison of the time course of current decay at test pulses of -80 and -120 mV

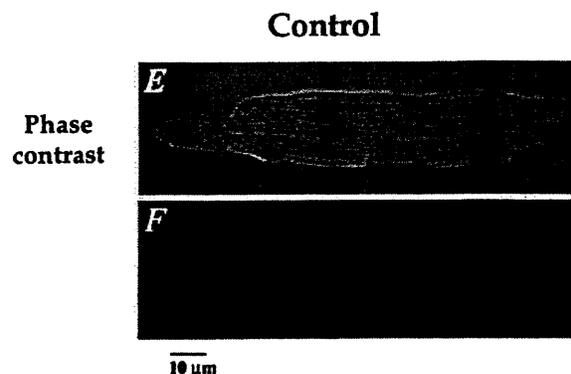
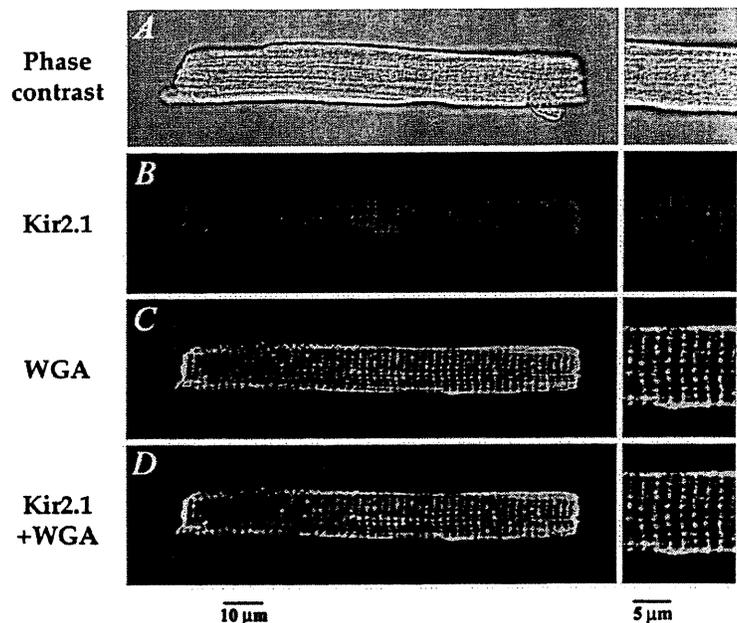
	-80 mV		-120 mV	
	$\tau$ (ms)	$n$	$\tau$ (ms)	$n$
$I_{tail}$	$50.7 \pm 4.1$	13	$37.9 \pm 3.5^*$	9
Train of pulses	$75.2 \pm 3.2^{\dagger\dagger}$	15	$62.9 \pm 4.7^* \dagger$	14
Single pulse at various times	$120.5 \pm 11.4^{\dagger\dagger}$	15	$87.7 \pm 7.7^* \dagger$	9

Time constants obtained from a single exponential function for the decline of the tail current ( $I_{tail}$ ) and of the currents obtained with the train of pulses or with a single pulse applied at various times. Data are given as means  $\pm$  s.e.m. \* $P = 0.03$  vs. corresponding parameter at -80 mV;  $\dagger P < 0.001$  vs.  $I_{tail}$ ;  $\dagger\dagger P < 0.01$  vs. pulse.

We then evaluated the contribution of a simple diffusion by using the following protocol. After a depolarizing pulse, the cells were held at -60 mV for various lengths of time, and we then applied one hyperpolarizing test pulse (at -80 mV or -120 mV) to estimate the amplitude of  $I_{tail}$ . Single exponential functions fitted to the currents produced with this protocol were compared to those

Figure 8. Immunofluorescent labelling of Kir2.1 and colocalization with wheat germ agglutinin (WGA) in mouse ventricular myocytes

A, phase-contrast image of a mouse ventricular cell, also presented in B-D, using immunofluorescence detection. B, the red fluorescent staining indicates the presence of Kir2.1. C, the green coloration corresponds to WGA staining of the cell membrane. D, superimposition of both images shows significant colocalization (yellow) of Kir2.1 and WGA in the transverse striations, further confirming the t-tubular localization of Kir2.1. The panels on the right in A-D show a higher magnification of the cell seen on the left. E-F, negative controls showing that no staining was apparent when the primary antibody was omitted. E, phase contrast image, and F, immunofluorescence detection of the same cell.



obtained with the current elicited by the train of pulses (Table 1). For the hyperpolarizing steps of  $-80$  mV, the time constant of the current decay obtained with the train of pulses ( $75.2 \pm 3.2$  ms) was considerably smaller than that of the current decay obtained with the single pulse applied at various times ( $120.5 \pm 11.4$  ms,  $P = 0.004$ ). Similarly, at  $-120$  mV, the time constant of current decline was also faster with the train of pulses ( $62.9 \pm 4.7$  ms) compared to that obtained with the single pulse applied at various times ( $87.7 \pm 7.7$  ms,  $P = 0.004$ ). The single-pulse protocol shows that clearing of  $K^+$  from the restricted space is slowed when inward flux is reduced, leaving simple diffusion as the major clearing mechanism. In addition, the decay of the test-pulse current amplitude obtained with the single pulse applied at various times was significantly faster at  $-120$  mV (Table 1) compared to  $-80$  mV. Again, this confirms the importance of the inward flux for the clearing of the  $K^+$  in the restricted space.

#### Immunolocalization of Kir2.1 in mouse ventricular myocytes

There is evidence that  $I_{K1}$  consists of different members of the Kir2 family. For instance, Kir2.1, Kir2.2 and Kir2.3

have all been found in guinea-pig cardiomyocytes (Liu *et al.* 2001) and Kir2.1 and Kir2.2 are both present in mouse and rat heart (Kubo *et al.* 1993; Ishihara & Hiraoka, 1994; Takahashi *et al.* 1994; Fiset *et al.* 1998; Nakamura *et al.* 1998; Leonoudakis *et al.* 2001; Zaritsky *et al.* 2001). However, in mammalian ventricles where  $I_{K1}$  is present, Kir2.1 has the highest level of transcript when compared to Kir2.2 or Kir2.3 (Brahmajothi *et al.* 1996; Liu *et al.* 2001). A recent study by Zaritsky *et al.* (2001) has provided clear evidence that the Kir2.1 gene is essential for  $I_{K1}$  in mouse ventricular myocytes. They demonstrated that ventricular myocytes isolated from the Kir2.1 knockout mouse lack a detectable  $I_{K1}$ , indicating that Kir2.1 is the major component of  $I_{K1}$  in mouse. In addition, Nakamura *et al.* (1998) have reported that antisense oligonucleotides against Kir2.1 partially suppress  $I_{K1}$  in rat ventricular myocytes, also demonstrating that Kir2.1 has an essential role in  $I_{K1}$  in rat ventricle.

The data presented so far suggest strongly that  $I_{tail}$  is generated by  $I_{K1}$ , and is probably due to  $K^+$  accumulation within the t-tubule system of isolated mouse ventricular myocytes. To provide additional evidence in support of this hypothesis, we investigated the localization of

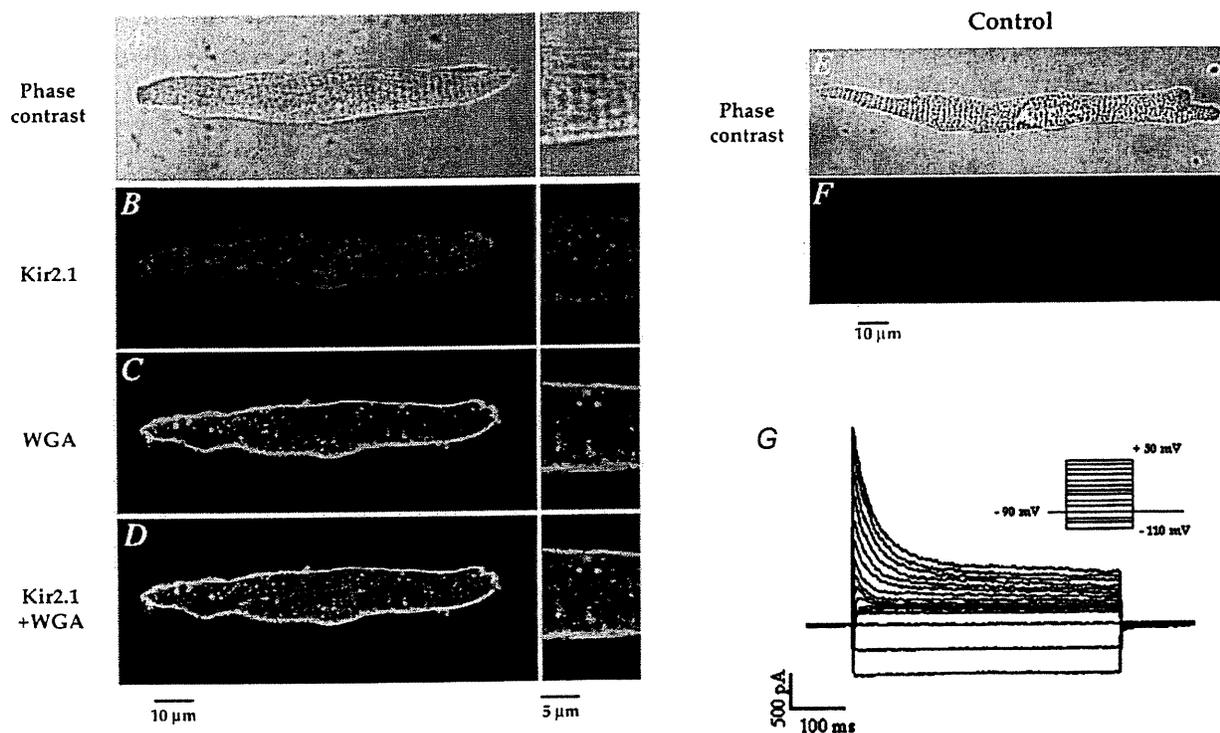


Figure 9. No significant t-tubule localization of Kir2.1 in mouse atrial myocytes, consistent with the absence of  $I_{tail}$  in these cells

A, phase-contrast image of a mouse atrial cell. B–C, same cell as in A showing the immunofluorescence detection of Kir2.1 (B) and WGA (C). D, superimposition of the images presented in B and C, revealing little or no overlap (yellow) between Kir2.1 and WGA labelling in the t-tubules. E, phase-contrast image of the control atrial cell presented in F, showing that no immunofluorescence staining was observed when the primary antibody was omitted. G, family of currents from a voltage clamped, isolated mouse atrial myocyte. The voltage-clamp protocol is shown in the inset; the holding potential was  $-90$  mV;  $500$  ms steps to potentials between  $-110$  and  $+50$  mV in  $10$  mV increments applied at  $0.1$  Hz.

Kir2.1, which is the major component of  $I_{K1}$  in mouse heart (Kubo *et al.* 1993; Ishihara & Hiraoka, 1994; Fiset *et al.* 1998; Zaritsky *et al.* 2001). Immunofluorescent localization of Kir2.1 established clearly that  $I_{K1}$  is preferentially localized in the t-tubule system of the mouse ventricular myocytes. Figure 8A shows that Kir2.1 immunoreactivity was predominantly in a regularly spaced arrangement of transversely oriented bands along the entire length of the cell. Double labelling was performed with anti-Kir2.1 and WGA to confirm that Kir2.1 labelling was localized to the plasma membrane. WGA was used to visualize sarcolemmal and t-tubule membranes since it binds selectively to *N*-acetylglucosamine and sialic acid residues of the glycocalyx (Peters *et al.* 1979; Wright, 1984; Takeuchi *et al.* 2000; Sedarat *et al.* 2000). Figure 8B shows that WGA clearly stained the peripheral sarcolemma, the t-tubules and the intercalated disks. Superimposition of Kir2.1 and WGA staining showed important co-localization (as visualized by the yellow coloration; Fig. 8C). Pixels with a yellow coloration were observed on the t-tubule membranes, confirming the presence of Kir2.1 in these membrane structures.

#### Absence of $I_{tail}$ in mouse atrial myocytes

Labelling of single atrial myocytes with a Kir2.1-specific antibody revealed immunofluorescence staining at the peripheral plasma membrane (Fig. 9A) without organized fluorescence in the cell interior. The WGA labelling in mouse atrial myocytes showed no well defined t-tubule system in these cells. In fact, small invaginations from the surface corresponding to the t-tubules were observed with WGA (Fig. 9B). Those striations were not significantly labelled with the anti-Kir2.1 antibody. The localization of Kir2.1 in atrial cells was confirmed by the pattern of distribution of co-localized Kir2.1 and WGA staining, which revealed significant co-localization only at the cell periphery (Fig. 9C). Consistent with these observations were the electrophysiological data that showed that no slowly decaying, inward currents followed the depolarizing voltage-clamp steps in isolated mouse atrial myocytes (Fig. 9G).

## DISCUSSION

This study provides an explanation for the slow inward  $I_{tail}$  that follows membrane depolarization of voltage-clamped mouse ventricular myocytes. The properties of  $I_{tail}$  suggest strongly that these currents result from the accumulation of  $K^+$  in a restricted extracellular space associated with the ventricular myocytes.  $K^+$  accumulation occurs during outward current flow through  $I_K$  channels in the restricted compartment; on repolarization to more negative potentials ( $-80$  mV), current through the  $K^+$  channels is augmented because of the elevated extracellular concentration of  $K^+$  and the shift of  $E_K$  to depolarized values. The decay of  $I_{tail}$  reflects the decline of the elevated  $K^+$  back to its resting value and results from

a combination of the passive diffusion of  $K^+$  out of the restricted space plus the influx of  $K^+$  into the cytosol through  $I_K$  channels.

All of the properties of  $I_{tail}$  can be accounted for by the following model:

- (1) The increase in  $I_{tail}$  magnitude with increases in outward current measured at the end of the depolarizing step (Figs 1 and 2). Increased  $I_{tail}$  magnitude reflects an increased  $K^+$  accumulation, which would result from a larger outward current.
- (2) The non-monotonic relationship between depolarizing step duration and  $I_{tail}$  magnitude (Fig. 3). The  $K^+$  concentration at the end of the depolarizing step depends on a balance between influx of  $K^+$  into the restricted space through delayed rectifier channels and  $K^+$  efflux via passive diffusion. Because of the time-dependent decline in outward  $K^+$  current during a depolarizing step, due to inactivation, accumulated  $K^+$  would initially increase, then decline or possibly reach a steady state as the duration of the depolarizing voltage-clamp step is increased.
- (3) Lack of effect of external  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$  on  $I_{tail}$  (Fig. 4). Neither of these ions have significant effects on  $I_{K1}$ .
- (4) Simultaneous block of  $I_{tail}$  and  $I_{K1}$  by  $BaCl_2$  (Fig. 5). Since  $I_{tail}$  is postulated to be generated by  $K^+$  influx through  $I_{K1}$  channels in the restricted space membranes, both of these currents must be blocked identically.
- (5) The time-dependent change in the apparent reversal potential of  $I_{tail}$  (Fig. 6). This arises because the concentration of accumulated  $K^+$  in the restricted extracellular space, and hence  $E_K$ , declines with time after the end of the depolarizing voltage-clamp step.
- (6) Slowed time course of decline of  $K^+$  concentrations when  $I_{K1}$  is removed (Fig. 7). Clearance of the restricted space occurs mainly via two processes: passive diffusion out of the space and inward current flow through  $I_{K1}$  channels within the space. Voltage clamping to a membrane potential where  $I_{K1}$  is small removes this contribution due to current flow, and only passive diffusion remains.

The accumulation phenomenon for  $K^+$  occurs in part because the outward currents in mouse myocytes are very large. However, a similar phenomenon may occur in other rodent myocytes (e.g. rat). For example, there are slow, inward  $I_{tail}$  apparent in current records obtained in rat ventricular myocytes (Shimoni *et al.* 1995; Ward *et al.* 1995). It is likely that 'accumulation tail currents' would be small in myocytes from the hearts of bigger mammals, where the major outward current is due to the rapid component of the delayed rectifier ( $I_{Kr}$ ), rather than large  $Ca^{2+}$ -independent transient outward  $K^+$  current ( $I_{to}$ ) and delayed rectifier currents, as in mouse and rat.

The most likely structures in adult mouse ventricular myocytes that could act as restricted extracellular spaces for  $K^+$  accumulation are the sarcolemmal caveolae and the t-tubule system. Adult mouse ventricular myocytes have many surface caveolae and a particularly extensive and complex t-tubule system (Forbes & Sperelakis, 1973; Forbes *et al.* 1984). The t-tubule system of the adult mouse ventricle comprises about 3.2% of the volume of the myocytes. The surface density of the t-tubule system membrane of adult mouse ventricular myocytes is about  $0.5 \mu\text{m}^2 \mu\text{m}^{-3}$ : this implies that roughly 50% of the total membrane area of adult mouse ventricular myocytes is made up of t-tubule membranes.

Using a specific antibody against Kir2.1, we have provided molecular evidence that  $I_{K1}$  is predominantly localized in the t-tubule system of mouse ventricular myocytes. Moreover, in adult mouse atrial cells where the t-tubule membrane system is very limited,  $I_{\text{tail}}$  was not observed on repolarization to the holding potential. Results of immunofluorescence microscopy performed on mouse atrial myocytes, where the immunolocalization of Kir2.1 showed mainly staining to the cell periphery, are consistent with the electrophysiological data obtained in these cells. In combination, these observations provide evidence that  $I_{\text{tail}}$  is likely to result from  $K^+$  accumulation in the t-tubule system in mouse ventricular myocytes. This is the first report of localization of  $I_{K1}$  (Kir2.1) in the t-tubules of mouse ventricular myocytes. Taken together, the results of this study suggest strongly that  $I_{\text{tail}}$  in mouse ventricular myocytes is produced by the activation of inward  $I_{K1}$  in the t-tubules, resulting from  $K^+$  accumulation in these membrane structures.

Reports by other groups strongly support our findings. Recently, a study by Leonoudakis *et al.* (2001) showed that Kir2.2 is also localized in striated bands corresponding to t-tubules in rat ventricular myocytes. This finding is interesting considering that Zaritsky *et al.* (2001) have demonstrated that by removing the gene encoding Kir2.2, there was a 50% reduction in  $I_{K1}$ , suggesting that Kir2.2 can also contribute to  $I_{K1}$ . Previous studies have shown that changes in  $I_{K1}$  magnitude closely correlate with the density of t-tubules in cardiomyocytes. Primary cultures of ventricular myocytes have been associated with a reduction of  $I_{K1}$  (Wahler, 1992; Schackow *et al.* 1995; Christé, 1999) and a parallel reduction in the density of t-tubules (Delcarpio *et al.* 1989). Christé has reported recently that cultured rabbit ventricular myocytes lose a large portion of  $I_{K1}$  and ATP-sensitive  $K^+$  current ( $I_{K-ATP}$ ) conductance in parallel with a decay in cell membrane capacitance (Christé, 1999). These data suggest that a major part of  $I_{K1}$  and  $I_{K-ATP}$  are located in the t-tubules of rabbit ventricular myocytes, since a reduction in membrane capacitance has been attributed mainly to the disappearance of the t-tubules (Lipp *et al.* 1996; Mitcheson *et al.* 1996). In addition, using immunofluorescence and immunoelectron microscopy, Takeuchi *et al.* (2000) have demonstrated that Kv4.2,

which generates much  $I_{\text{to}}$  in cardiomyocytes, is expressed mainly in the t-tubules in rat ventricular myocytes. Other studies have shown a preferential localization of ion channels to the t-tubule membrane. For instance, during the postnatal development of rabbit ventricular myocytes, it has been reported that there is a close temporal correlation between formation of the t-tubules and expression of dihydropyridine receptors (Sedarat *et al.* 2000). T-tubule membrane systems are well developed in mammalian ventricular myocytes and several previous studies have indicated that ion accumulation can occur within the t-tubular system in the isolated ventricular myocytes of other species. Yasui *et al.* (1993) recorded inward  $I_{\text{tail}}$  in single guinea-pig ventricular myocytes after treatment of the cells with nicorandil, an activator of  $I_{K-ATP}$ , which induced large outward currents in these myocytes. Yasui *et al.* interpreted their results using a similar model to that presented above; outward  $I_{K-ATP}$  during a depolarizing step resulted in  $K^+$  accumulation in t-tubules, and the inward  $I_{\text{tail}}$  produced on repolarization due to  $I_{K1}$  in the t-tubule membranes. Guinea-pig ventricular myocytes have an extensive t-tubule system, with a volume fraction of 2.5–3.2% and a surface area density of about  $0.4 \mu\text{m}^2 \mu\text{m}^{-3}$  (Forbes & Van Niel, 1988), similar to the mouse ventricular myocytes. Shepherd & McDonough (1998) also demonstrated slow diffusion in the t-tubules of guinea-pig ventricular myocytes. They rapidly increased  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  around guinea-pig ventricular myocytes while measuring the time course of the increase in the amplitude of voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  currents ( $I_{\text{Ca}}$ ).  $I_{\text{Ca}}$  increased in two phases: 30–40% of the current change occurred with a time constant of about 20 ms, while the remainder of the change occurred 10-fold more slowly. These authors suggested that the slow component reflected the slow equilibration of  $[\text{Ca}^{2+}]$  between the bulk solution and the lumen of the t-tubules. Yao *et al.* (1997) performed similar rapid solution-change experiments using adult rabbit and rat ventricular myocytes. Following a rapid (4 ms) removal of external  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $I_{\text{Ca}}$  declined slowly in both rabbit and rat ventricular myocytes, although the rate of decline of the current in rat myocytes ( $t_{90} = 910$  ms, the time required for 90% decline) was considerably slower than that in rabbit ventricular myocytes ( $t_{90} = 241$  ms). Changes in  $K^+$  concentration appeared to equilibrate much more rapidly with both types of cell. The time to reach a stable membrane potential after a rapid change in external  $K^+$  occurred with a  $t_{90}$  of 64 ms for rabbit cells and 137 ms in rat myocytes. Yao *et al.* (1997) suggested that sarcolemmal structures like t-tubules, surface caveolae and negatively charged proteins all contribute to the slowed diffusion of cations in myocardial cells.

In conclusion, our data, along with data from other investigators, suggest that  $K^+$  channels are localized preferentially in the t-tubules. Considering that cardiac  $K^+$  channels play very important roles in regulating both action potential duration and excitation–contraction

coupling and since the t-tubule is the major site of excitation-contraction coupling in ventricular cells, this t-tubule localization is not totally unexpected. Additional studies exploring the physiological consequence of the t-tubule localization of K<sup>+</sup> channels are required and may provide important insights into the functional role of cardiac K<sup>+</sup> channels under physiological and pathological conditions.

- ALMERS, W. (1972). The decline of potassium permeability during extreme hyperpolarization in frog skeletal muscle. *Journal of Physiology* **225**, 57–83.
- ATTWELL, D. E. & COHEN, I. S. (1977). The voltage clamp of multicellular preparations. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **31**, 201–245.
- ATTWELL, D. E., EISNER, D. A. & COHEN, I. S. (1979). Voltage clamp and tracer flux data: effects of a restricted extracellular space. *Quarterly Review of Biophysics* **12**, 213–263.
- BERS, D. M., LEDERER, W. J. & BERLIN, J. R. (1990). Intracellular Ca transients in rat cardiac myocytes: role of Na-Ca exchange in excitation-contraction coupling. *American Journal of Physiology* **258**, C944–954.
- BOUCHARD, R. A., CLARK, R. B. & GILES, W. R. (1993). Role of sodium-calcium exchange in activation of contraction in rat ventricle. *Journal of Physiology* **472**, 391–413.
- BRAHMAJOTHI, M. V., MORALES, M. J., LIU, S., RASMUSSEN, R. L., CAMPBELL, D. L. & STRAUSS, H. C. (1996). In situ hybridization reveals extensive diversity of K<sup>+</sup> channel mRNA in isolated ferret cardiac myocytes. *Circulation Research* **78**, 1083–1089.
- CHRISTÉ, G. (1999). Localization of K<sup>+</sup> channels in the t-tubules of cardiomyocytes as suggested by the parallel decay of membrane capacitance, I<sub>K1</sub>, and I<sub>KATP</sub> during culture and by delayed IK1 response to barium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **31**, 2207–2213.
- COHEN, I. S. & KLINE, R. P. (1982). K<sup>+</sup> fluctuations in the extracellular spaces of cardiac muscles. *Circulation Research* **50**, 1–16.
- DELCARPIO, J. B., CLAYCOMB, W. C. & MOSES, R. L. (1989). Ultrastructural morphometric analysis of cultured neonatal and adult rat ventricular cardiac muscle cells. *American Journal of Anatomy* **186**, 335–345.
- EGAN, T. M., NOBLE, D., NOBLE, S. J., POWELL, T., SPINDLER, A. J. & TWIST, V. W. (1989). Sodium-calcium exchange during the action potential in guinea-pig ventricular cells. *Journal of Physiology* **411**, 639–661.
- FISSET, C., CLARK, R. B., JANZEN, K. M., WINKFEIN, R. & GILES, W. R. (1998). Molecular identity of K<sup>+</sup> currents in adult mouse atrium and ventricle (abstract). *Biophysical Journal* **74**, A207.
- FISSET, C., CLARK, R. B., LARSEN, T. S. & GILES, W. R. (1997). A rapidly activating sustained K<sup>+</sup> current modulates repolarization and excitation-contraction coupling in adult mouse ventricle. *Journal of Physiology* **504**, 557–563.
- FORBES, M. S., HAWKEY, L. A. & SPERELAKIS, N. (1984). The transverse-axial tubular system (TATS) of mouse myocardium: its morphology in the developing and adult animal. *American Journal of Anatomy* **170**, 143–162.
- FORBES, M. S. & SPERELAKIS, N. (1973). A labyrinthine structure formed from a transverse tubule of mouse ventricular myocardium. *Journal of Cell Biology* **56**, 865–869.
- FORBES, M. S. & VAN NIEL, E. E. (1988). Membrane systems of guinea pig myocardium: ultrastructure and morphometric studies. *Anatomical Record* **222**, 362–379.
- ISHIHARA, K. & HIRAOKA, M. (1994). Gating mechanism of the cloned inward rectifier potassium channel from mouse heart. *Journal of Membrane Biology* **142**, 55–64.
- KUBO, Y., BALDWIN, T. J., JAN, Y. N. & JAN, L. Y. (1993). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* **362**, 127–133.
- LEONOUAKIS, D., MAILLIARD, W., WINGERD, K., CLEGG, D. & VANDENBERG, C. (2001). Inward rectifier potassium channel Kir2.2 is associated with synapse-associated protein SAP97. *Journal of Cell Science* **114**, 987–998.
- LIPP, P., HÜSER, J., POTT, L. & NIGGLI, E. (1996). Spatially non-uniform Ca<sup>2+</sup> signals induced by the reduction of transverse tubules in citrate-loaded guinea-pig ventricular myocytes in culture. *Journal of Physiology* **497**, 589–597.
- LIU, G. X., DERST, C., SCHLICHTHORN, G., HEINEN, S., SEEBOHM, G., BRUGGEMANN, A., KUMMER, W., VEH, R. W., DAUT, J. & PREISIG-MULLER, R. (2001). Comparison of cloned Kir2 channels with native inward rectifier K<sup>+</sup> channels from guinea-pig cardiomyocytes. *Journal of Physiology* **532**, 115–126.
- MITCHESON, J. S., HANCOX, J. C. & LEVI, A. J. (1996). Action potentials, ion channel currents and transverse tubule density in adult rabbit ventricular myocytes maintained for 6 days in cell cultures. *Pflügers Archiv* **431**, 814–827.
- NAKAMURA, T. Y., ARTMAN, M., RUDY, B. & COETZEE, W. A. (1998). Inhibition of rat ventricular I<sub>K1</sub> with antisense oligonucleotides targeted to Kir2.1 mRNA. *American Journal of Physiology* **274**, H892–900.
- NERBONNE, J. M. (2000). Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium. *Journal of Physiology* **525**, 285–298.
- PETERS, B. P., EBISU, S., GOLDSTEIN, I. J. & FLASHNER, M. (1979). Interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid. *Biochemistry* **18**, 5505–5511.
- SCHACKOW, T. E., DECKER, R. S. & TEN EICK, R. E. (1995). Electrophysiology of adult cat cardiac ventricular myocytes: changes during primary culture. *American Journal of Physiology* **268**, C1002–C1017.
- SEDARAT, F., XU, L., MOORE, E. D. W. & TIBBITS, G. F. (2000). Colocalization of dihydropyridine and ryanodine receptors in neonate rabbit heart using confocal microscopy. *American Journal of Physiology – Heart and Circulation Physiology* **279**, H202–209.
- SHEPHERD, N. & McDONOUGH, H. B. (1998). Ionic diffusion in transverse tubules of cardiac ventricular myocytes. *American Journal of Physiology* **275**, H852–860.
- SHIMONI, Y., SEVERSON, D. & GILES, W. R. (1995). Thyroid status and diabetes modulate regional differences in potassium currents in rat ventricle. *Journal of Physiology* **488**, 673–688.
- TAKAHASHI, N., MORISHIGE, K., JAHANGIR, A., YAMADA, M., FINDLAY, I., KOYAMA, H. & KURACHI, Y. (1994). Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding a second class of inward rectifier potassium channels in the mouse brain. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 23274–23279.
- TAKEUCHI, S., TAKAGISHI, Y., YASUI, K., MURATA, Y., TOYAMA, J. & KODAMA, I. (2000). Voltage-gated K<sup>+</sup> channel, Kv4.2, localizes predominantly to the transverse-axial tubular system of the rat myocyte. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **32**, 1361–1369.

- TRÉPANIÉ-BOULAY, V., ST-MICHEL, C., TREMBLAY, A. & FISET, C. (2001). Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circulation Research* **89**, 437–444.
- WAHLER, G. M. (1992). Developmental increases in the inwardly rectifying potassium current of rat ventricular myocytes. *American Journal of Physiology* **262**, C1266–1272.
- WARD, C. A., MA, Z., LEE, S. S. & GILES, W. R. (1995). Potassium currents in atrial and ventricular myocytes from a rat model of cirrhosis. *American Journal of Physiology* **273**, G537–544.
- WRIGHT, C. S. (1984). Structural comparison of the two distinct sugar binding sites in wheat germ agglutinin isolectin II. *Journal of Membrane Biology* **178**, 91–104.
- YAO, A., SPITZER, K. W., ITO, N., ZANIBONI, M., LORELL, B. H. & BARRY, W. H. (1997). The restriction of diffusion of cations at the external surface of cardiac myocytes varies between species. *Cell Calcium* **22**, 431–436.
- YASUI, K., ANNO, T., KAMIYA, K., BOYETT, M. R., KODAMA, I. & TOYAMA, J. (1993). Contribution of potassium accumulation in narrow extracellular spaces to the genesis of nicorandil-induced large inward tail current in guinea-pig ventricular cells. *Pflügers Archiv* **422**, 371–379.
- ZARITSKY, J. J., REDELL, J. B., TEMPEL, B. L. & SCHWARZ, T. L. (2001). The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying  $K^+$  current (IK1) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *Journal of Physiology* **533**, 697–710.

#### Acknowledgements

This study was supported by operating grants from the Canadian Institutes of Health Research and the Heart and Stroke Foundation of Canada to R.B.C., W.R.G. and C.F., and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (C.F.). W.R.G. is a Medical Scientist of the Alberta Heritage Fund for Medical Research (AHMFR). C.F. and B.G.A. are Research Scholars of the Heart and Stroke Foundation of Canada. The authors are thankful to Véronique Trépanier-Boulay, Louis-Robert Villeneuve and Judith Brouillette for their expert assistance.

#### Corresponding author

C. Fiset: Research Center, Montreal Heart Institute, 5000, rue Bélanger est, Montréal, Québec, Canada H1T 1C8.

Email: [fiset@icm.umontreal.ca](mailto:fiset@icm.umontreal.ca)

## ANNEXE 2

Trépanier-Boulay V., St-Michel C., Tremblay A., Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle *Circulation Research* 2001, Aug 31; 89 (5): 437-44

Cette étude démontre que les souris adultes présentent des différences au niveau de la repolarisation ventriculaire. En effet, l'amplitude du courant potassique ultrarapide à rectification retardée ( $I_{Kur}$ ), est significativement diminuée chez les femelles comparativement aux mâles. Le courant  $I_{Kur}$  est sous-tendu par le canal potassique Kv1.5. Les données de biologie moléculaire (Protection à la RNase, analyse par immunobuvardage Western, immunofluorescence et microscopie confocale) confirment les données d'électrophysiologie et démontrent que cette différence entre les mâles et les femelles se retrouve aussi au niveau transcriptionnel, suggérant fortement l'implication des HS (oestrogènes et androgènes) dans la régulation de l'expression des canaux potassiques cardiaques. Dans cette publication, j'ai participé de façon importante à la mise au point des expériences d'immunobuvardage Western pour les différents canaux potassiques étudiés.

# Gender-Based Differences in Cardiac Repolarization in Mouse Ventricle

Véronique Trépanier-Boulay, Chantale St-Michel, Annie Tremblay, Céline Fiset

**Abstract**—The mouse heart has become a widely used model for genetic studies of heart diseases. Thus, understanding gender differences in mouse cardiac repolarization is crucial to the interpretation of such studies. The objective of this study was to evaluate whether there are gender differences in cardiac repolarization in mouse ventricle and to gain insights into the ionic and molecular mechanisms underlying these differences. Action potential durations (APDs) and  $K^+$  currents in male and female ventricular myocytes were compared using a patch-clamp technique.  $APD_{20}$ ,  $APD_{50}$ , and  $APD_{90}$  were found to be significantly longer in females than males. Examination of the different  $K^+$  currents revealed that a significantly lower current density exists in female ventricular myocytes compared with male myocytes for the ultrarapid delayed rectifier  $K^+$  current,  $I_{Kur}$  (at +30 mV, male,  $33.2 \pm 2.9$  pA/pF [ $n = 22$ ]; female,  $20.9 \pm 1.73$  pA/pF [ $n = 19$ ],  $P < 0.001$ ). Consistent with these findings were the results of the ribonuclease protection assay, Western blots, and confocal analysis that showed a significantly lower expression level of Kv1.5 (coding for  $I_{Kur}$ ) in female compared with male ventricle. The additional  $K^+$  currents present in mouse ventricle exhibited no gender differences. In agreement with these electrophysiological data, no differences in the expression levels for the  $K^+$  channels underlying these currents were detected between both sexes. This study demonstrates that adult mice exhibit gender differences in cardiac repolarization. The expression of Kv1.5 and of its corresponding  $K^+$  current,  $I_{Kur}$ , is significantly lower in female mouse ventricle, and as a result, the APD is lengthened. (*Circ Res.* 2001;89:437-444.)

**Key Words:**  $K^+$  channel ■ electrophysiology ■ mouse ventricle ■ heart ■ gender

Transgenic mouse models provide a powerful tool for the investigation of cellular and molecular physiology of the heart and cardiovascular abnormalities.<sup>1-4</sup> The use of transgenic mouse might ultimately allow the molecular identification of various factors leading to heart diseases, and it may serve as a guide to appropriate therapeutic strategies. It is therefore not surprising that the mouse heart is now extensively used in mechanical, biochemical, molecular/genetic, and electrophysiological studies.<sup>2,3</sup>

Heart diseases are often associated with action potential prolongation.<sup>5,6</sup>  $K^+$  currents are key determinants of cardiac action potential duration (APD) and, therefore, of prime importance in controlling repolarization and duration of refractory period.<sup>7-10</sup> For all these reasons, there is great interest in defining the ionic and molecular basis of mouse cardiac  $K^+$  currents. As a result, there have been several recent studies describing the mouse ventricular  $K^+$  currents.<sup>11-21</sup>

Despite the importance of understanding gender differences in cardiac repolarization for the interpretation of the work done using transgenic mice, no attempts have been made to determine whether there are sex-related differences in the ionic or molecular basis of cardiac repolarization in mouse heart. Accordingly, the main motivation for the

present study was to provide a comprehensive description of the types, densities, and kinetics of voltage-gated  $K^+$  currents that define the action potential in adult male and female mouse ventricle. A combination of electrophysiological protocols together with ribonuclease (RNase) protection assays, Western blot analysis, immunofluorescence, and confocal imaging were used to characterize and compare the ionic and molecular basis of the cardiac  $K^+$  currents present in adult male and female mouse ventricle. Results presented in this study clearly demonstrate that adult mice exhibit significant gender differences in cardiac repolarization. Preliminary data were recently reported in abstract form.<sup>22</sup>

## Materials and Methods

### Isolation of Ventricular Myocytes

Single ventricular myocytes were obtained from the right and left epicardium of adult CD1 mice of both sexes (2 to 3 months, weighing 25 to 30 g). The enzymatic dispersion technique used in these experiments has been previously described.<sup>11</sup> We recorded  $K^+$  currents and action potentials from the right and left ventricular epicardium on the basis of preliminary data demonstrating no interventricular differences in  $K^+$  current density and APD between ventricular myocytes isolated from right and left epicardium in male and female mice.

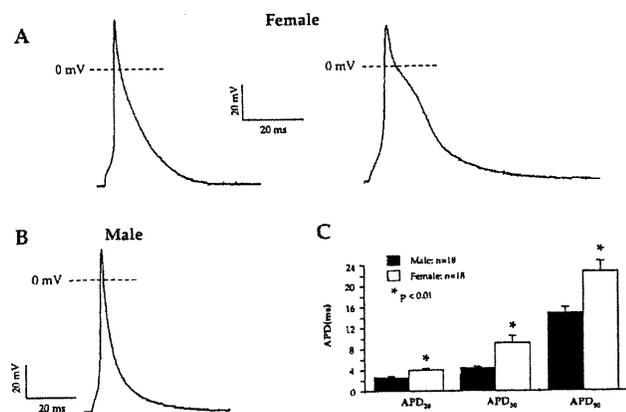
Original received February 2, 2001; resubmission received June 6, 2001; revised resubmission received July 6, 2001; accepted July 6, 2001.

From the Research Center, Montreal Heart Institute, and Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montréal, Québec, Canada.

Correspondence to Dr Céline Fiset, Research Center, Montreal Heart Institute 5000, Bélanger est, Montréal, Québec, Canada, HIT 1C8. E-mail: fiset@icm.umontreal.ca

© 2001 American Heart Association, Inc.

*Circulation Research* is available at <http://www.circresaha.org>



**Figure 1.** Comparison of action potential in male and female mouse ventricular myocytes. A, Typical examples of action potential recorded from 2 different female ventricular myocytes. Stimulus current was 1 ms, 0.7 nA, and frequency rate was 4 Hz. B, Typical example of action potential recording obtained using the same conditions in male ventricular cell. C, Bar graphs showing mean APD ( $\pm$ SEM) at 20%, 50%, and 90% repolarization in male and female mouse myocytes.

### Electrophysiological Recordings

Whole-cell voltage and current-clamp recording methods and data analysis were identical to those previously described.<sup>11</sup> All experiments were carried out at room temperature (20°C to 22°C) to achieve a good voltage-clamp control. Details on the electrophysiological protocols and myocytes isolation are available in the online data supplement at <http://www.circresaha.org>.

### RNase Protection Assay

An RNase protection assay was used to assess the mRNA levels of Kv1.5, Kv4.2, Kv4.3, and Kir2.1 K<sup>+</sup> channels in mouse ventricles obtained from mice of both genders. Briefly, cDNA fragments used to generate antisense RNA probes were synthesized and cloned by reverse transcription–polymerase chain reaction. Transcription was carried out using the MAXIscript In Vitro transcription kit (Ambion). The RNase protection assays were performed using the RPA III kit (Ambion). The total RNA samples and the probes were hybridized at 48°C overnight. Mouse  $\beta$ -actin was included in all reactions as an internal control. The mRNA results were quantified on a Bio-Rad PhosphorImager.

### Western Blot, Immunofluorescence, and Confocal Microscopy

Western blot analyses were performed on male and female mouse ventricles using standard techniques as described in the online supplement. Immunofluorescence analysis was carried out on ventricular myocytes isolated from mice of both genders (3 mice/group) using the protocol described in details in the online data supplement.

### Statistics

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. An unpaired Student *t* test was used to compare the differences in mean values. If probability value were  $<0.05$ , the results were considered statistically significant.

An expanded Materials and Methods section can be found in the online data supplement available at <http://www.circresaha.org>.

## Results

### Action Potential Duration

Current-clamp experiments at different stimulation frequencies (0.1 to 4 Hz) revealed significant changes in APD between both genders. Figure 1 shows typical examples of action potentials recorded at 4 Hz in adult female (Figure 1A)

and male (Figure 1B) ventricular myocytes. Figure 1A illustrates two examples of action potentials recorded from myocytes dissociated from two different female mice. These recordings show the range in duration of the action potentials in the female group. The action potentials were significantly longer in female myocytes compared with their male counterparts as illustrated by the example in Figure 1B. Mean APD from 18 cells in both groups obtained in 15 female and 14 male mice are summarized in Figure 1C. These bar graphs compare the APD recorded in male and female cells measured at 20% (APD<sub>20</sub>), 50% (APD<sub>50</sub>), and 90% (APD<sub>90</sub>) of the repolarization. APD<sub>20</sub> (male, 2.7  $\pm$  0.2 ms, versus female, 4.2  $\pm$  0.4 ms), APD<sub>50</sub> (male, 4.4  $\pm$  0.3 ms, versus female, 9.2  $\pm$  1.3 ms), and APD<sub>90</sub> (male, 14.8  $\pm$  1 ms, versus female, 22.7  $\pm$  2.1 ms) were all significantly longer in the female group compared with the males ( $P < 0.01$ ).

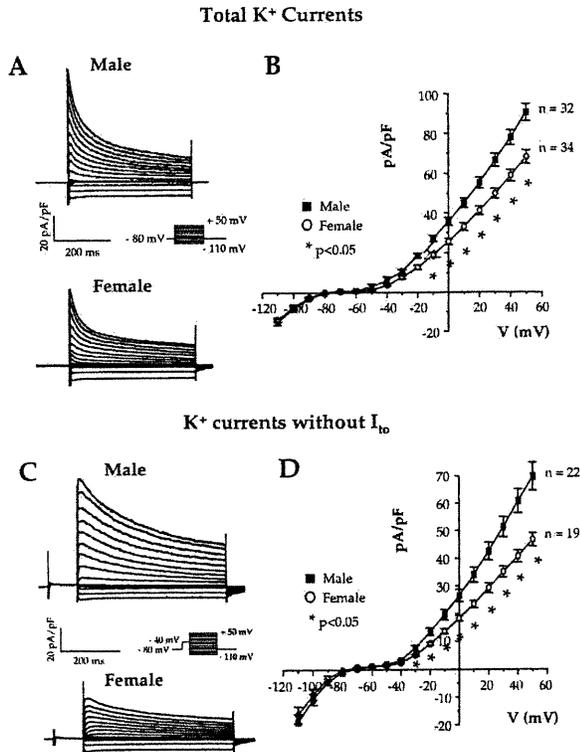
### Comparison of K<sup>+</sup> Currents in Male and Female Mouse Ventricular Myocytes

In the adult mouse ventricle, several K<sup>+</sup> currents are responsible for cardiac repolarization. These include the inward rectifier K<sup>+</sup> current ( $I_{K1}$ ), the Ca<sup>2+</sup>-independent transient outward K<sup>+</sup> current ( $I_{to}$ ), the ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current ( $I_{Kur}$ ), and the steady-state K<sup>+</sup> current ( $I_{ss}$ ). Xu et al<sup>19</sup> have recently characterized the outward K<sup>+</sup> currents in mouse ventricle. They reported the presence of four distinct mouse ventricular K<sup>+</sup> currents. A current sensitive to low-concentration 4-aminopyridine (4-AP) ( $I_{K,slow}$ ), a tetraethylammonium-sensitive noninactivating current ( $I_{ss}$ ), and a transient outward current that comprises a fast and a slow component ( $I_{to,f}$  and  $I_{to,s}$ ).  $I_{to,s}$  was reported to be found exclusively in cells originating from the septum.<sup>19</sup> In the present study, the current designated  $I_{to}$  corresponds to  $I_{to,f}$ . The steady-state component is referred to as  $I_{ss}$ , and  $I_{Kur}$  corresponds to the 4-AP-sensitive component of  $I_{K,slow}$  reported by Xu et al.<sup>19</sup> Given that the 4-AP-sensitive current present in human atrium and mouse ventricle results from the expression of the same K<sup>+</sup> channel isoform (Kv1.5),<sup>21,23</sup> we chose to keep the same nomenclature as the one used with human atrium and designated this current  $I_{Kur}$ .

To explore the possible ionic basis accounting for the differences in APD noticed between the two genders, macroscopic K<sup>+</sup> currents were recorded from freshly isolated ventricular myocytes using the whole-cell patch-clamp technique in the voltage-clamp configuration. Figure 2A illustrates typical examples of a family of total K<sup>+</sup> currents in male and female ventricular myocytes. All current amplitudes were normalized to the cell capacitance and expressed as densities (pA/pF). Cell membrane capacitances of ventricular myocytes isolated from male (84.0  $\pm$  2.4 pF, n=30) and female (84.7  $\pm$  2.5 pF, n=30) animals were indistinguishable.

### Inward Rectifier K<sup>+</sup> Current: $I_{K1}$

To evaluate the role of  $I_{K1}$  in the gender difference seen in ventricular APD, we compared both the resting membrane potential and the current density of  $I_{K1}$  in males and females. The resting membrane potentials were identical between male and female ventricular myocytes (male, -73.6  $\pm$  1 mV, n=30; female, -73.0  $\pm$  1 mV, n=30). Consistent with these



**Figure 2.** Comparison of  $I_{\text{peak}}$  and of the  $\text{K}^+$  current after inactivation of  $I_{\text{to}}$  in male and female mouse ventricular myocytes. A, Superimposed current records of total  $\text{K}^+$  current activated by voltage protocol shown in inset, in male and female mouse ventricular myocytes. B, Mean  $I$ - $V$  relationships for  $I_{\text{peak}}$  obtained in male (■) and female (○) cells. C, Family of  $\text{K}^+$  currents in male and female myocytes obtained from the same cells as those in panel A, but voltage-clamp steps were each preceded by an inactivating prepulse, 100 ms at  $-40$  mV (protocol shown in inset). D,  $I$ - $V$  relationships for the  $\text{K}^+$  current after  $I_{\text{to}}$  has been removed by the inactivating protocol in male (■) and female (○) myocytes.

data were the results of voltage-clamp experiments, which showed that the superimposed inward current traces corresponding to  $I_{\text{K1}}$  were similar between male and female ventricular myocytes (Figure 2A). The mean  $I$ - $V$  relationships for  $I_{\text{K1}}$  were determined and compared between both groups in Figure 2B.  $I_{\text{K1}}$  was measured at  $-110$  mV and its density did not differ between males ( $-14.4 \pm 1.5$  pA/pF,  $n=32$ ) and females ( $-14.6 \pm 1.3$  pA/pF,  $n=34$ ) ( $P=\text{NS}$ ). Depolarizing voltage steps in the range  $-80$  to  $-40$  mV produced very small outward current. For  $I_{\text{K1}}$ , this small outward current is critical for the late repolarization phase of the action potential. Values measured at  $-60$  mV that correspond to the maximum outward component for  $I_{\text{K1}}$  were not different between male ( $0.8 \pm 0.2$  pA/pF) and female ( $0.8 \pm 0.14$  pA/pF) mice. These results demonstrate that the longer APD in female mice is not due to gender differences in the density of either the inward or outward portions of  $I_{\text{K1}}$ .

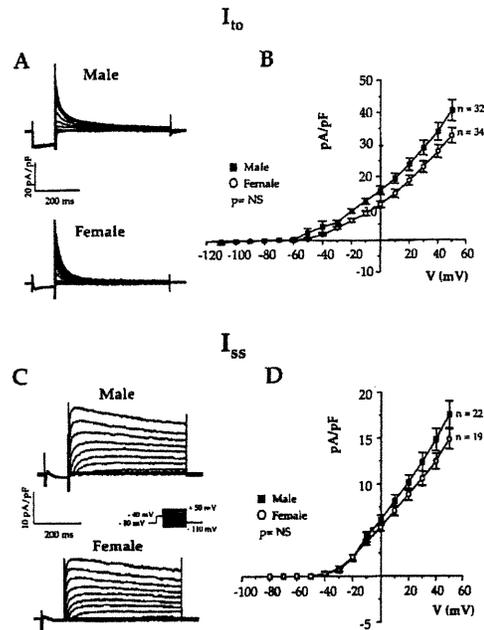
### Outward $\text{K}^+$ Currents

The peak outward  $I$ - $V$  relationships for the two genders show that the outward  $\text{K}^+$  current was significantly smaller in the female group (Figure 2B). Over a broad range of voltages (from  $-10$  to  $+50$  mV), the density of  $I_{\text{peak}}$  was significantly

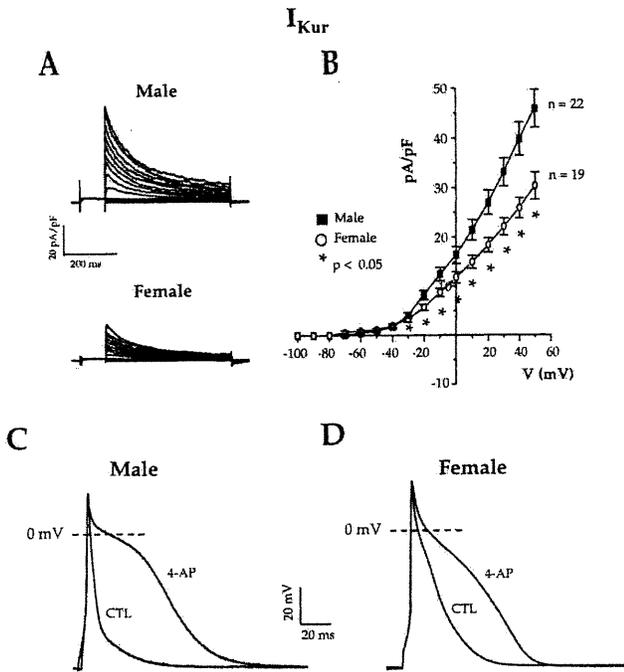
smaller in female compared with male ventricular myocytes. For instance, the mean current densities of the peak outward current measured at  $+30$  mV were  $58.9 \pm 2.9$  pA/pF ( $n=34$ ) in females and  $66.6 \pm 3.3$  pA/pF ( $n=32$ ) in males ( $P < 0.01$ ). These data were obtained from 16 male and 20 female mice. The outward  $\text{K}^+$  currents in adult mouse epicardial myocytes consist of three distinct components ( $I_{\text{to}}$ ,  $I_{\text{Kur}}$ , and  $I_{\text{ss}}$ ), based on their different time and voltage dependence, and different sensitivities to pharmacological agents.<sup>11,19,20</sup> To determine whether one or more of these currents exhibited gender difference, a combination of pharmacological and voltage-clamp protocols was used to separate the three components of outward  $\text{K}^+$  current in these myocytes. Current recordings presented in Figure 2C show that after  $I_{\text{to}}$  has been removed by an inactivating protocol (100 ms at  $-40$  mV), the remaining outward  $\text{K}^+$  currents were significantly larger in the male compared with the female ventricular myocytes. This is also illustrated in Figure 2D, which compares the corresponding  $I$ - $V$  plot for the peak current ( $+30$  mV, males,  $51.3 \pm 3.7$  pA/pF [ $n=32$ ]; females,  $35.1 \pm 2.0$  pA/pF [ $n=34$ ],  $P < 0.001$ ).

### Transient Outward $\text{K}^+$ Current: $I_{\text{to}}$

To investigate the possible role of  $I_{\text{to}}$  in lengthening the female mouse action potential, we compared the density of  $I_{\text{to}}$  in male and female cells. Figure 3A shows that  $I_{\text{to}}$  obtained by subtracting the pairs of currents (with and without the inactivating prepulse) was identical in male and female



**Figure 3.** Transient outward  $\text{K}^+$  current ( $I_{\text{to}}$ ; A and B) and the 4-AP-resistant current denoted as steady-state  $\text{K}^+$  current ( $I_{\text{ss}}$ ; C and D). A, Family of  $\text{K}^+$  currents in male and female myocytes by subtracting corresponding current records with (Figure 2C) and without (Figure 2A) the inactivating prepulse. B, Mean  $I$ - $V$  relationships for  $I_{\text{to}}$  obtained in male (■) and female (○) ventricles. C, Family of currents after application of  $200 \mu\text{mol/L}$  4-AP in male and female ventricular myocytes using inactivating prepulse voltage-clamp protocol shown in inset. D, Mean  $I$ - $V$  relationships for  $I_{\text{ss}}$  in male (■) and female (○) myocytes.



**Figure 4.** Ultrarapid delayed rectifier  $K^+$  current ( $I_{Kur}$ ) and action potential prolongation by 4-AP in male and female ventricular myocytes. A, Difference currents obtained by subtracting corresponding current records with (Figure 3C) and without (Figure 2C) 4-AP in male and female cells. B, Mean  $I$ - $V$  relationship for  $I_{Kur}$  in male (■) and female (○) myocytes. C and D, Typical examples of action potentials recorded in male and female ventricular myocytes under control conditions (CTL) and with 50  $\mu$ mol/L 4-AP. Dashed lines correspond to 0-mV level.

ventricular myocytes. This was confirmed on 32 male and 34 female cells isolated from 16 male and 20 female mice. The  $I$ - $V$  relationships for  $I_{to}$  (Figure 3B) clearly show that the density of  $I_{to}$  was similar between males (at +30 mV,  $28.9 \pm 2.2$  pA/pF) and females (at +30 mV,  $23.6 \pm 1.7$  pA/pF,  $P=NS$ ).

**Steady-State Outward  $K^+$  Current:  $I_{ss}$**

In mouse ventricular myocytes, there is a steady-state  $K^+$  current,  $I_{ss}$ , which is distinctly different from either  $I_{to}$  or  $I_{Kur}$  and which is not affected by concentrations of 4-AP (200  $\mu$ mol/L) that completely block  $I_{Kur}$ .<sup>11</sup> Thus, combining the inactivating protocol with the use of 4-AP that selectively blocks  $I_{Kur}$ , we compared the magnitude of  $I_{ss}$  between male and female mouse ventricular myocytes (Figure 3C). As already mentioned, in the absence of 4-AP the prepulse abolished the  $I_{to}$  component. The waveform in the presence of 4-AP consisted of a slowly activating, very slowly inactivating component,  $I_{ss}$  (Figure 3C). The  $I$ - $V$  relationships for  $I_{ss}$  (Figure 3D) indicate that the density of  $I_{ss}$  is similar in male and female ventricular myocytes (at +30 mV, male,  $12.4 \pm 1.0$  pA/pF [ $n=22$ ], and female,  $10.6 \pm 0.8$  pA/pF [ $n=19$ ],  $P=NS$ ).

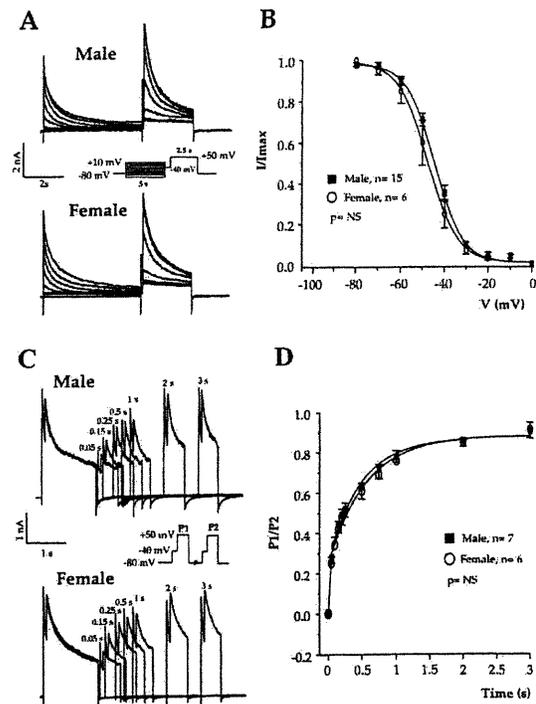
**Ultrarapid Delayed Rectifier  $K^+$  Current:  $I_{Kur}$**

The family of superimposed current records presented in Figure 4 corresponds to the 4-AP-sensitive current,  $I_{Kur}$ , in male and female ventricular myocytes. These current traces

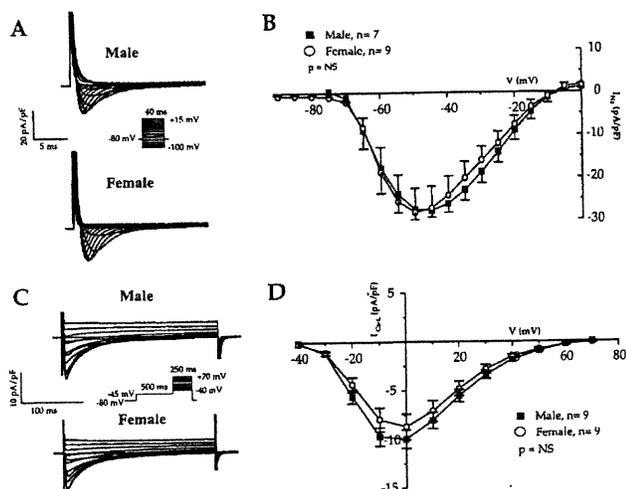
were obtained by subtraction of the corresponding current records before (Figure 2C) and after application of 4-AP (Figure 3C). The 4-AP-sensitive current ( $I_{Kur}$ ) was significantly smaller in female myocytes compared with males (Figure 4A). Pooled data in Figure 4B, plotted as  $I$ - $V$  relationships, show that  $I_{Kur}$  in cells from female animals was significantly smaller than that in male myocytes over a broad range of membrane voltages (from -30 to +50 mV). In the female group, the current density of  $I_{Kur}$  measured at +30 mV was  $20.9 \pm 1.7$  pA/pF ( $n=19$ ) compared with  $33.2 \pm 2.9$  pA/pF ( $n=22$ ) ( $P<0.001$ ) in the male cells. This lower current density (37%) was specific to  $I_{Kur}$  because the density of the three additional  $K^+$  currents examined in these cells did not differ between males and females. Figures 4C and 4D show the application of low concentration of 4-AP that selectively blocks  $I_{Kur}$ , on APD in male and female ventricular myocytes. In the presence of 4-AP, the APDs recorded in males were markedly lengthened and no longer different from those measured in female mouse ventricular myocytes.

**Voltage Dependence of Steady-State Inactivation of  $I_{Kur}$**

Figures 5A and 5B compare the voltage dependence of steady-state inactivation of  $I_{Kur}$  in male and female ventricular



**Figure 5.** Steady-state inactivation and reactivation of  $I_{Kur}$  in male and female ventricular myocytes. A, Family of currents showing voltage dependence of steady-state inactivation for  $I_{Kur}$  in male and female cells. B, Graph comparing voltage dependence of steady-state inactivation for  $I_{Kur}$  in males (■) and females (○). Smooth curves are best-fit Boltzmann functions.  $I/I_{max}$  indicates normalized current to the maximal amplitude of the current. C, Superimposed current records showing time-course recovery from inactivation of  $I_{Kur}$  in male and female cells. P2/P1 is the ratio of test pulse current/prepulse current amplitudes. Smooth lines are best-fit exponential functions.



**Figure 6.** Comparison of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  currents in male and female mouse ventricular myocytes. **A**, Superimposed current records of  $I_{\text{Na}}$  in male and female obtained from the protocol shown in inset. **B**, Mean  $I$ - $V$  relationships of  $I_{\text{Na}}$  in males ( $\blacksquare$ ) and females ( $\circ$ ). **C**, Superimposed current records of  $I_{\text{Ca-L}}$  obtained from protocol shown in inset in male and female ventricular myocytes. **D**, Mean  $I$ - $V$  relationships of  $I_{\text{Ca-L}}$  in male ( $\blacksquare$ ) and female ( $\circ$ ) cells.

cells. Figure 5B presents the Boltzmann function fitted to the data from 15 male and 6 female myocytes. In male cells,  $V_{1/2}$  was  $-44.7 \pm 1$  mV compared with  $-47.6 \pm 2.7$  mV for the female group. The slope factor was  $5.5 \pm 0.3$  mV for the male and  $5.4 \pm 0.7$  mV for the female group. No significant gender difference was found in the steady-state inactivation of  $I_{\text{Kur}}$ .

### Recovery From Steady-State Inactivation of $I_{\text{Kur}}$

Figures 5C and 5D summarize recovery from inactivation of  $I_{\text{Kur}}$  in male and female mouse ventricular myocytes. Single exponential equations were fit to these data with time constants at  $-80$  mV of  $289.6 \pm 71$  ms in the males compared with  $312.7 \pm 31$  ms in the female group ( $P = \text{NS}$ ). These data indicate that  $I_{\text{Kur}}$  recovered from inactivation at a similar rate in both genders.

### Inward Currents: $I_{\text{Na}}$ and $I_{\text{Ca-L}}$

Although the main focus of this study was to compare ventricular repolarization between male and female mice, we also examined whether there are gender-based differences in the inward currents,  $I_{\text{Na}}$  and  $I_{\text{Ca-L}}$ . Current traces of  $I_{\text{Na}}$  in ventricular myocytes of both genders are presented in Figure 6A. No significant difference in the peak density of  $I_{\text{Na}}$  was observed between the two groups (at  $-50$  mV, male,  $-27.4 \pm 2.4$  pA/pF [ $n=7$ ], and female,  $-28.2 \pm 5.8$  pA/pF, [ $n=9$ ],  $P = \text{NS}$ ). Superimposed current traces of  $I_{\text{Ca-L}}$  obtained from male and female ventricular myocytes are presented in Figure 6C. Mean  $I$ - $V$  relationships for  $I_{\text{Ca-L}}$  are presented in Figure 6D. The peak current density of  $I_{\text{Ca-L}}$  was not significantly different between male and female cells (at 0 mV,  $-9.96 \pm 0.9$  pA/pF [ $n=9$ ] and  $-8.71 \pm 1.3$  pA/pF [ $n=9$ ], respectively,  $P = \text{NS}$ ).

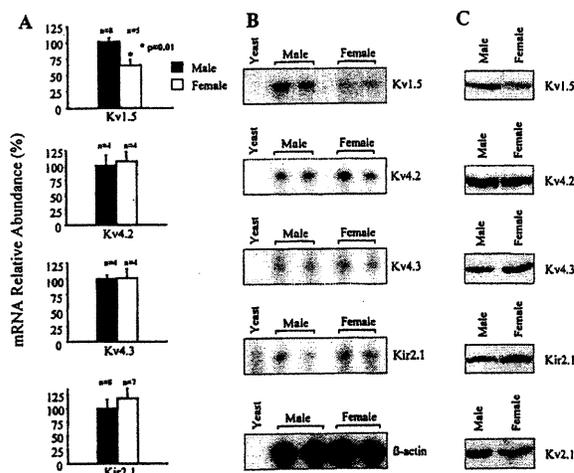
### mRNA Expression of Different $\text{K}^+$ Channels in Mouse Ventricle

To establish whether the reduction of  $I_{\text{Kur}}$  reflects a lower expression of Kv1.5 mRNA in female ventricle, we analyzed

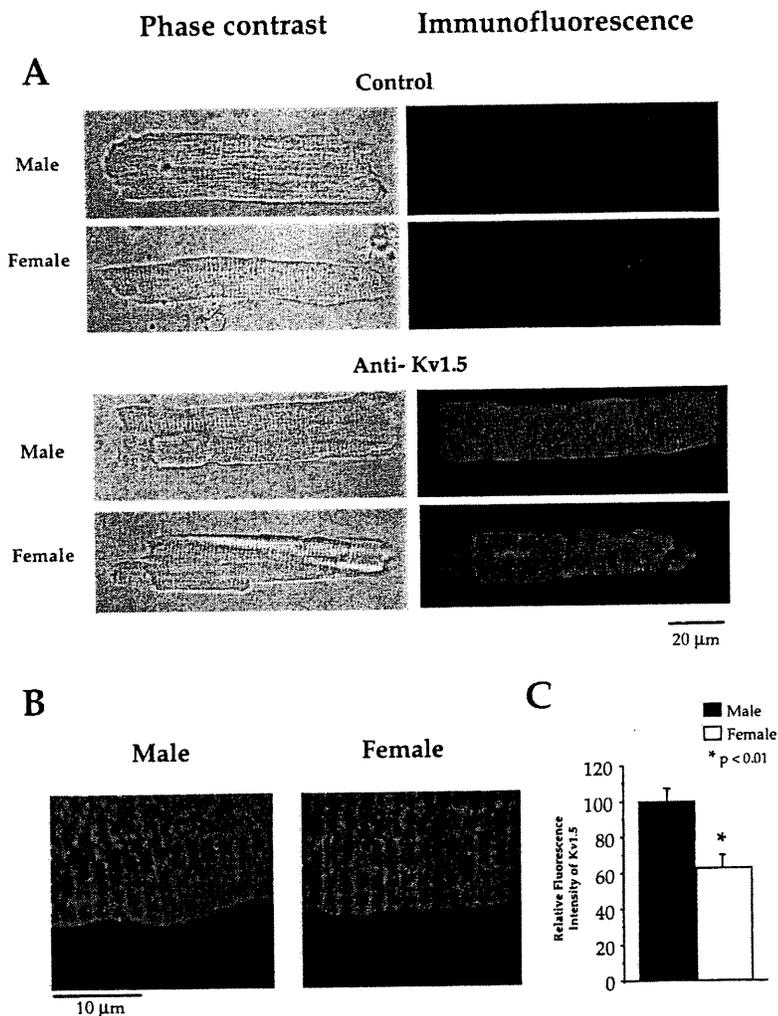
mRNA expression of selected  $\text{K}^+$  channels with RNase protection assay using RNA harvested from the intact ventricle of male and female mice. The  $\text{K}^+$  channels examined included Kv1.5 (coding for  $I_{\text{Kur}}$ ),<sup>21,23</sup> Kv4.2, Kv4.3 (both underlying  $I_{\text{to}}$ ),<sup>12,18,24-26</sup> and Kir2.1 (corresponding to  $I_{\text{K1}}$ ).<sup>27</sup> Whereas the transcript levels of Kv4.2, Kv4.3, and Kir2.1 showed no significant difference, there was a significantly lower expression (36%,  $P = 0.01$ ) of Kv1.5 in the ventricles of female mice relative to the males (Figures 7A and 7B). These mRNA data confirm our electrophysiological data showing that only  $I_{\text{Kur}}$  was decreased in female mouse ventricular myocytes compared with their male counterparts. Results were repeated using at least four mice in each group. During the course of a separate study on FVB/N mice, a similar difference in Kv1.5 mRNA levels was also noted (40% lower in female ventricle,  $P = 0.03$ ). Also in line with the current study, no sex-related differences were found in the message levels for the other  $\text{K}^+$  channels studied in this genetic strain of mice.

### Protein Expression of $\text{K}^+$ Channels and Immunolocalization of Kv1.5 in Mouse Ventricle

Experiments were undertaken to determine the protein level expression of Kv1.5 as well as that of the other  $\text{K}^+$  channels, Kv4.2, Kv4.3, and Kir2.1, in male and female ventricular myocytes. Barry et al<sup>12</sup> have shown that a 4-AP-resistant, slowly inactivating  $\text{K}^+$  current is encoded by Kv2.1 in mouse heart. Therefore, in addition to the other  $\text{K}^+$  channels studied, we also examined the protein expression of Kv2.1. Western



**Figure 7.** Comparison of different  $\text{K}^+$  channels expression in male and female mouse ventricle. **A**, Bar graphs comparing relative abundance of Kv1.5, Kv4.2, and Kir2.1 mRNA transcripts in male and female mice, determined by RNase protection assay. Values were normalized to  $\beta$ -actin signal. Relative abundance was calculated with value from male mice as a reference of 100%. **B**, Representative autoradiographs of mRNA levels for 4  $\text{K}^+$  channel isoforms measured in 2 male and 2 female RNA samples ( $2.5 \mu\text{g}$  of total RNA/sample). Yeast represents negative control (yeast total RNA). **C**, Western blot analysis of Kv1.5, Kv4.2, Kv4.3, Kir2.1, and Kv2.1 on proteins ( $100 \mu\text{g}$ /lane) isolated from male and female mouse ventricle. Fractions were separated on 10% SDS-PAGE and incubated with different  $\text{K}^+$  channels antibodies. Equal protein loading was confirmed by Ponceau S-stained membranes. Results were repeated using 3 mice from each group.



**Figure 8.** Detection and localization by immunofluorescent labeling of Kv1.5 in male and female mouse ventricular myocytes. **A**, Bottom, Isolated cells from both sexes were stained by exposure to primary antibody and then to TRITC-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody. Red fluorescent staining indicates presence of Kv1.5 in male and female myocytes. Left panels show corresponding phase images. Top, Negative controls (without primary antibody) showing a signal that is not different from background in both genders. **B**, Same cells as those seen on panel **A** (bottom) in male and female cells at a higher magnitude. **C**, Bar graphs showing that relative fluorescence intensity of Kv1.5 was 37% lower in female than in male ventricular myocytes. Individual measures of relative intensity of the K<sup>+</sup> channel Kv1.5 were taken on 5 different sites above the plasma membrane of 10 male and 10 female ventricular myocytes. These values were obtained with the laser scanning microscopy examiner software using an indicator that recorded fluorescence intensity on a specific point of the cell surface.

blot analysis revealed that the protein expression level of Kv2.1, Kv4.2, Kv4.3, and Kir2.1 was similar between male and female ventricle, confirming our electrophysiological data, which show no gender difference in their corresponding K<sup>+</sup> currents in mouse ventricular myocytes (Figure 7C). However, for Kv1.5, there was a significantly lower protein expression in female mouse ventricle as compared with male ventricle (Figure 7C). Moreover, immunolocalization of Kv1.5 by confocal microscopy showed a significant difference in the expression of Kv1.5 proteins between male and female myocytes (Figure 8A). A reduction of 37% in the relative fluorescence intensity of Kv1.5 was observed on the plasma membrane of female ventricular myocytes when compared with their male counterparts (Figure 8C).

**Discussion**

In this study, we demonstrated that adult mice clearly exhibit gender differences in cardiac repolarization. In females, a lengthening of APD was accompanied by a significant and specific lower expression of Kv1.5 and of its corresponding K<sup>+</sup> current, I<sub>Kur</sub>, despite similarities in voltage dependence and kinetics properties of this current in both genders. In contrast, we did not detect any gender difference in the additional K<sup>+</sup> currents present in mouse ventricle or in the expression level of their underlying K<sup>+</sup> channel isoforms.

To add further evidence that the gender difference in action potential is mediated by the difference in I<sub>Kur</sub> density, we applied low concentrations of 4-AP to myocytes isolated from male mice. The results show that block of I<sub>Kur</sub> in male myocytes results in a dramatic prolongation of the action potential (Figure 4C). Furthermore, APD equalized in male and female myocytes in the presence of 4-AP concentrations that selectively eliminated I<sub>Kur</sub>. In line with these results, we and others have previously reported that addition of 4-AP at concentrations selective for block of I<sub>Kur</sub> markedly prolonged APD in ventricular myocytes isolated from male mice.<sup>11,20</sup> Taken together, these observations provide strong evidence that the gender differences in I<sub>Kur</sub> density underlie the observed differences in action potential waveforms presented in Figure 1.

**Relation to Previous Studies**

The question of gender differences in cardiac repolarization is important. However, to our knowledge, only a few publications have focused on that important issue. Of these, no studies were performed using the mouse heart as an experimental model. Most of the previous research on gender-related differences in repolarization has been performed on rabbits. Liu et al first reported that female rabbit hearts had a

longer baseline and drug-induced changes in QT interval than male hearts.<sup>28</sup> In the same study, they found a small but statistically significant difference for the rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current ( $I_{Kr}$ ) and for  $I_{K1}$ . For both currents, the density was lower in females than in males. In their study,  $I_{Kr}$  currents were very atypical and activated at very positive potentials (threshold activation around +10 mV). In addition, its current density was statistically different only at test potentials positive to +30 mV where the physiological relevance remains uncertain. With regard to  $I_{K1}$ , they noticed a reduction only in the outward component of  $I_{K1}$  in the females. In the present study, we did not notice any significant differences in the current density of  $I_{K1}$  between male and female mouse ventricles. These discrepancies may be due to species differences and experimental conditions. Consistent with our results, they did not observe any significant gender differences in  $I_{to}$ .<sup>28</sup> In a separate study, they showed that despite a similar QT prolongation and K<sup>+</sup> channel block by 4-AP, the female rabbit hearts had a higher incidence of torsades de pointe compared with males.<sup>29</sup> However, they did not provide any explanation for these results. Recently, Pham et al<sup>30</sup> reported that the APD<sub>90</sub> was longer in papillary muscles of female than male rabbits but not the APD<sub>90</sub>. They also found that the  $I_{Kr}$  blocker dofetilide induced greater APD<sub>90</sub> prolongation in females than males whereas the  $I_{Ks}$  blocker chromanol had no effect on APD. These findings are interesting, but unfortunately the relationships between the APD and the K<sup>+</sup> currents were not examined. Using the rat as a model system, Leblanc et al<sup>31</sup> have reported that the action potential configurations, the  $I_{Ca-L}$  as well as the three K<sup>+</sup> currents present in rat ventricle ( $I_{K1}$ ,  $I_{to}$ , and  $I_{ss}$ ), were not different between male and female animals. These results are consistent with our findings showing that  $I_{Ca-L}$  and the three K<sup>+</sup> currents  $I_{K1}$ ,  $I_{to}$ , and  $I_{ss}$  were not different between both genders, whereas  $I_{Kur}$ , which is absent from rat ventricle, was significantly smaller in females.

### Potential Role for Sex Steroid Hormones in These Gender Differences

The mechanisms underlying gender-specific differences in cardiac repolarization are still largely unknown. Hormonal regulation of cardiac K<sup>+</sup> channel gene expression may affect basal electrical activity. The issue of the role of sex steroid hormones in the regulation of K<sup>+</sup> channel expression is an interesting question that has been the focus of previous studies.<sup>30,32-36</sup> However, the results of animal studies regarding the electrophysiological effects of estrogen or androgen have been divergent, and it is not clear from previous data whether sex steroid hormones consistently alter cardiac repolarization.<sup>37,38</sup>

A major finding of this study is that gender difference in Kv1.5 K<sup>+</sup> channel expression exists at the transcriptional level. The heart is a potential target not only for estrogen but also for androgen action given that both types of receptors are present in this organ.<sup>39</sup> Thus conceivably, androgen might be a candidate factor that shortens the action potential in male by upregulation of Kv1.5 expression in ventricle. Alternatively, estrogen might decrease the level of transcription and reduce the expression level of Kv1.5. Then again, both hormones

may potentially contribute to these gender-related differences.

Clearly, additional experimental studies are required to delineate the mechanism(s) of male-female differences in cardiac repolarization. Ongoing studies in our laboratory are aimed at exploring the role of sex steroid hormones on K<sup>+</sup> channel gene expression. Given the observed difference in APD between male and female mouse ventricles, a logical extension of this work will also be to compare QT interval in male and female mice.

### Potential Significance

As the use of murine modeling of human heart diseases increases, understanding sex-based differences in mouse cardiac repolarization is critical. This work improves our understanding of the fundamental mechanisms by which gender differences in cardiac repolarization occur and enhances our awareness of gender difference in the control of K<sup>+</sup> channel gene expression. The importance of this study is also that it validates the mouse model for further investigations of gender differences in cardiac electrophysiology.

### Acknowledgments

This study was supported by operating grants and personnel awards from the Canadian Institute of Health Research, the Heart and Stroke Foundation of Canada and Quebec, the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, and the Fonds de la Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal. We thank Louis-Robert Villeneuve for his expert assistance with the immunofluorescence and confocal experiments.

### References

1. Field LJ. Cardiovascular research in transgenic animals. *Trends Cardiovasc Med.* 1991;1:141-146.
2. Grupp IL, Subramaniam A, Hewett TE, Robbins J, Grupp G. Comparison of normal, hypodynamic and hyperdynamic mouse hearts using isolated work-performing heart preparations. *Am J Physiol.* 1993;265:H1401-H1410.
3. Christensen G, Wang Y, Chien KR. Physiological assessment of complex cardiac phenotypes in genetically engineered mice. *Am J Physiol.* 1997;272(6 pt 2):H2513-H2524.
4. Shuldiner AR. Transgenic animals. *N Engl J Med.* 1996;334:653-655.
5. Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res.* 1993;73:379-385.
6. Kaab S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Pak PH, Kass DA, Marbán E, Tomita F. Ionic mechanisms of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res.* 1996;78:262-273.
7. Tseng GN, Hoffman BF. Two components of transient outward current in canine ventricular myocytes. *Circ Res.* 1989;64:633-647.
8. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Two components of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current: differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol.* 1990;96:195-215.
9. Apkon M, Nerbonne JM. Characterization of two distinct depolarization-activated K<sup>+</sup> current in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol.* 1991;97:973-1011.
10. Wang Z, Fermi B, Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes: evidence for a novel delayed rectifier K<sup>+</sup> current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res.* 1993;73:1061-1076.
11. Fiset C, Clark RB, Larsen TS, Giles WR. A rapidly activating sustained K<sup>+</sup> current modulates repolarization and excitation-contraction coupling in adult mouse ventricle. *J Physiol (Lond).* 1997;504:557-563.
12. Barry DM, Xu H, Schuessler RB, Nerbonne JM. Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodeling in mice expressing a dominant-negative Kv4  $\alpha$ -subunit. *Circ Res.* 1998;83:560-567.

13. London B, Wang DW, Hill JA, Bennett PB. The transient outward current in mice lacking the potassium channel gene Kv1.4. *J Physiol*. 1998;509:171-182.
14. London B, Jeron A, Zhou J, Buckett P, Han X, Mitchell GF, Koren G. Long QT and ventricular arrhythmias in transgenic mice expressing the N-terminus and first transmembrane segment of a voltage-gated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:2926-2931.
15. Zhou J, Jeron A, London B, Han X, Koren G. Characterization of a slowly inactivating outward current in adult mouse ventricular myocytes. *Circ Res*. 1998;83:806-814.
16. Xu H, Barry DM, Li H, Brunet S, Guo W, Nerbonne JM. Attenuation of the slow component of delayed rectification, action potential prolongation, and triggered activity in mice expressing a dominant-negative Kv2  $\alpha$  subunit. *Circ Res*. 1999;85:623-633.
17. Guo W, Xu H, London B, Nerbonne JM. Molecular basis of transient outward K<sup>+</sup> current diversity in mouse ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)*. 1999;521:587-599.
18. Wickenden AD, Lee P, Sah R, Huang Q, Fishman GI, Backx PH. Targeted expression of a dominant-negative Kv4.2 K<sup>+</sup> channel subunit in the mouse heart. *Circ Res*. 1999;85:1067-1076.
19. Xu H, Guo W, Nerbonne JM. Four kinetically distinct depolarization-activated K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen Physiol*. 1999;113:661-677.
20. DuBell WH, Lederer WJ, Rogers TB. K(+) currents responsible for repolarization in mouse ventricle and their modulation by FK-506 and rapamycin. *Am J Physiol*. 2000;278:H886-H897.
21. London B, Guo W, Pan X, Lee JS, Shusterman V, Rocco CJ, Logothetis DA, Nerbonne JM, Hill JA. 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;88:940-946.
22. Fiset C, Trépanier-Boulay V, St-Michel C. Gender differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. Abstract. *Circulation*. 2000;102(suppl II):II-193.
23. Feng J, Wible B, Li GR, Wang Z, Nattel S. Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res*. 1997;80:572-579.
24. Dixon JE, McKinnon D. Quantitative analysis of potassium channel mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats. *Circ Res*. 1994;75:252-260.
25. Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS, McKinnon D. Role of the Kv4.3 potassium channel in ventricular muscle: a molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res*. 1996;79:659-668.
26. Fiset C, Clark RB, Shimoni Y, Giles WR. *Shal*-type channels contribute to the Ca<sup>2+</sup>-independent transient outward K<sup>+</sup> current in rat ventricle. *J Physiol (Lond)*. 1997;500:1:51-64.
27. Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature*. 1997;362:127-133.
28. Liu XK, Katchman A, Drici MD. Gender difference in the cycle length-dependent QT and potassium currents. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;285:672-679.
29. Liu XK, Wang W, Ebert SN, Franz MR, Katchman A, Woosley RL. Female gender is as risk factor for torsades de pointes in an in vitro animal model. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999;34:287-294.
30. Pham TV, Sosunov EA, Gainullin RZ, Danilo P Jr, Rosen MR. Impact of sex and gonadal steroids on prolongation of ventricular repolarization and arrhythmias induced by i(k)-blocking drugs. *Circulation*. 2001;103:2207-2212.
31. Leblanc N, Chartier D, Gosselin H, Rouleau JL. Age and gender differences in excitation-contraction coupling of the rat ventricle. *J Physiol (Lond)*. 1998;511:533-548.
32. Drici MD, Burklow TR, Haridasse V, Glazer RI, Woosley RL. Sex hormones prolong the QT interval and downregulate potassium channel expression in the rabbit heart. *Circ Res*. 1996;94:1471-1474.
33. Berger F, Borchard U, Hafner D, Pütz I, Weis TM. Effects of 17 $\beta$ -estradiol on action potential and ionic currents in male rat ventricular myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1997;356:788-796.
34. de Beer E, Keizer HA. Direct action of estradiol-17 $\beta$  on the atrial action potential. *Steroids*. 1982;40:223-231.
35. Tanabe S, Hata T, Hiraoka M. Effects of estrogen on action potential and membrane currents in guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 1999;46:H826-H833.
36. Degtiar VE, Osipenko VN, Naidenov VG, Shuba YM, Woosley RL. Testosterone-mediated modulation of HERG blockade by neuroleptics. Abstract. *Biophys J*. 2000;78:343A.
37. Prinzmetal M, Ishikawa K, Nakashima M, Oishi H, Ozkan E, Wakayama J, Baines JM. Estrogens and the heart. *Am J Obstet Gynecol*. 1967;98:575-576.
38. 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.
39. Stumpf WE. Steroid hormones and the cardiovascular system: direct actions of estradiol, progesterone, testosterone, gluco- and mineralcorticoids, and solatriol (vitamin D) on central nervous regulatory and peripheral tissues. *Experientia*. 1990;46:13-25.