

Université de Montréal

**Études du remodelage vasculaire utérin durant la grossesse :
caractérisation du rôle de l'œstrogène et de son action
vasorelaxante.**

par

Pierre-André Scott

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

en Pharmacologie

août, 2010

© Pierre-André Scott, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Études du remodelage vasculaire utérin durant la grossesse :
caractérisation du rôle de l'œstrogène et de son action
vasorelaxante.**

présentée par :

Pierre-André Scott

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Guy Rousseau
Président-rapporteur

Dr Jean St-Louis
Directeur de recherche

Dr Christian Beauséjour
Membre du jury

Dr Éric Rousseau
Examineur externe

RÉSUMÉ

La grossesse est un état physiologique particulier où de nombreux changements fonctionnels et structuraux surviennent. Chez la rate, pour répondre aux besoins grandissants du fœtus, l'artère utérine se développe pour atteindre le double de son diamètre original avant parturition. Par conséquent, le débit sanguin utérin augmente d'environ vingt fois. Pour ce faire, les vaisseaux utérins sont l'objet d'un remodelage caractérisé par une hypertrophie et une hyperplasie des différentes composantes de la paroi. De plus, ce remodelage est complètement réversible après la parturition, par opposition au remodelage vasculaire « pathologique » qui affecte les artères systémiques, dans l'hypertension chronique, par exemple. La grossesse s'accompagne aussi de modifications hormonales importantes, comme les œstrogènes dont la concentration s'accroît progressivement au cours de cette période. Elle atteindra une concentration trois cents fois plus élevée avant terme que chez une femme non gravide. Cette hormone possède de multiples fonctions, ainsi qu'un mode d'action à la fois génomique et non génomique. Considérant l'ensemble de ces éléments, nous avons formulé l'hypothèse que l'œstradiol serait responsable de modifier la circulation utérine durant la grossesse, par son action vasorelaxante, mais aussi en influençant le remodelage de la vasculature utérine.

Nous avons montré que le 17β -Estradiol (17β -E₂) produit une relaxation due à un effet non génomique des artères utérines en agissant directement sur le muscle lisse par un mécanisme indépendant du monoxyde d'azote et des récepteurs classiques aux œstrogènes (ER α , ER β). De plus, la relaxation induite par le 17β -E₂ dans l'artère utérine durant la gestation est réduite par rapport à celle des artères des rates non gestantes. Ceci serait attribuable à une diminution de monoxyde d'azote provenant de la synthèse de NO

neuronal dans les muscles lisses des artères utérines. Nos résultats démontrent que le récepteur à l'œstrogène couplé aux protéines G (GPER), la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase G (PKG) ne sont pas impliqués dans la signalisation intracellulaire associée à l'effet vasorelaxant induit par le 17β -E₂. Cependant, nous avons montré une implication probable des canaux potassiques sensibles au voltage, ainsi qu'un rôle possible des canaux potassiques de grande conductance activés par le potentiel et le calcium (BK_{Ca}). En effet, le penitrem A, un antagoniste présumé des canaux potassiques à grande conductance, réduit la réponse vasorelaxante du 17β -E₂. Toutefois, une autre action du penitrem A n'est pas exclue, car l'ibériotoxine, reconnue pour inhiber les mêmes canaux, n'a pas d'effet sur cette relaxation. Quoi qu'il en soit, d'autres études sont nécessaires pour obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la relaxation non génomique sur le muscle lisse des artères utérines.

Quant à l'implication de l'œstrogène sur le remodelage des artères utérines durant la gestation, nous avons tenté d'inhiber la synthèse d'œstrogènes durant la gestation en utilisant un inhibiteur de l'aromatase. Plusieurs paramètres ont été évalués (paramètres sanguins, réactivité vasculaire, pression artérielle) sans changements significatifs entre le groupe contrôle et celui traité avec l'inhibiteur. Le même constat a été fait pour le dosage plasmatique de l'œstradiol, ce qui suggère l'inefficacité du blocage de l'aromatase dans ces expériences. Ainsi, notre protocole expérimental n'a pas réussi à inhiber la synthèse d'œstrogène durant la grossesse chez le rat et, ce faisant, nous n'avons pas pu vérifier notre hypothèse.

En conclusion, nous avons démontré que le 17β -E₂ agit de façon non génomique sur les muscles lisses des artères utérines qui implique une action sur les canaux potassiques de la membrane cellulaire. Toutefois, notre protocole expérimental n'a pas

été en mesure d'évaluer les effets génomiques associés au remodelage vasculaire utérin durant la gestation et d'autres études devront être effectuées.

Mots-clés : grossesse, œstrogènes, monoxyde d'azote, artère utérine, remodelage vasculaire, rats

ABSTRACT

Pregnancy is a peculiar physiological state in which many structural and functional changes occur. In rats, to meet the growing needs of the fetus, uterine artery expands to reach twice its original diameter before parturition. Therefore, uterine blood flow increases by about twenty times. To do this, the uterine vessels undergo substantial remodelling characterized by hypertrophy and hyperplasia of the various components of the wall. Furthermore, this remodelling is completely reversible after parturition, as opposed to “pathological vascular remodelling” that affects systemic arteries in chronic hypertension, for instance. Pregnancy is also accompanied by significant hormonal changes, such as estrogens whose concentration in the blood increases progressively during this period. It reaches concentrations three hundred times higher before term than in non-pregnant women. This hormone has multiple functions and mediates its effects by genomic and non-genomic pathways. Considering these elements, we hypothesized that estradiol would be responsible for remodeling the uterine circulation during pregnancy, by its vasorelaxant action, but also by influencing the remodeling of the uterine vasculature.

We have shown that 17β -Estradiol (17β -E₂) produced non-genomic relaxation of uterine arteries by acting directly on smooth muscle using a mechanism independent of nitric oxide and classical estrogen receptors (ER α , ER β). Moreover, the relaxation induced by 17β -E₂ in the uterine artery during pregnancy is reduced compared to that of arteries from non-pregnant animals. This is the result of decrease of nitric oxide derived from neuronal NO synthase in smooth muscle of uterine arteries. Our results also show that the estrogen receptor coupled to G proteins (GPER), protein kinase A (PKA) and protein kinase G (PKG) are NOT involved in intracellular signaling associated with the vasorelaxant effect induced by the 17β -E₂. Moreover, we have shown a possible involvement of potassium

channels sensitive to voltage and a possible involvement of large conductance calcium-activated potassium channels (BK_{Ca}). Indeed, the penitrem A, a suspected antagonist of BK_{Ca} , reduced the vasorelaxant responses of 17β -E₂. However, some other actions of penitrem A are not excluded because iberiotoxin, known to inhibit the same channels, had no effect on this relaxation. However, further studies are needed to obtain a better understanding of the mechanisms involved in the relaxation non-genomics on the smooth muscle of uterine arteries.

As for the involvement of estrogen on the remodeling of uterine arteries during pregnancy, we attempted to inhibit the synthesis of estrogen during pregnancy using an aromatase inhibitor. Several parameters were evaluated (plasma values, vascular reactivity, blood pressure) without significant changes between the control group and those treated with the inhibitor. The same observation was made for the determination of plasma estradiol, suggesting the ineffectiveness of aromatase blocking in these experiments. Thus, our experimental protocol failed to inhibit the synthesis of estrogen in rats during pregnancy and, in so doing, we cannot confirm or refute our hypothesis.

In conclusion, we demonstrated that 17β -E₂ acts on smooth muscle of the uterine arteries by a non-genomic pathway by apparently acting on potassium channels. However, our experimental protocol was not able to assess the genomic effects associated with uterine vascular remodeling during pregnancy and further studies are required to ascertain this aspect of our work.

Keywords : pregnancy, estrogens, nitric oxide, uterine artery, vascular remodeling, rats

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract.....	vi
Table des matières.....	viii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Liste des abréviations	xv
Remerciements	xx
Chapitre 1 : Introduction	21
1. La grossesse	22
1.1 La physiologie maternelle au cours de la grossesse	22
1.1.1 Modifications hormonales	23
1.1.2 Modification cardiovasculaire.....	25
1.2 La rate comme modèle animal de la grossesse	28
1.2.1 Modifications hormonales	29
1.2.2 Modifications cardiovasculaires	30
2. La circulation utérine	31
2.1 La structure des vaisseaux sanguins	31
2.2 Les mécanismes de contraction et de relaxation vasculaire	33
2.2.1 Muscle lisse vasculaire	34
2.2.1.1 Caractéristiques structurales des MLV.....	35
2.2.2 La vasoconstriction	38

2.2.3 La vasorelaxation	40
2.3 La circulation utérine	42
2.5 Modifications et remodelages des vaisseaux utérins durant la gestation	44
3. Les œstrogènes et les hormones sexuelles	51
3.1 Le rôle des hormones stéroïdiennes dans la physiologie humaine	51
3.1.1 Œstrogènes	51
3.1.2 Progestérone	52
3.2 Implications durant la grossesse	53
3.2.1 Œstrogènes	53
3.2.2 Progestérone	54
3.3 La synthèse des hormones stéroïdiennes.....	55
3.3.1 La biosynthèse des œstrogènes.....	58
3.3.2 Les inhibiteurs de l'aromatase.....	61
3.4 Modes d'action des œstrogènes sur les vaisseaux sanguins.....	63
3.4.1 Les effets génomiques	64
3.4.2 Les effets non génomiques	65
3.5 Les récepteurs des œstrogènes	68
3.5.1 Les récepteurs classiques.....	68
3.5.1.1 Les outils pharmacologiques des ERs.....	72
3.5.2 Récepteur à l'œstrogène couplé aux protéines G	75
3.5.2.1 Fonctions du GPER dans le système cardiovasculaire.....	82
3.5.2.2 Les outils pharmacologiques du GPER	83
5. Hypothèses et objectifs de travail	85
<i>Chapitre 2 : Matériel et méthodes</i>	<i>88</i>
Animaux.....	89
Mesures de pression artérielle	90
Pléthysmographie caudale.....	90
Télémétrie	91
La réactivité vasculaire utérine.....	92

Dosage et échantillonnage	94
Dosage des œstrogènes sanguin.....	95
Analyses statistiques	96
Produits chimiques et agents pharmacologiques.....	97
Chapitre 3 : Manuscrit	99
Chapitre 4 : Résultats	106
Projet sur l'étude des mécanismes de la relaxation rapide du 17 β -œstradiol.....	108
inhibition de l'aromatase.....	116
A) Mesures pléthysmographiques.....	116
Paramètres physiologiques.....	116
Pression artérielle systolique	121
Réactivité vasculaire	122
B) Mesures télémétriques.....	126
Pressions artérielles	126
Réactivité vasculaire	129
Concentration d'œstradiol circulant.....	133
Chapitre 5 : Discussion et conclusion	135
Projet sur l'étude des mécanismes de la relaxation rapide du 17 β -œstradiol.....	136
Inhibition de l'aromatase et remodelage vasculaire	147
Perspectives	151
Bibliographie.....	160

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1** Modifications hémodynamiques
- Tableau 2** Efficacité et puissance de la relaxation au 17β -E2 sur des artères utérines de rates non gestantes avec différents inhibiteurs des canaux potassiques.
- Tableau 3** Efficacité et puissance de la relaxation au 17β -E2 sur des artères utérines de rates non gestantes avec différents inhibiteurs de protéine kinases, des ERs ou de synthèse protéique.
- Tableau 4** Efficacité et puissance de la relaxation induite par différents vasorelaxants sur des artères utérines de rates non gestantes.
- Tableau 5** Effets de l'administration d'ATD (5 mg/jour) sur le gain de poids, la consommation de nourriture et d'eau chez des rates gestantes pour la durée du traitement.
- Tableau 6** Effets du traitement avec l'ATD (5 mg/jour) sur les paramètres foétaux chez des rates gestantes.
- Tableau 7** Effets du traitement avec l'ATD (5 mg/jour) sur le poids de différents organes chez des rates gestantes.
- Tableau 8** Effets du traitement avec l'ATD (5 mg/jour) sur les paramètres sanguins chez des rates gestantes.
- Tableau 9** Effets du traitement avec l'ATD (5 mg/jour) sur les paramètres urinaires chez des rates gestantes.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** Structure comparée des vaisseaux sanguins.
- Figure 2** Canaux ioniques, pompes ioniques et co-transporteurs à la membrane plasmique d'un myocyte vasculaire.
- Figure 3** Anatomie de la circulation utérine chez la femme.
- Figure 4** Anatomie de la circulation utérine chez la rate.
- Figure 5** Représentation du remodelage d'une artère spiralée suite à l'invasion trophoblastique.
- Figure 6** Schéma de la stéroïdogénèse chez l'humain.
- Figure 7** Mécanismes de la réaction chimique de l'aromatation de l'androstènedione en estrone.
- Figure 8** Structure chimique de différents inhibiteurs de l'aromatase.
- Figure 9** Les effets directs (génomiques et non génomiques) de l'œstrogène sur les vaisseaux sanguins.
- Figure 10** Structure des récepteurs α et β aux œstrogènes chez l'humain.
- Figure 11** Structure de différents composés antiœstrogéniques et œstrogéniques.
- Figure 12** Mécanismes de la signalisation médiée par l'œstrogène via le récepteur GPER.
- Figure 13** Structure de l'agoniste (G-1) et l'antagoniste (G15) au GPER.
- Figure 14** Système de myographe à microvaisseaux.

- Figure 15** Courbes concentration-réponse comparant la relaxation induite par le 17β -E₂ sur des artères utérines précontractées avec 1 μ M de phényléphrine et suivant une préincubation avec différents bloqueurs de canaux potassique.
- Figure 16** Courbes concentration-réponse comparant la relaxation induite par le 17β -E₂ sur des artères utérines précontractées avec 1 μ M de phényléphrine et suivant une préincubation avec différents inhibiteurs.
- Figure 17** Courbes concentration-réponse mesurant la relaxation induite par différents agents vasorelaxant et comparé au 17β -E₂ sur des artères utérines précontractées avec 1 μ M de phényléphrine.
- Figure 18** Effets du traitement avec l'ATD (5 mg/jour) sur la pression artérielle systolique obtenue par méthode de mesure indirecte au niveau de la queue entre le jour 11 et 22 chez des rates gestantes.
- Figure 19** Effet du traitement avec l'ATD (5 mg/jour) sur le diamètre de l'artère utérine principale chez des rates gestantes à une pression transmurale de 60 mmHg.
- Figure 20** Courbe concentration-réponse comparant l'effet du traitement avec l'ATD (5 mg/jour) sur la réactivité vasculaire de l'artère utérine principale à l'angiotensine II chez des rates gestantes.
- Figure 21** Courbe concentration-réponse comparant l'effet du traitement avec l'ATD (5 mg/jour) sur la relaxation induite par l'œstrogène sur l'artère utérine principale suite à une stimulation de phényléphrine chez des rates gestantes.
- Figure 22** Effets du traitement avec l'ATD (10 mg/jour) sur la pression artérielle obtenue par télémétrie chez des rates gestantes.

- Figure 23** Effets du traitement avec l'ATD (10 mg/jour) sur la fréquence cardiaque obtenue par télémétrie chez des rates gestantes.
- Figure 24** Effets du traitement avec l'ATD (10 mg/jour) sur degré d'activité obtenue par télémétrie chez des rates gestantes.
- Figure 25** Effet du traitement avec l'ATD (10 mg/jour) sur le diamètre de l'artère utérine principale chez des rates gestantes.
- Figure 26** Courbe concentration-réponse comparant l'effet du traitement avec l'ATD (10 mg/jour) sur la réactivité vasculaire de l'artère utérine principale à l'angiotensine II chez des rates gestantes.
- Figure 27** Courbe concentration-réponse comparant l'effet du traitement avec l'ATD (10 mg/jour) sur la relaxation induite par l'œstrogène sur l'artère utérine principale suite à une stimulation de phényléphrine chez des rates gestantes.
- Figure 28** Niveau d'œstradiol circulant mesuré par chromatographie à phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) dans le sang maternel au 22^e jour de gestation.
- Figure 29** Mécanismes proposés pour expliquer la vasodilatation hypoxique induite par les érythrocytes.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2-ME	: 2-méthoxyestradiol
4-AP	: 4-aminopyridine
A_{2A}	: Récepteur à l'adénosine 2A
AGTR1	: Récepteur AT ₁ à l'angiotensine II
AMPc	: Adénosine monophosphate cyclique
ANP	: Peptide natriurétique auriculaire (<i>Atrial natriuretic peptide</i>)
ARNm	: Acide ribonucléique messager
ANG II	: Angiotensine II
ATD	: 1,4,6-Androstatrien-3,17-dione; inhibiteur de l'enzyme aromatasase
ATP	: Adénosine triphosphate
BK_{Ca}	: Canaux potassiques de grande conductance activés par le potentiel et le calcium
BSA	: Albumine de sérum bovin
Ca²⁺-ATPase	: Pompe à calcium dépendante de l'ATP
CaM	: Calmoduline
CCPA	: Conseil canadiens de protection des animaux
CDK	: Kinases dépendantes des cyclines (<i>Cyclin-dependent kinases</i>)
Cl⁻	: Ion chlore
CMLV	: Cellule musculaire lisse vasculaire
COS-7	: Cellules rénales immortalisées de singe (<i>African Green Monkey SV40-transfected kidney fibroblast cell line</i>)

CREB	: Élément de réponse liant l'AMPc (<i>cAMP response element binding</i>)
CTGF	: Facteur de croissance du tissu conjonctif (<i>connective tissue growth factor</i>)
Ctrl	: Contrôle
CYP19	: Aromatase (<i>Cytochrome P450, family 19</i>)
DHEA-S	: Sulfate de déhydroépiandrostérone
DPN	: Diarylpropionitrile
E₂	: Œstradiol
E_{max}	: Asymptote maximale de la courbe concentration-réponse ou l'effet maximale
EC₅₀	: 50 % du E _{max}
EGFR	: Récepteur au facteur de croissance épidermique (<i>Epidermal growth factor receptor</i>)
eNOS / NOS3	: Synthase de monoxyde d'azote endothéliale
ER	: Récepteur aux œstrogènes
ERE	: Élément de réponse aux œstrogènes
ERαKO	: Inactivation du gène ERα chez la souris
ERβKO	: Inactivation du gène ERβ chez la souris
ERαβKO	: Inactivation des gènes ERα et ERβ chez la souris
G-1	: Agoniste du GPER
G15	: Antagoniste du GPER
GC-MS	: Chromatographie à phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>)
GFP	: Protéine fluorescente verte (<i>Green fluorescent protein</i>)
GMPc	: Guanosine monophosphate cyclique

GPCR	: Récepteur couplés aux protéines G (<i>G protein-coupled receptor</i>)
GPER	: Récepteur à l'œstrogène couplé aux protéines G (<i>G Protein-coupled Estrogen Receptor</i>)
Hb	: Hémoglobine
HB-EGF	: Facteur de croissance similaire au facteur de croissance épidermique qui lie l'héparine (<i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>)
hCG	: Gonadotrophine chorionique humaine
HEK293	: Cellules embryonnaires humaines de rein (<i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i>)
HHS	: Hypothalamo-hypophysaire surrénalien
Hsp	: Protéine de choc thermique
HUVEC	: Cellules endothéliales dérivées de la veine ombilicale humaine (<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>)
<i>I_{cat}</i>	: Canaux non-sélectif de cations
IbTx	: Ibériotoxine
iNOS / NOS2	: Synthase de monoxyde d'azote inducible
IP₁	: Récepteur à la prostacycline 1 (<i>prostaglandin I₂ receptor 1</i>)
IP3	: Inositol triphosphate
K_{ATP}	: Canaux potassiques dépendants de l'ATP
KBS	: Solution Krebs bicarbonate
K_{Ca}	: Canaux potassiques dépendants du calcium
K_{IR}	: Canaux potassiques à rectification entrante
K_V	: Canaux potassiques sensible au voltage
LH	: Hormone lutéinisante
L-NAME	: L-Nitroarginine méthylester

MAPK	: Protéine kinase activée par un mitogène (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MLCK	: Kinase des chaînes légères de myosines (<i>myosin light chain kinase</i>)
MLCP	: Phosphatase des chaînes légères de myosines (<i>myosin light chain phosphatase</i>)
MLV	: Muscle lisse vasculaire
MMP	: Métalloprotéinase matricielle (<i>Matrix metalloproteinase</i>)
Na⁺/K⁺-ATPase	: Pompe à sodium dépendante de l'ATP
nNOS / NOS1	: Synthase de monoxyde d'azote neuronale
NO	: Monoxyde d'azote
NOS	: Synthases de monoxyde d'azote
NPR	: Récepteur au peptide natriurétique
P_{2Y}	: Récepteurs purinergique 2Y
PFBCI	: Chlorure de 2,3,4,5,6-Pentafluorobenzoyl (<i>Pentafluorobenzoyl chloride</i>)
PGI₂	: Prostacycline
PKA	: Protéine kinase A
PKC	: Protéine kinase C
PKG	: Protéine kinase G
PLC	: Phospholipase C
PPT	: Propylpyrazole triol
Récepteur H	: Récepteur histaminergique
RIA	: Radioimmunoessai (<i>radioimmunoassay</i>)
ROC	: Canaux calciques dépendant d'un ligand (<i>Receptor-operated calcium channel</i>)

RUPP	: Réduction de pression de perfusion utérine
SKBR3	: Ligné cellulaire de cancer du sein
SERCA	: Protéine régulatrice des pompes $\text{Ca}^{2+} \text{Mg}^{2+}$ -ATPase du réticulum sarcoplasmique (<i>Sarco/Endoplasmic Reticulum $\text{Ca}^{2+} \text{Mg}^{2+}$-ATPase</i>)
SERM	: Modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes (<i>Selective Estrogen Receptor Modulator</i>)
SNO	: S-nitrosothiols
SNO-Hb	: S-nitrosohémoglobine
SRAA	: Système rénine-angiotensine-aldostérone
TEA	: Tétrahéthylammonium (<i>Tetraethylammonium</i>)
VEGF	: Facteur de croissance vasculaire endothéliale (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VIPR	: Récepteur du peptide vasoactif intestinal (<i>vasoactive intestinal protein receptor</i>)
VSCC	: Canaux calciques dépendant du voltage (<i>voltage sensitive calcium channel</i>)

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes parents, Nicole et Jean-Pierre, qui ont toujours été d'un grand soutien. Ils ont su me guider merveilleusement et m'aider avec les décisions que j'ai prises. Je remercie mon frère et meilleur ami, Jean-David, pour les nombreux coups de main.

Je tiens à remercier Jean St-Louis qui a été un excellent mentor et qui m'a aidé, sans compter, à cheminer tout le long de ma formation dans le monde de la recherche scientifique. Merci au Dre Michèle Brochu, pour les nombreux conseils et encouragements.

Je remercie les gens du laboratoire, Karine, Annie, Mylène, Pascale, Marie-Claude, Cindy, Véronique, Leslie et Benoit pour votre amitié et pour avoir agrémenté tous ces jours au laboratoire.

Un merci tout spécial à Caroline, mon amoureuse, pour sa patience, ses encouragements, son soutien, son ravissant sourire et pour notre magnifique petite Annabelle. Finalement, merci à toi Georges.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1. LA GROSSESSE

L'Office québécois de la langue française définit la grossesse comme suit : « Espace de temps compris entre la fécondation et l'accouchement (soit normalement 280 jours ou 9 mois), ou entre la fécondation et l'avortement, pendant lequel l'embryon, puis le fœtus, se développent dans les organes génitaux de la mère ». Cette jolie définition, quoique tout à fait exacte, laisse planer une image extrêmement simpliste de ce qu'est réellement une grossesse. Mais en dessous des apparences, la femme subit une période de grands changements qui porte un ou plusieurs enfants en devenir. Non seulement la morphologie de son corps se modifie, mais la physiologie de plusieurs systèmes de l'organisme entier va s'adapter aux besoins grandissants de sa progéniture. Il s'agit d'un passage obligé pour la survie de l'espèce. Avec les nombreuses années, l'évolution a si bien harmonisé les choses que toutes ces adaptations s'organisent d'une manière quasi mystique. Comme tout n'est pas parfait, il existe plusieurs situations où une grossesse rencontre des complications et c'est dans ces moments que nous nous rendons compte de notre incompréhension de cet état physiologique. C'est pourquoi la recherche en obstétrique demeure essentielle.

1.1 LA PHYSIOLOGIE MATERNELLE AU COURS DE LA GROSSESSE CHEZ LA FEMME

Des adaptations maternelles majeures sur le plan anatomique, physiologique, métabolique et biochimique sont requises au maintien du développement

et de la croissance du fœtus. Ces changements sont observés sur pratiquement tous les systèmes et organes maternels. Ils s'amorcent rapidement suivant la fécondation, bien avant que les besoins de fœtus soient substantiels, pour se poursuivre tout au long de la période gestationnelle. De plus, la grossesse est une condition exceptionnelle, car ces adaptations sont complètement réversibles en *post-partum*. Probablement parce qu'ils pourraient survenir en réponse à des stimuli physiologiques fournis par l'unité fœto-maternelle.

1.1.1 Modifications hormonales

La grossesse amène d'énormes bouleversements au niveau hormonal chez la femme. Les œstrogènes, les progestagènes et les adrénocorticoïdes sont sécrétés abondamment dans la circulation maternelle et fœtale.

L'origine des œstrogènes varie au cours de la gestation et selon les besoins. Il existe trois types d'œstrogènes présents durant la grossesse : l'œstradiol, l'œstriol et l'œstrone. L'œstradiol provient presque exclusivement des ovaires maternels pour les 6 premières semaines de gestation [283]. Par la suite, le placenta prend la relève et sécrète de grandes quantités d'œstradiol converti à partir du déhydroépiandrostérone-sulfate (DHEA-S) fœtal circulant. Le DHEA-S est un stéroïde produit en grande partie par les surrénales. Après le premier trimestre, le placenta devient la principale source d'œstradiol circulant. Durant la phase folliculaire du cycle menstruel, la concentration d'œstradiol est moins de 0,1ng/mL et atteint un maximum de 0,4 ng/mL durant la phase lutéale [5]. Suivant la conception, les taux sériques d'œstradiol croissent pour atteindre une concentration de 6 à 30 ng/mL à terme [168]. Le profil de l'œstrone est relativement semblable. La source de production de l'œstrone est sensiblement la même que l'œstradiol. Les ovaires maternels sont la principale source pour les premières 4 à 6

semaines de gestation et par la suite c'est le placenta qui prend le relais pour le restant de la gestation. La concentration normale d'œstrone durant la phase folliculaire du cycle chez la femme est de 0,1 ng/mL. Suivant la conception la concentration reste à des niveaux de la phase lutéale jusqu'à la 6e ou 10e semaine. Par la suite, la concentration augmente graduellement pour atteindre de 2 à 30 ng/mL à terme [284]. Finalement, l'œstriol est quasi indétectable durant le cycle menstruel normal, car elle a une concentration de moins de 0,01 ng/mL. L'œstriol provient presque uniquement du placenta par la conversion du 16 α -OH-DHEA-S fœtal [147]. Les taux sériques d'œstriol chez la mère commencent à être détectables à 9 semaines de gestation avec une concentration de 0,05 ng/mL. À terme, l'œstriol atteint une concentration entre 10 et 30 ng/mL. Cette observation corrèle directement avec l'évolution stéroïdogénique du cortex de la surrénale du fœtus qui produit les précurseurs, dont le 16 α -OH-DHEA-S [283].

Une autre classe d'hormones impliquée dans la gestation est celle des progestagènes. Cette catégorie d'hormones est représentée majoritairement durant la grossesse par la progestérone et le 17 α -hydroxyprogestérone. La progestérone est présente à une concentration de moins de 1 ng/mL durant la phase folliculaire et graduellement, tout au long de la gestation, les taux sériques de progestérone augmentent pour atteindre un maximum de 100-300 ng/mL à terme [283]. D'abord, la progestérone est synthétisée par le corps jaune avant la 6^e semaine de gestation et le placenta prend la relève à partir de la 7^e semaine. À la 12^e semaine, le placenta devient la principale source de progestérone. La 17 α -hydroprogestérone provient elle aussi du corps jaune durant le premier trimestre, mais les ovaires continuent d'être une source importante de 17 α -hydroprogestérone durant toute la grossesse. Cependant, une fois parvenu au troisième trimestre, le placenta utilise des précurseurs provenant du fœtus pour sécréter des quantités croissantes de 17 α -hydroprogestérone [285].

Il y a plusieurs autres hormones impliquées au cours de la grossesse. Dès les 6^e et 7^e jours de grossesse, le fœtus produit la gonadotrophine chorionique (hCG) qui stimule le corps jaune et prolonge sa durée de vie pour la production de progestérone et d'œstrogènes. Lorsque le placenta est pleinement fonctionnel, la sécrétion d'hCG est remplie par les syncytiotrophoblastes et va en diminuant pour la suite de la grossesse.

Une autre hormone impliquée dans la grossesse humaine est la relaxine, cependant elle possède un rôle mitigé. Elle a tout d'abord été identifiée en 1926 par Frederick Hisaw comme une substance permettant l'assouplissement de ligaments pelviens, ce qui pourrait faciliter l'expulsion du bébé [109]. Il s'agit d'une hormone peptidique d'environ 6 kDa qui a une structure semblable à l'insuline. Sa composition en acides aminés et la taille de sa chaîne peptidique varient considérablement selon l'espèce. Chez la femme, la relaxine devient détectable dans le sang entre la 7^e et la 10^e semaine et les concentrations plasmatiques maximales surviennent avant parturition. Par contre, il semble que l'absence de cette hormone n'ait pas de conséquences sur le déroulement d'une grossesse normale. En effet, on rapporte que des femmes enceintes peuvent se rendre à terme grâce à un don d'ovule [84], malgré des concentrations indétectables de relaxine [128].

1.1.2 Modification cardiovasculaire

Une des adaptations cardiovasculaires importantes durant la grossesse est sans contredit l'augmentation du débit cardiaque. Au départ, le débit cardiaque chez une femme se situe en moyenne à 4,5 L/min. Dès la dixième semaine, le débit cardiaque va augmenter d'environ 1,5 L/min et va se maintenir jusqu'au terme à un débit moyen de 6L/min [187]. Le débit cardiaque dépend de la fréquence cardiaque (nombre de

battements par minute) et du volume d'éjection systolique (le volume de sang éjecté dans la circulation systémique par battement). Comme la fréquence cardiaque, qui est normalement d'environ 70 battements/min, n'est augmentée que modérément (≈15 à 20 battements par minute au repos) lors de la grossesse, l'augmentation du débit cardiaque vient surtout de la variation du volume d'éjection systolique qui augmente graduellement à partir de la 8^e semaine de grossesse. Cette augmentation du volume d'éjection est probablement secondaire à l'installation précoce d'une diminution de résistance vasculaire déjà en début de grossesse. En diminuant la résistance à l'éjection du sang dans la circulation systémique, ceci augmente la quantité de sang éjectée. La majorité de l'augmentation du débit est dirigée vers l'utérus, le placenta et les seins. Chez la femme non gravide, le flot sanguin utérin est d'environ 100 mL/min, soit environ 2 % du débit cardiaque, et va s'intensifier jusqu'à atteindre en moyenne 1200 mL/min à terme [270, 273]. Cette augmentation importante de perfusion utérine est nécessaire pour subvenir aux besoins nutritionnels et pour l'élimination des déchets métaboliques du fœtus.

On observe aussi durant la gestation une augmentation du volume sanguin circulant. Cette expansion peut atteindre jusqu'à 40 % du volume sanguin initial (1,6 L) à partir de la 30^e semaine de grossesse et se maintenir jusqu'à terme [69]. Cette hausse du volume découle principalement d'une rétention substantielle de sodium et d'eau par les tubules rénaux en raison de la suractivation du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). Cette augmentation de volume a pour but, ici aussi, d'augmenter l'apport sanguin au niveau utéro-placentaire. En réponse à cette augmentation de volume circulant, il a été observé chez la femme un accroissement de la dimension du ventricule gauche en fin de diastole. Celle-ci débute au premier trimestre et s'accroît jusqu'à terme et est accompagnée d'un épaissement de la paroi du ventricule qui se définit comme une

hypertrophie modérée du myocarde. Ces changements structuraux du cœur s'apparentent à ceux observés en réponse à l'entraînement physique [68]. De même, le diamètre de l'oreillette droite et gauche augmente tôt dans le processus gestationnel pour atteindre un maximum à la 30^e semaine. Ce remodelage serait aussi occasionné par l'augmentation du volume sanguin, ce qui suggère une augmentation de la précharge [87].

Malgré cette augmentation du débit cardiaque et du volume circulant, on observe une diminution de la pression artérielle [38, 196]. Cette chute de pression débute au premier trimestre, soit entre la 8-12^{ième} semaine et atteint son plus bas niveau au 2^e trimestre pour ensuite amorcer une ascension aux alentours de la 32-34^e semaine jusqu'à parturition [304]. Normalement, la pression artérielle diminue durant la grossesse et revient graduellement au niveau auquel elle était avant le début de celle-ci [172].

La pression artérielle est le produit du débit cardiaque et de la résistance vasculaire périphérique. Comme mentionné ci-haut, le débit cardiaque augmente durant la gestation. Afin d'abaisser la pression artérielle, l'organisme doit impérativement réduire la résistance vasculaire systémique et c'est effectivement ce qui se produit. Il a été démontré que la réponse vasculaire *in vivo* et *in vitro* sur des artères systémiques (aorte, mésentérique, etc.) aux agents vasopresseurs, comme l'angiotensine II (ANG II), la vasopressine et la phényléphrine, est diminuée durant la gestation. Ce phénomène a d'abord été décrit chez la femme [60] et est appelé la résistance de la gestation aux effets des vasoconstricteurs. Les mécanismes impliqués dans cette baisse de réactivité vasculaire restent encore peu connus. Il est toutefois accepté que les hormones d'origine ovarienne et placentaire jouent un rôle dans ces changements. Il a été proposé que les œstrogènes, la progestérone, la prostacycline (PGI₂) et le monoxyde d'azote qui sont augmentés durant la grossesse contribueraient à antagoniser les effets locaux des différents vasoconstricteurs comme l'ANG II qui est très présent durant la grossesse [236].

Tableau 1 : Modifications hémodynamiques (adapté de Clark S., et coll.) [41])

	36-38 SEMAINES DE GROSSESSE	DIFFÉRENCE AVEC UNE FEMME NON-ENCEINTE
Débit cardiaque (L/min)	6.2 ± 1.0	+43 % (p<0.05)
Rythme cardiaque (bpm)	83 ± 10.0	+17 % (p<0.05)
Résistance vasculaire systémique (dyne·cm·sec ⁻⁵)	1210 ± 266	-21 % (p<0.05)
Pression artérielle moyenne (mm Hg)	90.3 ± 5.8	NS
Pression veineuse centrale (mm Hg)	3.6 ± 2.5	NS

1.2 LA RATE COMME MODÈLE ANIMAL DE LA GROSSESSE

Le rat est l'un des modèles animaux les plus fréquemment utilisés pour l'étude de la grossesse chez l'humain. Une des raisons principales est que la fin de la gestation chez la rate est accompagnée de changements cardiovasculaires et de modifications hormonales qui sont qualitativement similaires à ceux observés chez la femme [66]. De façon générale, nous pouvons corrélérer la plupart des adaptations physiologiques qui se produisent au 2^e trimestre chez la femme avec la dernière semaine de gestation chez la rate.

Plusieurs études ont utilisé et utilisent encore la brebis pour des expérimentations cardiovasculaires durant la gestation [36, 174-176, 199, 200, 236-242, 245]. L'avantage de la taille de la femelle et du fœtus joue pour beaucoup. Par contre, le rat possède quant à lui plusieurs autres propriétés se rapportant à la grossesse et le développement fœtal qui le favorise au niveau de la recherche en laboratoire. D'abord, sa petite taille, la facilité à se procurer des spécimens de grande qualité, leur coût relativement peu élevé, les nombreuses connaissances acquises sur cette espèce, une gestation très courte (≈21

jours) et la facilité d'hébergement sont des avantages très appréciables. De plus, le profil hormonal croissant, la placentation hémochorial et le fait que les bébés soient dépendants des parents à la naissance sont d'autres comparatifs similaires à la grossesse humaine [66]. On doit cependant préciser que la placentation hémochorial chez la femme a comme interface placentaire une seule couche de cellules trophoblastiques, alors que chez la rate il en existe trois (hémotriochorial). Il n'y a cependant pas d'indications en faveur d'une relation entre le nombre de couches tissulaires qui séparent la circulation maternelle et embryofœtale et l'efficacité du transfert placentaire. Pour toutes ces raisons, nous pouvons qualifier le rat comme étant un modèle approprié pour les études sur la grossesse.

1.2.1 Modifications hormonales

La littérature est beaucoup moins exhaustive quant aux modifications hormonales qui surviennent durant la gestation chez le rat. Il a été démontré que la concentration de progestérone est environ 5 ng/mL en début de gestation et elle atteint un maximum (35ng/mL) au milieu de la gestation (jours 12-13), pour retourner au niveau de départ avant la parturition. L'œstrogène (œstradiol) augmente graduellement tout au long de la gestation avec une concentration variant de 50 à 250 pg/mL au 22^e jour [89, 91, 110, 163, 210]. En revanche, une autre étude plus récente n'a pas constaté d'augmentation de la concentration d'œstradiol durant la gestation chez le rat [56]. Cette observation est surprenante, mais les auteurs ne nous éclairent pas sur cette observation, puisqu'ils n'ont pas tenté de l'expliquer. D'autre part, il semble que la production de progestérone par le corps jaune soit nécessaire chez le rat. Contrairement à l'humain, le placenta ne serait pas en mesure de produire suffisamment de progestérone pour le maintien de la gestation

[90]. Il a aussi été démontré que la production croissante d'œstrogène, ainsi que le pic œstrogénique avant parturition, seraient eux aussi dépendants des ovaires maternels tout au long de la gestation [17].

Pour ce qui est de la relaxine, cette hormone a une implication majeure chez les espèces non primates, mais a peu d'importance chez l'humain. Par exemple chez la rate, la relaxine permet la croissance du myomètre et de l'endomètre, une diminution de la fréquence des contractions [149], ainsi que le ramollissement du col utérin qui facilite la mise bas [29] et le développement des mamelons [116].

1.2.2 Modifications cardiovasculaires

Il se produit chez la rate gestante plusieurs changements cardiovasculaires semblables à ce qui se produit chez la femme durant la grossesse. On constate une augmentation de volémie, d'environ 20 % au début de la troisième semaine, pour ensuite atteindre 40 % avant la mise bas [15, 243]. De plus, on observe aussi chez la rate gravide une diminution de la résistance vasculaire périphérique, ainsi qu'une diminution de la réactivité vasculaire aux agents vasoconstricteurs [179]. Cependant, nous observons un effet inverse pour ce qui est de la réactivité vasculaire des artères utérines. En fait, nous avons démontré dans le laboratoire que les artères utérines répondent plus fortement à différents vasoconstricteurs (ANG II, phényléphrine, KCl) durant la gestation [258]. Par ailleurs, on observe également une chute de pression artérielle chez la rate gestante [12, 256] comparable à celle présente chez la femme [38, 196]. Cependant, elles surviennent à des périodes différentes chez les deux espèces. En fait, la chute de pression chez la rate s'amorce au milieu de la dernière semaine de gestation, sur un total de trois, tandis qu'elle survient au 2^e trimestre de grossesse chez la femme.

2. LA CIRCULATION UTÉRINE

2.1 LA STRUCTURE DES VAISSEAUX SANGUINS

Les vaisseaux sanguins font partie d'un étonnant système de canalisation dynamique pour acheminer et contrôler la distribution du sang aux organes et tissus cibles. Les artères transportent le sang du cœur aux tissus et sont les vaisseaux les plus actifs pour contrôler l'hémodynamique. La paroi d'une artère est composée de trois revêtements principaux soit : la tunique interne, la tunique moyenne et la tunique externe (Figure 1). La tunique interne, aussi appelée intima, est constituée d'un épithélium simple pavimenteux nommé endothélium, d'une membrane basale, ainsi que d'une couche de tissu élastique appelé la limitant élastique interne. Tous les tissus élastiques des vaisseaux sanguins sont composés de fibres d'élastine entourées de plusieurs autres protéines, comme la fibrilline qui est essentielle à leur stabilité. Ces fibres élastiques peuvent s'étirer jusqu'à 150 % de leur longueur et reprendre leur forme initiale. La deuxième couche est la tunique moyenne qui est composée de fibres élastiques et de myocytes formant le muscle lisse. La tunique externe est principalement constituée de fibre élastique et de fibres de collagène qui amènent un élément de rigidité aux vaisseaux sanguins. La fonction des vaisseaux sanguins diffère en fonction de leur localisation. De même, la proportion des différents éléments décrits ci-dessus se modifie selon le calibre et la fonction du vaisseau.

Bien que les veines soient essentiellement constituées des trois mêmes tuniques que les artères, l'épaisseur relative de chaque couche diffère. Les veines ont une très mince tunique interne et moyenne, mais ont une très épaisse tunique externe avec des fibres de collagène et des fibres élastiques. De nombreuses veines possèdent des valvules veineuses qui sont des minces replis de la tunique interne qui empêche la circulation rétrograde du sang. Le retour veineux, soit le volume de sang qui revient au cœur à partir des veines systémiques, dépend de deux choses. Premièrement, du gradient de pression entre les veinules (≈ 16 mmHg) et le ventricule droit (0 mmHg), mais aussi des contractions musculaires des membres inférieurs et du changement de pression dans le thorax et l'abdomen durant la respiration. Une veine ayant la même localisation qu'une artère est plus grosse que celle-ci, mais elle possède une paroi plus mince.

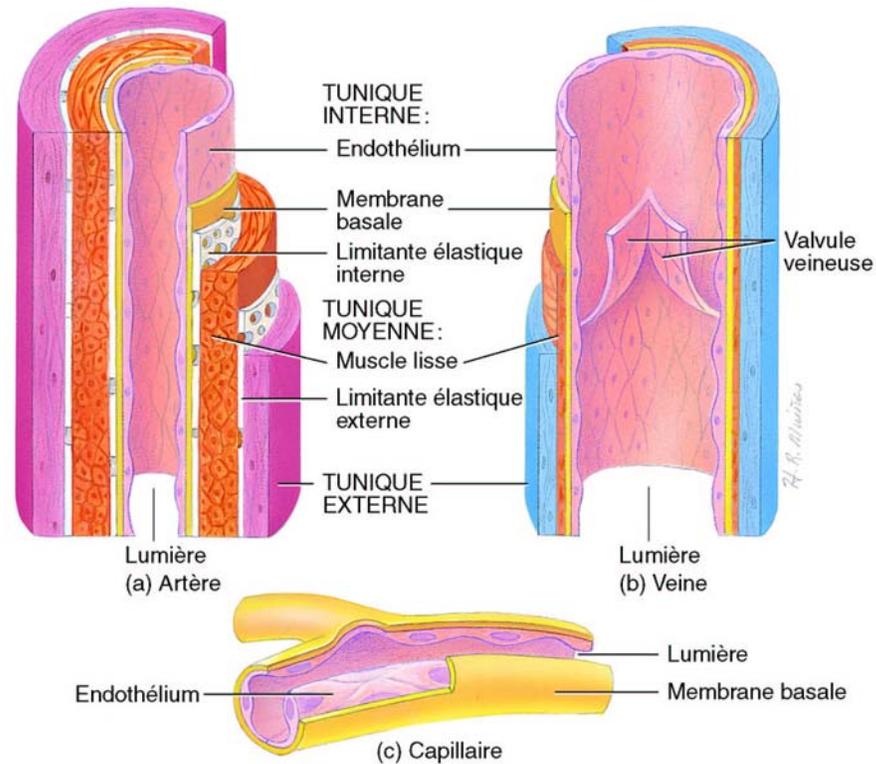


Figure 1 : Structure comparée des vaisseaux sanguins. (tiré de Tortora) [276]

2.2 LES MÉCANISMES DE CONTRACTION ET DE RELAXATION VASCULAIRE

La vasoconstriction est la diminution de la lumière d'un vaisseau sanguin qui résulte de la contraction des muscles lisses localisés dans la tunique moyenne de sa paroi. La vasoconstriction est un mécanisme très efficace pour diminuer le flot sanguin en aval du courant sanguin. De plus, ceci crée une augmentation de résistance au flot qui se répercute en amont de la circulation. C'est par ce mécanisme qu'un organisme qui devient soudainement hypotendu peut régulariser sa pression artérielle. Mais, l'effet recherché peut aussi être de nature locale, comme le fait de réduire le flot sanguin cutané pour

éviter la perte de chaleur ou la constriction d'un vaisseau suite à une lésion pour amorcer l'hémostase. Les vaisseaux sanguins ont aussi la propriété d'agrandir leur lumière. Ce phénomène est la vasodilatation qui permet d'augmenter le flot sanguin suite à une diminution de la résistance d'un vaisseau sanguin. Lorsqu'elle est systémique, la vasodilatation favorise une diminution de la pression artérielle, mais peut être aussi d'ordre local suivant une demande métabolique d'un organe ou bien secondaire à une libération d'histamine dans un processus d'inflammation par exemple.

2.2.1 Muscle lisse vasculaire

Que ce soit la contraction ou la dilatation, le joueur principal de ces variations de diamètre est le muscle lisse. Comme les muscles cardiaques et squelettiques, la contraction des muscles lisses est induite par une augmentation d'ions calcium (Ca^{2+}) cytosoliques. Néanmoins, les mécanismes des muscles lisses sont différents [167] :

- Contrairement aux muscles cardiaques et squelettiques, un potentiel d'action n'est pas nécessaire pour induire une contraction, mais tout de même possible.
- La contraction cardiaque se fait par l'activation des filaments d'actine qui libèrent un site d'ancrage lorsque la concentration de calcium intracellulaire est suffisante pour activer la troponine qui bloque ce site. Tandis que dans le muscle lisse vasculaire (MLV), c'est plutôt une activation de la myosine par phosphorylation lorsqu'il y a augmentation de la concentration de calcium cytosolique.
- La force de contraction augmente avec la concentration de calcium cytosolique, mais aussi par une augmentation de sensibilité au calcium.

- La durée de contraction des MLV est beaucoup plus longue. En fait, un vaisseau sanguin peut être contracté partiellement durant toute une vie, ce qu'on appelle son tonus de base.

2.2.1.1 Caractéristiques structurales des MLV

Les MLV ont une structure différente des autres types de muscle. Le sarcomère, formé de filaments d'actine et de myosine, demeure l'unité fonctionnelle du muscle. Cependant, les filaments d'actines et de myosines sont plus longs que ceux retrouvés dans les cellules cardiaques, ce qui permet un potentiel de raccourcissement plus considérable [167]. De plus, la myosine participe à la contraction seulement lorsqu'elle est phosphorylée par la kinase des filaments légers de myosine « myosin light chain kinase, MLCK », ce qui n'est pas le cas dans les autres types de muscle. Une autre différence est que les unités de contraction ne sont pas organisées aussi étroitement que les muscles cardiaques et squelettiques et n'ont pas l'aspect strié. Les filaments d'actine sont plutôt regroupés en « bandes denses » à la membrane plasmique et en « corps dense » dans le cytoplasme. Des filaments intermédiaires qui composent le cytosquelette relient les « zones denses » entre elles afin de permettre des contractions efficaces.

Le réticulum endoplasmique lisse est nommé réticulum sarcoplasmique dans les cellules musculaires. Ce réticulum sarcoplasmique contient une réserve d'ions calciques disponibles pour la cellule. Toutefois, elle ne compte que pour 1 à 4 % du volume de la cellule, c'est-à-dire que son apport calcique n'est pas suffisant et la cellule dépend d'un apport de Ca^{2+} extracellulaire pour générer la force nécessaire à une contraction musculaire. Pour avoir une uniformité et un synchronisme de contraction entre les cellules du MLV, il existe des jonctions communicantes. Il s'agit de jonctions intercellulaires qui permettent de mettre en relation le cytoplasme de deux cellules adjacentes. Ils sont

formés à partir de protéines nommées connexines qui sont assemblées en hexamères (connexon). Un connexon sur chaque cellule permet de former un tube qui relie celles-ci. Ce lien ainsi établi donne la possibilité qu'un courant ionique se propage et crée une dépolarisation synchronisée entre les cellules avoisinantes.

On retrouve plusieurs canaux et transporteurs ioniques à la membrane plasmique, ainsi qu'à la membrane du réticulum sarcoplasmique des cellules de muscle lisse vasculaire (Figure 2). Deux vaisseaux sanguins avec une localisation anatomique différente n'ont pas nécessairement les mêmes propriétés électriques. Ceci est dû à la diversité de populations et/ou proportions de leurs canaux ioniques qui varient entre les différents types de vaisseaux. Le potentiel de membrane des cellules de muscle lisse vasculaire d'une artère pressurisée est autour de -50 à -60 mV comparativement à -80, -90 mV pour les cardiomyocytes. Ce potentiel de membrane négatif est obtenu par un efflux constant d'ions potassiques par les canaux K^+ suivant le potentiel électrochimique avec le milieu extracellulaire, comme c'est également le cas pour les myocytes cardiaques. Le potentiel électrochimique des ions K^+ selon l'équation de Nernst, qui décrit l'expression explicite d'un courant ionique, est d'environ -90 mV étant donné la concentration d'ions K^+ plus élevée à l'intérieur de la cellule qu'à l'extérieur (165 mM et 5 mM respectivement). Toutefois, les myocytes des muscles lisses sont aussi perméables aux ions chlore et calcium dans un ratio $\approx 10:4:2$ ($K^+ : Cl^- : Ca^{2+}$). Donc, il y a un faible efflux Cl^- et un faible influx Ca^{2+} ce qui crée un équilibre à un potentiel membranaire de -50 mV. Pour conserver cette balance électrochimique les pompes Na^+/K^+ -ATPases vont utiliser de l'énergie pour maintenir la concentration intracellulaire d'ions K^+ élevée. Cette polarisation relative à -50 mV contribue entre autres au tonus de base des vaisseaux sanguins. Car, une cellule qui possède un potentiel de -50 à -60 mV, comparativement à -90 mV pour les

cardiomyocytes, augmente la probabilité d'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage (VSCC) et cette entrée de calcium supplémentaire permet de maintenir un tonus de base [167].

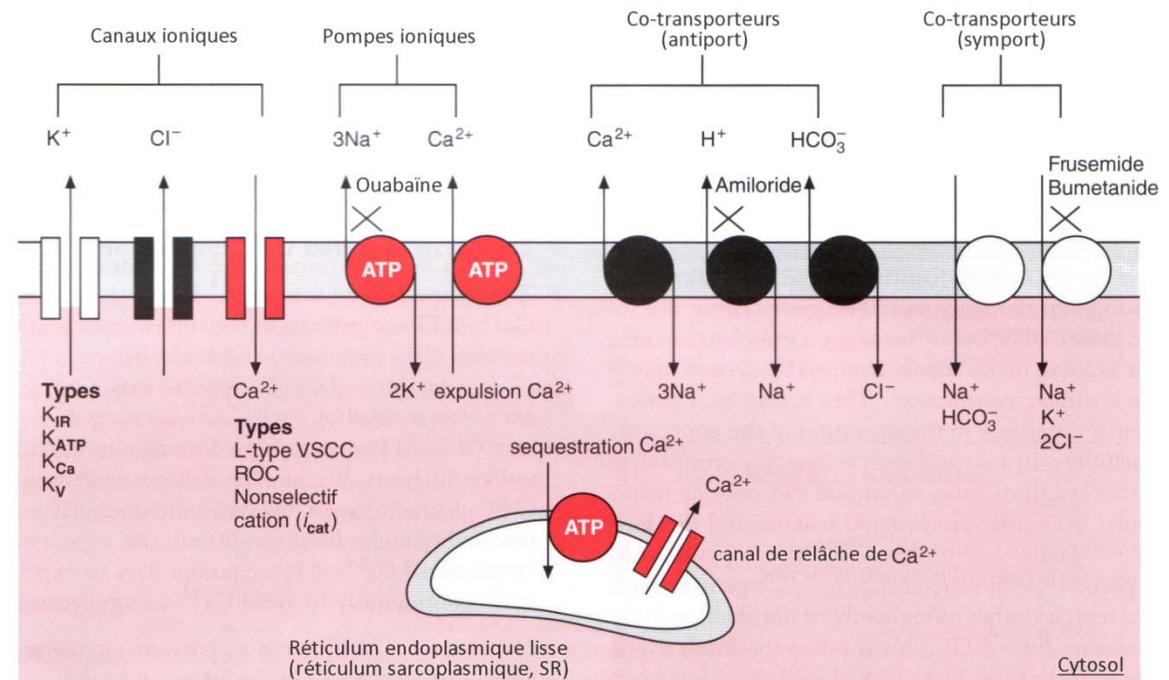


Figure 2 : Canaux ioniques, pompes ioniques et co-transporteurs à la membrane plasmique d'un myocyte vasculaire. Canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}), voltage-dépendants (K_V), calcium-dépendants (K_{Ca}), rectifiant entrant (K_{IR}); Canaux calciques de longue durée sensible au voltage « L-type voltage sensitive calcium channel » (L-type VSCC), dépendant d'un ligand « Receptor-operated calcium channel » (ROC) et canaux non sélectifs de cations (i_{cat}). (traduit de Levick et al.) [167]

2.2.2 La vasoconstriction

Les vaisseaux sanguins ont la propriété d'être continuellement dans un état partiellement contracté que l'on nomme le tonus de base. Considérant les caractéristiques distinctes des MLV, on peut définir la vasoconstriction comme une augmentation du tonus de base et la dilatation comme une réduction de celui-ci. La contraction peut être augmentée par des hormones circulantes (ex. : adrénaline, ANG II, vasopressine), des substances paracrines (ex. : endothéline, sérotonine, thromboxane) ou via la stimulation du système nerveux sympathique, c'est-à-dire la relâche de noradrénaline par les neurones efférents du système nerveux autonome situés dans la tunique externe de la paroi vasculaire (Figure 1). Comme nous avons mentionné précédemment, la concentration de calcium cytosolique est l'élément principal qui contrôle la contraction. Cette concentration de calcium dans le cytoplasme est à la fois contrôlée par :

- l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire via les canaux calciques voltage-dépendent (VSCC) ou les canaux calciques ligand-dépendant (ROC) (Figure 2)
- la relâche des stocks de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique
- le retrait du Ca^{2+} cytosolique par les pompes Ca^{2+} -ATPase
- La recapture du Ca^{2+} cytosolique par le réticulum sarcoplasmique

Pour illustrer ce phénomène suite à l'activation des récepteurs α -adrénergiques, on peut représenter le mécanisme de contraction en deux phases. La première, rapide, consiste en l'augmentation très rapide de la concentration de calcium intracellulaire. En fait, lorsque la disponibilité des ions Ca^{2+} augmente dans le cytoplasme, leur liaison à la protéine régulatrice calmoduline (CaM) est favorisée. Ainsi, la calmoduline est saturée par

la liaison à quatre ions calciques, son affinité pour la MLCK s'accroît d'un million de fois. Il va s'en suivre la formation d'un complexe actif CaM-MLCK. Ce complexe est responsable de la phosphorylation des filaments de myosine sur une sérine en position 19 ce qui lui permet d'interagir avec l'actine pour générer un glissement de l'une sur l'autre, le tout consommant de l'ATP [80]. Pour contrebalancer, il existe une phosphatase des chaînes légères de myosines (MLCP) qui déphosphoryle les têtes de myosine. Lorsque la concentration de calcium intracellulaire chute, la MLCK devient moins active et l'activité de la phosphatase prend alors le dessus. Ceci permet au muscle de relaxer et de retourner à son tonus basal.

Cependant, il existe une deuxième phase à la contraction qui permet au vaisseau de maintenir une contraction sur une plus longue période. Elle débute généralement de 30 à 60 secondes plus tard et permet le maintien de la contraction même si la concentration de calcium cytosolique chute. Cet événement survient grâce à une augmentation de la sensibilité au calcium. Dans l'exemple d'une stimulation α -adrénergique, la kinase rhoA est activée et va amener l'inhibition de la phosphatase MLCP (phosphorylation de sa sous-unité se liant à la myosine) [144]. De plus, la protéine kinase C, activée par le diacylglycérol suite à une stimulation α -adrénergique, va aussi inhiber la MLCP [117] via l'activation de la protéine CPI-17 (PKC-activated protein phosphatase inhibitor) [146]. Il est aussi possible que des kinases phosphorylent la protéine caldesmon et l'empêchent de jouer son rôle d'inhibiteur de l'activité actomyosine ATPasique [177]. Cela favorise alors l'activité dynamique entre la myosine et l'actine, c'est-à-dire la contraction.

Comme il a été mentionné précédemment, les vaisseaux sanguins ont la capacité de maintenir un niveau faible de contraction, c'est-à-dire un tonus de base, pendant une longue période. Ceci s'effectue sans demander un apport énergétique trop important, car

les MLV sont capables de maintenir une contraction en utilisant que le 1/300^e de l'énergie nécessaire pour une contraction similaire par les muscles striés. Ceci est possible, car le cycle de liaison/détachement de la myosine à l'actine se fait beaucoup plus lentement dans les MLV, la durée de liaison étant conséquemment beaucoup plus longue. Ceci crée un état « verrouillé » où la contraction est maintenue avec peu de consommation d'ATP [1].

2.2.3 La vasorelaxation

La relaxation des muscles lisses vasculaires est obtenue suite à une diminution du tonus contractile des myocytes d'un vaisseau sanguin. Lorsque cette réduction de tension est plus basse que le tonus de base du vaisseau, on observe une vasodilatation. Pour ce faire, il y a trois différentes voies qui vont amener une baisse de la concentration de calcium cytosolique pour restreindre l'activité de la MLCK. Premièrement, il y a la vasorelaxation induite par une hyperpolarisation des cellules du MLV, qui réduit la probabilité d'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant. Ceci provoque une chute de l'entrée de calcium et par conséquent une diminution de la concentration de calcium cytosolique. Cette hyperpolarisation des cellules musculaires est atteinte par l'ouverture des canaux potassiques à la membrane plasmique. Par exemple, les K_{ATP} sont activés par des agents pharmacologiques comme la cromakalim [262] ou par un environnement hypoxique [55]. De même, l'exercice physique amène une augmentation modérée de la concentration d'ions potassium extracellulaire. Ceci a comme conséquence de stimuler l'ouverture des canaux potassiques rectifiants entrants (K_{IR}) qui vont hyperpolariser les cellules musculaires et amener une vasodilatation [171].

La deuxième approche demande une activation de la voie AMPc-PKA (adénosine monophosphate cyclique – Protéine kinase A) par l'activation de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Plusieurs substances vont activer cette voie via leurs récepteurs : l'isoprotérénol (agoniste β_2 -adrénergique), la prostacycline (agoniste du récepteur à la prostacycline; IP_1), l'adénosine (agoniste A_{2A}), l'histamine (agoniste des récepteur H_1 et H_2) [126], le peptide vasoactif intestinal ($VIPR_1$; $VIPR_2$) et la « calcitonin gene-related peptide » (calcitonin receptor-like receptor). Ces GPCR vont ensuite activer l'adénylate cyclase liée à la membrane plasmique. L'augmentation conséquente de la concentration d'AMPc dans le cytosol active la protéine kinase A (PKA), en se liant sur les 2 sous-unités régulatrice de la protéine ce qui rend les 2 sous-unités catalytiques accessibles [143]. La PKA ainsi activée peut induire une relaxation de trois différentes approches :

- En phosphorylant la phospholambane, c'est-à-dire la protéine régulatrice des pompes $Ca^{2+} Mg^{2+}$ -ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA) [43] ou possiblement en phosphorylant les pompes Ca^{2+} -ATPase à la membrane plasmique [123]. Ceci a comme conséquence d'accentuer la séquestration et l'expulsion des ions Ca^{2+} de la cellule.
- En phosphorylant les canaux K_{ATP} et K_{Ca} , ce qui accroît leur probabilité d'ouverture, amène une hyperpolarisation de la cellule et diminue l'activité des canaux calciques voltage-dépendant [261].
- La PKA phosphoryle et inhibe la MLCK. Ce qui va réduire la sensibilité de la cellule pour le calcium [45].

Finalement, la troisième voie de vasorelaxation se produit via l'activation de la voie de signalisation GMPc-PKG (guanosine monophosphate cyclique – Protéine kinase G). Par exemple, le monoxyde d'azote (NO), via l'activation de la guanylate cyclase soluble, et du

peptide natriurétique auriculaire (ANP), via ses récepteurs NPR1 et NPR2, vont augmenter le niveau de GMPc intracellulaire. Le GMPc active la protéine kinase G (PKG) qui, à son tour, phosphoryle la phospholambane. Comme avec la PKA, ceci permet l'activation de la SERCA [43] et l'augmentation de séquestration du calcium dans le réticulum sarcoplasmique. La PKG une fois activée peut aussi phosphoryler des canaux potassiques à la membrane plasmique et ainsi amener une relaxation par dépolarisation de la cellule [268, 302]. L'isoforme de PKG présent dans les cellules de muscle lisse est le PKG-I. Cette isoforme, lorsqu'elle est activée, peut relaxer les cellules musculaires lisses vasculaires en phosphorylant la phosphatase des chaînes légères de myosine (MLCP) [75, 266, 305]. La MLCP activée déphosphoryle les chaînes de myosine, induisant une relaxation de la cellule. En plus de l'activation de MLCP, le PKG serait en mesure de réduire la sensibilité de la cellule au calcium empêchant l'activation de la PKC et en augmentant le taux de déphosphorylation de CPI-17, ce qui favorise encore plus l'activation de la MLCP (voir la section « La vasoconstriction » ci-dessus) [22].

2.3 LA CIRCULATION UTÉRINE

Chez la femme, le sang maternel atteint l'utérus par deux voies qui se regroupent au niveau du myomètre (Figure 3). Premièrement, le sang partant de l'aorte se rend à l'artère iliaque commune et passe ensuite dans l'artère iliaque interne. De là, l'artère utérine irrigue l'utérus à partir de la base de l'utérus. La deuxième voie est celle de l'artère ovarienne, qui provient de l'aorte abdominale, irrigue les ovaires et s'anastomose ensuite à l'artère utérine dans la partie supérieure de l'utérus. L'artère utérine longe les parois latérales de l'utérus en formant un plexus et abandonne de nombreux vaisseaux à

direction perpendiculaire, les artères arquées. Celles-ci se ramifient en artères radiales, qui pénètrent le myomètre et vont jusqu'à l'endomètre.

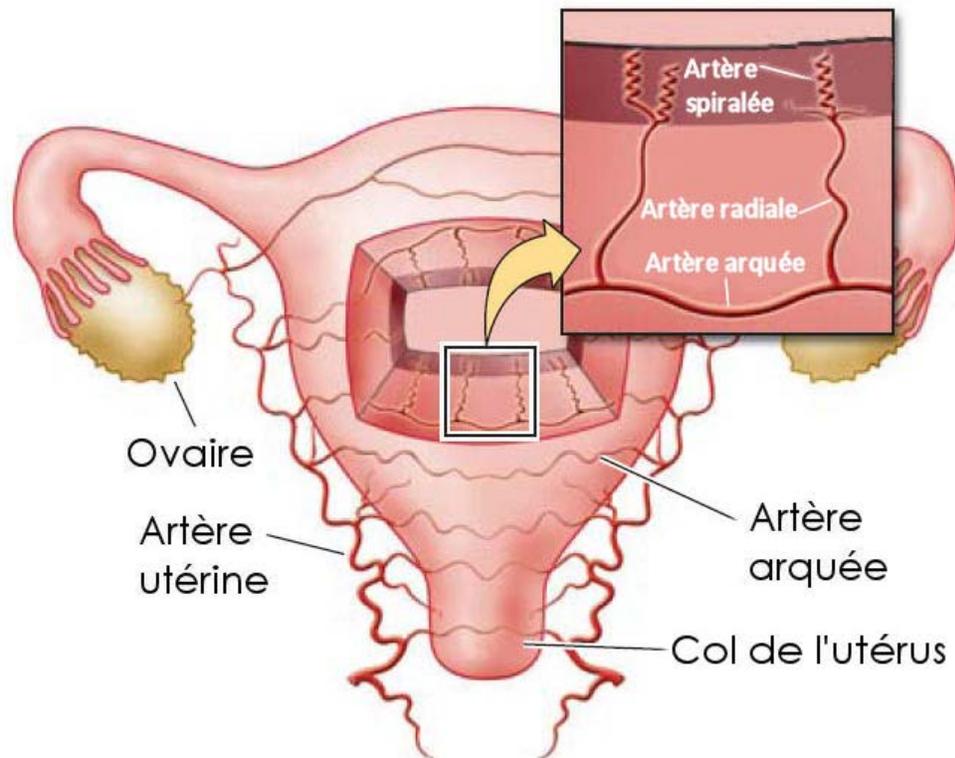


Figure 3 : Anatomie de la circulation utérine chez la femme. (Traduit de Osol et Mandala) [213].

À cette localisation, les artères radiales deviennent les artères spiralées dues à leur structure hélicoïdale. La vascularisation veineuse suit parallèlement la circulation artérielle.

Chez la rate cette circulation est morphologiquement similaire. Cependant, les vaisseaux utérins (artères principales, arquées et radiales) sont en majorité situés à

remodelage considérable durant la gestation pour permettre l'augmentation nécessaire du flot sanguin utérin. Cette intensification du flot a pour but principal de subvenir aux besoins développementaux croissants du fœtus tout au long de la gestation et de permettre une élimination efficace des déchets métaboliques. Dans la circulation utérine, on pourrait décrire deux types de remodelage vasculaire différents. D'une part, il y a celui subit par les artères spiralées à l'interface du placenta et d'autre part, il y a le remodelage des plus gros vaisseaux, dont l'artère utérine et les artères arquées. À ce jour, notre compréhension de ces deux phénomènes symbiotiques demeure relativement à l'état d'ébauche. Malgré cela, nous savons que les mécanismes sous-adjacents sont bel et bien différents.

Ce qui caractérise le remodelage des artères spiralées est l'invasion trophoblastique. Suivant l'implantation du blastocyste dans l'endomètre, certaines cellules trophoblastiques commencent à se différencier. Comme ces cellules ne feront pas partie intégrante de la formation du placenta, elles sont appelées trophoblastes extravilloux. Au départ, une colonie de trophoblastes extravilloux migre au niveau de la décidua et enveloppe les artères spiralées maternelles. À cet endroit, la paroi musculaire des artères et les cellules endothéliales sont détruites ce qui entraîne une distension du vaisseau. Ce phénomène invasif reste encore très peu connu, cependant il en résulte une perte des cellules musculaires lisses et des fibres élastiques de la média des artères spiralées localisées dans la décidua de l'endomètre. De plus, il a été observé que suite à la disparition de ces composantes, celles-ci sont remplacées par du tissu fibrinoïde [25, 222]. Le fibrinoïde est défini comme étant une substance amorphe acidophile, parfois légèrement fibrillaire, présentant une apparence histologique à de la fibrine et résultant de la dégradation du tissu conjonctif [140].

Dans ces artères altérées, un deuxième sous-type de trophoblastes extravilloux, les trophoblastes endovasculaires, vont produire une deuxième vague d'invasion. Les trophoblastes endovasculaires vont migrer le long de la paroi interne des artères et vont éventuellement remplacer les cellules endothéliales maternelles (Figure 5). Lors d'une grossesse dite « normale » ou en bonne santé, les trophoblastes extravilloux vont envahir la circulation jusqu'au premier tiers du myomètre [280]. L'ensemble de ces altérations vise à créer une zone de faible résistance vasculaire, insensible aux stimuli vasoconstricteurs (destruction des cellules musculaires lisses vasculaires) et de diamètre augmenté, le tout permettant une augmentation du flot sanguin destiné aux échanges foeto-maternels.

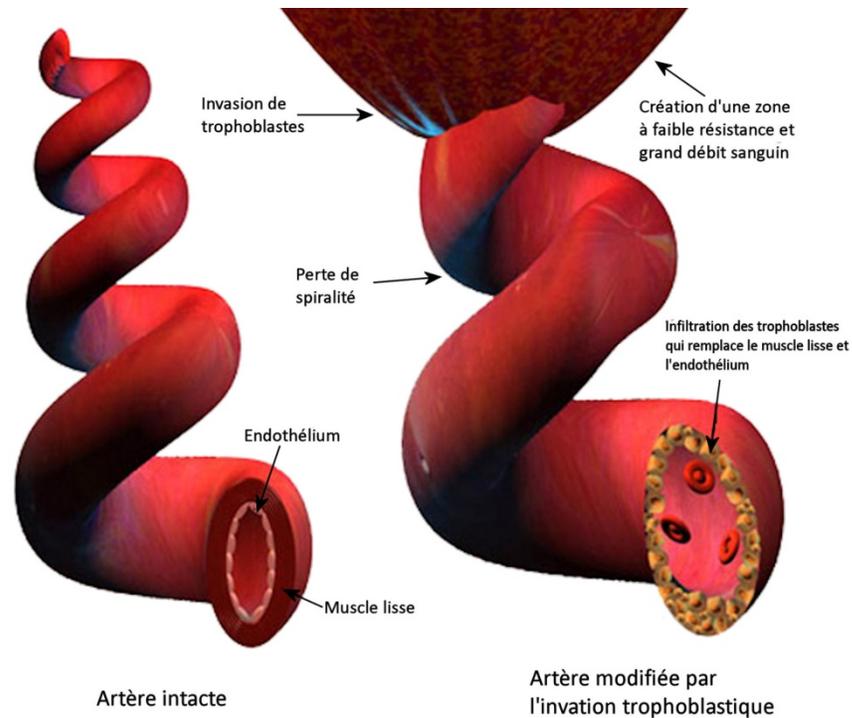


Figure 5 : Représentation du remodelage d'une artère spiralée suite à l'invasion trophoblastique. (traduit de Dash et Keogh) [53]

D'autre part, les vaisseaux utérins de plus gros calibre (artères arquées, artères utérines) sont aussi l'objet d'un remodelage, qui semble différent d'un point de vue mécanistique. Les connaissances que nous avons sur cet épiphénomène nous proviennent principalement d'observation chez les animaux. Nous savons que chez le rat le remodelage est caractérisé par une hypertrophie et une hyperplasie de la paroi des vaisseaux [39]. Le diamètre interne de l'artère utérine arquée de la rate atteint essentiellement le double durant la gestation et régresse complètement en *post-partum*. De plus, la résistance de ces vaisseaux à l'étirement est augmentée durant la gestation et diminue aussi en *post-partum* [258]. Le remodelage de la circulation utérine ne touche pas seulement les artères, les veines aussi sont atteintes. Le diamètre de la veine utérine principale augmente près du double durant la gestation et il y a une augmentation de compliance de celle-ci [217], ce qui est l'opposé de ce qui est observé sur les artères [258]. On remarque aussi une augmentation de l'indice mitotique des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses, ce qui indique une augmentation de leur prolifération. Malgré cela, nous ne savons pas quelle hormone, facteur de croissance, autre substance ou combinaison de ceux-ci amorcent et permettent ce remodelage vasculaire durant la grossesse.

En plus du diamètre qui est augmenté par le remodelage durant la grossesse, les vaisseaux utérins vont aussi subir un allongement. Chez le rat, l'utérus est dit bicornu, c'est-à-dire qu'il est sous forme de deux cornes utérines liées à un petit corps utérin qui inclut le col utérin (Figure 4). Les artères utérines suivent les cornes en position médiane (intérieure) et à mesure que les cornes s'agrandissent proportionnellement au nombre de fœtus, les artères se développent aussi. Il est très évident de constater une croissance

longitudinale de la vasculature en fin de gestation comparativement à une rate non gestante. La longueur de l'artère utérine principale et l'artère utéro-ovarienne à terme peut atteindre le double ou le triple comparé à ce qu'on observe chez une non gestante [213]. La situation est similaire et peut être encore plus importante (4.8X) pour les artères de plus petite taille comme les artères arquées et radiales [212]. Lorsqu'on considère à la fois le remodelage circonférentiel et longitudinal, on estime que l'accroissement du poids des constituants de la paroi vasculaire utérine chez le rat est de l'ordre de 300-700 % [213].

Un tel remodelage a pour effet de réduire la résistance au passage du flot sanguin. D'un point de vue théorique, l'augmentation de la longueur d'un vaisseau sanguin aurait comme résultat d'accroître la résistance de celui-ci. Cependant, durant la gestation cette plus grande résistance au passage prolongée du sang dans le vaisseau est contrebalancée par l'augmentation du diamètre. Ce phénomène peut être décrit en se basant sur la loi de Poiseuille, qui est une représentation mathématique décrivant l'écoulement laminaire d'un fluide visqueux dans un tube rigide de petit diamètre. Selon cette loi, on peut estimer qu'un petit vaisseau sanguin agit comme un tube rigide. Ainsi, le flot du liquide (Q) se comporte suivant la relation mathématique suivante : $Q = \frac{\pi(P_e - P_s)r^4}{8\eta L}$ où P_e est la pression à l'entrée du tube, P_s est la pression à la sortie du tube, η est la viscosité du liquide, L est la longueur du tube et r est le rayon de la lumière du tube. La force qui s'oppose au mouvement du fluide, on parle ici de résistance hydraulique est défini comme le ratio de la pression sur le flot de ce même fluide. Donc, la résistance (R) engendrée par le tube, ou d'un vaisseau sanguin dans notre cas se définit comme suit : $R = \frac{(P_e - P_s)}{Q} = \frac{8\eta L}{\pi r^4}$. Donc, selon cette équation une petite variation de diamètre du vaisseau va produire une très

grande chute de résistance et/ou une augmentation du flot sanguin. Si par exemple la longueur et le diamètre d'une artère doublent, il y aura une augmentation du double de la résistance à cause de la longueur, mais il y aura une diminution 16 fois plus importante parce que le diamètre ayant doublé, c'est-à-dire $(2r)^4 = 16$, r étant unitaire puisque c'est la valeur de départ. Il en résulte une diminution de 8 fois la résistance ce qui peut correspondre à une augmentation proportionnelle du flot sanguin, si l'on considère que la viscosité du liquide reste la même. Ce qui n'est pas le cas, car durant la grossesse on observe une diminution de la viscosité du sang qui peut contribuer à réduire la résistance au flot sanguin dans la circulation [209]. On peut alors supposer que le flot sanguin peut être encore un peu plus que 8 fois durant la grossesse en suivant l'exemple proposé.

Nous savons que les artères utérines en amont des artères spiralées ne sont pas sujettes à l'invasion trophoblastique, mais elles subissent tout de même un remodelage important. Les mécanismes sous-adjacents sont encore mal définis, mais nous savons que ce remodelage vasculaire est un processus actif qui dépend d'au moins quatre activités cellulaires : croissance, mort, migration et la production ou la dégradation de la matrice extracellulaire [141]. Chacun de ces processus cellulaires est soumis à une multitude de facteurs qui peuvent les contrôler seul ou en combinaison. Parmi ces facteurs, on compte les forces physiques qui sont appliquées sur les parois vasculaires, c'est-à-dire la pression et les forces de cisaillements. Les hormones circulantes comme les stéroïdes sexuels ou le VEGF, mais aussi par des facteurs locaux générés dans la paroi vasculaire comme le NO et l'endothéline [213].

Différentes approches ont été utilisées pour essayer de décortiquer l'implication de ces multiples facteurs. Une parmi celles-ci est l'étude de la pseudogestation. La pseudogestation est une condition chez certains mammifères où la stimulation sexuelle

induit des changements endocriniens, allant jusqu'à une douzaine de jours, similaire à ceux amenés par la gestation et ce même si l'accouplement ne résulte pas en une fécondation. Chez la souris, on déclenche une pseudogestation en accouplant la femelle avec un mâle infertile (vasectomisé) et 11 jours plus tard on mesure une augmentation de 25 % du rayon de la lumière et 71 % de l'aire en coupe transversale de l'artère utérine principale [288]. Ces différences reviennent aux valeurs de base au jour 17 de la pseudogestation. Suggérant que les hormones ovariennes sont responsables du déclenchement du remodelage de l'artère utérine. Pour la suite de la gestation, il est possible que des facteurs locaux (d'origine foetoplacental) aillent contribuer à la poursuite du remodelage.

Dans la même optique, d'autres études ont tenté de reproduire ce remodelage en administrant des hormones à des niveaux comparables à ceux obtenus durant la gestation. Par exemple, l'injection quotidienne de benzoate d'œstradiol durant 3 semaines chez des cobayes ovariectomisés a permis de doubler le diamètre interne des artères radiales [192]. La manière dont l'œstrogène permet la croissance du calibre artériel est encore inconnue, mais il s'agit probablement d'actions génomiques qui vont activer plusieurs autres facteurs qui vont permettre ce remodelage. On sait que l'œstrogène amène une plus grande production de NO provenant de l'endothélium vasculaire [176, 245], ce qui est aussi observé durant la grossesse [203, 204]. Prenant en considération qu'une déficience en NO diminue le remodelage vasculaire durant la grossesse [211, 287], il est fort probable qu'une augmentation de biodisponibilité de NO soit impliquée dans des cas de remodelage vasculaire hypertrophique vers l'extérieur, c'est-à-dire un remodelage où la lumière du vaisseau augmente et l'épaisseur de la paroi reste inchangée amenant un agrandissement de l'aire en coupe transversale de l'artère. De plus, l'œstrogène en synergie avec la progestérone sont d'importants facteurs

influençant l'expression de facteurs de croissance, comme le VEGF par exemple [108]. Une augmentation d'expression de celui-ci permet alors une croissance angiogénique ainsi qu'une activation de plusieurs métalloprotéinases matricielles (MMP) qui vont réarranger la matrice extracellulaire [96].

Un autre modèle animal expérimental a été étudié, soit la ligature unilatérale d'une corne utérine. Certains animaux possèdent un utérus duplex, comme la souris et le rat, qui est composé de deux cornes utérines distinctes (Figure 4). Ainsi, on peut ligaturer une corne sans affecter l'autre. Par cette procédure, il est possible d'étudier le remodelage vasculaire utérin durant la gestation dans un même animal alors qu'une corne porte des unités foetoplacentaires, l'autre non. Chez la rate, la taille et le diamètre des vaisseaux de la corne utérine ligaturée est similaire à celle d'une rate non gestante. Tandis qu'on peut observer une augmentation de la taille et la dimension des vaisseaux utérins qui irrigue la corne avec des fœtus [85]. Ceci indique que les hormones et facteurs locaux joueraient un rôle important dans ce type remodelage vasculaire.

3. LES ŒSTROGÈNES ET LES HORMONES SEXUELLES

3.1 LE RÔLE DES HORMONES STÉROÏDIENNES DANS LA PHYSIOLOGIE HUMAINE

3.1.1 Œstrogènes

Les œstrogènes ont plusieurs fonctions dont la principale est le développement et le maintien des fonctions sexuelles femelles. À la puberté, ils stimulent la maturation du

vagin, de l'utérus et des trompes de Fallope. Ils sont responsables du développement mammaire, de l'évolution des caractères sexuels secondaires, de la répartition du tissu adipeux, de l'amincissement du derme et modifient la morphologie générale. À l'âge adulte, ils facilitent la croissance des follicules ovariens et accentuent la motilité des trompes de Fallope. En combinaison avec la progestérone, ils sont impliqués dans le processus ovulatoire en fournissant un rétrocontrôle positif (juste avant l'ovulation) ou négatif (durant la plus grande partie du cycle) sur la sécrétion de gonadotrophines. De plus, ils accroissent le flot sanguin utérin, ils entraînent une multiplication cellulaire intense (mitoses) de l'endomètre dont l'épaisseur augmente, ainsi qu'une prolifération des cellules du myomètre avec augmentation de leur contractilité durant les menstruations. Ils entraînent la sécrétion d'une glaire cervicale plus liquide ce qui est favorable à la pénétration des spermatozoïdes dans l'utérus. Ils sont responsables de la prolifération des canaux mammaires durant le cycle menstruel.

D'autre part, les œstrogènes auraient d'autres fonctions comme de rendre les sécrétions des glandes sébacées plus fluides ce qui diminuerait la formation de comédons. Ils auraient la propriété de réduire le cholestérol plasmatique circulant en modifiant le métabolisme des lipoprotéines. Ils sont capables de donner lieu à une relaxation des vaisseaux sanguins, de diminuer la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et ils permettent aussi de diminuer la résorption osseuse en antagonisant les effets de l'hormone parathyroïde. [58, 94, 115]

3.1.2 Progestérone

La progestérone est impliquée dans le développement glandulaire (lobules et alvéoles) des seins et prépare l'utérus à la nidation en combinaison avec l'œstrogène. Au niveau de l'endomètre, elle entraîne un arrêt des mitoses provoquées par les œstrogènes

et amène l'apparition d'un aspect sécrétoire, dit « de dentelle utérine », avec vacuoles remplies de glycogène. Au niveau du col utérin, elle permet de rendre la glaire cervicale plus dense rendant le passage des spermatozoïdes plus difficile en période d'infécondité. Elle a aussi un effet hyperthermique responsable de l'augmentation de la température basale d'environ 0,5 °C au cours de la phase lutéale du cycle menstruel. La progestérone possède des propriétés de rétrocontrôle sur l'hypophyse et l'hypothalamus qui sont très complexes. Durant la phase lutéale du cycle menstruel, elle inhibe la sécrétion des gonadostimulines hypophysaires (LH, FSH) qui régularisent le cycle ovarien et le déclenchement de l'ovulation. D'autre part, la progestérone a plusieurs actions métaboliques comme d'augmenter le niveau basal d'insuline ainsi que l'augmentation d'insuline après l'ingestion de glucides. [58, 94]

3.2 IMPLICATIONS DURANT LA GROSSESSE

3.2.1 Œstrogènes

Durant la gestation, l'œstrogène a des répercussions principalement sur la vasculature utérine, la stéroïdogénèse placentaire et la parturition. Des études expérimentales ont démontré que l'œstrogène accroît le flot sanguin dans les organes reproducteurs femelles [240]. Étant donné la très forte exposition du lit utéro-placentaire à la sécrétion directe et massive d'œstriol durant la gestation, il a été suggéré que cette dernière pourrait constituer la principale substance responsable de l'augmentation du flot sanguin utérin chez la femme. Cependant, ceci ne peut pas être le cas chez la rate étant donné qu'il n'y a pas de production d'œstriol chez cette espèce. D'autre part, des

mécanismes contrôlés par l'œstrogène permettraient au fœtus de gérer la production et la sécrétion de la progestérone durant le troisième trimestre. Ceci, découle de l'observation chez le babouin où l'œstrogène dirige la biosynthèse de progestérone placentaire en régulant la disponibilité du LDL cholestérol pour la conversion en pregnénolone et les stéroïdes découlant de celle-ci [107]. D'autre part, les œstrogènes fœtoplacentaires agissent sur la parturition, car ils sont intimement reliés à l'irritabilité myométriale, la contractilité et le travail. L'œstrogène augmente d'une part la sensibilité à l'ocytocine en augmentant la biosynthèse des prostaglandines [35]. Étant donné que la relâche placentaire d'œstrogène est liée à l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (HHS) fœtal, il semble que cet axe ajuste la synchronisation de la parturition. Ceci serait effectué en partie via la signalisation de l'axe HHS sur la production d'œstrogène placentaire. Par exemple, chez l'humain, le travail est déclenché soit trop tôt ou trop tard lorsque les fœtus sont anencéphaliques. Ceci a aussi été démontré chez le macaque avec des fœtus dont l'encéphale a été retiré chirurgicalement [67, 292].

3.2.2 Progestérone

Durant la gestation, la progestérone provenant du corps jaune amènerait une relaxation de la mobilité des trompes de Fallope, pour balancer l'effet activateur de l'œstrogène [228]. De plus, la progestérone en combinaison avec l'hCG et le cortisol inhiberait la réponse immunitaire afin d'éviter le rejet du conceptus et du placenta en développement [195]. Elle contrebalancerait aussi l'effet de l'œstrogène en atténuant l'augmentation du flot sanguin utérin [114]. Cet effet opposé à l'œstrogène est aussi vrai pour ce qui est de la parturition. La progestérone relaxe l'utérus en inhibant la synthèse et la sécrétion de prostaglandines tandis que l'œstrogène fait tout simplement l'inverse.

3.3 LA SYNTHÈSE DES HORMONES STÉROÏDIENNES

Les hormones stéroïdiennes ont été traditionnellement décrites comme des stéroïdes synthétisés par des glandes à sécrétion endocrines et qui, transportées par le sang, vont avoir une action sur d'autres organes ou tissus en se liant sur des récepteurs spécifiques. Chez l'humain, ces hormones sont synthétisées à partir du cholestérol et sont produites principalement par les surrénales, les testicules ou les ovaires. Cependant, une partie de la production d'hormones stéroïdiennes peut être produite dans les tissus périphériques près du site d'action à partir de précurseurs circulants. Cette production d'hormone stéroïdienne extraglandulaire a été baptisée intracrinologie [158]. La figure 6 vous donne un aperçu de la stéroïdogénèse à partir du cholestérol et des enzymes impliquées chez l'humain.

Une glande ou une zone particulière de celle-ci dans certains cas peut produire des hormones spécifiques. Par exemple, dans les glandes surrénales la partie interne, nommée la médullosurrénale, est responsable de la synthèse des catécholamines (adrénaline, noradrénaline), tandis que la partie externe nommée corticosurrénale est responsable de la production d'hormones stéroïdiennes. De plus, ce même cortex se divise en trois zones cellulaires distinctes qui se distinguent par une expression spécifique d'enzyme de la stéroïdogénèse. Une de ces zones est la *zona glomerulosa* qui peut produire des minéralocorticoïdes (aldostérone) à cause de la présence de l'enzyme « aldostérone synthase ». Ensuite, il y a la *zona fasciculata* qui synthétise des glucocorticoïdes (cortisol) sous l'action des « 17 α -hydroxylase/17,20 lyase » et la « 11 β -hydroxylase ». Troisièmement, il y a la *zona reticularis* qui sécrète des stéroïdes androgéniques (déhydroépiandrostérone [DHEA], DHEA-sulfate, androstènedione) par la

présence de la « 17α -hydroxylase/17,20 lyase » et l'absence de la « 11β -hydroxylase ». Les androgènes d'origine surrénalienne servent de précurseurs à la conversion périphérique pour la production d'hormones androgéniques ou œstrogéniques actives (testostérone, dihydrotestostérone, œstradiol, etc.) [159].

Les hormones stéroïdiennes ont été historiquement classées selon le type de récepteurs auxquels elles ont été associées soit : les œstrogènes, les progestagènes, les androgènes, les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes. La structure liposoluble de ces hormones leur permet de passer facilement au travers des membranes cellulaires. Cette propriété permet à ces hormones de se lier à des récepteurs cytosoliques ou nucléaires dans les cellules cibles.

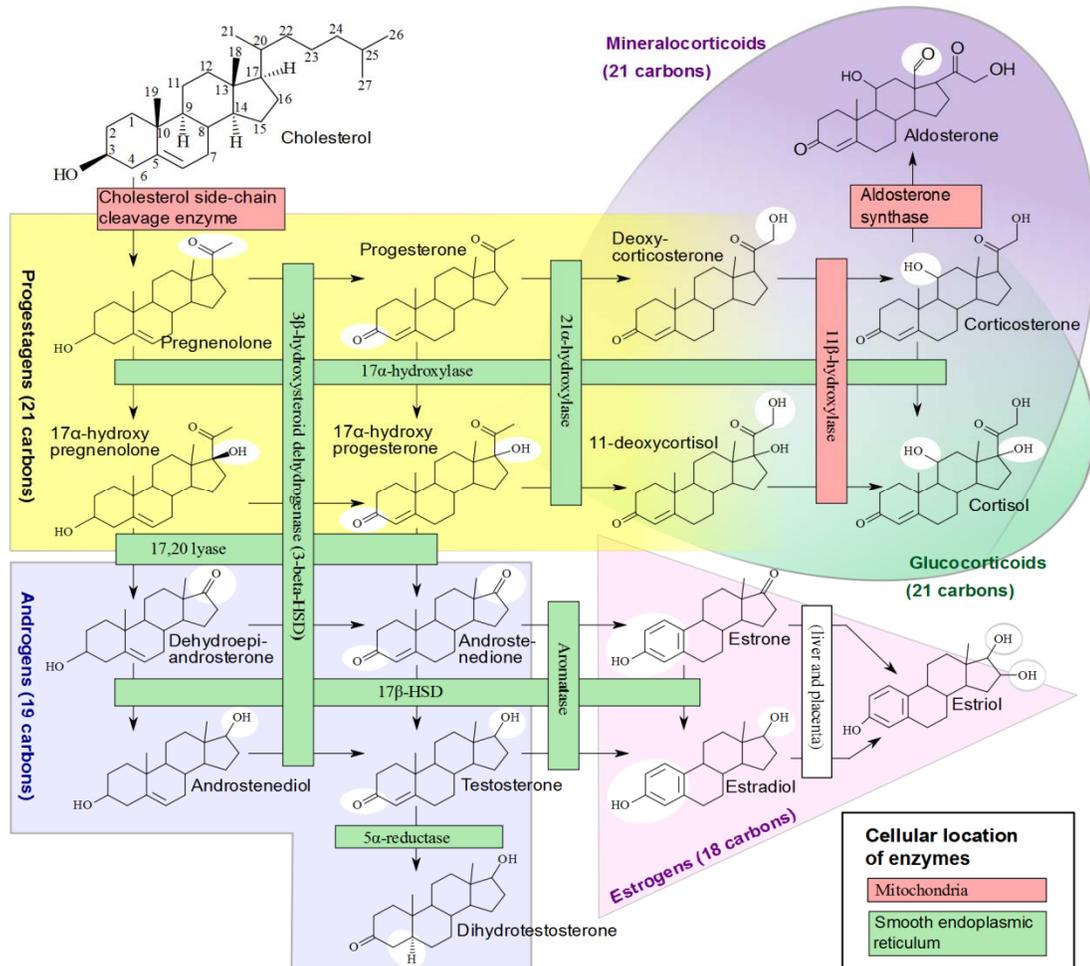


Figure 6 : Schéma de la stéroïdogénèse chez l'humain. Les groupements encerclés en blanc indiquent les changements entre les différents intermédiaires. (traduit de David Richfield et Mikael Häggström tiré de Boron W.F. et al.) [23]

3.3.1 La biosynthèse des œstrogènes

Les différentes molécules d'œstrogènes endogènes sont formées à partir de l'androstenedione ou de la testostérone comme précurseur immédiat. Pour ce faire, une réaction impliquant la transformation du cyclohexène illustré le plus à gauche de la molécule aussi appelé cycle A en cycle benzénique aromatique. Cette réaction illustrée par la figure 7 est catalysée par l'enzyme aromatase (CYP19).

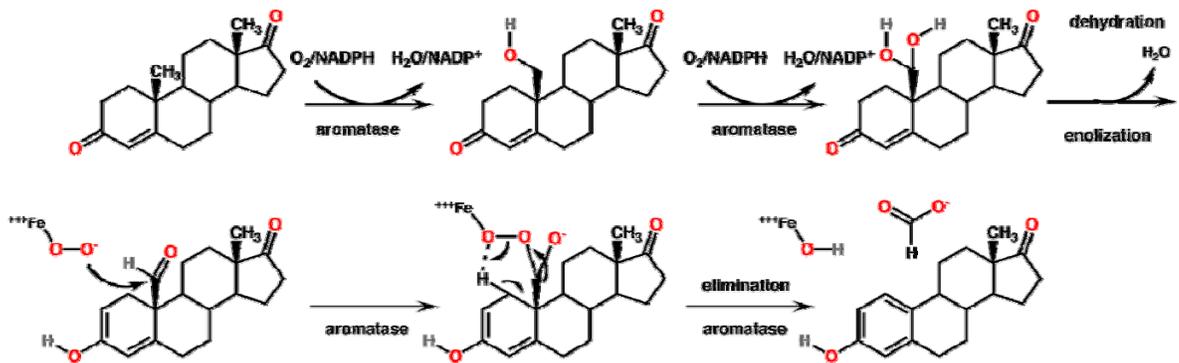


Figure 7 : Mécanismes de la réaction chimique de l'aromatation de l'androstènedione en estrone. Cette réaction est catalysée par l'enzyme aromatase à chacune des étapes. (tiré de Lee J.S. et al.) [161]

La présence de cet enzyme a été identifiée dans le réticulum endoplasmique des cellules ovariennes de la granulosa, des cellules de Sertoli et de Leyding dans les testicules, les cellules stromales des tissus adipeux, les syncytiotrophoblastes placentaires, les blastocystes, les os et différentes régions du cerveau [252]. Tous ces tissus peuvent alors produire des œstrogènes à partir de précurseurs circulants [159]. Cependant, les ovaires sont la principale source d'œstrogènes circulants chez les femmes préménopausées. L'œstrogène synthétisé en majorité est l'œstradiol produit par les

cellules de la granulosa provenant des précurseurs androgéniques produits par les cellules de la thèque des follicules ovariens. L'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc induite par les gonadotrophines via liaison à leur récepteur couplé aux protéines G situé à la membrane plasmique de la granulosa ovarienne va permettre une augmentation de l'expression de l'aromatase via le facteur de transcription CRE/CREB [81]. De plus, les gonadotrophines/AMPc vont aussi augmenter l'expression de la P450_{scc} (enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol) [290]. Cette enzyme facilite le transport du cholestérol à l'intérieur des mitochondries des cellules qui synthétisent des stéroïdes. Donc, en plus d'accroître l'activité de l'aromatase, on augmente la quantité de précurseurs disponibles. D'autre part, les ovaires possèdent une forme de 17 β -hydroxystéroïdes déshydrogénase de type 1 qui favorise la production de testostérone et d'œstradiol par rapport à l'androstènedione et l'estrone. Ce qui explique pourquoi l'œstradiol est l'œstrogène majoritairement produit par les ovaires.

Quoique relativement rare, il existe des cas répertoriés de mutations qui inactivent le gène de l'aromatase (CYP19A1). Les individus atteints ne peuvent pas synthétiser d'œstrogènes de manière endogène et il en résulte une accumulation des précurseurs androgéniques (androstènedione, testostérone). Lors d'une grossesse, si l'aromatase du fœtus n'a pas d'activité, le DHEA-S (voir section 1.1.2) produite par les surrénales fœtales ne pourra pas être converti en estrogène par le placenta. Il sera alors converti en testostérone et amènera la virilisation de la mère et du fœtus. Durant la grossesse, des signes comme de l'hirsutisme et de l'acné sont observés chez la mère. Les manifestations apparentes chez la mère se résorbent après la naissance de l'enfant. Les petites filles affectées sont diagnostiquées à la naissance par leur pseudohermaphrodisme. Des ovaires kystiques et une maturation osseuse retardée peuvent survenir durant l'enfance et se poursuivre à l'adolescence. Ces jeunes filles arrivent à la puberté avec une aménorrhée

primaire, l'absence de développement des seins, une virilisation et un hypogonadisme primaire (hypergonadotrophique). Les jeunes garçons atteints n'ont pas de symptômes apparents à la naissance, ils sont donc diagnostiqués beaucoup plus tard. Les signes observables sont une grande taille, une maturation osseuse retardée, une fermeture des épiphyses retardée, des douleurs aux os, un corps aux proportions eunuchoïdes et un excès d'adiposité. Malgré tout cela, un traitement avec l'administration d'œstrogènes dissipe les symptômes autant chez les hommes que les femmes. [129]

La situation inverse, c'est-à-dire une activité excessive de l'aromatase et une conversion exagérée des androgènes en œstrogènes, a aussi été observée et documentée dans la littérature. Les mutations répertoriées sont le produit de réarrangement chromosomique qui par erreur associe un promoteur hautement transcrit au gène CYP19A1 [251, 274]. Les signes cliniques apparaissent durant la petite enfance chez les deux sexes avec un développement des seins, la croissance et une maturation accélérée des os. En plus de ces symptômes, les jeunes garçons peuvent avoir d'autres manifestations comme un petit garçon de 8 ans avait de l'acné, de la pilosité pubienne, mais avec des testicules d'un volume prépubère [162]. À l'âge adulte, les personnes atteintes sont de petite stature et les hommes souffrent de gynécomastie et les femmes de macromastie. Quelques sujets féminins ont eu des affections gynécologiques qui pourraient être attribuables à un excès d'œstrogènes (cancer de l'endomètre, léiomyome et des irrégularités menstruelles). Une femme atteinte avait encore un niveau d'œstrogènes élevé et des saignements similaires à des menstruations après 70 ans [274]. Un traitement avec des inhibiteurs d'aromatase est indiqué et efficace dans ces situations.

3.3.2 Les inhibiteurs de l'aromatase

Les inhibiteurs de l'aromatase font partie d'une classe de médicament généralement administré dans le traitement des cancers du sein ou des ovaires chez des patientes ménopausées. Ils peuvent aussi être utilisés dans les cas de syndrome d'activité excessive de l'aromatase décrite dans la section précédente. La fonction est bien évidemment d'inhiber l'activité de l'enzyme cytochrome P450 aromatase qui est responsable de la dernière étape pour la synthèse d'œstrogènes (voir la section 3.3.1 ci-dessus). Aujourd'hui, la troisième génération d'inhibiteurs de l'aromatase est utilisée en clinique. Les trois composés les plus utilisés présentement sont l'anastrozole (Arimidex™; AstraZeneca), le letrozole (Femara™; Novartis), et l'exemestane (Aromasin™; Pfizer). Ces molécules peuvent aussi être classées en inhibiteur type I ou type II. Les molécules de type I ont une structure de stéroïde similaire aux androgènes et vont se lier irréversiblement à l'enzyme et ainsi bloquer le site actif de liaison avec le substrat (ex. : exemestane). Les inhibiteurs de type II n'ont pas une structure de stéroïde et agissent en perturbant le complexe enzymatique. Les molécules utilisées en ce moment se lient sur l'hème du cytochrome P450 et leur action est réversible par compétition avec le substrat (ex. : anastrozole, letrozole). [137, 191] Le 1,4,6-Androstatrien-3,17-dione (ATD) est un autre inhibiteur d'aromatase que l'on peut classer de type 1 selon les définitions précédentes. Cet inhibiteur est encore utilisé en recherche pour sa disponibilité commerciale et son efficacité [11, 61, 219].

Les effets secondaires les plus souvent associés aux traitements avec des inhibiteurs d'aromatase ressemblent aux symptômes associés à la ménopause due au faible niveau d'œstrogènes. C'est-à-dire des bouffées de chaleur, sècheresse vaginale, une accélération de la déminéralisation osseuse, une augmentation de l'incidence

d'ostéoporose et des fractures. Mais plusieurs patientes ressentent aussi des douleurs articulaires suivant un traitement aux inhibiteurs d'aromatase comparativement au tamoxifen (antagoniste ER α et ER β) [30]. Les mécanismes impliqués dans la relation entre l'inhibiteur d'aromatase et arthralgie sont malheureusement encore peu connus [42].

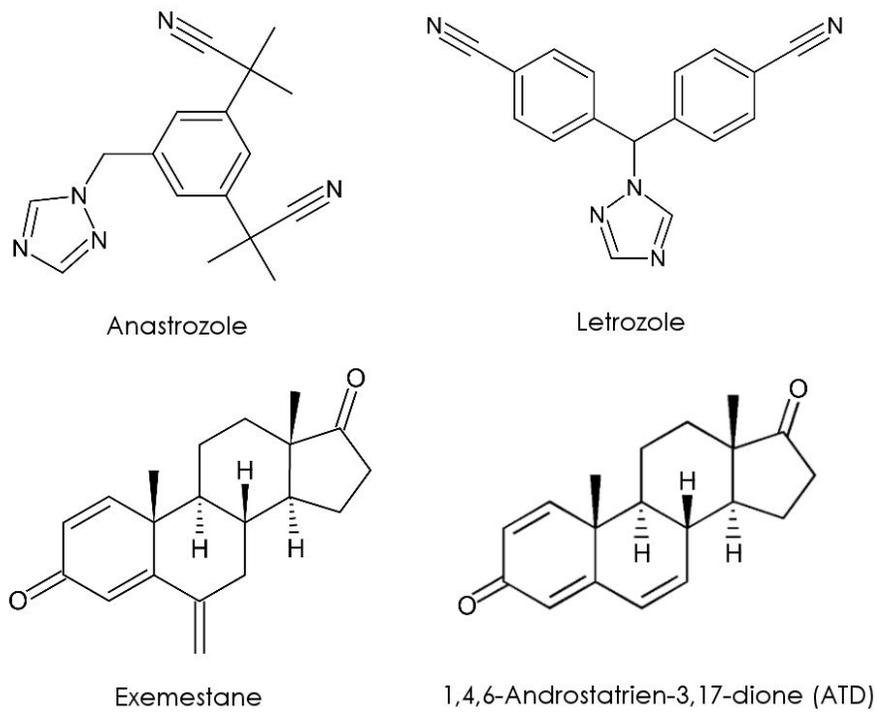


Figure 8 : Structure chimique de différents inhibiteurs de l'aromatase.

3.4 MODES D'ACTION DES ŒSTROGÈNES SUR LES VAISSEAUX SANGUINS

L'œstrogène est une hormone sexuelle faisant partie de la famille des stéroïdes qui agissent principalement par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires. Les œstrogènes ont été caractérisés comme étant des molécules capables d'exercer plusieurs effets sur le système cardiovasculaire à la fois par des voies génomiques et non génomiques (Figure 9).

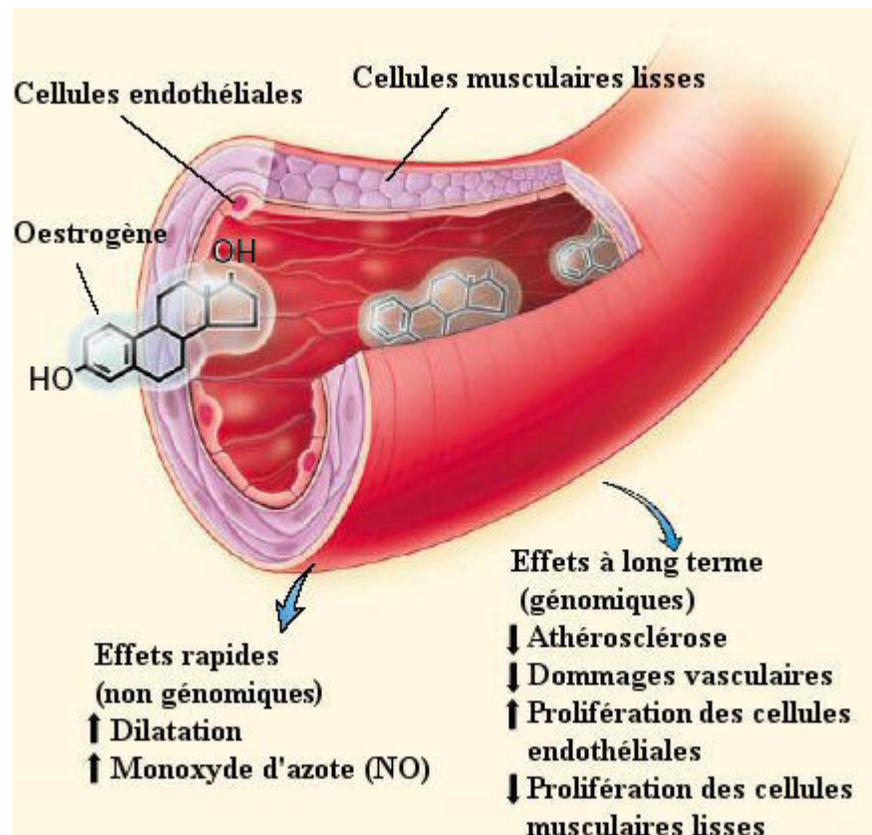


Figure 9 : Les effets directs (génomiques et non génomiques) de l'œstrogène sur les vaisseaux sanguins. (Adapté de Mendelsohn et coll.)[186]

3.4.1 Les effets génomiques

Les œstrogènes agissent via les récepteurs aux œstrogènes (ER), membres de la superfamille des récepteurs nucléaires qui agissent comme des facteurs de transcription. Ils permettent d'influencer l'expression des gènes contrôlés par ces hormones. La voie de l'activation d'un gène par l'œstrogène est la suivante : il y a d'abord un passage passif de l'œstrogène libre au travers de la membrane pour entrer dans la cellule. Il se lie ensuite à son récepteur ce qui va entraîner la dissociation de chaperonnes de la famille des protéines activées par choc thermique « *heat shock proteins* » (ex : Hsp90, Hsp56). Celles-ci stabilisent le récepteur et augmentent son affinité pour l'œstrogène [224]. Cette dissociation des HSP va permettre la dimérisation du récepteur et sa translocation vers le noyau de la cellule. Ce complexe agit comme facteur de transcription en se liant à l'ADN au site de l'élément de réponse spécifique (ERE) ou « estrogen response element » du gène cible. Il est bon de noter que plusieurs EREs retrouvés dans le génome sont légèrement différents de la séquence consensus, mais tout de même efficaces [208]. En plus du complexe stéroïde-récepteur dimérisé, plusieurs co-activateurs sont recrutés pour initier la transcription du gène cible [92, 183]. Ces voies peuvent être bloquées en utilisant des inhibiteurs non spécifiques de la synthèse protéique (ex.: cycloheximide) ou de la transcription (ex.: actinomycine D). Cette voie de régulation par l'œstrogène est présente dans les vaisseaux sanguins. Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que l'œstrogène accélérerait la croissance des cellules endothéliales suivant une blessure vasculaire [151, 193]. Il est fort probable que cet effet de l'œstrogène soit dû à l'augmentation de l'expression de

VEGF observée dans les cellules musculaires lisses vasculaires [151]. Ceci corrèle avec le fait que l'œstrogène peu exercer une influence sur la transcription du VEGF par un élément de réponse imparfait à l'œstrogène (ERE1520) dans la région promotrice du gène de VEGF [31]. De plus, l'œstrogène empêcherait la migration ainsi que la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaire en agissant directement sur celles-ci [19, 150] ou par l'augmentation de production de NO par les cellules endothéliales [46]. Le groupe de Charles Rosenfeld a démontré chez la brebis, qu'en inhibant la synthèse protéique avec de la cycloheximide, l'augmentation du flot sanguin utérin induit par le 17 β -estradiol (E₂) était considérablement réduite, suggérant des événements transcriptionnels dans ces réponses [241].

3.4.2 Les effets non génomiques

Depuis quelques années, plusieurs études ont montré des effets spécifiques des stéroïdes qui ne semblent pas être médiés par une action génomique de l'hormone. En effet, les différentes évidences sont : 1- une action très rapide qui ne peut résulter de l'expression de gènes (de l'ordre de la seconde à la minute), 2- les effets observés dans des cellules qui ne possèdent pas la machinerie de synthèse d'ARNm et de protéine comme les spermatozoïdes, 3- une réponse insensible aux inhibiteurs de transcription ou de synthèse protéique 4- l'effet est observé avec de l'œstrogène est couplée à de l'albumine (BSA), ce qui empêche l'hormone de pénétrer à l'intérieur de la cellule, 5- ces effets peuvent être observés même en présence d'antagonistes spécifiques des ERs (ICI 182,780; Tamoxifène; etc.). [72]

Les effets de l'œstrogène par un mécanisme d'action non génomique sur les cellules nerveuses ont été parmi les premiers rapportés. Déjà dans les années 80, on a remarqué que l'œstrogène est capable de modifier la conductance ionique et de moduler l'excitabilité de cellules nerveuses en quelques secondes après l'application [198]. On a observé que l'œstrogène agit via l'interaction avec un récepteur spécifique à la membrane des neurones pour amener son effet. [277] Des études plus récentes ont démontré que l'œstrogène active la formation d'AMPc [97], la phosphorylation de l'élément de réponse liant l'AMPc (CREB) [308], la formation d'inositol triphosphate (IP3) [73] et l'activation de MAPKs dans des cellules de neuroblastomes [297]. Dans la même optique, une étude récente a démontré que le traitement au 17β -E₂ ou à de l'œstrogène conjugué à du BSA augmente la croissance des neurites et des embranchements de neurones dopaminergiques en déclenchant une relâche de Ca⁺ intracellulaire quelques secondes après le traitement. De plus, cette hausse de croissance est inhibée par des antagonistes des voies AMPc/PKA et du Ca²⁺, mais pas par le ICI 182,780 [18]. Le ICI 182,780 est un antagoniste des récepteurs classiques aux œstrogènes (ER α , ER β), qui permet de bloquer complètement leur activité et provoque la dégradation de ceux-ci [291].

De même, les effets non génomiques des œstrogènes jouent un rôle important sur les tissus vasculaires. En général, *in vivo* la vasodilatation occasionnée par l'œstrogène est présumée indirecte, c'est-à-dire en agissant sur l'endothélium qui lui sécrète des substances vasorelaxantes. Par exemple, il a été démontré que l'œstrogène agit sur les cellules endothéliales en activant les MAPK et en augmentant la transcription de gènes, la prolifération cellulaire et l'expression de la synthase de monoxyde d'azote endothéliale (eNOS). Il a aussi été décrit avec des coronaires d'humain et de porc ou des aortes de rat que l'éthinylestradiol ou le 17β -E₂ amenaient des relaxations aiguës significatives [232, 247, 306]. Ceci a été suggéré comme mécanisme pouvant expliquer l'effet

cardioprotecteur des traitements hormonaux de remplacement chez la femme ménopausée. Dans des cellules endothéliales isolées d'artère pulmonaire de fœtus de mouton, l'œstrogène amène une augmentation de l'activité de eNOS en moins de 5 minutes. Par contre, cette activation des eNOS peut-être complètement inhibée par le tamoxifène ou le ICI 182,780 [160], mais pas l'actinomycine D [37]. Ce qui suggère que l'effet est médié par les récepteurs classiques aux œstrogènes sans que la transcription d'un message génomique soit impliquée. D'autres études ont montré que cette activation de eNOS s'effectuait sans augmentation de calcium intracellulaire dans les cellules endothéliales [34], mais se produisait via l'activation de la voie PI3K/Akt [106]. Fait étonnant, le 17β -E₂ amène une relaxation rapide des artères de la queue de rates, mais pas chez les mâles [185]. Le mécanisme par lequel cette différence se manifeste est encore inconnu.

Les œstrogènes pourraient, dans une autre mesure, amener leurs effets via une action directe sur cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). Pour qu'un vaisseau sanguin puisse relaxer il faut diminuer la concentration de calcium activateur dans les CMLV. Étant donné que l'œstrogène amène une vasorelaxation rapide, il doit réussir à diminuer la concentration de Ca⁺ intracellulaire des CMLV d'une manière ou d'une autre. Jusqu'à présent, une étude a démontré, dans les coronaires de porc, que l'œstrogène diminuerait la relâche de calcium venant du réticulum sarcoplasmique [104]. Plusieurs autres études ont plutôt observé une diminution de l'influx de calcium dans les CMLV de porcs [50, 264] ou alors une augmentation de la sortie de calcium [223]. Des études de patch-clamp sur des CMLV de rat et de lapin suggèrent que l'œstrogène inhibe l'entrée de calcium par l'inhibition de canaux calciques de type L [145]. Une autre possibilité par laquelle l'œstrogène pourrait diminuer l'influx de calcium, c'est en ouvrant des canaux potassiques situés à la membrane plasmique. En suractivant les canaux K⁺ la cellule

devient hyperpolarisée ce qui réduit la probabilité d'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage. Des études de patch-clamp ont démontré que l'œstrogène active les canaux potassiques de grande conductance activés par le potentiel et le calcium (BK_{Ca}) dans des myocytes de coronaire [302]. Il semblerait qu'environ 70 % de la relaxation aiguë induite par l'œstrogène serait dépendante de l'activité des BK_{Ca} [242]. Il a été démontré que des concentrations physiologiques d'œstrogène sur des myocytes d'artère coronaire permettraient l'ouverture des BK_{Ca} [303]. Les BK_{Ca} de coronaire de rat seraient activés par l'œstradiol via la production endothéliale de NO [301] ou par l'activation directe de la voie NO/GMPc dans les CMVL [303]. Cette augmentation de NO par les œstrogènes provient de l'activation de la voie PI3-kinase-Akt qui va stimuler les NOS de type 1 (nNOS) dans les CMLV [103].

3.5 LES RÉCEPTEURS DES ŒSTROGÈNES

3.5.1 Les récepteurs classiques

Comme décrit ci-dessus (Figure 9), l'œstrogène exerce ses actions génomiques via l'interaction avec les récepteurs des œstrogènes. Également, les récepteurs nucléaires aux œstrogènes ont aussi la possibilité de permettre à cette hormone d'agir via des mécanismes non génomiques. Nous allons nous attarder dans cette section à décrire la structure des récepteurs aux œstrogènes afin de mieux comprendre leur fonction.

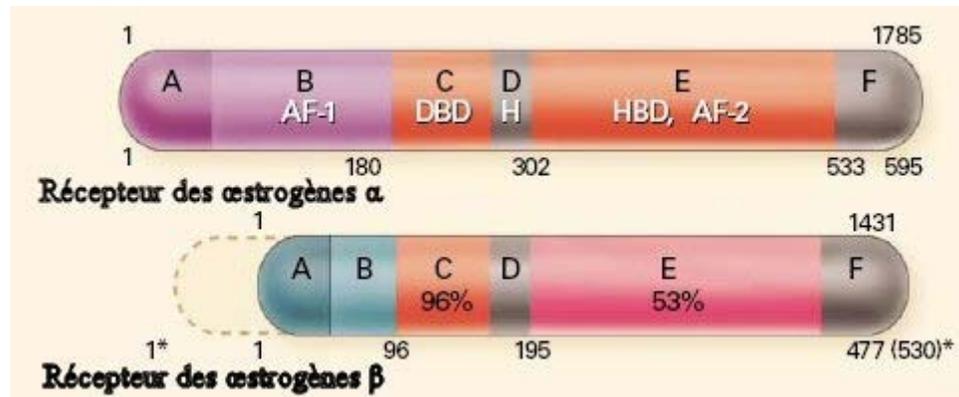


Figure 10 : Structure des récepteurs α et β aux œstrogènes chez l'humain. Le domaine N-terminale (A/B) avec sa fonction d'activation de la transcription hormone-indépendant (TAF-1), le domaine de liaison à l'ADN (DBD) (C), la région charnière ou « hinge » (D) et la région C-terminale (E/F) contenant un domaine de liaison à l'hormone (HBD) et le site de la fonction d'activation de la transcription dépendant de l'hormone (TAF-2) (Traduit de Mendelsohn et coll)[186]

Il existe deux récepteurs aux œstrogènes, ER α et ER β , qui font partie de la superfamille des récepteurs aux stéroïdes. Leur nomenclature a été modifiée par le « HUGO Gene Nomenclature Committee » par ERS1 pour le gène de ER α et ERS2 pour ER β . Cependant, l'ancienne nomenclature est utilisée dans ce manuscrit simplement par habitude de travail. Le premier récepteur à être identifié fut ER α , cloné en 1985 [293]. Environ dix ans plus tard, un second récepteur (ER β) a été cloné [154, 279]. Celui-ci a été décrit comme ayant des caractéristiques structurelles (12 hélices) et fonctionnelles très semblables au ER α . Ils ont tous deux la même structure modulaire composée de six domaines (A à F). Malgré que ces protéines soient le produit de deux gènes différents, ils partagent une très grande homologie de séquence pour le domaine de liaison à l'ADN (C) ($\approx 96\%$) et aussi pour le domaine de liaison au ligand (E) ($\approx 53\%$). Ce dernier, en plus d'être

responsable de la liaison avec le ligand, permet l'homodimérisation et la localisation nucléaire du récepteur. De plus, le domaine « E » contient une fonction d'activation dépendante du ligand (AF-2). Le domaine N-terminale (A/B) en plus d'avoir des sites de phosphorylation fonctionnels possède aussi une fonction d'activation (AF-1), mais qui est indépendante du ligand [156]. Des études ont démontré que le domaine AF-2 peut avoir des interactions protéines-protéines qui vont permettre de recruter des cofacteurs transcriptionnels pour contrôler la transcription des gènes cibles [101, 111]. Les deux ERs reconnaissent la même séquence consensus qui se nomme l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE). La séquence minimale consensus est une séquence palindromique de 13 pb (5'-GGTCAnnnTGACC-3'). Récemment, il a été démontré par analyse génomique que la plupart de gènes cibles des récepteurs des estrogènes contiennent diverses variations des éléments ERE [24, 208].

Malgré ces ressemblances entre les deux types de récepteurs, certaines études ont démontré des nuances d'affinités pour différents ligands comme la génistéine, le raloxifène et le tamoxifène [14, 153]. De même, il a été démontré que ces deux récepteurs pouvaient recruter plusieurs cofacteurs communs, mais que chacun d'eux pouvait aussi mobiliser des cofacteurs spécifiques [296]. Afin d'évaluer le rôle des 2 types récepteurs, des modèles animaux où les gènes $ER\alpha$ ($ER\alpha KO$) et/ou $ER\beta$ ($ER\beta KO$) ont été inactivés. La souris $ER\alpha KO$ est viable et se développe jusqu'à l'âge adulte avec un phénotype apparemment normal. Cependant, les femelles sont infertiles et les mâles ont une diminution marquée de leur fertilité. On observe chez les femelles une hypoplasie de l'utérus, l'absence de développement mammaire et des ovaires sans corps jaunes [296]. D'ailleurs, un homme a été diagnostiqué comme ayant une mutation bi-allélique inactivant le gène de $ER\alpha$. Cet individu avait une apparence normale avec des organes génitaux normaux, mais il souffrait d'ostéoporose et sa croissance n'était pas terminée à

l'âge de 28 ans [254]. Les souris ER β KO ont un phénotype externe normal et elles sont fertiles, mais elles ont de plus petites portées à cause d'une réduction de leur efficacité d'ovulation. Les mâles, quant à eux, développent avec l'âge une hypertrophie de la prostate et de la vessie [152]. Il particulièrement est intéressant de noter que dans chacun des modèles d'inactivation génique, comme chez les souris sauvages, le 17 β -E₂ protège les vaisseaux de façon similaire, suite à une lésion vasculaire, en réduisant l'épaississement de la paroi et en inhibant la prolifération des CMLV. Ceci suggère que ER α et ER β peuvent se compenser l'un l'autre pour certaines fonctions ou que le rôle protecteur de l'œstrogène dans la protection vasculaire est indépendant des ERs. Les mêmes expériences ont été effectuées sur des souris avec une inactivation génique par mutagenèse pour les deux récepteurs aux œstrogènes (ER $\alpha\beta$ KO). Les résultats sont différents étant donné que le traitement au 17 β -E₂ réduit l'épaississement de la tunique moyenne seulement chez les souris de type sauvage et pas chez les ER $\alpha\beta$ KO. Étonnamment, comme pour les souris de type sauvage, le 17 β -E₂ amène une augmentation du poids utérin et inhibe la prolifération des CMLV des ER $\alpha\beta$ KO [138]. Ces résultats suggèrent qu'un type de récepteurs, ER α ou ER β , est nécessaire pour certaines fonctions, comme l'inhibition de l'épaississement de la media dans le cas présent. De plus, ces résultats suggèrent que les différentes actions de l'œstrogène dans la réponse suivant une blessure vasculaire ne sont pas toutes dépendantes des récepteurs aux œstrogènes. Mais, ceci reste à être prouvé avec un meilleur knock-out étant donné que ER $\alpha\beta$ KO exprime un variant d'épissage de ER α qui peut lier l'E₂ et médier l'expression de gènes suite à la liaison à l'hormone [47].

Une autre caractéristique importante qui apporte une utilité supplémentaire au fait d'avoir deux récepteurs quasi identiques, c'est l'évidence que ER β aurait comme rôle de modifier l'expression de ER α [102]. Il semblerait que le domaine A/B d'ER β agirait

efficacement comme répresseur à des concentrations sous-saturantes d'œstrogène. De plus, dans des cellules HepG2 lorsque ER β est exprimé, le tamoxifène perd son effet d'agoniste partiel via ER α . Ce qui indique que l'expression relative des deux différents récepteurs pourrait être un déterminant clé dans la réponse d'un tissu donné aux agonistes et antagonistes des ERs. Il a été suggéré que le ER β aurait un effet modulateur de ER α en plus d'un effet antiprolifératif dans l'utérus immature, du moins chez la souris [300].

3.5.1.1 Les outils pharmacologiques des ERs

Il existe plusieurs antagonistes des récepteurs aux œstrogènes. Les antiœstrogènes agissent en compétition avec l'œstrogène sur le domaine de liaison du récepteur favorisant une conformation à celui-ci qui est inadéquat pour remplir son rôle de régulateur transcriptionnel. Il existe deux types d'antagoniste des ERs, soit les antiœstrogènes totaux et les antiœstrogènes partiels ou SERMs (selective estrogen receptor modulators) (Figure 11). Les SERMs ont la particularité d'être à la fois antagonistes et agonistes dépendamment du tissu. Trois SERM connus sont le tamoxifène, le raloxifène et clomifène. Le tamoxifène, qui agit via son métabolite l'hydroxytamoxifène, est surtout utilisé contre les tumeurs mammaires par son effet antagoniste dans cet organe. Cependant, il a également un effet œstrogénique au niveau de l'endomètre et de l'os, ce qui fait qu'un traitement prolongé augmente l'incidence de cancer de l'endomètre. Même si le raloxifène possède une structure assez différente du tamoxifène, il agit lui aussi comme antagoniste au niveau des seins et de l'endomètre. Par contre, il a un effet œstrogénique sur les os ce qui peut prévenir l'ostéoporose. Le clomifène a comme principal effet d'inhiber le rétrocontrôle hypothalamo-hypophysaire assuré par l'œstradiol. Son administration pendant quelques jours provoque une décharge de FSH,

puis de LH, susceptible de déclencher une ovulation. Le clomifène est donc utilisé dans le traitement des stérilités par anovulation. Les antagonistes totaux comme leur nom l'indique bloquent complètement l'activité des récepteurs aux œstrogènes et amènent la dégradation de ceux-ci. Deux exemples connus sont le ICI 182,780 et le EM-800 [278]. L'affinité relative du ICI 182,780 est de 0,89 comparé à l'œstradiol (1,00) [291], donc une affinité d'environ 100 fois supérieures au tamoxifène pour ER α , mais sans présenter d'activité agoniste de l'œstrogène dans les différents tissus [112].

Pour ce qui est des agonistes, il y a bien sûr le 17 β -œstradiol qui lie les deux récepteurs, mais il y a aussi des agonistes plus spécifiques pour l'un ou l'autre des sous-types de récepteurs. Par exemple, il y a le propylpyrazole triol (PPT) est un agoniste ER α avec une affinité 400 fois supérieure à ce sous-type comparativement à ER β [263]. Deuxièmement, il y a le Diarylpropionitrile (DPN) qui lui à une affinité 70 fois supérieure pour ER β relativement à ER α [189]. L'utilité de ces deux molécules réside dans la possibilité de discriminer si un effet œstrogénique dépendant des ERs peut être attribuable à l'un des deux sous-types.

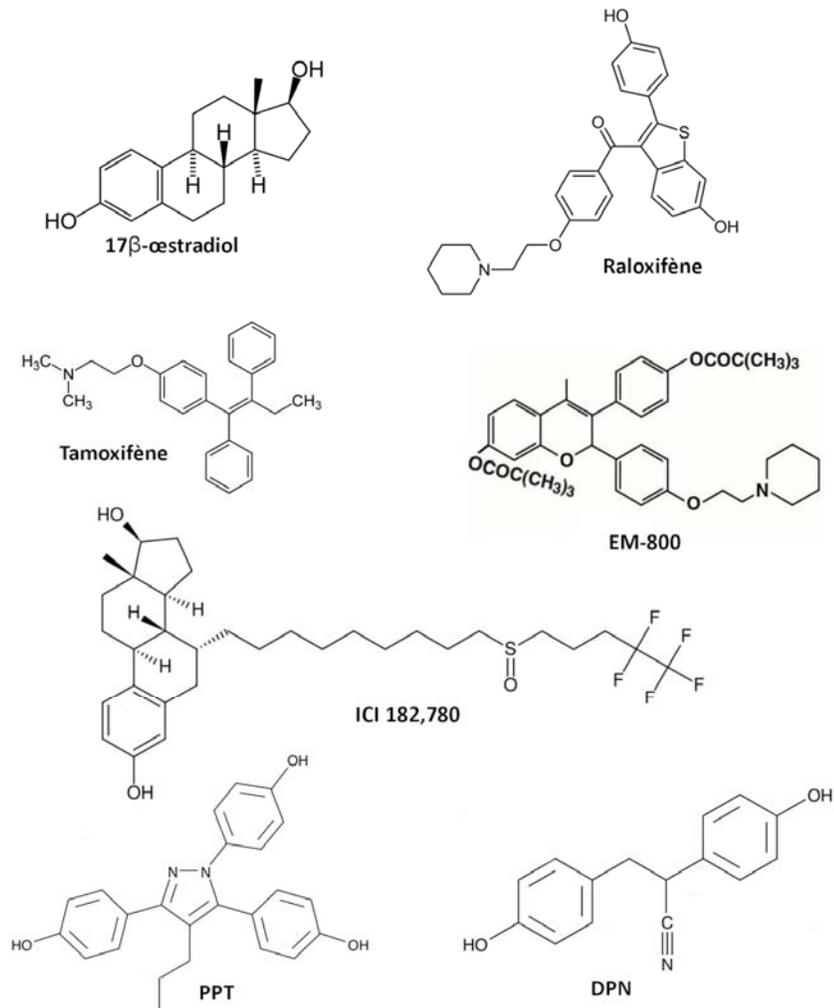


Figure 11 : Structure de différents composés antiœstrogéniques et œstrogéniques. Soit l'œstrogène principal (17 β -œstradiol), deux SERMS (Raloxifène, Tamoxifène), deux antiœstrogènes totaux (EM-800, ICI 182,780) et deux agonistes sélectifs (PPT, DPN).

3.5.2 Récepteur à l'œstrogène couplé aux protéines G

Nous avons décrit dans la section précédente les deux récepteurs classiques des œstrogènes (ER α et ER β), mais il existe plusieurs autres récepteurs qui ont été proposés comme étant associés aux œstrogènes [275]. Malgré cela, très peu d'entre eux ont été le sujet de recherches plus approfondies. Il existe une exception à la règle, le récepteur GPER (G protein-coupled estrogen receptor 1). Ce récepteur a été cloné par plusieurs groupes de recherche différents vers la fin des années 90. Il a été décrit sous différentes appellations soit GPR30, GPCR-Br, FEG-1, CMKRL2, CEPR, et LyGPR [33, 76, 157, 207, 216, 267]. La séquence d'acides aminés déduite à partir du gène proposait une structure avec 7 hélices transmembranaires caractéristiques de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR : G protein-coupled receptors). On a ensuite procédé à des comparaisons d'homologie de structure avec d'autres GPCR et on a trouvé des similitudes entre le GPER et le récepteur AT₁ de l'angiotensine II (AGTR1), le récepteur alpha de l'interleukine-8 (IL8RA) et le récepteur des chémokines 1 (motif C-C) (CCR1) avec respectivement 28 %, 28 % et 24 % de similitudes [33]. Cette similitude structurale laissait croire que le substrat de ce récepteur serait probablement un peptide. Contre toute attente, Filardo et al. publient en 2000 un article démontrant que la phosphorylation rapide des protéines kinases activées par un mitogène (MAPK : mitogen-activated protein kinase), Erk-1 et Erk-2, par le 17 β -œstradiol était dépendante de la présence du GPER [78]. En fait, ils ont démontré que le 17 β -œstradiol activait Erk-1/-2 dans les cellules de cancer mammaire MCF-7 (qui exprime ER α et ER β), mais aussi dans les SKBR3 qui n'exprime pas ces deux récepteurs. Ils ont cependant corrélé la réponse au 17 β -œstradiol avec la présence par immunovurdage de GPER dans ces cellules. Ils ont ensuite utilisé des cellules

de cancer mammaire MDA-MB-231 ($ER\alpha^-$, $ER\beta^+$ et $GPER^-$) qui se sont avérées insensibles à l'activation de Erk-1/-2 par le 17β -œstradiol. Toutefois, en transfectant et surexprimant le gène de GPER dans ces cellules, ils ont retrouvé l'effet par le 17β -œstradiol observé dans les autres cellules de cancer mammaire. Suite à cette publication, plusieurs autres études ont suivi démontrant l'implication de GPER et son activation par les œstrogènes dans d'autres systèmes cellulaires en effectuant des atténuations géniques « knockdown » de GPER [132, 134, 135, 231]. L'atténuation génique est une technique qui a pour but réduire l'expression d'un gène qui peut être atteint avec différents outils moléculaires. La méthode la plus utilisée en ce moment et la voie des ARN interférents. D'une vision simplifiée, il s'agit ici d'utiliser un système de contrôle de l'expression des gènes de la cellule et de lui livrer de façon exogène ou de lui faire produire des petites molécules d'ARN complémentaire à l'ARN messenger du gène ciblé. Si la complémentarité entre l'ARNm et l'ARN interférent est parfaite il y aura recrutement d'un complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex) et l'ARNm sera clivé et dégradé [105]. Une complémentarité non parfaite entre les 2 brins pourrait tout de même empêcher la synthèse de protéine si le site de liaison sur l'ARNm se situe en 3' ce qui empêche la traduction du messenger [63].

Suite à ces travaux qui démontraient une corrélation entre l'œstradiol, le GPER et un effet cellulaire donné, un autre groupe a fait des études de liaison pour s'assurer que cette relation GPER et œstradiol était directe. Utilisant une lignée cellulaire mentionnée précédemment, soit les SKBR3 ($ER\alpha^-$, $ER\beta^-$ et $GPER^+$) ou des cellules embryonnaires humaines de rein (HEK293) ($ER\alpha^-$, $ER\beta^-$) transfecté avec le GPER, ils ont effectué des études de liaison. Ils ont démontré qu'il y avait une liaison spécifique caractéristique d'un seul site de liaison entre 17β -E₂ tritié et le GPER avec une constante de dissociation (K_d) de 2,7 nM [272]. Ceci représente une affinité du 17β -E₂ pour GPER environ 10 fois plus que pour $ER\alpha$ et $ER\beta$ (K_d de 0,13 et 0,12 nM respectivement) [153].

Presque au même moment, Revankar *et al.* démontrent par microscopie confocale à fluorescence que le GPER couplé à la « green fluorescent protein » (GFP) colocalise avec un composé œstrogénique fluorescent de synthèse. De plus, ils démontrent que la localisation cellulaire du GPER-GFP n'est pas à la membrane plasmique, mais plutôt à la membrane du réticulum endoplasmique [234]. Ces observations ont été reconfirmées par le même groupe [235] et par d'autres en utilisant des dérivés œstrogéniques perméables ou imperméables à la membrane plasmique [181, 215, 246]. Toutefois, il existe aussi des études qui, au contraire, affirment que les GPER sont plutôt localisés à la membrane plasmique seulement [77, 86].

Jusqu'à présent, plusieurs études dans la littérature ont voulu documenter les effets et la signalisation intracellulaire induits par les œstrogènes via le GPER. Nous avons déjà fait mention de l'activation des Erk-1/-2 suivant l'activation de GPER par Filardo *et al.* [78]. D'autre part, Revankar *et al.* ont rapporté, dans des cellules rénales immortalisées de singe (COS-7), que l'activation des GPER par l'œstrogène donnait lieu à l'activation de la voie de PI3K. Dans les deux cas, l'activation de ces voies de signalisation est la résultante d'une transactivation du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR; *epidermal growth factor receptor*) (Figure 12). Suivant l'activation de ce deuxième récepteur, il y aurait une activation protéine G $\beta\gamma$ -dépendante de la protéine Src. Src, par son activité tyrosine kinase, irait phosphoryler la protéine adaptatrice Shc, ce qui permettrait l'activation de métalloprotéinases (MMP). Ces MMP vont permettre la relâche du facteur de croissance similaire à l'EGF qui lie l'héparine (HB-EGF; *Heparin-binding EGF-like growth factor*). En fait, les MMP clivent la protéine précurseure qui se trouve liée à la membrane (proHB-EGF) ce qui va libérer des molécules d'HB-EGF et se lier au récepteur EGFR [225]. Le récepteur, une fois activé, amènera la mise en place des voies de signalisation de PI3K et des MAPK soit Erk-1/-2.

En plus de la transactivation du EGFR par le GPER, il semblerait que ce récepteur liant l'œstrogène soit aussi capable d'amener une mobilisation de calcium intracellulaire suivant son activation. Cette intensification de la concentration de calcium intracellulaire a été observée dans des cellules de cancer du sein (SKBR3) [20, 59] et dans des cellules COS7 [234] ou bien HEK293 [77] transfectées avec le GPER. Outre ces expériences effectuées avec des lignées cellulaires cancéreuses ou transformées, des résultats similaires ont été obtenus avec des cultures primaires de neurones sensitifs de rats [74] ou de neurones de primate produisant de la gonadolibérine [205]. Par ailleurs, on a rapporté, dans des cultures primaires de cellules musculaires lisses vasculaires provenant de veines ombilicales humaines, que l'ajout d'un agoniste du GPER amenait une petite augmentation de calcium intracellulaire pendant quelques minutes, mais surtout qu'elle empêchait l'entrée de calcium et la vasoconstriction induite par la sérotonine [99].

Une autre voie de signalisation plausible obtenue par le GPER serait la hausse de la concentration d'AMPc intracellulaire. Cet effet a déjà été démontré avec l'œstradiol dans différents tissus, par exemple dans des neurones hippocampiques de rats [97] ou des artères coronaires humaines [197]. Plus récemment, cet effet a été observé dans des cellules transfectées avec le gène du GPER [77, 79]. De même, cette production d'AMPc via GPER peut aussi être obtenue avec d'autres composés œstrogéniques comme les xénoestrogènes [271], composés synthétiques d'origine industrielle présent dans l'environnement ayant des propriétés œstrogéniques [253], ou des phytoestrogènes [136].

Finalement, en plus de ces actions non génomiques induites par le GPER, il semble que ce récepteur soit aussi en mesure de modifier l'expression de différents gènes [227]. Quelques études ont signalé une augmentation de l'expression génique de la cycline D2 [135] et de Bcl-2 [133] dans des kératinocytes. Les cyclines sont des protéines impliquées

dans la régulation du cycle cellulaire en contrôlant les kinases dépendantes des cyclines (CDK) et Bcl-2, une protéine anti-apoptotique qui empêche l'activation des caspases, inhibe la peroxydation lipidique des membranes et bloque l'action de protéines pro-apoptotiques comme Bax et Bad [188]. D'autre part, l'activation de GPER permettrait la régulation positive du facteur de croissance neuronale (nerve growth factor) via l'expression du facteur de transcription c-fos dans les macrophages [132]. Ce dernier étant un facteur de transcription nucléaire dont la transcription est augmentée par de multiples stimuli, comme d'autres facteurs de croissance [190]. Dans la même ligne d'idées, l'œstradiol ou un agoniste spécifique des GPER (G-1) augmente l'expression de plusieurs gènes, dont c-fos, pS2 et les cyclines A, D1 et E, observée dans des cellules de cancer de l'ovaire [7]. Mais, il est intéressant de noter qu'ils n'accroissent pas l'expression du récepteur de la progestérone qui est un gène très bien documenté comme étant influencé par les œstrogènes via ER α [139]. À notre connaissance, il n'existe qu'une seule étude dans la littérature qui a effectué un criblage génique (puce à ADN) sur des cellules SKBR3 (ER α ⁻, ER β ⁻ et GPER⁺) pour identifier les gènes qui sont induit par l'activation du GPER [218]. L'activation du GPER par le 17 β -E₂ ou le tamoxifen, antagoniste des ER et agoniste du GPER, augmente la transcription d'une panoplie de facteurs de transcription dont le plus fortement exprimé est le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF). La sécrétion de CTGF suite à l'activation du GPER promeut non seulement la prolifération cellulaire, mais aussi la migration cellulaire. C'est donc dire que les effets génomiques induits par l'activation du GPER peuvent avoir plusieurs implications physiologiques, dont une plus grande probabilité de métastase ou de résistance aux agents antioestrogéniques comme le tamoxifen dans les cas de cancer du sein.

Pour tenter de caractériser l'implication du GPER, des animaux « knockouts » (invalidation du gène GPER par mutagenèse) ont été conçus. Comme l'œstrogène est

impliqué dans le développement et la fonction des organes reproducteurs, cet aspect a été étudié et les souris obtenues n'ont pas montré de défauts apparents [178, 214, 294]. Cependant, l'utilisation *in vivo* d'un antagoniste du GPER (G15) réduirait la prolifération des cellules de la paroi utérine. Le GPER aurait alors un rôle de soutien aux récepteurs ER α qui sont nécessaires à l'expression des gènes dépendants des ERE, de même qu'à la prolifération et l'imbibition en fluides de l'utérus [59]. Malgré cette participation minoritaire dans le développement des tissus utérins [59] et mammaires [215], les souris GPER^{-/-} présentent des troubles d'hyperglycémie, une réduction de croissance osseuse et une augmentation de la pression artérielle [178]. La hausse de la pression artérielle serait causée par une augmentation du ratio media/lumière observé dans les vaisseaux de résistance (mésentériques). Ce qui entraînerait probablement une augmentation de la résistance vasculaire périphérique. L'hyperglycémie, quant-à-elle, serait secondaire à une diminution d'expression et de relâche d'insuline des îlots de Langerhans. Comme l'œstrogène permet la régulation de la relâche d'insuline, les souris « knockouts » ont permis de démontrer que le GPER serait primordial pour la relâche d'insuline dépendante de l'estrogène [178]. D'autres études utilisant des souris GPER^{-/-} attribuent un rôle au GPER dans le développement de l'obésité [99] et le système immunitaire [294]. Il est fort probable que l'utilisation de souris GPER^{-/-} va contribuer à approfondir les connaissances et les cibles thérapeutiques potentielles via ce récepteur.

Quoi qu'il en soit, toutes ces études semblent démontrer que les GPER sont bel et bien des récepteurs qui peuvent être activés par les œstrogènes, produire une activation cellulaire et sont responsables de différentes activités physiologiques.

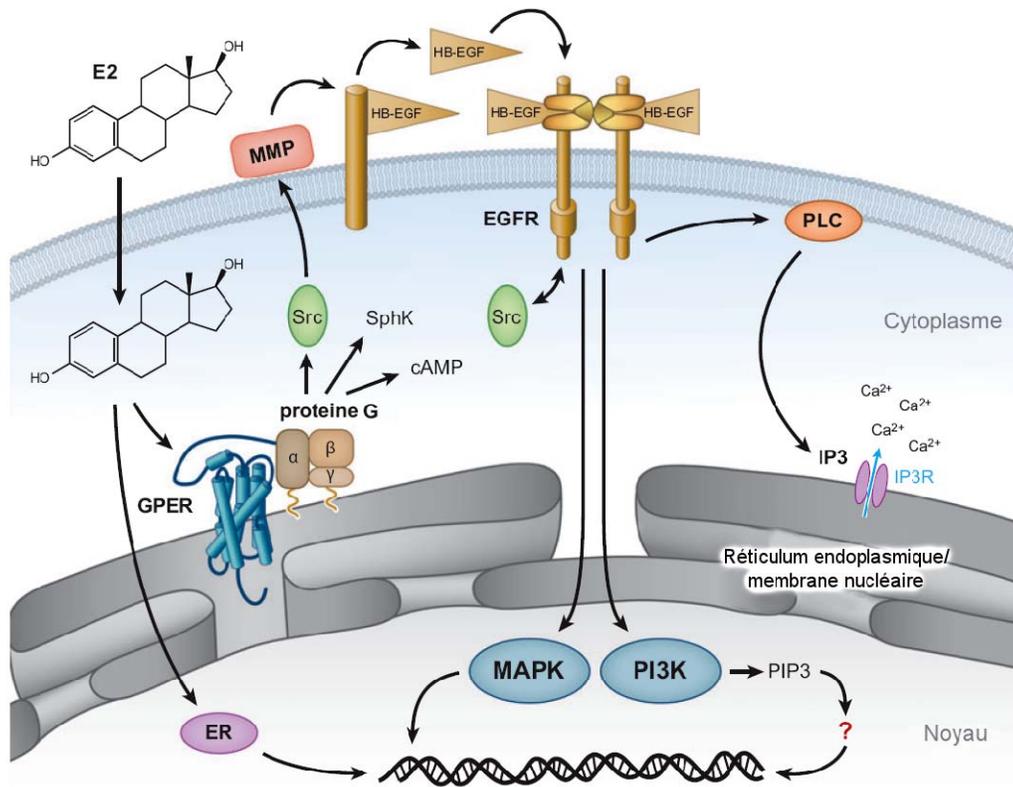


Figure 12 : Mécanismes de la signalisation médiée par l'œstrogène via le récepteur GPER. L'œstrogène libre (E₂) peut traverser la membrane et se lier à l'un de ses récepteurs (ER et GPER). Lorsque ce dernier lie le GPER, il active les protéines G hétérotrimériques qui à leur tour peuvent activer plusieurs effecteurs dont l'andénylate cyclase (ce qui augmente la concentration d'AMPc), Src et la sphingosine kinase (SphK). Ces deux dernières voies de signalisation iraient activer des métalloprotéinases de la matrice (MMP) qui vont permettre la relâche du facteur de croissance similaire à l'EGF qui lie l'héparine (HB-EGF). À son tour, l'HB-EGF va activer le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) qui amène la mise en place de plusieurs autres voies de signalisation, dont la phospholipase C (PLC) et l'activation de protéines kinases activées par un mitogène (MAPK) (modifié de Prossnitz et al.) [226]

3.5.2.1 Fonctions du GPER dans le système cardiovasculaire

Avec les outils disponibles aujourd'hui, il est maintenant possible d'étudier les effets physiologiques résultant de l'activation du GPER. Dans la mesure où les œstrogènes sont engagés dans une multitude de systèmes physiologiques, il est raisonnable de considérer que l'implication du GPER peut être substantielle. Une des premières évidences que le GPER pourrait avoir une fonction dans les vaisseaux sanguins vient de l'observation d'une augmentation d'ARNm de GPER dans des cellules endothéliales dérivées de la veine ombilicale humaine (HUVEC) soumise à un flot du milieu de culture. C'est-à-dire que les forces de cisaillement appliquées par le flot physiologique du sang dans les vaisseaux sanguins et la variation de celui-ci modifieraient l'expression du GPER dans les HUVEC [267]. Le GPER est aussi exprimé dans les cellules musculaires lisses vasculaires d'artères cérébrales de souris [120], d'artères mammaires internes et de veines saphènes humaines [100]. Outre la présence du récepteur, il est important de savoir s'il peut être activé par l'œstrogène et quels sont ses effets. Étant donné que le 17β -E₂ est un agoniste non sélectif de ER α , ER β et GPER, il est difficile de discriminer si l'un de ces récepteurs est responsable de ces effets non génomiques vasculaires. Cependant, certaines études ont démontré que des SERMS (tamoxifène, raloxifène) pouvaient eux aussi amener une vasodilatation non génomique et que le ICI 182,780, un antagoniste des récepteurs classiques aux œstrogènes, n'empêche pas la relaxation [165, 166]. Le mécanisme de ces observations est demeuré mal compris et différentes hypothèses infructueuses ont tenté en vain de fournir une explication. Ce n'est que récemment qu'il a été démontré que ces trois antagonistes des ERs étaient en même temps des agonistes du GPER [78, 234, 272]. Ces observations laissent présager que le GPER pourrait avoir un rôle à jouer dans le contrôle du tonus vasculaire. Une étude très récente a été publiée en

utilisant une souche de rat qui s'avère être un modèle d'hypertension sensible à l'œstrogène. C'est-à-dire qu'une carence en œstrogènes, via l'ovariectomie, chez ces rates produit une augmentation significative et soutenue de la pression artérielle. Cette augmentation de pression peut être évitée en administrant un agoniste spécifique au GPER (G-1) à l'aide d'une pompe osmotique sous-cutanée [169]. Dans le même ordre d'idée, un autre groupe a obtenu une chute de pression artérielle dépendante de la dose de G-1 administré (perfusion), chez des rats Sprague-Dawley normotensif, soit une diminution d'environ 10 % de la pression artérielle moyenne avec une dose de 164.8 ng/kg-min [99]. Chez le rat, sur des artères mésentériques précontractées avec de l'uridine 5'-triphosphate, ils ont obtenu une relaxation de 29 ± 4 % avec 1 $\mu\text{mol/L}$ de G-1. Des résultats similaires ont été obtenus avec des artères mammaires internes humaines et des carotides de souris. Ils ont aussi observé que l'agoniste G-1 diminuait la mobilisation de calcium provoqué par la sérotonine (vasoconstricteur). Enfin, l'activation du GPER inhibait la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires humaines qui n'exprimaient ni ER α ni ER β . Tous ces éléments mis ensemble tendent à indiquer que le GPER pourrait avoir un rôle à jouer important dans le système cardiovasculaire.

3.5.2.2 Les outils pharmacologiques du GPER

Plusieurs outils pharmacologiques concernant le GPER ont déjà été cités. Pour simplement faire un rappel, nous savons que le composé endogène prédominant des œstrogènes, le 17 β -œstradiol, lie à la fois ER α , ER β et le GPER [234, 272]. Tandis que l'isomère 17 α -œstradiol, l'œstrone, l'œstriol, la progestérone, le cortisol et la testostérone n'ont pas ou très peu d'affinité pour le récepteur GPER [272]. Paradoxalement, des molécules utilisées comme antagonistes des récepteurs classiques aux œstrogènes, soit le Tamoxifène et le ICI 182,780, lient le GPER avec une bonne affinité

[272] et agissent tout deux comme agoniste du GPER [78, 234]. Une autre molécule digne de mention est la génistéine, un phytoestrogène. La génistéine possède une grande affinité pour ER β et GPER. Elle serait en mesure d'activer le GPER et d'augmenter l'expression de *c-fos* via la voie d'activation de ERK1/2 [173]. Il est maintenant possible de se procurer, via des fournisseurs scientifiques, un agoniste spécifique au GPER qui n'active pas les récepteurs classiques aux œstrogènes. Cette molécule, la G-1 et a été découverte par un criblage virtuel et biomoléculaire exhaustif [20]. L'affinité du G-1 pour le GPER est évaluée à 11 nmol/L (comparé à 5,7 nmol/L pour E₂) et l'affinité pour les ERs n'est pas significative à des concentrations allant jusqu'à 1 μ mol/L. Les sections précédentes de cette thèse renferment plusieurs exemples que le G-1 est en mesure d'activer le GPER. Finalement, une nouvelle molécule, la G15, structurellement semblable au G-1 a été caractérisée comme antagoniste [59].

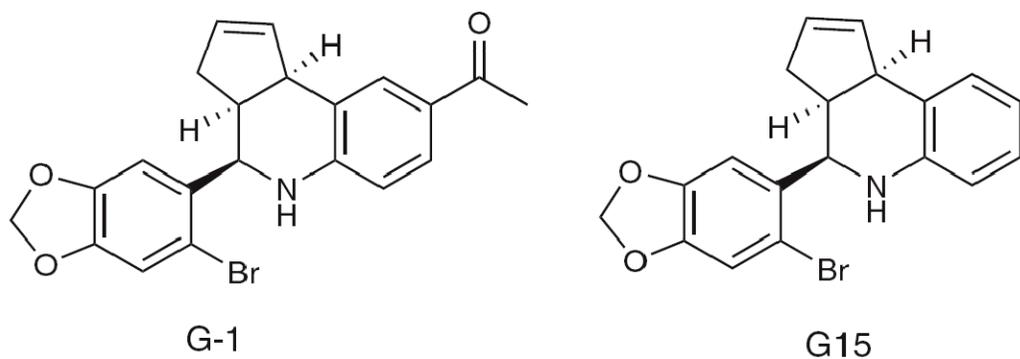


Figure 13 : Structure de l'agoniste (G-1) et l'antagoniste (G15) au GPER. (modifié de Dennis M.K. et al.) [59]

5. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL

Lorsqu'on ouvre la cavité abdominale d'une rate gestante, il est évident que les vaisseaux utérins chez le rat subissent une croissance considérable quant à la longueur et au diamètre. Ce remodelage de la vasculature utérine est caractérisé comme une hypertrophie et une hyperplasie de toutes les composantes de la paroi vasculaire [39]. Le remodelage influe sur les réponses de ces artères à différents stimuli. En effet, la réactivité des artères utérines est augmentée pour plusieurs agents vasoconstricteurs (phényléphrine, angiotensine II, chlorure de potassium) pendant la gestation [51, 258] et l'inverse de ce qui se produit dans la circulation systémique [179]. Donc, le remodelage de la vasculature utérine durant la grossesse modifie à la fois la structure des artères utérines, leurs composantes (fibres d'élastine et de collagène) et aussi leur réactivité.

Il est connu que la grossesse amène plusieurs modifications de la concentration des hormones circulantes. Parmi celles-ci, il y a l'œstradiol, l'œstrogène présent en majorité, dont la concentration s'accroît tout le long de la grossesse. Elle atteindra une concentration trois cents fois plus élevée avant terme qu'une femme non gravide. Cette hormone a de multiples fonctions ainsi qu'un mode d'action à la fois génomique et non génomique. Nous nous sommes alors demandé comment l'œstradiol influence ou modifie la circulation utérine durant la grossesse.

À partir des données de la littérature et de l'expérience acquise au laboratoire durant ma formation à la maîtrise, nous avons formulé deux hypothèses.

- A. La relaxation induite par une action non génomique du 17β -œstradiol sur les muscles lisses vasculaires des artères utérines de rats est indépendante

des récepteurs classiques aux œstrogènes et est modifiée durant la gestation en raison d'une variation de l'expression des NOSs dans les cellules musculaires lisses.

- B. L'inhibition de la synthèse d'œstrogènes, par un bloqueur de l'aromatase, occasionnerait une altération du remodelage vasculaire observé durant la grossesse et, par conséquent, des modifications de la réactivité vasculaire.

Pour répondre à ces hypothèses, nous avons établi les objectifs suivants :

- A1. Mesurer les effets vasorelaxants aigus des oestrogènes sur les artères utérines dénudées de leur endothélium.
- A2. Identifier les voies de signalisation moléculaire impliquée à l'aide d'outils pharmacologiques.
- A3. Comparer l'expression des synthèses de monoxyde d'azote dans les muscles lisses vasculaire utérin entre les rates gestantes et non gestantes.
- B1. Enrayer la synthèse d'œstrogènes durant la gestation chez le rat par l'administration d'un inhibiteur de l'enzyme aromatase (ATD).
- B2. Évaluer si le traitement avec l'ATD à une incidence sur le déroulement de la gestation en mesurant des paramètres physiologiques et biochimiques de la mère et des foetus.
- B3. Évaluer si le traitement à l'ATD durant la gestation affecte les artères utérines en modifiant le remodelage vasculaire et la réactivité vasculaire.

En répondant aux hypothèses et objectifs de ce projet de recherche, nous espérons avoir une meilleure compréhension des mécanismes par lesquelles l'œstrogène est en mesure d'influencer la réactivité vasculaire et le remodelage de la

circulation utérine durant la grossesse. Le but recherché est de comprendre ces mécanismes pour nous mener à définir de nouvelles approches thérapeutiques afin de réduire l'incidence d'une restriction de croissance intra-utérine. En fait, les maladies vasculaires maternelles associées à une diminution de la perfusion utéro-placentaire seraient responsables d'environ 25-30 % de tous les enfants ayant subi une restriction de croissance intra-utérine [233]. Plusieurs études, tant chez l'homme que chez les animaux, ont proposé qu'une restriction de croissance intra-utérine soit associée à une augmentation de morbidité, de mortalité ainsi que des conséquences à long terme sur le développement de plusieurs systèmes physiologiques (cardiovasculaire, métabolique, endocrinien, reproducteur, neurologique, respiratoire et squelettique) ce qui mènerait au développement de maladies chroniques à l'âge adulte [13, 82]. D'autre part, le remodelage vasculaire utérin a la particularité d'être complètement réversible après la parturition. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans ce remodelage ainsi que ceux qui permettent ce retour au stade prégestationnel pourrait amener à l'identification de cibles thérapeutiques pour d'autres types de remodelage vasculaire qui eux ne sont pas réversible (hypertension, athérosclérose, etc.).

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

ANIMAUX

Les rats que nous utilisons ont accès tout le long de leur séjour à la nourriture (2018 Teklad Global 18 % Protein Rodent Diet; Teklab Premier Laboratory Diets, Madison, WI) et l'eau du robinet *ad libitum*. Ils sont hébergés dans un environnement avec luminosité (de 6:00 à 18:00) et température (21 ± 3 °C) contrôlées. Cette étude a été approuvée par le comité local de protection des animaux qui est accrédité par le Conseil canadien de protection des animaux (CCPA).

Des rates Sprague-Dawley (Charles River Canada, St-Constant, QC, Canada) ayant un poids de 225 à 250 g sont croisées avec un mâle fertile. Le lendemain matin lorsque des spermatozoïdes sont retrouvés dans les frottis vaginaux, on considère la rate à son jour 1 de gestation sur 22. Au jour 14, nous débutons le protocole proprement dit par l'injection sous-cutanée quotidienne d'un inhibiteur de l'aromatase jusqu'au jour précédant le sacrifice de l'animal. Le volume des injections est ajusté au poids de l'animal. Nous avons utilisé un inhibiteur d'aromatase, l'ATD (1,4,6-androstatrien-3,17-dione), que nous avons administré à une concentration de 5 mg/jour dans un volume d'injection variant entre 150 et 200 μL [61, 113, 180]. Le poids corporel des animaux a été mesuré au jour 1 ainsi que quotidiennement des jours 11 à 22 de la gestation. La prise de nourriture et d'eau a également été notée quotidiennement des jours 11 à 22. Le poids du cœur, des reins, des ovaires et les paramètres fœtaux (poids des bébés, des placentas et de l'unité foetoplacentaire) ont été mesurés au jour 22.

Nous avons aussi effectué un protocole expérimental à l'animalerie du CHUM-Technopôle Angus en collaboration avec la Dre Julie Lavoie. Nous avons tout mis en œuvre

pour que les conditions soient le plus identiques possible au protocole précédent. Nous avons utilisé la même souche de rats Sprague-Dawley provenant de Charles River, la même diète, le même horaire de luminosité 12h :12h et dans un environnement à température et humidité contrôlées. Les soins et installations répondent aux standards demandés par le CCPA et toutes les interventions pratiquées sur les animaux ont été approuvées par le comité institutionnel de protection des animaux du CHUM.

Des rates pesant 225-250g sont croisées avec un mâle fertile. Le lendemain matin lorsque des spermatozoïdes sont retrouvés dans les frottis vaginaux, on considère la rate à son jour 1 de gestation sur 22. Au jour 14, nous avons inséré des implants sous la peau des rates (région sous-scapulaire). Il s'agissait d'implants d'ATD 80 mg produit sur demande avec une libération programmée de 10mg/jour pour une période maximale de 21 jours (Innovative Research of America, Sarasota, Florida, USA).

MESURES DE PRESSION ARTÉRIELLE

Pléthysmographie caudale

La pression artérielle a été mesurée par pléthysmographie caudale (Noninvasive Blood Pressure System for Rats and Mice RTBP 2000, Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA) chez des rats conscients. L'enregistrement de la pression se fait au niveau de la queue du rat où un brassard gonflable permet l'occlusion de l'artère caudale. Un détecteur, qui se situe en position distale sur la queue par rapport au coffre, détecte le retour de la circulation sanguine lorsque le brassard dégonfle. Les rats sont maintenus

dans un tube de contention en plastique et les rats ont été acclimatés au système de prise de pression entre les jours 7 à 10 de l'expérience et la pression a été enregistrée aux jours 11 à 22. Chaque jour, nous prenons 10 mesures de pression consécutives par rat pour minimiser l'erreur par individu et nous calculons la moyenne pour la journée.

Télémetrie

La pression artérielle et le rythme cardiaque des rates ont été mesurés par un système d'implant qui transmet ces données par radiotélémetrie. Deux à trois jours après réception, les rates ont subi une chirurgie pour la mise en place des implants TA11PA-C40 (Data Sciences; St. Paul, MN, USA). Ces chirurgies ont été pratiquées par Catherine Michel, technicienne en santé animale pour l'équipe de la Dre Julie Lavoie. Nous induisons l'anesthésie chez ces rates en administrant 4 % d'isoflurane par inhalation et nous maintenons cet état en réduisant le débit à ~2 % en continu. On administre une dose de buprénorphine sous-cutanée qui servira d'analgésique postopératoire et nous administrons une infiltration de marcaine aux sites où seront pratiquées les incisions après rasage et désinfection (détergent, iode, éthanol) des zones désignées. Durant la chirurgie les rates étaient couchées en position dorsale sur un dispositif chauffant pour maintenir leur température corporelle. Une incision abdominale était nécessaire pour introduire l'implant dans la cavité abdominale et maintenue en place par des points de suture sur la paroi abdominale. De plus, une incision sur la surface interne de la cuisse gauche est nécessaire pour permettre l'accès à l'artère fémorale. La canule insérée dans l'artère est engagée jusqu'à la jonction entre l'aorte abdominale et l'artère iliaque. Lorsque la canule est en place, le site d'insertion est ligaturé avec un fil de suture. On referme ensuite les deux plaies avec du fil de suture (soie 4-0) et des agrafes chirurgicales (9 mm Autoclips).

Pour chaque animal, nous avons effectué trois jours de lecture avant d'entreprendre les croisements avec des mâles. Ensuite, nous avons pris des lectures un jour sur deux du jour 1 au jour 14 de gestation et à tous les jours du jour 15 jusqu'au matin du sacrifice. Durant une période de lecture, tous les paramètres sont mesurés à une minute d'intervalle. Pour chaque animal que nous avons utilisé, nous avons fait la moyenne de toutes les valeurs mesurées durant le jour, c'est-à-dire durant leur période de repos.

LA RÉACTIVITÉ VASCULAIRE UTÉRINE

Cette partie de projet a été effectuée avec le système de myographe à microvaisseaux en utilisant des artères utérines de rates non gestantes et dénudées de leur endothélium. Les étapes expérimentales ont été décrites dans l'article [249] et encore plus en détail dans une revue [248]. Pour faire un survol, immédiatement après avoir sacrifié les animaux, les deux cornes utérines avec leur vasculature sont retirées et immergées dans un tampon Krebs bicarbonate froid et oxygéné (95 % O₂, 5 % CO₂ pour maintenir un pH 7.4) ainsi composé : (en mol/L) 118 NaCl, 4.65 KCl, 25 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂, 1.18 MgSO₄, 1.18 KH₂PO₄, et 5.5 dextrose. L'artère utérine principale est isolée et nettoyée des tissus conjonctif et adipeux et l'artère est coupée en segments de 1,5 et 2 mm de longueur. Pour étudier l'effet de l'œstrogène sur les muscles lisses des vaisseaux, nous avons éliminé l'endothélium. Ceci est obtenu en plaçant une canule dans le vaisseau pour perfuser avec une solution aqueuse de Triton X-100 (0,03 %) et rinçons avec du Krebs. Deux fils de tungstène (Ø 25 µM) sont ensuite introduits dans la lumière du vaisseau. Les extrémités des fils sont attachées sur les supports du myographe à microvaisseaux (Kent scientific, modifié).

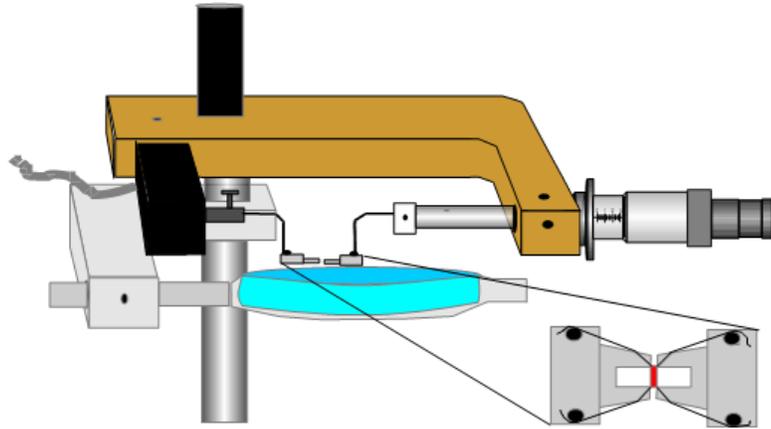


Figure 14 : Système de myographe à microvaisseaux. (schéma de Sicotte B.) [248]

Un des supports est relié à un transducteur de force (Kent Scientific) et l'autre à un micromètre gradué. Les étirements sont enregistrés sous forme de tension par un ordinateur en utilisant un système d'acquisitions de données par le logiciel PolyVIEW (Grass-Telefactor). Le segment d'artère utérine est baigné dans 5 mL de solution de Krebs oxygénée. La solution est changée aux 15 minutes environ. Le vaisseau est d'abord étiré durant une période de 10 min et laissé à reposer sans tension 10 minutes. Cette opération se fait trois fois consécutives, elle permet d'éviter l'hystérèse du vaisseau lors des étapes subséquentes. Nous effectuons ensuite des étirements cumulatifs de 50 μm avec une période de stabilisation (~ 3 minutes) entre chaque étirement. Nous distendons le vaisseau jusqu'à atteindre ~ 2 à 3 mN/mm (1 $\text{mN} = 102$ mg) dépendamment du diamètre du segment vasculaire. Ceci nous permet de tracer une courbe longueur-tension passive spécifique au vaisseau. On détermine la longueur d'étirement (F_{60}) nécessaire pour obtenir une circonférence équivalente à une tension passive de 60 mmHg sur le vaisseau suivant la loi de Laplace (L_{60}). Après une équilibration du vaisseau à L_{60} pendant 30 minutes, la réactivité du segment vasculaire est évaluée par l'application de 1 μM de

phényléphrine. Une fois le plateau de réponse atteint, nous vérifions si de l'endothélium fonctionnel est encore présent en ajoutant 10 μM carbachol, un agoniste cholinergique et vasodilatateur dépendant de l'endothélium. S'il y a relaxation ($\geq 10\%$) suivant la stimulation avec le carbachol, ces segments d'artère utérine ne sont pas utilisés. Ensuite, la solution de Krebs baignant les tissus est changée plusieurs fois et on laisse reposer 60 minutes. À ce moment, on ajoute un des modulateurs pharmacologiques (L-NAME, ICI 182,780, TEA, etc.). Après trente minutes, on stimule le vaisseau avec 1 μM de phényléphrine et au plateau de réponse, nous appliquons des concentrations croissantes cumulatives d'œstradiol ($17\alpha\text{-E}_2$ ou $17\beta\text{-E}_2$) afin d'obtenir une courbe concentration-relaxation. Dans notre protocole d'animaux traité avec l'ATD nous avons aussi testé la contraction de ces artères à l'angiotensine. Pour ce faire, nous avons ajouté des doses croissantes d'angiotensine II sur des segments d'artères utérines au repos, c'est-à-dire seulement sous tension mécanique passive (60 mmHg). Les concentrations de chaque substance que nous avons utilisée sont indiquées dans la section résultat et dans la légende de chacune des figures.

DOSAGE ET ÉCHANTILLONNAGE

Au jour 20, nous avons placé les rates sous traitement à l'ATD et celles ayant un placebo dans des cages métaboliques durant 24 h où nous avons mesuré le volume urinaire ainsi que leur consommation d'eau et de nourriture. L'échantillon urinaire recueilli a été utilisé pour doser les concentrations de créatinine, d'urée, de sodium, de potassium, de calcium total et de protéines. Ces analyses ont été effectuées au laboratoire de biochimie clinique du CHU Ste-Justine. Au 22^e jour de gestation, les rates ont été sacrifiées par décapitation. Nous avons prélevé du sang dans trois tubes de prélèvement

différents. Premièrement, nous avons recueilli $\approx 0,5$ mL dans un tube avec anticoagulant, BD Vacutainer K₂EDTA (#367861, Franklin Lake, NJ, USA), dans lequel nous avons prélevé une aliquote avec un microcapillaire (Fisherbrand, Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) pour mesurer l'hématocrite. Deuxièmement, une autre fraction du sang (≈ 1 mL) a été recueillit dans un tube BD Vacutainer Lithium-Heparin (#367886) qui, après centrifugation (1550 g durant 20 minutes à 4°C) a été envoyé au service de biochimie clinique du CHU Ste-Justine pour évaluer la concentration de créatinine, d'urée, de sodium, de potassium et de calcium total. Le sodium et le potassium ont été dosés avec des électrodes spécifiques, le calcium total par réaction colorimétrique, l'urée via une électrode de conductibilité et la créatinine par un test enzymatique colorimétrique. Le sang restant (≈ 4 mL) est recueilli dans un tube BD Vacutainer Serum (#367815), centrifugé à 1,550 g durant 20 minutes à 4°C. Le surnageant (sérum) est congelé pour éventuellement doser les stéroïdes circulants.

Dosage des œstrogènes sanguin

Nous avons utilisé une trousse radioimmunologique pour la détection d'œstradiol dans le sérum suivant le protocole fourni par la compagnie (Double Antibody Estradiol RIA kit, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). Cependant, nous avons eu une réaction croisée des anticorps de cette trousse avec l'ATD retrouvé dans le sérum.

Nous avons alors dosé l'œstradiol sanguin en utilisant un système de chromatographie à phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). Ces expériences ont été faites en collaboration avec Thierry Ntimbane, un étudiant au

doctorat au centre de recherche du CHU Ste-Justine [32, 206]. Le dosage se fait à partir de 500 μL de sérum. Nous avons ajouté 1,5 mL de tampon acétate (pH 5,2) que nous saturons avec du NaCl en poudre, puis nous ajoutons 2 gouttes de HCl (12N) pour précipiter les protéines. On récolte le surnageant et on effectue une double extraction à l'éther d'éthyle pour recueillir les molécules hydrophobes, dont les stéroïdes. Nous avons ensuite fait une dérivation au chlorure de pentafluorobenzoyl (PFBCl), ce qui rend la molécule plus volatile pour utilisation dans le GC-MS. Une fois la réaction arrêtée, nous avons fait une double extraction avec de l'hexane. Les échantillons étaient ensuite séchés complètement et reconstitués dans 50 μL d'hexane avant d'être injectés dans le GC-MS. Des aliquotes de 2 μL ont été injectés dans un système de chromatographie gazeuse Hewlett Packard série 6890 version A.02.14 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) avec une colonne capillaire DB-17HT (2.5 m x 0.1 mm x 0.1 μm) de la compagnie Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Le tout est couplé à spectromètre de masse (Agilent Technologies Mass Selective Detector 5973 Network) utilisé en mode d'ionisation chimique avec du méthane. Nous avons détecté les ions correspondant au ratio de la masse sur la charge (m/z) de 660 et 665 pour le $17\beta\text{-E}_2$ et le standard interne [$^2\text{H}_5$] $17\beta\text{-E}_2$ respectivement. Le programme de température du chromatographe que nous avons utilisé est le suivant : 150°C durant 2 min, augmentation progressive de 20°C/min jusqu'à 280°C et de 5°C/min jusqu'à 325°C. Ensuite, maintenir à 325 °C pendant 2 minutes.

ANALYSES STATISTIQUES

Les pressions artérielles systoliques par mesure indirecte non invasive ou par télémétrie ont été comparées dans chaque groupe avec des valeurs stables de prétraitement par un test d'analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs pour mesures

répétées (Prism 5.0, Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA). Les paramètres physiologiques; soit les données plasmatiques, urinaires et hormonales, le poids des organes et les données fœtales ont été comparés par un test T de Student pour des données non pairées.

Chaque courbe concentration-réponse a été analysée par régression non linéaire selon l'équation logistique à quatre paramètres : $Y = \frac{E_{\max}}{1 + 10^{(\text{LogEC}_{50} - X) \text{Pente}}}$ où « X » est le logarithme de la concentration de l'agoniste et « Y » est la réponse obtenue (% relaxation). Le E_{\max} est l'asymptote de la courbe soit la réponse maximale possible pour cet agoniste. L' EC_{50} est la concentration d'œstrogène nécessaire pour obtenir 50 % de la réponse maximale. La réponse maximale (E_{\max}) et la concentration de l'agoniste nécessaire pour produire 50 % du E_{\max} (EC_{50}) ont été comparées entre les groupes par un test de F (Prism 5.0). Il faut préciser que puisque nous travaillons avec des concentrations réparties de façon égale sur une échelle logarithmique il est important de comparer le $\log EC_{50}$ pour s'assurer de la linéarité des données. Donc, ces données sont exprimées en pD_2 , c'est-à-dire $-\log EC_{50}$ étant pour faciliter l'interprétation des résultats.

PRODUITS CHIMIQUES ET AGENTS PHARMACOLOGIQUES

Tous les produits employés sous forme de sel dans ces expériences (tampons, solutions de Krebs, etc.) étaient de grade analytique provenant de Fisher Scientific (Montréal, QC, Canada) et Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). Les différents solvants proviennent soit de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) ou Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ, USA) Nous nous sommes procuré de l'ATD (1,4,6-androstatrien-3,17-dione) auprès de la compagnie Steraloids Inc. (Newport, RI, U.S.A.). Nous avons été en

mesure d'obtenir une suspension de ce composé dans une solution d'éthanol (10 %)/ propylène glycol. Il était préférable de dissoudre l'ATD dans l'éthanol que l'on réchauffe au bain-marie et ensuite on ajoute le propylène glycol pour obtenir une suspension homogène. Nous nous sommes procuré l'agoniste du GPER (G-1) chez Calbiochem (EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ, USA). Le KT5720, le Rp-8-pCPT-cGMPS, la génistéine, le ICI 182,780, le Tetraethylammonium (TEA), la Cycloheximide, le pentafluorobenzoyl chloride (PFBCl) le 4-aminopyridine (4-AP), le Penitrem A et le Glybenclamide proviennent tous de chez Sigma-Aldrich. Finalement, nous avons obtenu le propylpyrazole triol (PPT), le Diarylpropionitrile (DPN), l'ibériotoxine (IbTX), et le 2-méthoxyestradiol (2-ME) chez Tocris bioscience (Ellisville, MO, USA).

CHAPITRE 3 : MANUSCRIT

Vasorelaxant action of 17 β -estradiol in rat uterine arteries: role of nitric oxide synthases and estrogen receptors [249]

Vasorelaxant action of 17 β -estradiol in rat uterine arteries: role of nitric oxide synthases and estrogen receptors

Pierre-André Scott,^{1,3} André Tremblay,^{1,2} Michèle Brochu,^{1,2} and Jean St-Louis^{1,2,3}

¹Centre de Recherche, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, and Departments of ²Obstetrics and Gynecology and ³Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Submitted 26 June 2007; accepted in final form 15 October 2007

Scott PA, Tremblay A, Brochu M, St-Louis J. Vasorelaxant action of 17 β -estradiol in rat uterine arteries: role of nitric oxide synthases and estrogen receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H3713–H3719, 2007. First published October 19, 2007; doi:10.1152/ajpheart.00736.2007.—The uterine vasculature plays an important role during pregnancy by providing adequate perfusion of the maternal-fetal interface. To this end, substantial remodeling of the uterine vasculature occurs with consequent changes in responsiveness to contractile agents. The purpose of our study was to characterize the vasorelaxant effects of estrogens on vascular smooth muscles of the rat uterine artery during pregnancy and to evaluate the involvement of estrogen receptors (ESR) and nitric oxide synthases (NOS). To do so, we measured NOS expression in the whole uterine and mesenteric circulatory bed by Western blotting. Vasorelaxant effects of 17 β -estradiol (17 β -E₂) were assessed on endothelium-denuded uterine arteries with wire myographs in the absence and presence of pharmacological modulators [nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), ICI-182780, tamoxifen]. All experiments were performed on arteries from nonpregnant (NP) and late pregnant (P) rats. In the uterine vasculature of the latter group, NOS3 (endothelial NOS) expression was increased, while NOS1 (neuronal NOS) was reduced compared with NP rats. Expression of the NOS2 (inducible NOS) isoform was undetectable in the two groups. Both 17 β -E₂ and 17 α -E₂ induced uterine artery relaxation, but the latter evoked lower responses. Endothelium-denuded arteries from NP rats showed larger relaxation with 17 β -E₂ than P rats. This larger relaxation disappeared in the presence of L-NAME. The ESR antagonist ICI-182780 did not affect acute relaxation with 17 β -E₂ and 17 α -E₂. Moreover, membrane-nonpermeant 17 β -E₂:BSA (estradiol conjugated to bovine serum albumin) did not induce any vasorelaxation. Our results indicate that estrogens exert direct acute vasorelaxant effects in smooth muscles of the rat uterine artery that are mediated by mechanisms independent of ESR activation, but with some stereospecificity. Part of this effect, in NP rats only, is due to nitric oxide produced from muscle NOS1.

estrogens; pregnancy

THE UTERINE VASCULATURE plays a pivotal role during pregnancy, being responsible for adequate perfusion of the maternal-fetal interface. To achieve this goal, the substantial remodeling of the uterine vasculature that occurs is characterized in the rat by hypertrophy and hyperplasia of all components of the vessel walls (10). However, the mechanisms involved are still unclear. Pregnancy-induced remodeling of the uterine vasculature results in several functional alterations, such as increased vascular reactivity to different vasoconstrictors (39), while reactivity is reduced in systemic arteries (24, 38).

Pregnancy is also accompanied by major hormonal changes, especially of sex steroids. In women, the plasma concentrations

of estradiol (E₂) range between 0.1 and 0.4 ng/ml during the normal menstrual cycle (1). After conception, the E₂ serum level increases progressively until it reaches 6–30 ng/ml at term (21). In nonpregnant rats, E₂ ranged from 3 to 19 pg/ml during the estrous cycle, rising to 30–57 pg/ml on the last (22nd) day of gestation (15, 20). E₂ has been shown to augment blood flow in the uterine vasculature (22, 32). Given the high exposure of the utero-placental bed to the direct and massive secretion of estrogens during gestation, these hormones should play a significant role in the uterine arterial circulation during pregnancy. Estrogen may act via two different pathways: genomic and nongenomic (2). The simplified classical view of the genomic pathway needs estrogen to bind estrogen receptor (ESR1) (formerly ER α) or ESR2 (formerly ER β), favoring dimerization. The dimer formed can regulate the transcription of target genes that have estrogen response element sequences in their promoter region. On the other hand, estrogen has been reported to induce some of its effects in a short period of time that could not involve new protein synthesis. These rapid actions of estrogen, referred to as nongenomic actions, could arise from endothelial cell activation or occur directly on vascular smooth muscle (VSM) cells (VSMC). Many studies have disclosed that arterial relaxation mediated by estrogen could result from endothelial cell activation, which releases nitric oxide (NO) (7) and leads to cGMP pathway activation in VSMC that could activate calcium-activated potassium channels (33). However, this pathway is probably not the main route through which E₂ elicits vasorelaxation, because it has been demonstrated several times that E₂ can relax endothelium-denuded arteries (9, 18). With the use of pharmacological levels of E₂, vascular relaxation in the absence of endothelium was correlated with decreased Ca²⁺ influx (17, 40), increased K⁺ efflux (41, 44), and intracellular cAMP elevation (25) in VSMC. However, it has been discerned in the porcine coronary artery that E₂ relaxation of VSM requires protein kinase G activation by augmenting cAMP and then possibly opening large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (BK_{Ca}) (18). A more recent study suggested that E₂-induced relaxation involves NO activation of BK_{Ca} in human coronary smooth muscle cells after stimulation of neuronal nitric oxide synthase (nNOS, NOS1) (16).

In addition, seven-transmembrane G protein-coupled receptor 30 (GPR30) has been reported to trigger rapid cellular signaling when activated by estrogen (14). Binding to this receptor was found to be highly specific to 17 β -E₂, with 17 α -E₂ having much less affinity, similar to that of these

Address for reprint requests and other correspondence: J. St-Louis, Centre de Recherche, CHU Sainte-Justine, 3175 Chemin Côte-Sainte-Catherine, Montreal, QC, Canada H3T 1C5 (e-mail: [REDACTED]).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

compounds for ESR (29). GPR30 has been localized in the cytoplasm (13) and probably in the endoplasmic reticulum (29), possibly with a small GPR30 pool at the plasma membrane (12). It has also been shown that GPR30, expressed intracellularly, is capable of initiating cellular signaling, and insufficient GPR30 is expressed on the cell surface to initiate signaling in response to impermeable ligands [E₂:bovine serum albumin (BSA)] (30).

NOS are responsible for the production of NO, a volatile gas with well-known vasorelaxant properties on vascular tissues. NOS exist in three isoforms: NOS3 [endothelial NOS (eNOS)], mainly present in the vascular endothelium; NOS1 (nNOS), present in neurons and innervated tissues, such as smooth muscles; and NOS2 [inducible NOS (iNOS)], inducible and expressed ubiquitously. Several studies have reported that NOS3 expression is increased in the uterine vasculature during estrogen treatment, the follicular phase, and pregnancy, suggesting that endothelially generated NO is involved in the vasorelaxant actions of E₂ (23, 27, 28). However, little is known about changes in NOS2 and NOS1 expression in uterine arteries during pregnancy. NOS1 expression has been shown to be completely abolished in the VSMC of human umbilical cords after preeclamptic pregnancy (36).

Since increased NOS3 expression in the uterine arterial endothelium during pregnancy is well-documented, what are the direct effects of E₂ on uterine arterial smooth muscle (in the absence of endothelium)? How are these effects modulated during pregnancy in regard to the significant remodeling that occurs in arterial walls during this condition? Our study was designed to characterize the acute effect of estrogens on VSM of uterine arteries, determine how it is affected by pregnancy, and establish whether ESR and NO participate in the acute relaxant action of E₂. We hypothesized that the acute action of 17 β -E₂ on endothelium-denuded uterine arteries is mediated by a pathway independent from ESR but involving some participation of nonendothelial NOS.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, QC, Canada; total of 120) weighing 225–250 g were mated with fertile males. The morning on which spermatozoa were found in vaginal smears was considered day 1 of pregnancy. Virgin rats of the same age (\approx 14–15 wk of age) served as controls without consideration of the stage of the estrous cycle. All animals had ad libitum access to food (Teklad global 18% protein rodent diet, Harlan Teklad; Montreal, QC, Canada) and tap water. They were killed by decapitation on day 22 of pregnancy (parturition on day 23). Their uterine horns and small intestine with attached vasculature were removed and placed in cold oxygenated Krebs bicarbonate solution of the following composition (in mmol/l): 118 NaCl, 4.65 KCl, 25 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂, 1.18 MgSO₄, 1.18 KH₂PO₄, and 5.5 dextrose. The uterine vasculature was isolated by blunt dissection of fat and connective tissues. The blood vessels of one uterine horn were detached from the uterus, frozen immediately in liquid nitrogen, and kept at -80°C until being used for Western blots. The main uterine artery of the other horn was prepared for myotropic activity experiment (see below). The mesenteric vascular bed was prepared in a similar way with blunt dissection of fat and connective tissues, detached from the intestine body, and frozen rapidly in liquid nitrogen. This gave a small vascular tree composed of the superior mesenteric artery down to the fourth branch. All animals were housed under controlled light (6 AM–6 PM) and temperature ($21 \pm 3^{\circ}\text{C}$).

The protocols were approved by the local animal care committee, which is accredited by the Canadian Council on Animal Care.

Western blotting. Frozen tissues were powdered with a mortar and homogenized in Tris buffer (mmol/l: 250 Tris·HCl, 10 EDTA, 10 EGTA, pH 7.4). For each uterine artery preparation, we pooled the vasculature of two or three animals to obtain enough protein per sample. The homogenate was centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. Protein concentration in the supernatant was measured by Bradford assay (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) (4). Proteins (45 μg /well) were separated on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels (7.5%) and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were then incubated in blocking solution (Tris-buffered saline-Tween-5% skim dry milk) for 30 min at room temperature. They were then kept overnight at 4°C with primary antibody, washed, and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 30 min at room temperature. Protein loading was estimated on the same gel by cutting the membrane in two and using mouse anti- β -actin primary antibodies on the lower part. Immunoreactive bands were visualized with the enhanced chemiluminescence (ECL) detection system. The samples were compared by scanning densitometry with Alpha Imager software (Alpha Innotech, San Leandro, CA). The antibodies and optimal dilution were anti-NOS3 mouse IgG1 clone 3 (no. 610297; 1/1,000), anti-NOS2 mouse IgG1 clone 54 (no. 610432; 1/5,000), anti-NOS1 mouse IgG2a clone 16 (no. 610309, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA; 1/1,000), anti- β -actin mouse IgG1 clone AC-15 (no. ab6276, Abcam, Cambridge, MA; 1/10,000), and anti-mouse IgG horseradish peroxidase-linked whole antibody from sheep (no. NA931; 1/2,000) (ECL kit, Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada).

Myotropic activity of uterine arteries. The main uterine arteries in the middle portion along the uterine horn were cleaned of fat and connective tissues, and rings (1.5–2.0 mm) were prepared and mounted in wired myographs as described previously (39), with some modifications. For instance, the endothelium was removed by passing Triton X-100 (0.03% vol/vol) in the artery before its mounting on myograph supports similarly to the method of Connor and Feniuk (11). The passive tension applied on the uterine arteries was equivalent to 60 mmHg (L_{60}), which is the passive circumference that the arterial segment would have had at this transmural pressure.

After the arterial segments were set up in myographs, they were stretched three times to minimize subsequent hysteresis and allowed to equilibrate (10 min) in the absence of passive tension. The segments were stretched in steps of ~ 50 μm in diameter until ~ 2 – 3 mN/mm (1 mN = 102 mg) of wall tension was reached. The vessels were held at each length for 2–3 min, and wall tension was recorded. The data were fitted to the exponential curve $y = Ae^{Bx}$ to evaluate L_{60} , as previously described (39). After equilibration at this passive length for 30 min, reactivity of the arterial segments was evaluated by challenge with 1 $\mu\text{mol/l}$ phenylephrine (Phe). At plateau response the absence of a functional endothelium was verified by adding 10 $\mu\text{mol/l}$ carbachol, and only arteries that did not respond were used. The arterial segments were washed three times and, 45 min later, the vessels were restimulated with 1 $\mu\text{mol/l}$ Phe in the absence or presence of nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 $\mu\text{mol/l}$) or ICI-182780 (20 $\mu\text{mol/l}$) added 15 min before Phe. When the plateau response was reached, cumulative concentrations of estrogens (17 α -E₂ or 17 β -E₂) were added to generate concentration-relaxation curves. We also performed these experiments with 17 β -E₂:BSA conjugates, followed by another relaxation to 17 β -E₂.

Statistical analysis. For Western blotting, each value was standardized to β -actin from the same blot. Differences between pregnant (P) and nonpregnant (NP) groups were determined by Student's *t*-test. In the myotropic experiments, responses to estrogens were expressed in percentage of relaxation from the increased tone induced by Phe (1 $\mu\text{mol/l}$). Concentration-relaxation curves were analyzed by nonlinear regression with Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA): $Y = E_{\text{max}}/1 + 10^{(\log EC_{50} - X)\text{slope}}$, where *X* is the logarithm of estrogen

concentration and Y is the response obtained (% relaxation). Maximum response (E_{max}) and the concentration of agonist producing 50% of E_{max} (EC_{50}) were compared between groups by F -test (Prism).

Drugs and chemicals. All salts used in these experiments were of analytical grade and obtained from Fisher Scientific (Montreal, QC, Canada) and Bio-Rad. Phe (phenylephrine hydrochloride), carbachol (carbamylcholine chloride), 17 α -E₂, and 17 β -E₂ were purchased from Sigma (St. Louis, MO). ICI-182780 was procured from Tocris Cookson (Ellisville, MO). 1,3,5(10)-Estratrien-3,17 β -diol-6-one 6-carboxymethylxime:BSA and 1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol 17-hemisuccinate:BSA were purchased from Steraloids (Newport, RI). Stock solutions of ICI-182780, 17 α -E₂, and 17 β -E₂ were prepared in DMSO, and 17 β -estradiol:BSA conjugates were prepared in water.

RESULTS

Uterine artery diameter, under passive tension equivalent to 60 mmHg transmural pressure, increased twofold at the end of pregnancy compared with NP rats (NP $290 \pm 5 \mu\text{m}$, P $560 \pm 7 \mu\text{m}$; $P < 0.001$, $n = 60$ each). As documented previously (39), Phe (1 $\mu\text{mol/l}$) induced a much larger response (almost double) in arteries of P compared with NP rats (Fig. 1, A and B, insets), and this response was not affected by preincubation with L-NAME. 17 β -E₂ evoked concentration-dependent relaxation of the uterine arteries in both groups of animals. However, relative (%) relaxation by 17 β -E₂ in endothelium-denuded uterine arteries was greater in NP compared with P rats (E_{max} , $118 \pm 3\%$ for NP vs. $106 \pm 4\%$ for P; $P < 0.05$, $n = 10$ each) (Fig. 1). This larger relaxation observed in the arteries of NP rats was blocked when their tissues were preincubated with L-NAME (E_{max} , from $118 \pm 3\%$ to $100 \pm 6\%$; $P < 0.01$, $n = 10$ each; Fig. 1A). The stereoisomer 17 α -E₂, documented to have a reduced affinity for ESR (19), induced relaxation of the uterine arteries in both groups, but of significantly reduced magnitude compared with 17 β -E₂. For instance, maximum relative relaxation with 17 α -E₂ in the uterine arteries of NP rats was $76 \pm 10\%$ (Fig. 2B), which was similar for the arteries of P animals. However, sensitivity to both agonists was similar ($-\log EC_{50} = 5.62 \pm 0.13$ for 17 α -E₂ and 5.47 ± 0.05 for 17 β -E₂; not significant).

Preincubation of arterial segments with 20 $\mu\text{mol/l}$ ICI-182780, an ESR antagonist, did not affect the vasorelaxant responses to 17 β -E₂ and 17 α -E₂ (Fig. 2). Similar results were obtained with tamoxifen, an ESR antagonist (data not shown).

Moreover, 17 β -E₂:BSA conjugates, in concentrations similar to those of 17 β -E₂, did not produce any relaxation in endothelium-denuded uterine arteries (data not shown), but 17 β -E₂ then applied confirmed the relaxation capacity of the arterial segments.

We measured NOS expression by Western blot analysis in whole uterine and mesenteric vascular beds, the latter being representative of the systemic circulation in NP and P rats. Figure 3, A and B, show that, in both vasculatures, NOS3 expression was increased at the end of pregnancy, this difference seeming to be relatively more significant in the uterine compared with the mesenteric circulation ($\sim 4.5\times$ vs. $\sim 1.5\times$). NOS2 expression in both vasculatures was undetectable (Fig. 3C; mesenteric not shown). In contrast, we observed that NOS1 was significantly decreased (Fig. 3E) during pregnancy in the uterine but not in the mesenteric vasculature (Fig. 3D).

DISCUSSION

The purpose of this investigation was to characterize the vasorelaxant effects of estrogens on the VSM of uterine arteries and their difference during pregnancy. We wanted to evaluate the involvement of the different NOS and of ESR in relation to the acute relaxation induced by estrogens.

First, we observed that uterine artery diameter doubled before parturition compared with NP rats, indicating that this vessel undergoes considerable remodeling during pregnancy, as occurs in all arteries of this circulatory bed (5, 39). Second, we demonstrated that 17 β -E₂ was able to induce concentration-dependent acute relaxation in endothelium-denuded main uterine arteries. Maximum vasodilatation was greater for NP than P rats (Fig. 1). Furthermore, this larger relative relaxation in arteries of NP rats was reduced after preincubation with L-NAME to the level found in arterial segments from P rats (Fig. 1). These observations demonstrate that E₂ induces direct acute VSM relaxation of the uterine artery in rats, and they suggest some involvement of nonendothelial NO production under 17 β -E₂ application, since the arteries were denuded of their endothelium. Moreover, this NO production in uterine artery VSM is obliterated during gestation.

We have also disclosed that 17 α -E₂ induced smaller maximal relaxations than 17 β -E₂ in uterine arteries. The effect of 17 α -E₂ relative to 17 β -E₂ is a controversial issue in the

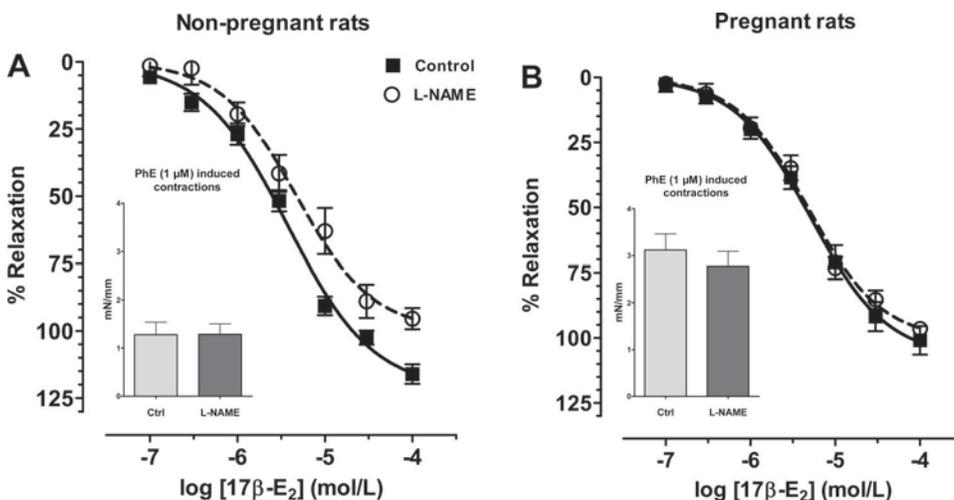


Fig. 1. Estrogen-induced relaxation of isolated uterine arterial segments from non-pregnant (A) and pregnant (B) rats and the effect of preincubation with nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 $\mu\text{mol/l}$). x-Axis depicts the log of 17 β -estradiol (E₂) concentration, while y-axis shows the relative relaxation response in % of phenylephrine (Phe)-induced contraction (inset). The number of vessels used per curve was 9 or 10, all from different animals. Data points represent means \pm SE.

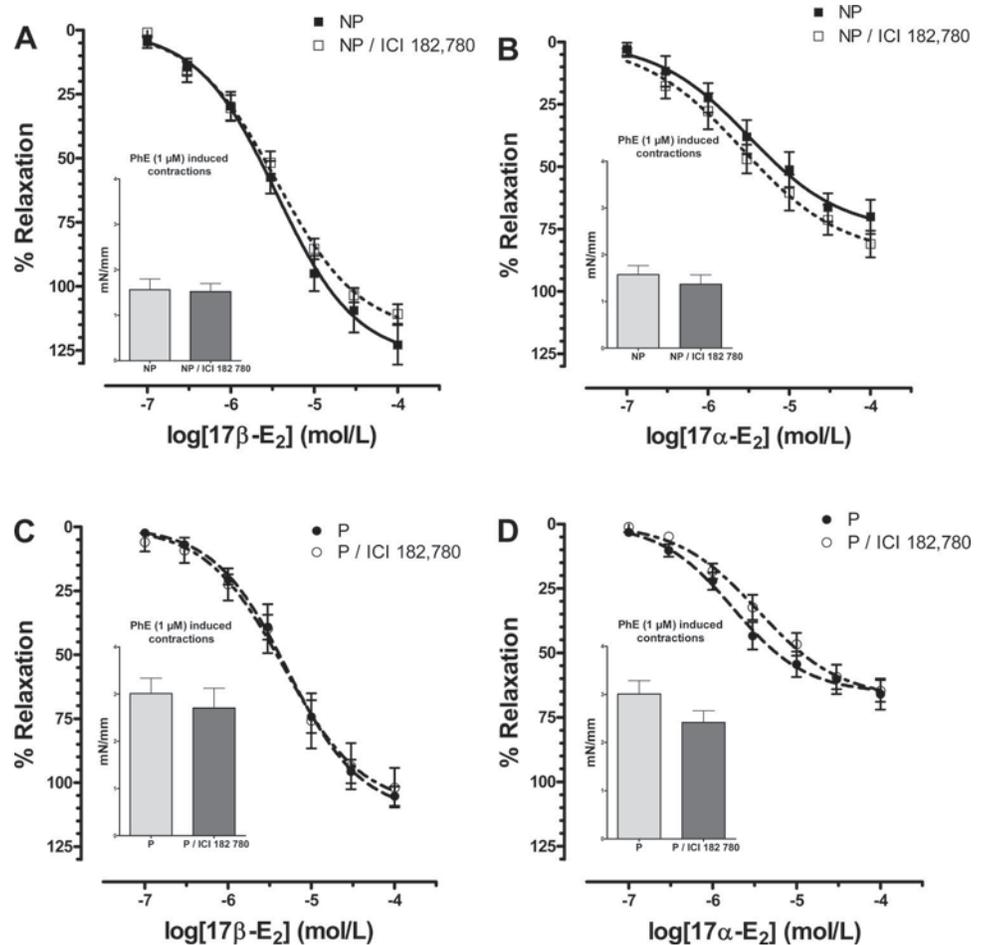


Fig. 2. Concentration-response curves of 17 β -E₂ (A, C) and 17 α -E₂ (B, D) on the endothelium-denuded main uterine artery of non-pregnant (NP; A, B) and pregnant (P; C, D) rats. Open symbols represent the concentration-relaxation curves to 17 β -E₂ or 17 α -E₂ in the presence of ICI-182780 (20 μ mol/l). x-Axis depicts the log of 17 β -E₂ or 17 α -E₂ concentrations, while y-axis shows the relative relaxation response in % of Phe-induced contraction (*inset*). The number of vessels used per curve was 9 or 10, all from different animals. Data points represent means \pm SE.

literature. Indeed, some laboratories have reported that 17 α -E₂ relaxed pig coronary arteries without achieving complete dilatation when contracted with Ca²⁺ (34), while others noted that 17 α -E₂ generated relaxation similar to that of 17 β -E₂ in the mesenteric arteries of rats (26). On the other hand, 17 α -E₂ displayed only minor effects on mesenteric artery diameter over a concentration range similar to the effective vasodilatory concentration of 17 β -E₂ in the same strain of rats (37). Our work reveals that the maximal relaxation induced by 17 α -E₂ is around two-thirds of that generated by 17 β -E₂. Comparison remains difficult, since our experiments were carried out in different arteries (uterine) from animals of a different sex (female). Various vasculatures may present distinct contractile properties. For example, reactivity to Phe in mesenteric arteries is decreased during gestation (24, 38), whereas it is increased in uterine arcuate arteries (39). However, our comparative data on the effects of 17 α -E₂ and 17 β -E₂ indicate that the former acts as a partial agonist compared with the latter, because they have different efficacies with similar potencies. In the present study, maximal vascular effects of estrogens require supra-physiological concentrations of free hormone. We must take into consideration that in order to measure vasorelaxant effects of estrogen the tone of the isolated blood vessels should be increased to supra-physiological levels. High concentrations of vasorelaxant are then needed to induce measurable relaxation. It is now generally accepted that concentrations of estrogen higher than those found in plasma are needed (43).

We also wanted to investigate whether the acute vasodilatory action of 17 β -E₂ was mediated via intracellular or membrane-localized interactions. An earlier study reported that E₂:BSA was able to relax the pressurized mesenteric arteries of rats with intact endothelium (37). The authors suggested that estrogens may have nongenomic effects that appear to be mediated via stereospecific interactions at the plasma membrane level. In our experiments, two different membrane-impermeant, BSA-conjugated 17 β -estradiols (BSA on C17 or C6) were used, and both failed to produce vasorelaxation of endothelium-denuded uterine arteries (data not shown), indicating that estrogen must at least penetrate the plasma membrane of smooth muscle cells to mediate its effects when endothelial cells are removed. To further evaluate ESR involvement in the vasodilatation observed in endothelium-denuded arteries, we performed the same protocol in arterial segments pretreated with ICI-182780 (Fig. 2) or tamoxifen (data not shown) before measuring the concentration-relaxation curves to 17 α -E₂ and 17 β -E₂. These ESR antagonists did not affect relaxation generated by either 17 α -E₂ or 17 β -E₂. This finding suggests that E₂-induced relaxation of uterine artery VSM uses a pathway different from ESR. It has been reported that ICI-182780 was also unable to block estrogen-mediated relaxation in other vasculatures, such as the mesenteric arteries of rats (37) and coronary arteries of dogs (40), while the vasorelaxant effects of 17 β -E₂ were partially inhibited by ICI-182780 in rat aortas (6). This indicates that the

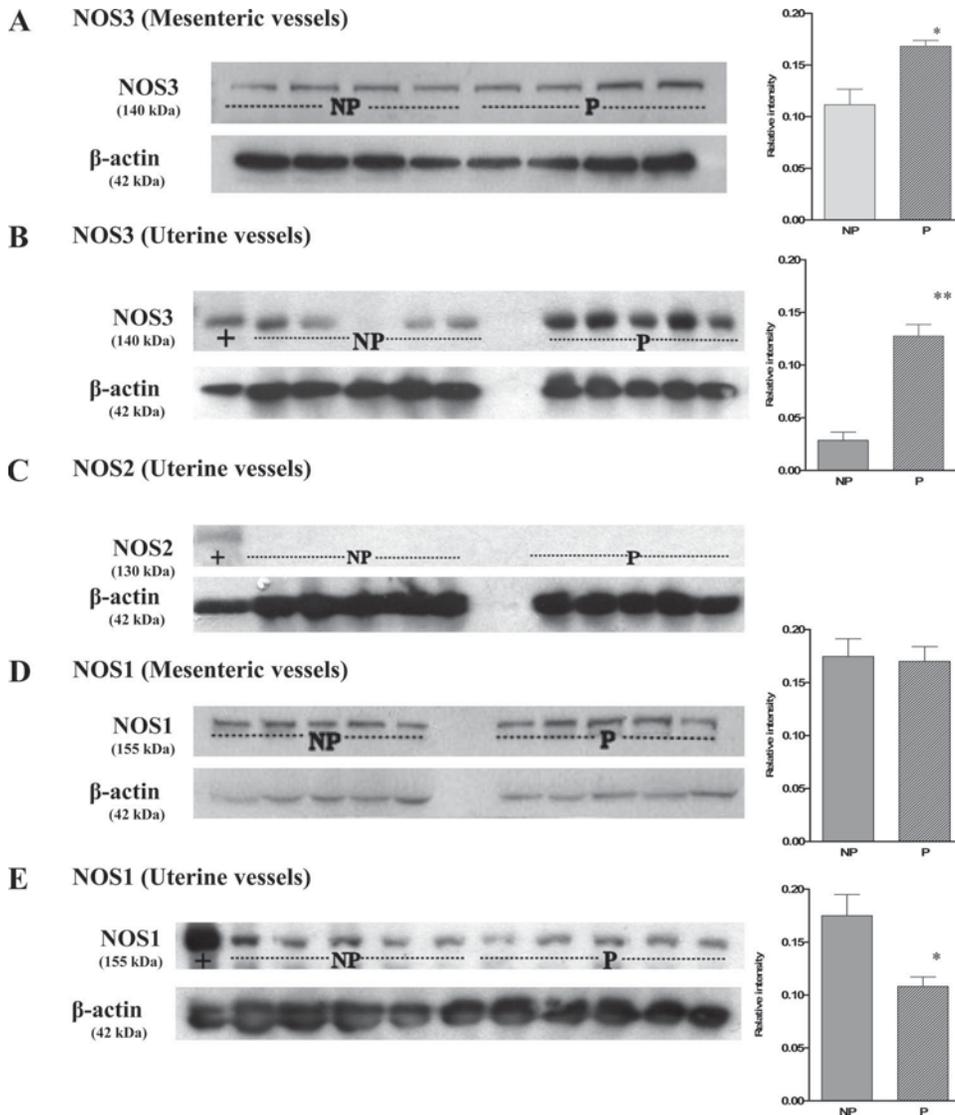


Fig. 3. Western immunoblots showing the protein expression of nitric oxide synthase (NOS)3 (B), NOS2 (C), and NOS1 (E) in uterine vessels as well as NOS3 (A) and NOS1 (D) in mesenteric vessels. Each blot compares protein expression between NP and P (day 22) rats, samples in each well coming from different animals. The positive controls for NOS3, NOS2, and NOS1 were a human endothelial lysate derived from an aortic endothelium cell line, a mouse macrophage lysate from the RAW 264.7 cell line, and a rat pituitary lysate from a pituitary tumor of a female Wistar-Furth rat, respectively, all provided by the antibody supplier. *Right*: protein expression relative to β -actin. Data points represent means \pm SE. * $P \leq 0.01$, ** $P \leq 0.001$.

mechanism by which estrogen exerts its relaxing action could be different in distinct vascular beds and different when the endothelium is present or absent. To our knowledge, our observation is original for the uterine artery. These considerations lead us to postulate that estrogens induce vasodilatation of endothelium-denuded uterine arteries via a mechanism that does not require ESR. However, it shows stereospecificity because 17 α -E₂ also relaxed the uterine arteries with potency similar to that of 17 β -E₂, but with about two-thirds of the latter's efficacy.

As mentioned above, GPR30 is a candidate effector for the nongenomic actions of E₂. It has been determined that GPR30 is located in the cytoplasm and that it initiates cellular signaling from inside the cell (30). Does the absence of relaxation to E₂:BSA and the incapacity of ICI-182780 to block E₂ in our study mean that these responses might be mediated by GPR30? First, we should demonstrate the presence of these molecules in uterine artery VSMC. With growing interest in effectors similar to GPR30, new tools (agonists) (3) should be developed, and it will then be imperative to see whether this receptor

is involved in the vasorelaxant effects of E₂ observed in uterine arteries.

We showed by Western blotting that NOS3 expression was increased in mesenteric and uterine vessels during gestation. These data are in agreement with several other studies in animals (23, 28) and humans (27). Moreover, the relative increase of NOS3 in uterine vessels was higher than in mesenteric vessels, as also reported in ewes (23). Despite these observations, augmented NOS3 expression cannot be evoked to explain the higher relaxation generated by 17 β -E₂ in NP compared with P rats, since our myotropic experiments were carried out in uterine arteries denuded of their endothelium, and NOS3 was found exclusively in the endothelium of uterine arteries of sheep and ewes (8, 35). In addition, we were unable to detect NOS2 in uterine and mesenteric vessels. These results concur with several studies in which NOS2 was not seen in the uterine or resistance vessels of animals (35, 42) and humans (27). Finally, we showed that NOS1 expression did not vary in mesenteric vessels, while it was markedly decreased in uterine vessels at the end of gestation. Another investigation reported

that NOS1 expression tended to be reduced during pregnancy in human uterine arteries but did not reach significance (27). In contrast, Rosenfeld et al. (31) noted increased NOS1 expression in the uterine arteries of ewes after daily 17 β -E₂ administration. Our data indicate that NOS1 is responsible for NO production in the VSMC of uterine arteries in NP rats. This NO production allows the larger vasorelaxation induced by 17 β -E₂ and is lost during pregnancy when NOS1 expression is decreased.

In conclusion, in the present study, we demonstrate that 17 β -E₂ and 17 α -E₂ induced relaxation of the uterine arteries by an endothelium-independent mechanism. Also, 17 β -E₂ produced larger relative relaxation in endothelium-denuded uterine arteries of NP compared with P rats because of higher NO production, believed to derive from NOS1. Because E₂:BSA conjugates did not relax the uterine arteries, we think that estrogen can relax them by some intracellular interactions in smooth muscle cells, this response being ESR independent, since ESR antagonists were unable to block 17 β -E₂, and 17 α -E₂-induced relaxation. However, this acute effect of estrogens manifested some stereospecificity, indicating that a putative, receptive, specific structure is responsible for the effect. A better understanding of the mechanisms by which estrogens influence uterine vascular function and remodeling during pregnancy may help us to know what causes reduced perfusion of the utero-placental unit in clinical conditions such as intrauterine growth restriction.

GRANTS

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Grant MOP 62790 to J. St. Louis, and P.-A. Scott was the recipient of a studentship from the CIHR.

REFERENCES

- Abraham GE, Odell WD, Swerdloff RS, Hopper K. Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, and estradiol-17 β during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 34: 312–318, 1972.
- Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 19: 833–842, 2005.
- Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, Parker MA, Tkachenko SE, Savchuck NP, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol* 2: 207–212, 2006.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254, 1976.
- Bruce NW. The distribution of blood flow to the reproductive organs of rats near term. *J Reprod Fertil* 46: 359–362, 1976.
- Bucci M, Roviezzo F, Cicala C, Pinto A, Cirino G. 17- β -Oestradiol-induced vasorelaxation in vitro is mediated by eNOS through hsp90 and akt/pkb dependent mechanism. *Br J Pharmacol* 135: 1695–1700, 2002.
- Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. 17 β -Estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. *Circ Res* 81: 885–892, 1997.
- Chen DB, Jia S, King AG, Barker A, Li SM, Mata-Greenwood E, Zheng J, Magness RR. Global protein expression profiling underlines reciprocal regulation of caveolin 1 and endothelial nitric oxide synthase expression in ovariectomized sheep uterine artery by estrogen/progesterone replacement therapy. *Biol Reprod* 74: 832–838, 2006.
- Chester AH, Jiang C, Borland JA, Yacoub MH, Collins P. Oestrogen relaxes human epicardial coronary arteries through non-endothelium-dependent mechanisms. *Coron Artery Dis* 6: 417–422, 1995.
- Cipolla M, Osol G. Hypertrophic and hyperplastic effects of pregnancy on the rat uterine arterial wall. *Am J Obstet Gynecol* 171: 805–811, 1994.
- Connor HE, Feniuk W. Role of endothelium in haemoglobin-induced contraction of dog basilar artery. *Eur J Pharmacol* 140: 105–108, 1987.
- Filardo E, Quinn J, Pang Y, Graeber C, Shaw S, Dong J, Thomas P. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology* 148: 3236–3245, 2007.
- Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, Resnick MB, Giri D, DeLellis RA, Steinhoff MM, Sabo E. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin Cancer Res* 12: 6359–6366, 2006.
- Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* 14: 1649–1660, 2000.
- Garland HO, Atherton JC, Baylis C, Morgan MRA, Milne CM. Hormone profiles for progesterone, oestradiol, prolactin, plasma renin activity, aldosterone and corticosterone during pregnancy and pseudopregnancy in two strains of rat: correlation with renal studies. *J Endocrinol* 113: 435–444, 1987.
- Han G, Ma H, Chintala R, Miyake K, Fulton DJ, Barman SA, White RE. Nongenomic, endothelium-independent effects of estrogen on human coronary smooth muscle are mediated by type I (neuronal) NOS and PI3-kinase-Akt signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H314–H321, 2007.
- Han SZ, Karaki H, Ouchi Y, Akishita M, Orimo H. 17 β -Estradiol inhibits Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release induced by thromboxane A₂ in porcine coronary artery. *Circulation* 91: 2619–2626, 1995.
- Keung W, Vanhoutte PM, Man RY. Acute impairment of contractile responses by 17 β -estradiol is cAMP and protein kinase G dependent in vascular smooth muscle cells of the porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol* 144: 71–79, 2005.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138: 863–870, 1997.
- Leiberman JR, Wiznitzer A, Glezerman M, Feldman B, Levy J, Sharoni Y. Estrogen and progesterone receptors in the uterine artery of rats during and after pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 51: 35–40, 1993.
- Lindberg BS, Johansson ED, Nilsson BA. Plasma levels of nonconjugated oestrone, oestradiol-17 β and oestriol during uncomplicated pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 32: 21–36, 1974.
- Magness RR, Rosenfeld CR. Local and systemic estradiol-17 β : effects on uterine and systemic vasodilation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 256: E536–E542, 1989.
- Magness RR, Shaw CE, Phernetton TM, Zheng J, Bird IM. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. II. Pregnancy effects on NO synthase expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 272: H1730–H1740, 1997.
- Massicotte G, St-Louis J, Parent A, Schiffrin EL. Decreased in vitro responses to vasoconstrictors during pregnancy in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 2466–2471, 1987.
- Mugge A, Riedel M, Barton M, Kuhn M, Lichtlen PR. Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 β -oestradiol in vitro. *Cardiovasc Res* 27: 1939–1942, 1993.
- Naderali EK, Walker AB, Doyle P, Williams G. Comparable vasorelaxant effects of 17 α - and 17 β -oestradiol on rat mesenteric resistance arteries: an action independent of the oestrogen receptor. *Clin Sci (Lond)* 97: 649–655, 1999.
- Nelson SH, Steinsland OS, Wang Y, Yallampalli C, Dong YL, Sanchez JM. Increased nitric oxide synthase activity and expression in human uterine artery during pregnancy. *Circ Res* 87: 406–411, 2000.
- Ni Y, Meyer M, Osol G. Gestation increases nitric oxide-mediated vasodilation in rat uterine arteries. *Am J Obstet Gynecol* 176: 856–864, 1997.
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307: 1625–1630, 2005.
- Revankar CM, Mitchell HD, Field AS, Burai R, Corona C, Ramesh C, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. Synthetic estrogen derivatives demonstrate the functionality of intracellular GPR30. *ACS Chem Biol* 2: 536–544, 2007.

31. **Rosenfeld CR, Chen C, Roy T, Liu X.** Estrogen selectively up-regulates eNOS and nNOS in reproductive arteries by transcriptional mechanisms. *J Soc Gynecol Investig* 10: 205–215, 2003.
32. **Rosenfeld CR, Killam AP, Battaglia FC, Makowski EL, Meschia G.** Effect of estradiol-17, on the magnitude and distribution of uterine blood flow in nonpregnant, oophorectomized ewes. *Pediatr Res* 7: 139–148, 1973.
33. **Rosenfeld CR, White RE, Roy T, Cox BE.** Calcium-activated potassium channels and nitric oxide coregulate estrogen-induced vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H319–H328, 2000.
34. **Salas E, Lopez MG, Villarroya M, Sanchez-Garcia P, De PR, Dixon WR, Garcia AG.** Endothelium-independent relaxation by 17- α -estradiol of pig coronary arteries. *Eur J Pharmacol* 258: 47–55, 1994.
35. **Salhab WA, Shaul PW, Cox BE, Rosenfeld CR.** Regulation of types I and III NOS in ovine uterine arteries by daily and acute estrogen exposure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H2134–H2142, 2000.
36. **Schonfelder G, Fuhr N, Hadzidiakos D, John M, Hopp H, Paul M.** Preeclampsia is associated with loss of neuronal nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells of the human umbilical cord. *Histopathology* 44: 116–128, 2004.
37. **Shaw L, Taggart MJ, Austin C.** Mechanisms of 17 β -oestradiol induced vasodilatation in isolated pressurized rat small arteries. *Br J Pharmacol* 129: 555–565, 2000.
38. **St-Louis J, Paré H, Roy B, Brochu M.** Decreased response to vasopressin in the mesenteric resistance arteries of pregnant rats: effects of nifedipine and Bay K 8644. *J Soc Gynecol Investig* 2: 516–522, 1995.
39. **St-Louis J, Paré H, Sicotte B, Brochu M.** Increased reactivity of uterine arcuate artery throughout pregnancy and postpartum. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 273: H1148–H1153, 1997.
40. **Sudhir K, Chou TM, Mullen WL, Hausmann D, Collins P, Yock PG, Chatterjee K.** Mechanisms of estrogen-induced vasodilation: in vivo studies in canine coronary conductance and resistance arteries. *J Am Coll Cardiol* 26: 807–814, 1995.
41. **Tsang SY, Yao X, Chan HY, Wong CM, Chen ZY, Au CL, Huang Y.** Contribution of K⁺ channels to relaxation induced by 17 β -estradiol but not by progesterone in isolated rat mesenteric artery rings. *J Cardiovasc Pharmacol* 41: 4–13, 2003.
42. **Vagnoni KE, Shaw CE, Phernetton TM, Meglin BM, Bird IM, Magness RR.** Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. III. Ovarian and estrogen effects on NO synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 275: H1845–H1856, 1998.
43. **White RE.** Estrogen and vascular function. *Vascul Pharmacol* 38: 73–80, 2002.
44. **White RE, Darkow DJ, Lang JL.** Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ Res* 77: 936–942, 1995.



CHAPITRE 4 : RÉSULTATS

PROJET SUR L'ÉTUDE DES MÉCANISMES DE LA RELAXATION RAPIDE DU 17 β -ŒSTRADIOL

Les expériences sur l'étude des mécanismes de la relaxation rapide de l'œstradiol ont été faites avec des artères utérines dénudées d'endothélium qui ont été précontractées avec de la phényléphrine (1 μ M). L'absence d'endothélium fonctionnel est confirmée lorsqu'aucune relaxation n'est obtenue en ajoutant 10 μ M de carbachol, un agoniste cholinergique et vasodilatateur dépendant de l'endothélium, après contraction à la phényléphrine (1 μ M).

La figure 15 montre l'effet d'une préincubation avec différents bloqueurs de canaux potassiques sur la relaxation induite par le 17 β -E₂. Cette relaxation est similaire entre les artères contrôles et celles en présence des différents inhibiteurs, excepté pour le penitrem A et la 4-aminopyridine lorsqu'ils sont ajoutés à la solution de Krebs. La courbe de relaxation au 17 β -E₂ avec une préincubation au penitrem A (figure 15B) a été déplacée vers la droite, tandis que celle traitée avec la 4-aminopyridine réduit la relaxation maximale (figure 15D). Le tableau 2 rapporte la mesure de la relaxation maximale et de la sensibilité (PD₂) de l'effet du 17 β -E₂ et montre la différence entre les valeurs du groupe contrôle avec celles du penitrem A et de la 4-aminopyridine.

La figure 16 montre les résultats d'une autre série d'expériences utilisant différents modulateurs pharmacologiques. Nous avons utilisé un antagoniste (ICI 182,780) des récepteurs nucléaires aux œstrogènes (ER α , ER β), un inhibiteur sélectif de la protéine kinase A (KT5720) et G (Rp-8-pCPT-cGMPS) et un inhibiteur de synthèse protéique (Cycloheximide). La figure 16 et le tableau 3 nous montre qu'aucun de ces traitements ne modifie la dilatation de l'artère utérine engendrée par l'œstradiol.

Finalement, nous avons effectué d'autres séries d'expériences où nous avons évalué la relaxation induite par différents agents vasorelaxants par comparaison au 17β - E_2 . Les résultats de ces expériences sont illustrés dans la figure 17 et le tableau 4. La relaxation induite par la génistéine sur des artères utérines dénudées de leur endothélium et précontracté avec $1\ \mu\text{M}$ de phényléphrine est similaire à celle provoquée par des concentrations équivalentes de 17β - E_2 . De plus, le ICI 182,780, antagoniste des $ER\alpha$ et $ER\beta$, est incapable d'enrayer cette relaxation du vaisseau par la génistéine (Figure 17A). Quant au ICI 182,780, il n'est pas apte à lui seul de provoquer une relaxation des artères utérines (Figure 17B). Les agonistes sélectif pour $ER\alpha$ (PPT) et $ER\beta$ (DPN), induisent tout deux une relaxation comparable au groupe contrôle (Figure 17C et D). D'autre part, nous avons utilisé l'agoniste G-1 spécifique au récepteur à protéine G qui est activé par l'œstrogène (GPER) pour évaluer son action vasorelaxante sur les artères utérines. Cet agoniste du GPER a été incapable de provoquer une relaxation significative des artères utérines (Figure 17E). Finalement, nous avons mesuré la relaxation induite par le 2-methoxyœstradiol. Le 2-ME est un métabolite de l'œstradiol qui possède une très faible affinité pour les récepteurs nucléaires des œstrogènes. Il possède néanmoins des propriétés antiangiogéniques et antiprolifératives sur les cellules musculaires lisses, mais aussi une capacité à réduire la contraction musculaire d'aorte [98] ou d'artère fémorale [145]. De notre côté, nous avons observé que le 2-ME est apte à relaxer les artères utérines dénudées d'endothélium avec une efficacité et une puissance similaire au 17β - E_2 (Figure 17F).

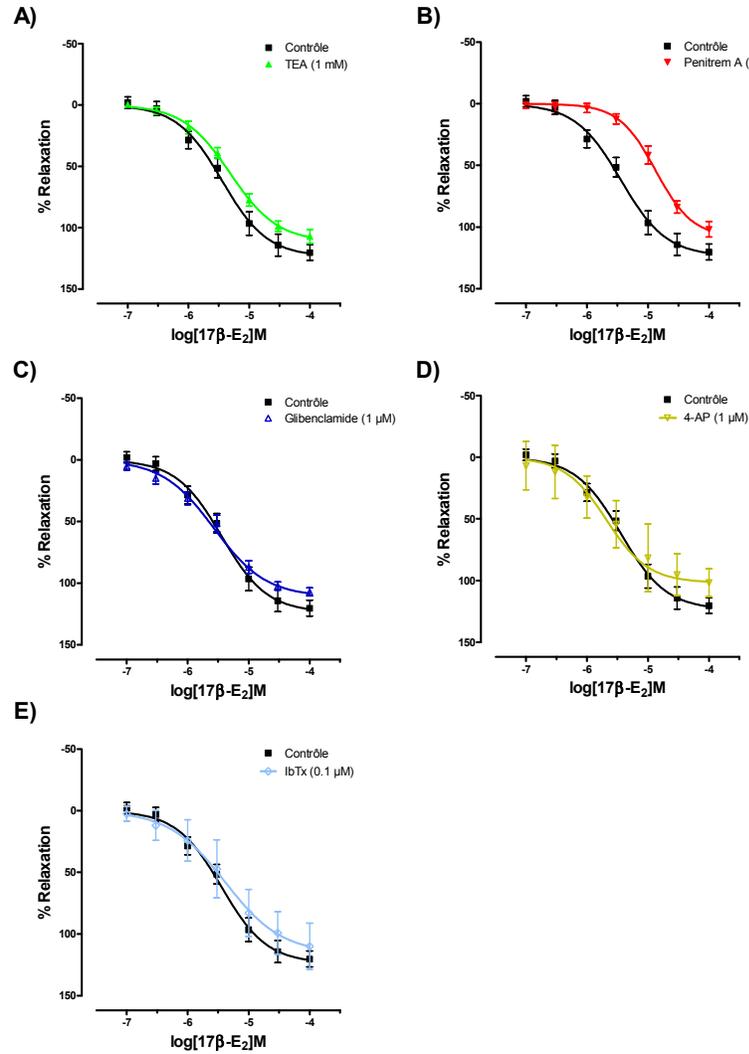


Figure 15 : Courbes concentration-réponse comparant la relaxation induite par le $17\beta\text{-E}_2$ sur des artères utérines de rates non gestantes précontractées avec $1\ \mu\text{M}$ de phényléphrine et suivant une préincubation avec différents bloqueurs de canaux potassique. A) Tetraethylammonium B) Penitrem A C) Glibenclamide D) 4-Aminopyridine E) Iberiotoxin. L'axe des x représente le log de la concentration de $17\beta\text{-E}_2$ et l'axe des y montre le % de relaxation relative à la contraction induite par $1\ \mu\text{M}$ de phényléphrine. Chaque point représente la moyenne des valeurs pour chaque concentration de $17\beta\text{-œstradiol}$ appliquée et les barres représentent l'erreur standard à la moyenne (ESM).

Tableau 2 : Efficacité et puissance de la relaxation au 17 β -E₂ sur des artères utérines de rates non gestantes avec différents inhibiteurs des canaux potassiques.

Groupes	n	17 β -E ₂		
		E _{max} (%)	pD ₂	EC ₅₀ (μ M)
Contrôle	10	123.5 \pm 7.7	5.445 \pm 0.093	3.6
TEA (1 mM)	10	111.4 \pm 5.3	5.312 \pm 0.069	4.9
Penitrem A (0.1 μ M)	10	108.2 \pm 7.8	4.875 \pm 0.074	** 13.3
Glibenclamide (1 μ M)	12	111.0 \pm 4.4	5.568 \pm 0.066	2.7
4-AP (1 μ M)	10	102.6 \pm 4.5 *	5.618 \pm 0.070	2.1
lbTx (0.1 μ M)	7	115.6 \pm 8.8	5.385 \pm 0.120	4.1

** p < 0.0001, * p < 0.05

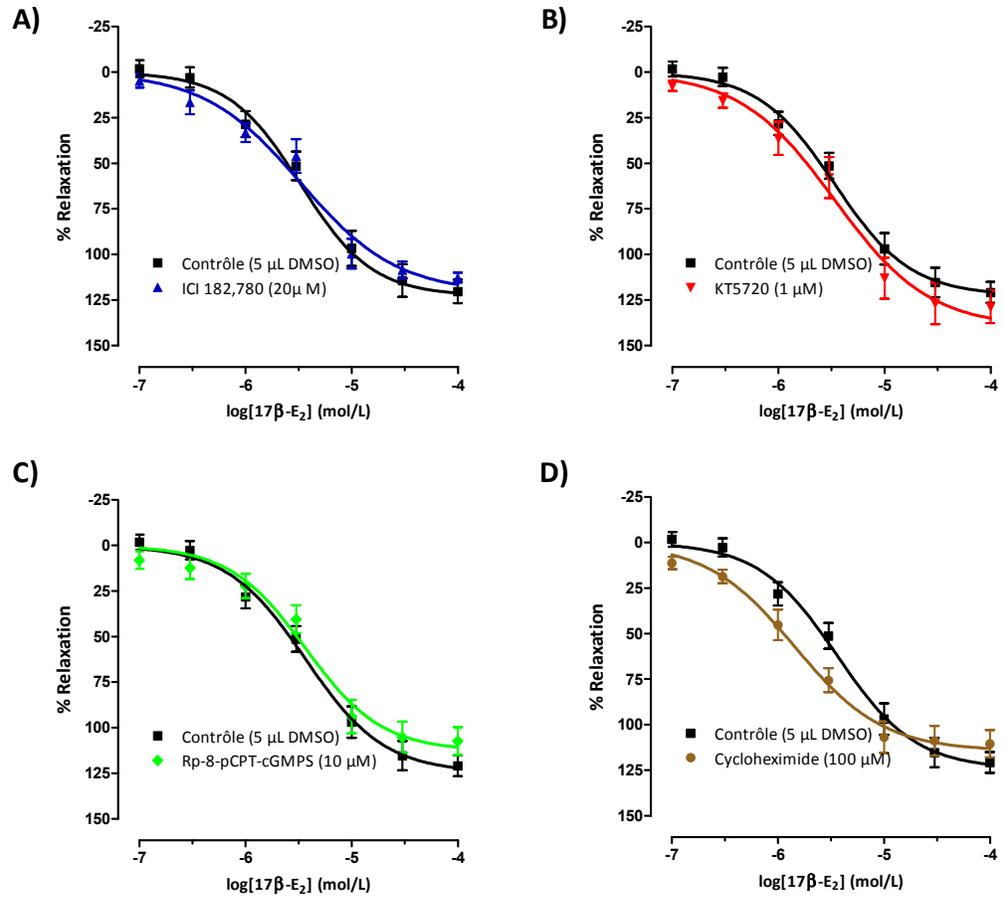


Figure 16 : Courbes concentration-réponse comparant la relaxation induite par le 17β-E2 sur des artères utérines précontractées avec 1 μM de phényléphrine et suivant une préincubation avec différents inhibiteurs. A) ICI 182,780 B) KT5720 C) Rp-8-[(4-Chlorophenyl)thio]-cGMPS D) Cycloheximide. L'axe des x représente le log de la concentration de 17β-E2 et l'axe des y montre le % de relaxation relative à la contraction induite par 1 μM de phényléphrine. Chaque point représente la moyenne des valeurs pour chaque concentration d'inhibiteurs appliquées et les barres représentent l'erreur standard à la moyenne (ESM).

Tableau 3 : Efficacité et puissance de la relaxation au 17 β -E₂ sur des artères utérines de rates non gestantes avec différents inhibiteurs de protéine kinases, des ERs ou de synthèse protéique.

Groupes	<i>n</i>	17 β -E ₂		
		E _{max} (%)	pD ₂	EC ₅₀ (μ M)
Contrôle	10	122.6 \pm 6.5	5.482 \pm 0.078	3.3
ICI 182,780 (20 μ M)	9	120.8 \pm 8.1	5.484 \pm 0.107	3.3
KT5720 (1 μ M)	9	137.2 \pm 10.4	5.509 \pm 0.120	3.1
Rp-8-pCPT-cGMPS (10 μ M)	8	113.0 \pm 7.9	5.428 \pm 0.102	3.7
Cycloheximide (100 μ M)	7	114.4 \pm 6.0	5.841 \pm 0.091	1.4

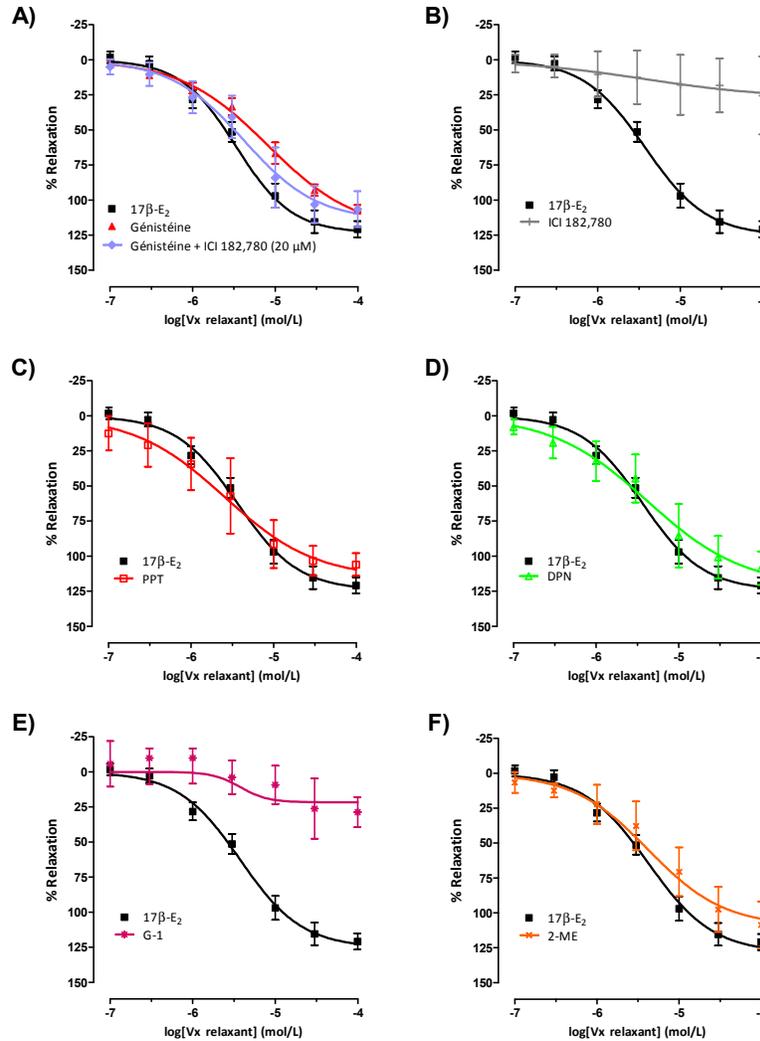


Figure 17 : Courbes concentration-réponse mesurant la relaxation induite par différents agents vasorelaxant et comparée au 17β-E₂ sur des artères utérines précontractées avec 1 μM de phényléphrine. A) Génistéine et Génistéine + préincubation avec ICI 182,780 (20 μM) B) ICI 182,780 C) PPT D) Diarylpropionitrile ou DPN E) Agoniste du GPER, G-1 F) 2-méthoxyœstradiol. L'axe des x représente le log de la concentration de 17β-E₂ et l'axe des y montre le % de relaxation relative à la contraction induite par 1 μM de phényléphrine. Chaque point représente la moyenne des valeurs pour chaque concentration d'agent vasorelaxant appliquée et les barres représentent l'erreur standard à la moyenne (ESM).

Tableau 4 : Efficacité et puissance de la relaxation induite par différents vasorelaxants sur des artères utérines de rates non gestantes.

Groupes	<i>n</i>	Vasorelaxant			
		E_{max} (%)		pD_2	EC_{50} (μM)
Contrôle (17 β -E2)	10	123.3 \pm 5.9		5.474 \pm 0.070	3.4
Génistéine	10	121.8 \pm 10.7		5.089 \pm 0.133	8.1
Génistéine + ICI 182,780 (20 μM)	11	114.6 \pm 5.6		5.38 \pm 0.075	4.2
ICI 182,780	5	30.9 \pm 34.3		---	
PPT	8	115.5 \pm 8.4		5.593 \pm 0.129	2.6
DPN	8	121.7 \pm 10.8		5.377 \pm 0.153	4.2
Agoniste G-1	5	27.4 \pm 5.7		---	
2-methoxyœstradiol	7	124.5 \pm 12.2		5.141 \pm 0.154	7.2

INHIBITION DE L'AROMATASE

A) Mesures pléthysmographiques

Paramètres physiologiques

Pour cette partie de l'étude nous avons utilisé deux groupes de rates dont l'un a reçu un traitement avec un inhibiteur d'aromatase et l'autre a rempli la fonction de groupe contrôle. Durant les 13 premiers jours de gestation, nos deux groupes expérimentaux ont résidé dans les mêmes conditions. À compter du jour 14, le groupe aromatase a reçu des injections d'ATD de 5 mg/jour et le groupe contrôle des injections du véhicule seulement. Nous avons mesuré différents paramètres physiologiques pour évaluer si le traitement influençait la progression de la grossesse. Nous avons comparé entre les deux groupes si les paramètres physiologiques de la mère, les paramètres fœtaux, le poids des organes de la mère et leur ratio, les paramètres sanguins et urinaires. Toutes ces analyses sont énumérées dans les tableaux 5 à 9. En comparant entre le groupe contrôle et celui traité avec l'ATD avec un test de t , il n'y aucune différence statistique pour les différents éléments physiologiques.

Tableau 5 : Effets de l'administration d'ATD (5 mg/jour) sur le gain de poids, la consommation de nourriture et d'eau chez des rates gestantes pour la durée du traitement.

	Contrôle (6)	ATD (9)
Gain de poids (g)	70.7 ± 6.6	61.0 ± 3.5
Consommation eau (mL)	364.0 ± 21.2	303.0 ± 19.2
Consommation nourriture (g)	194.7 ± 35.8	154.6 ± 4.4

Tableau 6 : Effets du traitement avec l'ATD (5 mg/jour) sur les paramètres fœtaux chez des rates gestantes.

	Contrôle (6)	ATD (9)
Poids moyen des placentas (g)	0.460 ± 0.014	0.478 ± 0.016
Poids moyen des ratons (g)	4.76 ± 0.16	4.99 ± 0.15
Poids des placentas/Poids des bébés (%)	9.70 ± 0.46	9.69 ± 0.50
Nombre de ratons/portée	15.2 ± 1.0	15.6 ± 0.5

Tableau 7 : Effets du traitement avec l'ATD (5 mg/jour) sur le poids de différents organes chez des rates gestantes.

	Contrôle (6)	ATD (9)
Coeur	0.868 ± 0.013	0.828 ± 0.023
Ventricule gauche	0.597 ± 0.015	0.564 ± 0.018
Reins	1.65 ± 0.05	1.55 ± 0.06
Ovaires	0.151 ± 0.011	0.133 ± 0.005
Coeur/Poids corporel	0.224 ± 0.005	0.215 ± 0.005
Ventricule gauche/Poids corporel	0.154 ± 0.004	0.146 ± 0.003
Reins/Poids corporel	0.424 ± 0.017	0.405 ± 0.017
Ovaires/Poids corporel	0.039 ± 0.003	0.035 ± 0.001

Tableau 8 : Effets du traitement avec l'ATD (5 mg/jour) sur les paramètres sanguins chez des rates gestantes.

	Contrôle (6)	ATD (9)
Urée (mmol/L)	5.48 ± 0.21	4.89 ± 0.26
Créatinine (μmol/L)	48.8 ± 2.9	51.0 ± 4.3
Sodium (mmol/L)	136 ± 1	136 ± 1
Potassium (mmol/L)	6.30 ± 0.318	6.18 ± 0.28
Calcium total (mmol/L)	1.88 ± 0.34	1.99 ± 0.13
Osmolalité (mOsmol/kg H₂O)	294 ± 1	295 ± 3
Hématocrite (%)	41.2 ± 2.1	39.9 ± 0.5

Tableau 9 : Effets du traitement avec l'ATD (5 mg/jour) sur les paramètres urinaires chez des rates gestantes.

	Contrôle (6)	ATD (9)
Consommation d'eau (mL/24h)	40.8 ± 6.2	31.7 ± 4.6
Volume urinaire (mL/24h)	17.1 ± 4.5	10.4 ± 3.0
Bilan hydrique (mL/24h)	23.7 ± 3.5	21.3 ± 2.2
Urée (mmol/24h)	5.64 ± 0.72	4.51 ± 0.38
Créatinine (µmol/24h)	75.8 ± 2.7	62.1 ± 5.3
Sodium (mmol/24h)	0.530 ± 0.103	0.394 ± 0.056
Potassium (mmol/24h)	2.02 ± 0.25	1.47 ± 0.16
Calcium total (mmol/24h)	0.087 ± 0.017	0.055 ± 0.015

Pression artérielle systolique

Le graphique suivant (Figure 18) nous montre l'effet d'un traitement avec 5 mg d'ATD par jour sur la pression artérielle systolique des rates durant les jours 12 à 22 de leur gestation. L'analyse des données par une ANOVA à deux facteurs pour des données répétées nous indique que le temps est un déterminant significatif dans la variation des données. C'est-à-dire que l'on observe ici aussi une baisse significative de la pression artérielle systolique avec la progression de grossesse, comme nous avons déjà publié auparavant [16, 243, 257]. Celle-ci est statistiquement identique entre les deux groupes donc le traitement avec l'ATD n'apporte aucun changement sur la pression. Or, un post-test de Bonferroni comparant le point d'une courbe avec l'autre, à chaque jour, nous montre qu'au jour 20 il y a une pression plus élevée chez les rates ATD sans que celle-ci soit significative. On suppose alors qu'il y a un léger retard de la baisse de pression associée à la grossesse dans le groupe ATD.

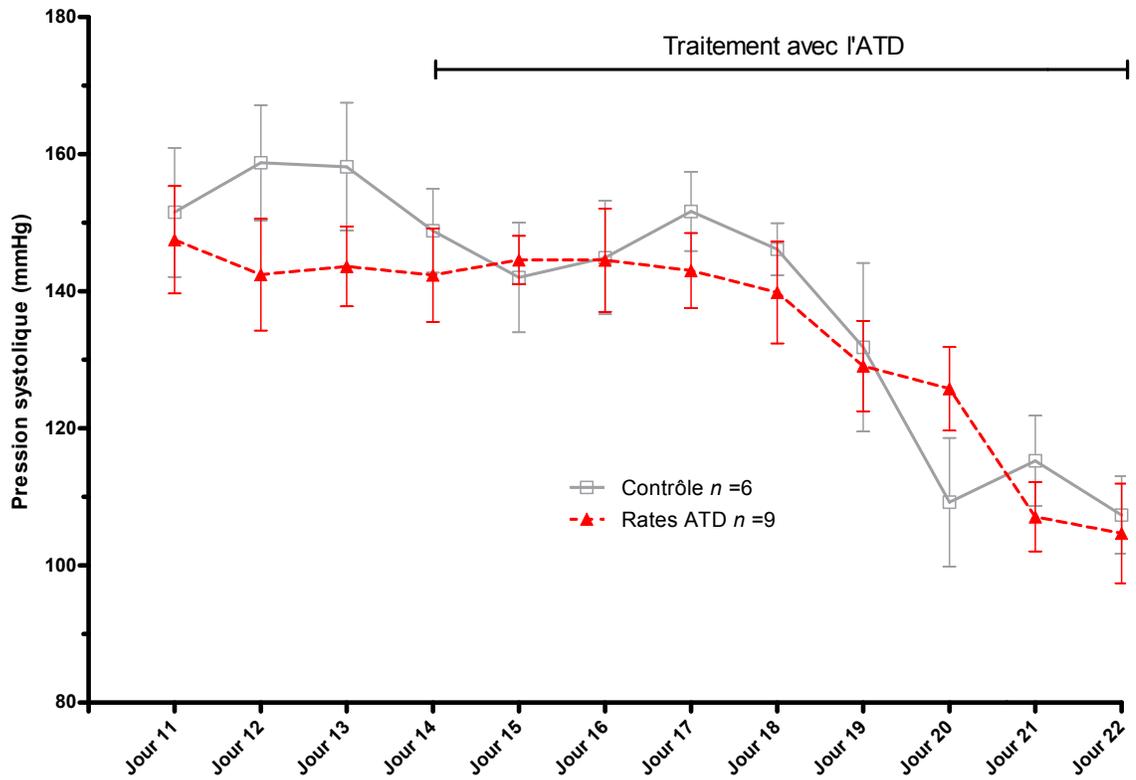


Figure 18 : Effets du traitement avec l'ATD (5 mg/jour) sur la pression artérielle systolique obtenue par méthode de mesure indirecte au niveau de la queue entre le jour 11 et 22 chez des rates gestantes. Chaque point représente la moyenne des valeurs pour chaque jour et les barres représentent l'erreur standard à la moyenne (ESM).

Réactivité vasculaire

Le traitement à l'ATD que nous avons administré à des rates gestantes avait pour but de voir si nous aurions un effet sur le remodelage vasculaire utérin. Pour ce faire, nous avons effectué des expériences pour vérifier la réactivité vasculaire de segments d'artère

utérine. Avant chaque série d'expériences nous avons étiré mécaniquement les vaisseaux à une pression transmurale équivalente à 60 mmHg qui correspond sensiblement à la pression physiologique de ce vaisseau. À cette pression appliquée, nous pouvons déduire que le diamètre du vaisseau est inchangé chez les rates traitées avec l'ATD (Ctrl : $477 \pm 24 \mu\text{m}$ n = 6; ATD : $487 \pm 26 \mu\text{m}$ n = 9; NS; Figure 19). Par la suite, nous avons évalué la réactivité vasculaire à l'angiotensine II des artères utérines dénudées de leur endothélium (Figure 20). Suite au traitement à l'ATD, la courbe concentration-réponse à l'ANG II est similaire au groupe contrôle. (pD_2 ; Ctrl : 9.61 ± 0.15 n = 6; ATD : 9.55 ± 0.11 n = 9; NS). (E_{max} ; Ctrl : 3.56 ± 0.33 mN/mm n = 6; ATD : 3.08 ± 0.23 mN/mm n = 9; NS). Nous avons aussi mesuré la relaxation induite par le $17\beta\text{-E}_2$ sur ces mêmes artères sans leur endothélium (Figure 21). Il n'y a pas de différence de puissance ni de sensibilité entre les rates traitées avec l'ATD ou les contrôles (pD_2 ; Ctrl : 5.50 ± 0.05 n = 6; ATD : 5.48 ± 0.06 n = 9; NS) (E_{max} ; Ctrl : 99.6 ± 3.3 % n = 6; ATD : 103.8 ± 3.7 % n = 9; NS).

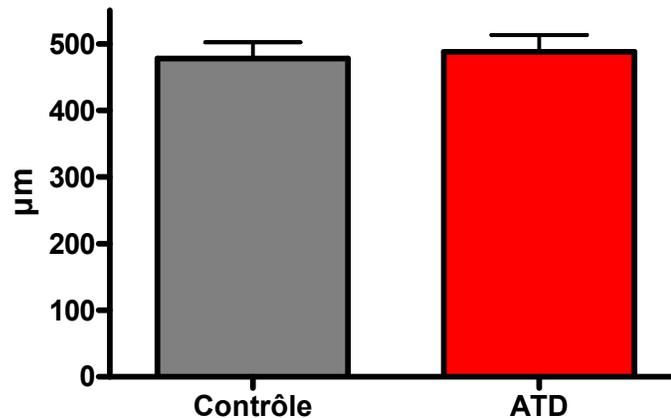


Figure 19 : Effet du traitement avec l'ATD (5 mg/jour) sur le diamètre de l'artère utérine principale chez des rates gestantes à une pression transmurale de 60 mmHg. (Ctrl : n = 6 ATD : n = 9)

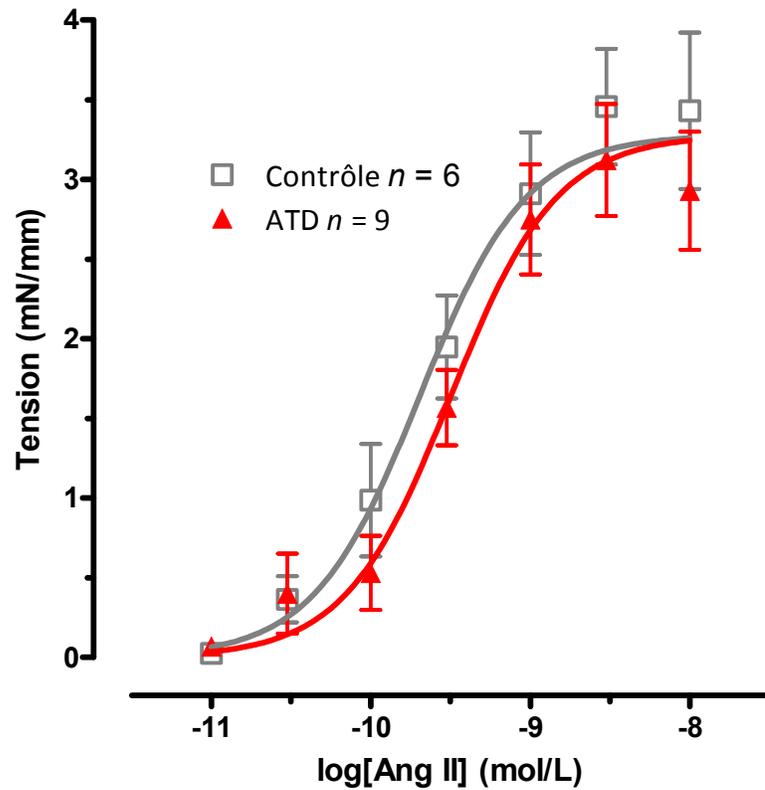


Figure 20 : Courbe concentration-réponse comparant l'effet du traitement avec l'ATD (5 mg/jour) sur la réactivité vasculaire de l'artère utérine principale à l'angiotensine II chez des rates gestantes. L'axe des x représente le log de la concentration d'angiotensine II et l'axe des y montre la tension générée par le segment d'artère en mN/mm. Chaque point représente la moyenne des valeurs pour chaque concentration d'angiotensine II appliquée et les barres représentent l'erreur standard à la moyenne (ESM).

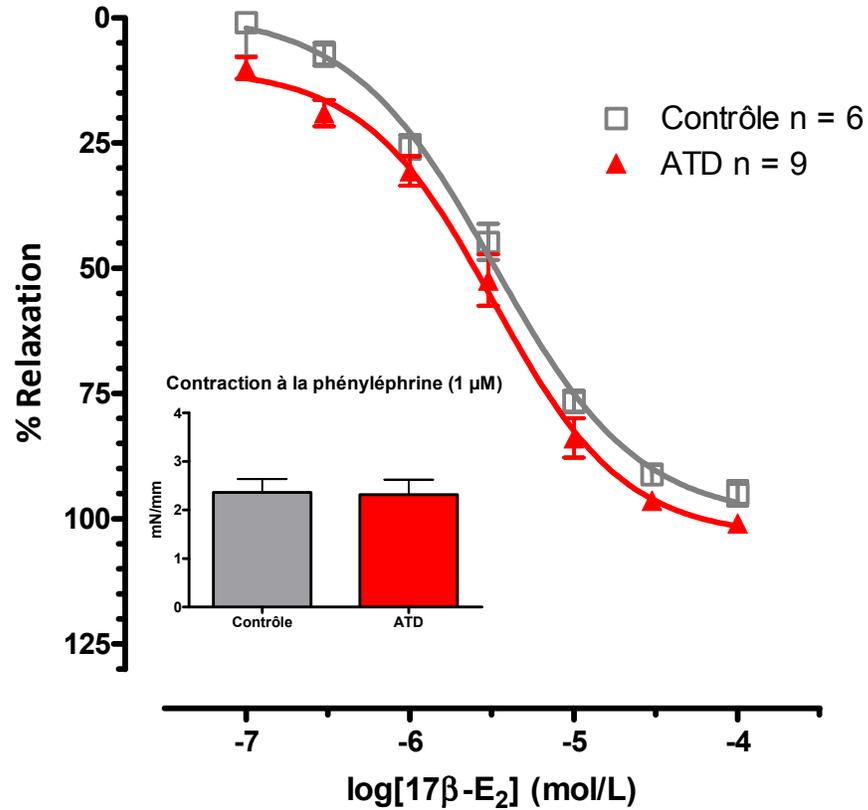


Figure 21 : Courbe concentration-réponse comparant l'effet du traitement avec l'ATD (5 mg/jour) sur la relaxation induite par le 17β-œstradiol sur l'artère utérine principale suite à une stimulation de phényléphrine chez des rates gestantes. L'axe des x représente le log de la concentration de 17β-E₂ et l'axe des y montre le % de relaxation relative à la contraction induite par 1 μM de phényléphrine. Chaque point représente la moyenne des valeurs pour chaque concentration de 17β-œstradiol appliquée et les barres représentent l'erreur standard à la moyenne (ESM).

B) Mesures télémétriques

Pressions artérielles

Les cinq figures suivantes représentent les mesures cardiovasculaires que nous avons obtenues avec un système d'implant radiotéléométrique qui nous a permis d'avoir en simultanée la pression artérielle systolique, la pression artérielle diastolique, la pression artérielle moyenne (Figure 22), la fréquence cardiaque (Figure 23) et une mesure du degré d'activité de la rate (Figure 24). Nous avons comparé tous ces paramètres par un ANOVA à deux facteurs pour mesures répétées par rapport au temps et par rapport au traitement avec 10 mg/jour d'ATD avec des pellets à libération continue. Il n'y a pas d'effet significatif du traitement à l'ATD, ni sur les pressions artérielles mesurées, ni sur la fréquence cardiaque et ni sur le degré d'activité physique des mères durant l'expérimentation. Néanmoins, on remarque qu'il y a systématiquement une différence d'environ 3 mmHg de moins chez les rates ATD à partir du jour 1 de gestation, et ce, jusqu'à la fin. Une seule exception, le jour 15 qui se trouve à être le premier jour postchirurgie suite à l'insertion des implants d'ATD ou de placebo. De plus, vous constaterez que les trois jours pré-gestation n'ont pas cette différence entre les deux groupes. D'autre part, on remarque à la figure 23 qu'il y a aussi une augmentation de fréquence cardiaque au cours de la gestation qui est typique de celle-ci, mais le traitement à l'ATD n'amène pas de variation significative entre les deux groupes. Ici aussi, on remarque que la fréquence cardiaque chez les rates ATD est moindre durant la gestation, et ce, même avant le traitement à l'ATD. Finalement, on remarque à la figure 24 que le niveau d'activité de la mère n'est pas influencé par le traitement à l'ATD.

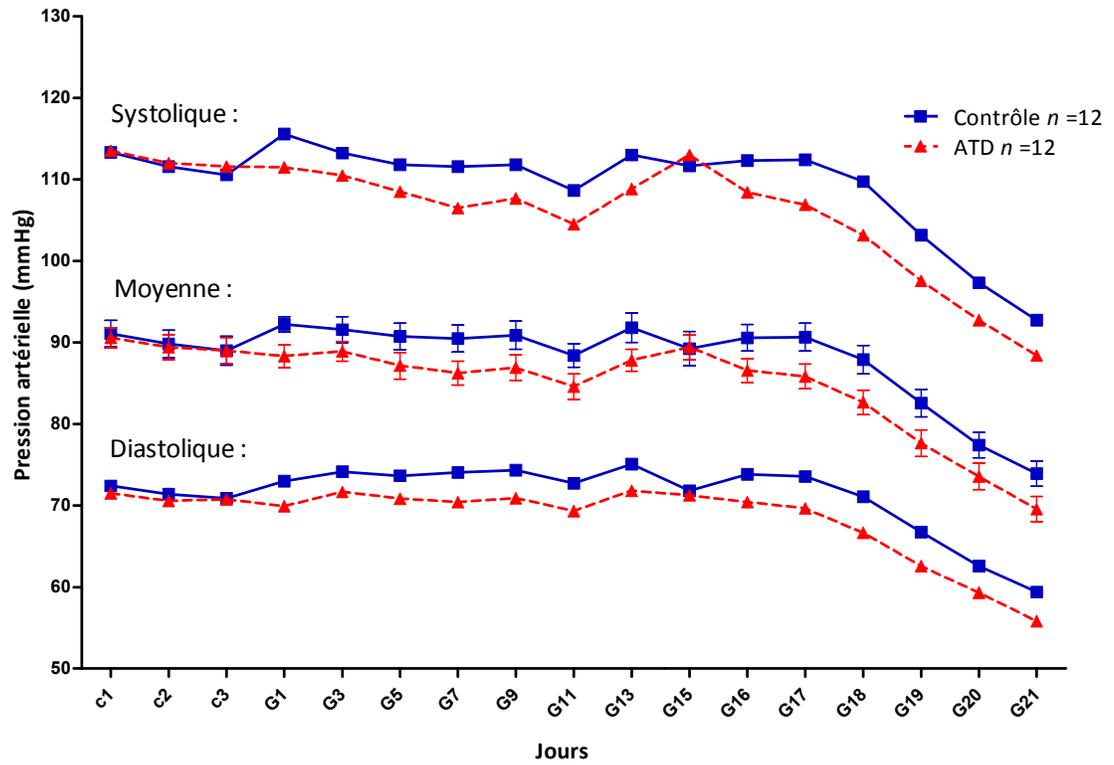


Figure 22 : Effets du traitement avec l'ATD (10 mg/jour) sur la pression artérielle obtenue par télémétrie chez des rates gestantes. Chaque point représente la moyenne des valeurs pour chaque jour et les barres représentent l'erreur standard à la moyenne (ESM).

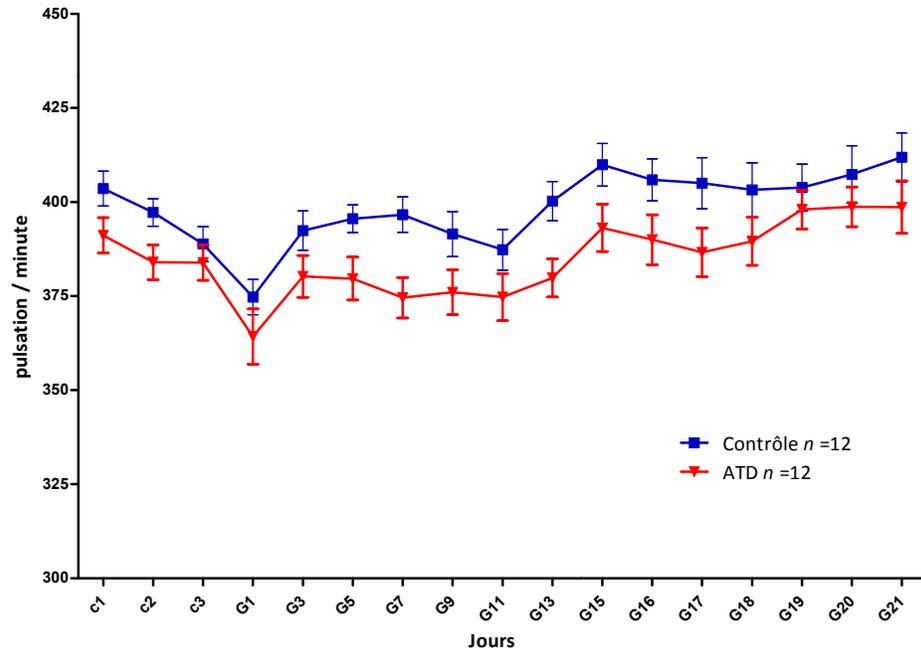


Figure 23 : Effets du traitement avec l'ATD (10 mg/jour) sur la fréquence cardiaque obtenue par télémétrie chez des rates gestantes. Chaque point représente la moyenne des valeurs pour chaque jour et les barres représentent l'erreur standard à la moyenne (ESM).

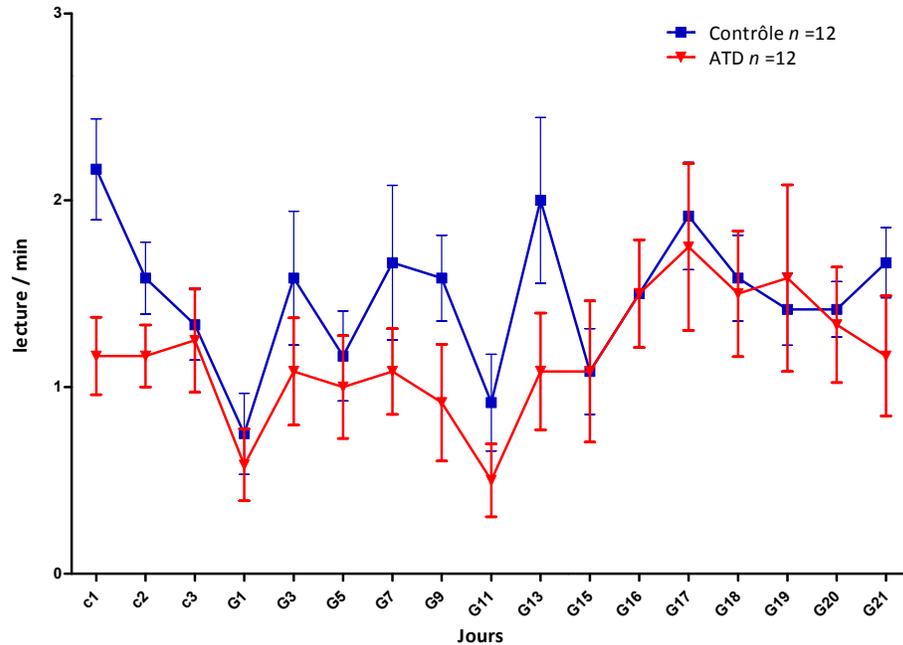


Figure 24 : Effets du traitement avec l'ATD (10 mg/jour) sur degré d'activité obtenue par télémétrie chez des rates gestantes. Chaque point représente la moyenne des valeurs pour chaque jour et les barres représentent l'erreur standard à la moyenne (ESM).

Réactivité vasculaire

De façon similaire à la section précédente, nous voulions mesurer l'impact de l'administration d'ATD sur le remodelage et la fonction vasculaire utérine. Cette fois-ci, la quantité administrée par jour est le double (10 mg/jour) et est distribuée en libération continue à l'aide d'un pellet sous-cutané. Nous avons évalué le diamètre de l'artère utérine principale sous une tension passive de 60 mmHg (Figure 25). Aucune différence n'est apparente entre le groupe ayant reçu un placebo et celui ayant reçu l'ATD (Ctrl : $487 \pm 25 \mu\text{m}$; ATD : $459 \pm 15 \mu\text{m}$; NS). Il va de même pour la contraction à l'ANG II (Figure 26)

et la relaxation induite par l'œstradiol (Figure 27). ANG II : (pD₂; Ctrl : 9.37 ± 0.16 n = 11; ATD : 9.57 ± 0.11 n = 10; NS) (E_{max}; Ctrl : 3.62 ± 0.31 mN/mm n = 11; ATD : 3.47 ± 0.22 mN/mm n = 10; NS). 17β-E₂ : (pD₂; Ctrl : 5.50 ± 0.09 n = 11; ATD : 5.53 ± 0.06 n = 10; NS) (E_{max}; Ctrl : 99 ± 6 % n = 11; ATD : 100 ± 4 % n = 10; NS)

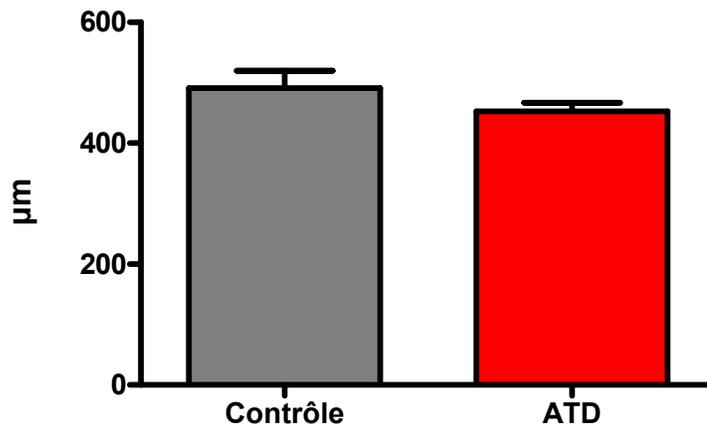


Figure 25 : Effet du traitement avec l'ATD (10 mg/jour) sur le diamètre de l'artère utérine principale chez des rates gestantes. (Ctrl n =11; ATD n =10)

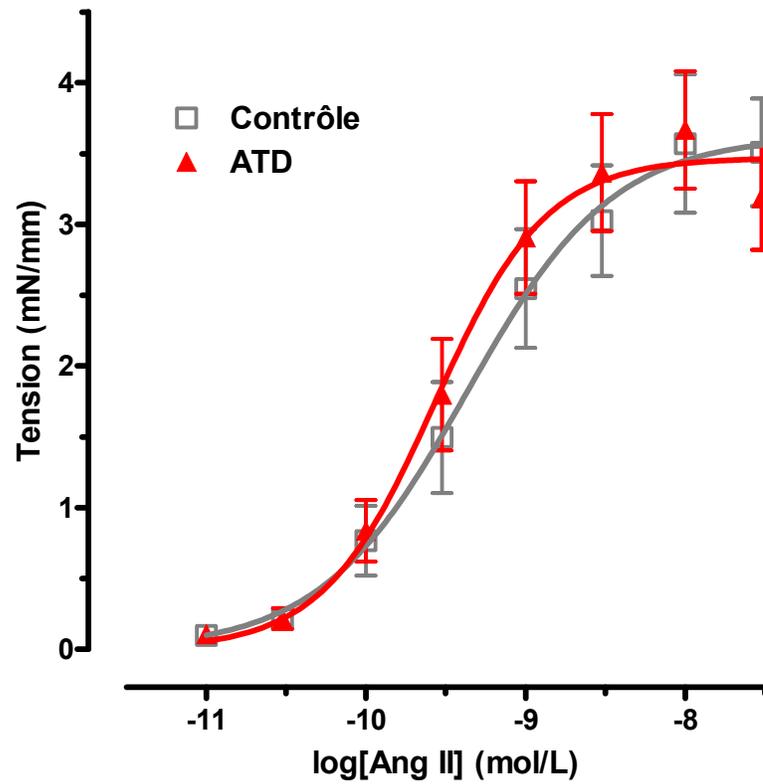


Figure 26 : Courbe concentration-réponse comparant l'effet du traitement avec l'ATD (10 mg/jour) sur la réactivité vasculaire de l'artère utérine principale à l'angiotensine II chez des rates gestantes. (Ctrl $n = 11$; ATD $n = 10$) L'axe des x représente le log de la concentration d'angiotensine II et l'axe des y montre la tension générée par le segment d'artère en mN/mm. Chaque point représente la moyenne des valeurs pour chaque concentration d'angiotensine II appliquée et les barres représentent l'erreur standard à la moyenne (ESM).

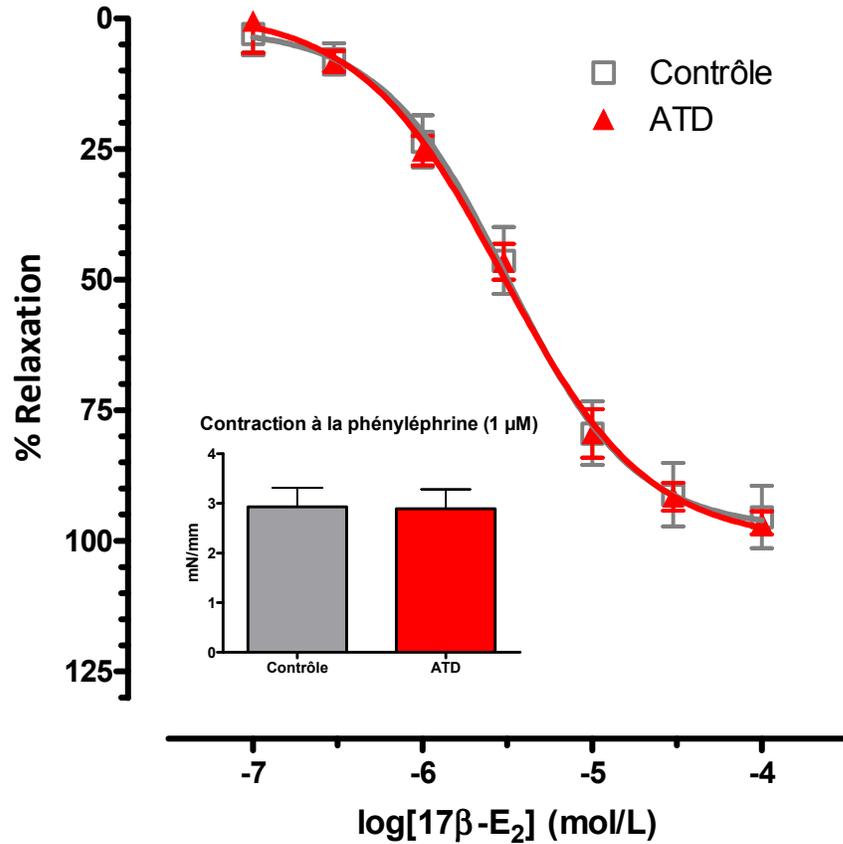


Figure 27 : Courbe concentration-réponse comparant l'effet du traitement avec l'ATD (10 mg/jour) sur la relaxation induite par le 17β-œstradiol sur l'artère utérine principale suite à une stimulation de phényléphrine chez des rates gestantes. (Ctrl $n = 11$; ATD $n = 10$) L'axe des x représente le log de la concentration de 17β-E₂ et l'axe des y montre le % de relaxation relative à la contraction induite par 1 μM de phényléphrine. Chaque point représente la moyenne des valeurs pour chaque concentration de 17β-œstradiol appliquée et les barres représentent l'erreur standard à la moyenne (ESM).

Concentration d'œstradiol circulant

Nous avons finalement évalué, par chromatographie à phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse, la concentration d'œstradiol plasmatique chez les mères au 22^e jour de gestation. La concentration pour les deux groupes se situe dans les valeurs normales à cette période de la gestation chez la rate. Il n'y a donc pas de différence significative entre les deux groupes tel qu'illustré à la figure 28 (Ctrl : 163 ± 16 N=11, ATD : 195 ± 35 N=12; NS). À la lumière de ces résultats, nous ne pouvons que constater que l'ATD s'est avérée inefficace à bloquer la synthèse d'oestradiol; ce qui ne nous permet pas de vérifier notre hypothèse.

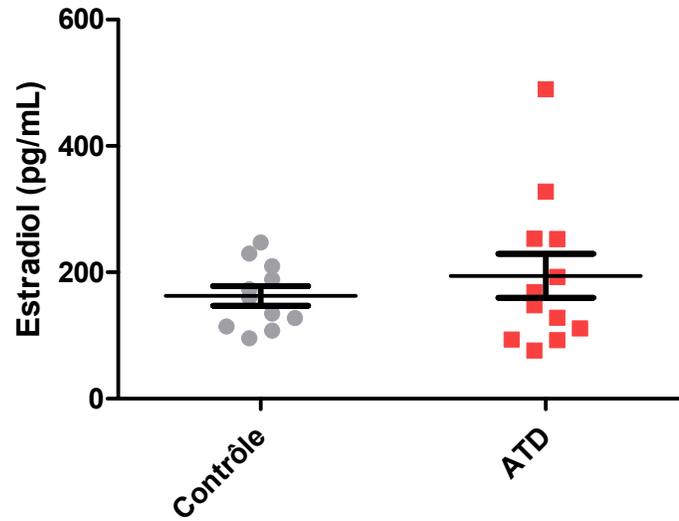


Figure 28 : Niveaux d'œstradiol circulant mesurés par chromatographie à phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) dans le sang maternel au 22^e jour de gestation. (Ctrl $n = 11$; ATD $n = 12$)

CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSION

La gestation est une condition physiologique essentielle à procréation et la survie de l'espèce. En dépit des avancés de la recherche et l'amélioration des soins prénataux dans la majorité des pays industrialisés, nous connaissons encore très peu les mécanismes qui régissent l'adaptation maternelle à la grossesse. En particulier, nous ne savons pas quels sont les processus qui permettent à la circulation utérine de se modifier afin d'accentuer grandement l'apport de sang à l'unité fœto-maternelle. Plusieurs hypothèses différentes ont été formulées au cours des années. En résumé, elles suggèrent un rôle de facteurs soit locaux, soit systémiques. Au laboratoire nous nous sommes intéressés aux œstrogènes qui ont justement la particularité d'être en circulation en quantité de plus en plus grande dans le sang durant la grossesse. Qui plus est, ils provoquent des changements génomiques à long terme, mais agissent aussi de façon rapide et locale via des actions non génomiques.

PROJET SUR L'ÉTUDE DES MÉCANISMES DE LA RELAXATION RAPIDE DU 17B-ŒSTRADIOL

Dans la première partie de nos recherches, nous nous sommes appliqués à caractériser la relaxation rapide induite par l'œstrogène sur les artères utérines dénudées de leur endothélium et d'expliquer les différences observées durant la gestation chez le rat. Il était établi avant d'entreprendre cette étude que l'œstrogène pouvait entraîner une relaxation rapide de vaisseaux sanguins de différentes espèces et localisations anatomiques [10, 232, 247]. Plusieurs ont décrit cette relaxation comme étant en grande partie indirecte, c'est-à-dire en agissant via l'endothélium qui lui sécrète des substances vasorelaxantes [27], mais nous avons démontré sur les artères utérines, comme d'autres

groupes sur plusieurs autres vaisseaux sanguins, que cette relaxation est aussi possible en l'absence d'endothélium [4, 83, 103, 125, 145, 249, 282, 302]. La particularité de cette étude est que nous avons observé une différence de relaxation au 17β -E₂ entre les artères utérines de rates gestantes et non gestantes. Suite à une contraction à la phényléphrine, les artères des rates non gestantes étaient en mesure de montrer une relaxation plus importante à l'application de 17β -E₂ comparativement aux artères de gestantes. Cette différence est abolie lorsque les artères sont pré-incubées avec un inhibiteur des synthèses de monoxyde d'azote (L-N^G-Nitroarginine methyl ester; L-NAME) (Fig.1 du manuscrit 1). Ceci suggère que chez les rates nullipares, une partie de la relaxation induite directement sur le muscle lisse vasculaire par le 17β -E₂ est dépendante de la production tissulaire de NO. En corollaire, nous avons observé que l'expression de la synthase de NO neuronale (NOS1) est moindre dans les artères utérines de rates gestantes que non gestantes. Nous croyons que cette diminution de l'expression de NOS dans la paroi vasculaire durant la gestation diminue un peu la propension à relaxer de l'artère utérine dénudée d'endothélium [249]. D'autre part, nous avons aussi démontré que dans des artères utérines intactes (avec endothélium), l'expression de la synthase de NO endothéliale (NOS3) est augmentée d'environ 4,5 fois durant la gestation. Ces données sont similaires à celles obtenues par d'autres investigateurs chez des animaux [176, 204] et chez l'humain [203]. Ainsi, même s'il y a une plus faible expression de NOS1 provenant de la paroi vasculaire durant le remodelage occasionné par la grossesse, l'endothélium compense grandement par une expression de NOS3 beaucoup plus substantielle.

Dans le manuscrit inclus à cette thèse, nous avons aussi démontré que la relaxation rapide induite par l'œstrogène sur des artères utérines sans endothélium est en grande partie indépendante de la production de NO. Elle est aussi stéréospécifique puisque le 17α -E₂, stéréoisomère de l'œstrogène endogène, relaxe les mêmes artères

avec une puissance similaire, mais avec le tiers de l'efficacité du 17β -E₂. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres laboratoires avec des coronaires de porc [247] ou des artères mésentériques de rats [250]. De plus, elle est indépendante des récepteurs classiques aux œstrogènes, car la préincubation avec un antagoniste des ERs (ICI 182,780) ne permet pas de prévenir la relaxation observée. Également, l'utilisation du 17β -E₂ couplé à de l'albumine bovine, donc imperméable à la membrane plasmique, ne provoque pas de relaxation comme le fait l'hormone à l'état original. Nous avons rapporté qu'un conjugué 17β -E₂:BSA pouvait induire une relaxation des artères mésentériques ayant conservé leur endothélium [250]. Ce qui laisse présager que le site d'action du 17β -E₂ sur les cellules musculaires lisses est intracellulaire ce qui n'est pas le cas pour les cellules endothéliales.

Comme nos résultats montrent que la majorité de la relaxation induite directement sur la paroi musculaire de l'artère utérine par le 17β -E₂ est indépendante du monoxyde d'azote et des récepteurs classiques aux œstrogènes (ER α , ER β), une importante question demeure sans réponse : quels sont les mécanismes cellulaires responsables de cette relaxation non génomique induite par le 17β -E₂? Nous avons alors tenté de répondre à cette question en poursuivant notre expérimentation.

Tout d'abord, nous avons évalué l'effet d'une préincubation avec des bloqueurs de différents canaux potassiques sur la relaxation induite par l'œstrogène. Nous nous sommes inspirés d'études chez le porc qui démontraient que la relaxation induite par l'œstrogène dans des artères coronaires était indépendante de l'endothélium et permettait l'ouverture des canaux potassiques à large conductance activés par le calcium (BK_{Ca}) [52, 302]. En vous référant à la figure 15, nous avons utilisé des bloqueurs permettant d'inhiber trois des quatre types de canaux potassiques retrouvés dans les muscles lisses artériels [202], soit les canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}) bloqués

par la glibenclamide, les canaux potassiques voltage-dépendants (K_v) inactivés par le 4-aminopyridine et les canaux BK_{Ca} par le penitrem A, l'iberiotoxine ou le tétraéthylammonium. Nous n'avons pas ciblé le type de canaux potassiques rectifiants entrants « inward-rectifier potassium channel » (K_{IR}) puisque ces canaux sont activés lorsqu'il y a une augmentation de la concentration de potassium extracellulaire ou lorsque la cellule est dans un état hyperpolarisé, contrairement au K_v et K_{Ca} qui sont activés lorsque la cellule est dépolarisée [202]. Comme nous étudions la relaxation du 17β -E₂ suivant une contraction à la phényléphrine, dans notre cadre expérimental les cellules du muscle lisse sont dans un état dépolarisé (contraction) donc les K_{IR} ne seront pas actifs ou du moins leur rôle serait très minime. Les résultats que nous avons obtenus suggèrent la participation des canaux potassiques dépendants du voltage (diminution de l'efficacité) et probablement les BK_{Ca} dans la relaxation directe sur les muscles lisses d'artère utérine induite par le 17β -E₂ avec une certaine nuance. En effet, nous avons observé un déplacement de la courbe de relaxation vers la droite en préincubant nos artères avec le penitrem A, suggérant que le blocage des canaux BK_{Ca} antagoniserait la relaxation induite par l'œstrogène (Figure 15B). Nous avons débuté cette série d'expériences en utilisant le TEA, Penitrem A, le glibenclamide et le 4-AP en parallèle, dans des myographes séparés. Ainsi, chaque anneau d'artère utérine était préincubé avec l'un de ces bloqueurs. Nous avons escompté utiliser le tétraéthylammonium comme bloqueur des BK_{Ca} qui avait été utilisé par White et coll. avec des coronaires de porc [302] en plus du Penitrem A. En fait, le TEA est un ion ammonium quaternaire avec quatre groupes éthyliques $N^+(CH_2CH_3)_4$ qui a la propriété d'inhiber les trois types de canaux potassiques suivant K_{Ca} , K_{ATP} et K_v selon la concentration utilisée. Leurs IC_{50} avec le TEA est respectivement de 0.2 mM, 7 mM et 10 mM [202]. Le penitrem A, aussi nommé tremortin, est une mycotoxine causant des tremblements qui a été isolée originalement de *Penicillium palitans*. Il a été déterminé par

patch-clamp qu'une concentration de 10 nM est suffisante pour bloquer l'activité d'environ 100 % des canaux BK_{Ca} sans affecter l'activité d'autres types de canaux potassiques [148].

Suite à la disparité de réponse entre le TEA 1 mM et le Penitrem A 100 nM, nous avons refait l'expérience en utilisant l'ibérotisine 100 nM (IbTX). Cette molécule est une toxine provenant du venin du scorpion *Buthus tamulus* qui peut seulement se lier à la partie extracellulaire des BK_{Ca}. L'IbTX est spécifique à ce type de canaux et possède un IC₅₀ de 250 pM [88]. Comme vous pouvez l'observer à la figure 15E l'utilisation d'une bonne concentration d'IbTX (0,1 µM) ne modifie pas la relaxation induite par le 17β-E₂ sur le muscle lisse des artères utérines. Il semble que le pentrem A exercerait cet effet par un autre mécanisme que l'inhibition de l'activité des canaux BK_{Ca}.

Nous nous sommes aussi intéressés à la signalisation intracellulaire qui serait activée par le 17β-E₂ pour relaxer les muscles lisses des artères utérines. Nous avons tout d'abord confirmé que nous avons affaire à des effets non génomiques du 17β-E₂, car la cycloheximide, un inhibiteur de synthèse protéique, n'empêche pas cette vasodilatation rapide. Après quoi, nous avons ciblé deux protéines kinases impliquées dans le processus de relaxation vasculaire soit la protéine kinase A et la protéine kinase G (voir section 2.2.2 de l'introduction, p.40). Une préincubation avec un inhibiteur de PKA (KT5720) ou PKG (Rp-8-pCPT-cGMPS) n'a pas d'effet sur la relaxation au 17β-E₂. Nous avons utilisé ces inhibiteurs à des concentrations (1 µM KT5720; 10 µM Rp-8-pCPT-cGMPS) démontrées efficaces dans des conditions similaires [118, 142, 194, 220, 281]. Ces résultats sont tout de même surprenants, puisque l'activation de ces voies de signalisation n'apparaît pas obligatoire pour induire une relaxation de l'artère utérine par le 17β-E₂. Par exemple, il a été démontré que le 17β-E₂ peut activer directement les BK_{Ca} sur leur sous-unité β₁ et amener une relaxation en facilitant la repolarisation de la cellule [286]. Ce qui n'est

probablement pas le cas ici, puisque nous avons observé que les BK_{Ca} ne sont pas impliqués dans la relaxation induite par le 17β-E₂ du moins par le blocage avec l'ibTX et le TEA (voir ci-haut). Cependant, il est tout à fait probable que le 17β-E₂ puisse relaxer ces vaisseaux dénudés d'endothélium en inhibant l'entrée de calcium via l'inhibition de canaux calcique de type-L (L-type VSCC) [145, 201] ou en augmentant leur expulsion par la SERCA ou les pompes Ca²⁺-ATPase de la membrane plasmique. Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de tester ces hypothèses. Une façon de mesurer si les VSCC de type-L sont impliqués dans la relaxation des artères utérines sans endothélium par le 17β-E₂ serait de précontracter nos vaisseaux avec de la pényléphrine dans un milieu sans calcium et de mesurer la contraction résultant de l'ajout de calcium en concentration croissante, c'est-à-dire une courbe concentration-réponse au CaCl₂ [244]. Cette courbe servira de contrôle et sera comparé à des vaisseaux préincubés avec de la phényléphrine combiné à du 17β-E₂. Si les VSCC type-L sont bel et bien impliqué, le 17β-E₂ serait en mesure de réduire l'efficacité et/ou la sensibilité du CaCl₂. Alternativement, nous pourrions vérifier par électrophysiologie (patch-clamp) si le 17β-E₂ est capable de réduire le courant ionique transitant par ce canal. Pour mesurer l'implication des pompes Ca²⁺-ATPase (PMCA, SERCA), nous pourrions préincuber nos vaisseaux avec un bloqueur spécifique de ces pompes (ex. : carboxyeosine) et voir s'ils ont un effet sur la relaxation induite par le 17β-E₂.

Il est aussi possible que d'autres mécanismes soient responsables de la relaxation des artères utérines dénudées d'endothélium par le 17β-E₂. Nous avons observé que la génistéine est capable de produire une vasorelaxation similaire à celle observée par le 17β-E₂ (Figure 17-A). La génistéine possède des propriétés œstrogéniques et peut lier les récepteurs classiques aux œstrogènes et produire des effets similaires aux œstrogènes endogènes, mais avec une affinité de liaison aux récepteurs beaucoup plus faible [153,

155]. Cependant, nous avons fait la même expérience en préincubant nos segments d'artère avec le ICI 182,780 sans changement à la relaxation induite, ce qui exclut l'implication des ERs. Cependant, la génistéine est aussi un inhibiteur non spécifique bien établi des tyrosines kinases [6]. Cette propriété de la génistéine lui permettrait d'inhiber la contraction induite par une signalisation de tyrosines kinases dans les muscles lisses vasculaires comme l'endothéline-1[170] ou la sérotonine [298]. Cette relation pourrait être encore plus répandue, car il a été justement démontré dans cellules de muscle lisse vasculaire qu'il y aurait un « crosstalk » entre la signalisation tyrosine kinase et celle de la contraction [127]. Bien que l'activation de protéines kinases soit intimement reliée à la voie de signalisation qui induit la prolifération, la croissance et la différenciation cellulaire, elle est aussi susceptible d'activer la MLCK et générer une contraction dans les cellules musculaires lisses vasculaires. La génistéine serait en mesure, par son action d'inhibiteur de tyrosine kinase, d'empêcher la phosphorylation de la MLCK et la contraction musculaire induite soit par la phényléphrine ou du sérum foetal bovin. Il s'agit seulement de pistes potentielles, puisque l'œstradiol n'est pas un inhibiteur de tyrosine kinases en soi. Mais puisqu'un « crosstalk » est possible entre ces deux voies de signalisations, il serait intéressant de savoir si tel est le cas pour le $17\beta\text{-E}_2$.

Nous avons démontré préalablement que la relaxation des artères utérines sans endothélium par le $17\beta\text{-E}_2$ n'est pas modifiée en présence d'un antagoniste des récepteurs aux œstrogènes (tamoxifène, ICI 182,780) [249]. Depuis quelques années un récepteur orphelin couplé aux protéines G attire beaucoup d'attention depuis qu'il été démontré qu'il pouvait se lier à l'œstrogène et amener une réponse cellulaire [78]. Ce récepteur est aujourd'hui nommé GPER et nous l'avons décrit dans la section 3.5.2 de l'introduction. Depuis sa découverte, plusieurs études ont décrit différentes voies de signalisation cellulaire activées par ce récepteur et leurs réponses physiologiques dans

plusieurs tissus chez différentes espèces. C'est pourquoi nous avons vérifié si ce récepteur pouvait être responsable de la relaxation ER-indépendante observée avec le 17β -E₂ dans les artères utérines sans endothélium. Comme le ICI 182,780 lie le GPER et permet l'activation de ERK1/2 dans un modèle cellulaire de cancer mammaire [78], nous avons utilisé cette substance pour déterminer si des concentrations croissantes de ICI 182,780 serait en mesure de faire relaxer les artères utérines dénudées d'endothélium. Comme le démontre la figure 17B, le ICI 182,780 est incapable d'induire une relaxation de l'artère utérine. Par la suite, nous avons utilisé un agoniste spécifique au GPER, le G-1, qui n'a pas entraîné de relaxation comparable au 17β -E₂ (Figure 17E).

En 2009, un article est paru clamant avoir observé une baisse de pression artérielle chez des rats traités avec l'agoniste G-1 ainsi qu'une relaxation *ex vivo* de $29 \pm 4\%$ des artères mésentériques après 40 min avec $1 \mu\text{mol/L}$ de G-1 [99]. La relaxation est relative à une contraction obtenue par de l'uridine 5' triphosphate ($30\text{-}50 \mu\text{mol/L}$) pour atteindre un plateau à $\sim 50\%$ du diamètre interne de base. La comparaison de nos résultats avec ceux de ce papier est difficile à faire. D'une part, il ne s'agit pas du même type de vaisseaux et ils ont gardé l'endothélium intact. D'autre part, nous avons fait une courbe dose réponse, tandis qu'eux ont donné une dose unique et ils ont regardé l'effet dans le temps. De notre point de vue, le G-1 ne semble pas en mesure d'induire une relaxation en agissant directement sur les muscles lisses des artères utérines, car il fait très pâle figure comparativement aux relaxations obtenues avec le 17β -E₂. Nous obtenons une relaxation maximale de $27,4 \pm 5,7\%$ pour le G-1 et de $123,3 \pm 5,9\%$ pour le 17β -E₂ (E_{max} ; Tableau 9). Donc, la relaxation maximale constatée avec le G-1 est comparable à celle obtenue par le groupe de Haas et coll. [99]. Cependant, nous obtenons cette relaxation avec des doses 100 fois plus concentrées, mais notre niveau de contraction de départ avec la phényléphrine est aussi plus élevé ($\sim 80\%$). Est-ce la concentration de G-1 ou le temps qui

est un facteur important dans ce cas-ci? Nous voyons un effet relaxant non génomique avec le 17β -E₂ car la relaxation observée entre chaque dose n'a que 5 minutes d'intervalle. De plus, nous avons confirmé ces données en utilisant la cycloheximide qui n'a pas d'effet sur la relaxation au 17β -E₂. Nous avons mentionné en introduction que des études ont montré que l'activation du GPER par le 17β -E₂ pouvait engendrer une modification de l'expression de certains gènes, c'est-à-dire avoir une action génomique. Est-ce que la relaxation observée par ces auteurs [99] est due à une synthèse protéique permettant une relaxation du muscle lisse? Il serait intéressant qu'ils puissent refaire cette expérience en utilisant un inhibiteur de synthèse protéique comme la cycloheximide. Nous pourrions refaire de même avec notre système au laboratoire et voir si cela empêcherait la faible relaxation produit par le G-1 sur les artères utérines.

Pour revenir à la question de départ, à savoir est-ce que le 17β -E₂ engendre la relaxation observée du muscle lisse de l'artère utérine via l'activation du GPER? À la lumière des résultats que nous avons présentement, nous croyons que non. Par contre, il se pourrait qu'une petite partie de la relaxation provienne de l'activation du GPER. Il faudrait cependant être en mesure de confirmer ce résultat en utilisant un antagoniste du GPER. On pourrait supposer que le fait de préincuber les vaisseaux avec une telle substance du GPER réduirait la relaxation induite par le 17β -E₂ d'environ 25 %. Le G15 est un antagoniste du GPER, qui n'est pas encore disponible commercialement, mais qui serait très intéressant d'utiliser. Une étude vient tout juste d'être publiée en version préliminaire sur le site du « American journal of physiology – Heart and Circulatory Physiology » démontrant que la relaxation induite par le G-1 (10 μ M) est 35 à 40 % suivant la contraction à l'U46619 (10 nM), dans des carotides de rat est dépendante de l'endothélium [26]. C'est-à-dire, que cette relaxation est inexistante en absence d'endothélium fonctionnel. Ceci corrobore avec les résultats que nous avons obtenus et

nous suggérons alors que la relaxation induite par le $17\beta\text{-E}_2$ directement sur le muscle lisse vasculaire n'est pas induite par une activation du GPER.

À la figure 17, nous rapportons des expériences faites en utilisant des composés œstrogéniques spécifiques au $\text{ER}\alpha$ (PPT) et au $\text{ER}\beta$ (DPN). Nous étions curieux de savoir comment se comporteraient ces composés, dans une relaxation que nous croyons ER-indépendante. Les deux substances ont été en mesure de produire une relaxation similaire au $17\beta\text{-E}_2$. Ce qui suggère que leur structure différente (Figure 11) permet aussi de produire une relaxation de l'artère utérine avec la même puissance et la même efficacité que le $17\beta\text{-E}_2$. Nous avons aussi utilisé le 2-méthoxyœstradiol, qui lui aussi amène une relaxation des artères utérines sans endothélium identique au $17\beta\text{-E}_2$. Le 2-ME est un métabolite naturel endogène de l'œstradiol produit dans différents types cellulaires, dont les cellules musculaires lisses vasculaires [307]. Il a été démontré que les femmes prééclampsiques avaient de faibles taux circulants de 2-ME [131]. La relaxation que nous avons obtenue est intrigante, étant donné qu'il a été rapporté que le 2-ME nécessitait la présence d'endothélium pour faire relaxer le muscle lisse de l'aorte via la production de NO [98]. Peut-être est-ce une différence entre la vasculature utérine et l'aorte. Il serait intéressant de poursuivre l'étude du 2-ME et son implication dans la vasculature utérine.

En résumé, nous avons démontré que le $17\beta\text{-E}_2$ produit une relaxation non génomique des artères utérines en agissant directement sur le muscle lisse par un mécanisme indépendant du monoxyde d'azote et des récepteurs classiques aux œstrogènes ($\text{ER}\alpha$, $\text{ER}\beta$). Le GPER, la PKA, la PKG ne sont pas impliqués dans la signalisation intracellulaire qui permet l'effet vasorelaxant induit par le $17\beta\text{-E}_2$. Nous avons observé une implication des canaux potassiques sensibles au voltage ainsi qu'une possible implication des BK_{Ca} . En effet, cette dernière observation est basée sur l'effet du

penitrem A, soit par une action sur le BK_{Ca} ou une action encore inconnue du composé. Quoi qu'il en soit, d'autres études seront nécessaires pour obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans cette relaxation non génomique sur le muscle lisse des artères utérines.

INHIBITION DE L'AROMATASE ET REMODELAGE VASCULAIRE

Durant la grossesse, plusieurs changements physiologiques surviennent chez la mère, dont un important bouleversement hormonal. Les œstrogènes, les progestagènes et les minéralocorticoïdes sont sécrétés abondamment dans la circulation, maternelle et fœtale. Nous avons proposé l'hypothèse qu'une inhibition de la synthèse d'œstrogène durant la grossesse amènerait une altération du remodelage vasculaire et conséquemment des modifications de la réactivité vasculaire. Comme les œstrogènes ont la propriété d'inhiber la migration ainsi que la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires [19, 46, 150] il est possible que l'absence d'œstrogènes permette l'exacerbation des effets prolifératifs d'autres facteurs circulants, augmentant ainsi le remodelage. Par contre, il est aussi probable qu'en empêchant l'augmentation de cette hormone durant la grossesse, nous perturbions les mécanismes qui créent ce remodelage, résultant en un amincissement de la taille des vaisseaux utérins observé durant la grossesse. Pour ce faire, nous avons élaboré un protocole où nous administrons un inhibiteur de l'aromatase, l'enzyme responsable de la transformation des androgènes en œstrogènes. L'administration de l'inhibiteur a été faite à partir du jour 14 de la gestation. Cette date a été choisie de manière à éviter de produire des complications au niveau de l'implantation et de l'organogénèse fœtale et tout juste avant que le diamètre de l'artère utérine soit significativement plus large que celle d'une non gestante [258]. Nous avons débuté nos expériences en utilisant le letrozole (Femara®) qui nous a été gracieusement fourni par la compagnie Novartis (Novartis Canada, Dorval, QC, Canada). Nous avons administré des injections de Letrozole à une concentration de 3 mg/kg/jour avec des volumes d'injection entre 150 et 200 µL [95, 164, 265]. Des difficultés expérimentales

majeures sont apparues en cours de réalisation. Nous avons observé une dégradation générale de l'état de santé des mères durant leur gestation, dont un décès avant la mise bas. Ce qui a provoqué l'arrêt du protocole. De plus, le letrozole a provoqué une certaine tératogénicité. En effet, les rats avaient des malformations apparentes dont un aspect anormal de leur crâne qui était en forme de cône. Nous fûmes surpris de cette mauvaise tournure, ignorant si c'est le composé ou l'absence d'œstrogène qui était responsable de ces effets. Quelques mois plus tard, nous n'étions pas étonnés de recevoir un communiqué provenant de Novartis déconseillant l'utilisation de ce médicament chez les femmes enceintes. Nous nous sommes tournées vers un autre inhibiteur d'aromatase dont l'utilisation durant la gestation n'avait pas été associée à quelques problèmes majeurs que ce soit. Nous avons utilisé l'ATD (1,4,6-androstatrien-3,17-dione) pour bloquer la synthèse d'œstrogène avec un protocole qui a été utilisé par d'autres groupes [61, 64, 113, 121, 180]. Comme il est indiqué dans la section « matériel et méthodes », la première série de rats a été réalisée dans nos installations au CHU Ste-Justine. Donc, l'administration d'ATD ou du véhicule pour le groupe contrôle se faisait par une injection sous-cutanée quotidienne et la pression artérielle était mesurée par pléthysmographie caudale chez des rats conscients. Nous avons aussi comparé entre les deux groupes, le diamètre de l'artère utérine et des paramètres physiologiques de la mère : diverses données fœtales, le poids des organes de la mère et leur ratio, les paramètres sanguins et urinaires sans observer de différence entre les deux groupes. De plus, il n'y avait pas de changements quant à la réactivité des artères utérines à l'angiotensine II, ni aux effets relaxants du 17β -E₂. Pour la pression artérielle, nous n'avons pas eu de différence significative entre les deux groupes outre une tendance vers un retard de la chute de pression de fin de gestation dans le groupe traité avec l'ATD. Puisque la technique que nous avons utilisée pour mesurer la pression est reconnue pour être une mesure en état

de stress (cage de contention et manipulation quotidienne de l'animal), l'erreur peut s'avérer relativement grande nous contraignant à devoir utiliser un échantillon beaucoup plus grand pour tirer une conclusion fiable. C'est alors que nous avons eu l'opportunité de collaborer avec la Dre Julie Lavoie pour utiliser le système de prise de pression par téléométrie du Centre de recherche du CHUM-Technopôle Angus. Pour minimiser le stress imposé aux animaux, ils ont été hébergés dans des salles spécialement isolées avec un minimum d'activité de la part du personnel et nous avons utilisé des implants sous-cutanés à libération continue pour administrer l'ATD. De plus, la concentration d'ATD administré par jour a été doublée par rapport à ce que nous avons utilisé dans la 1^{re} version du protocole, pour tenter d'accentuer les effets potentiels d'un inhibiteur d'aromatase durant la grossesse. Nous avons obtenu sensiblement les mêmes résultats, c'est-à-dire aucun changement significatif du diamètre des artères utérines, de la pression artérielle, de la contraction à l'angiotensine II et de la relaxation induite par le 17β -E₂.

La première chose que nous avons faite par la suite fut de confirmer l'efficacité du traitement à l'ATD en mesurant la concentration d'œstradiol dans les échantillons sanguins. L'utilisation d'une trousse commerciale de radioimmunoessai (RIA) (Double Antibody Estradiol, Diagnostic Products Corp (DPC); Los Angeles, CA) s'est avéré non opérationnel puisque sur une dizaine d'échantillons, nous avons obtenu des concentrations d'œstradiol autour du 10 à 15 pg/mL chez les rates du groupe contrôle, résultats comparables aux valeurs obtenues par d'autres investigateurs [61] alors que chez les rates traitées avec l'implant d'ATD nous avons obtenu des concentrations d'œstradiol variant entre 100 et 450 pg/mL. Il semble que la trousse RIA utilisée présentait une réaction croisée avec l'ATD, causant une surévaluation des concentrations d'œstradiol. Une réaction croisée semblable a aussi été observée avec un RIA pour la testostérone [65]. Comme solution alternative, nous avons eu recours à une technique de dérivation

des échantillons pour dosage par GC-MS [32, 182, 206]. Les résultats illustrés à la figure 28 sont conséquents avec tous nos résultats précédents, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de différence entre les deux groupes. Nous nous attendions à une baisse marquée de la concentration d'œstradiol par un traitement à l'ATD [61], alors que d'autres n'ont jamais montré si leur traitement avait eu une incidence sur la concentration d'œstrogènes circulants [64, 113, 121, 180].

À la lumière de ces résultats, nous nous trouvons dans une situation ambiguë. Le fait qu'il n'y ait pas eu d'inhibition, ou du moins une réduction, de la production d'œstradiol suite au traitement à l'ATD nous place dans un contexte où nous ne savons pas quel élément a fait défaut. Est-ce que le composé fourni par Steraloids est efficace? Plusieurs autres études ont utilisé ce composé provenant du même fournisseur avec des résultats qui démontrent son efficacité [121, 221, 269]. Pour répondre à cette question, nous aurions pu tester l'efficacité de l'ATD en mesurant l'activité *in vitro* de l'aromatase par conversion d'estradiol radiomarqué avec des préparations de placenta qui contiennent beaucoup d'aromatase [229]. Néanmoins, même si nous aurions voulu faire ce test, la totalité de l'ATD avait été envoyée directement chez le fabricant d'implants « Innovative Research of America ». Nous avons tout de même dosé des échantillons sanguins provenant des rates qui avaient eu du letrozole, inhibiteur de l'aromatase utilisé cliniquement, pour voir si ce composé avait réussi à modifier la concentration d'œstradiol. Les niveaux d'estradiol mesurés par GC-MS furent de 149 ± 2 pg/mL $n= 2$, donc ce n'était pas significativement différents des contrôles. Est-ce que le mode d'administration sous-cutané sous forme d'implants a fait le travail escompté? Pour voir si ce le mode d'administration était en faute, nous avons dosé des échantillons sanguins provenant des rates traitées à l'ATD par injection quotidienne sous-cutanée au CHU Ste-Justine. Encore une fois la concentration d'œstradiol mesurée par GC-MS dans le plasma de ces animaux

n'était pas différente des contrôles (145 ± 20 pg/mL $n= 4$; NS). Est-ce que le dosage de l'œstradiol par GC-MS doit être remis en question? Tous les contrôles ont été faits et refaits et chaque échantillon a été injecté en triplicata pour minimiser l'erreur occasionnée par l'appareil et que chaque échantillon est comparé au standard interne ($[^2\text{H}_5]17\beta\text{-E}_2$) d'une concentration connue que nous avons ajouté dans chaque échantillon.

En conclusion, nous pouvons affirmer que notre protocole expérimental n'a pas réussi à inhiber la synthèse d'œstrogène durant la grossesse chez le rat et par conséquent nous ne pouvons pas confirmer ou infirmer notre hypothèse de départ.

PERSPECTIVES

Durant ce projet de doctorat, je me suis intéressé au processus biochimique qui permet le transport du NO par les érythrocytes. Je crois que ce mécanisme pourrait avoir une implication dans la relaxation rapide *in vivo* ainsi que le remodelage la vasculature utérine pour répondre aux besoins du fœtus durant la grossesse. Ce processus fait appel aux S-nitrosothiols (SNO) qui, lorsqu'ils sont attachés à une protéine, peuvent devenir donneurs de monoxyde d'azote. Le NO est un vasorelaxant qui agit via la hausse de la concentration de GMPc intracellulaire (voir l'introduction p.40). De plus, le NO peut être impliqué dans le remodelage vasculaire, car il a été démontré qu'il contribue au remodelage circonférentiel et à l'augmentation du diamètre des artères utérines durant la gestation [211]. Ces mécanismes ne sont pas encore parfaitement établis et, à mon avis, il serait primordial de s'y intéresser plus profondément.

Notons que la plupart des études concernent les S-nitrosothiols dans un contexte de relaxation rapide suivant un besoin métabolique avec une action temporelle limitée : par exemple la relaxation observée dans les tissus musculaires durant l'effort physique qui crée un micro-environnement hypoxique. Ce phénomène pourrait aussi être un joueur important pour la vasorelaxation et le remodelage vasculaire utérin durant la grossesse.

Comment les S-nitrosothiols induisent la relaxation d'un vaisseau sanguin? Il est probable que ce soit en association aux érythrocytes circulants. En fait, il semble que ceux-ci auraient la propriété d'ajuster la perfusion capillaire en fonction du métabolisme du tissu environnant, ce qui est désigné par le terme « vasodilatation hypoxique ». Ceci amène la relaxation des muscles lisses vasculaires dans une région où il y a une faible disponibilité d'oxygène tissulaire, ce qui vise à accroître la distribution d'oxygène. Plusieurs hypothèses sont débattues pour en expliquer le fonctionnement, alors que plusieurs études ont identifié la relâche de NO par les érythrocytes comme étant la voie principale [49, 54, 62, 124].

Au départ, cette propriété des érythrocytes semblait invraisemblable. En effet, en ajoutant des globules rouges à une préparation *ex vivo* d'aorte de lapin on observait un effet contractile [259]. Depuis lors, des études se sont intéressées aux interactions du NO avec le fer de l'hème [57]. Ainsi, l'hémoglobine (Hb) libre « consommerait » le NO et, ce faisant, jouerait un rôle de vasoconstricteur [130]. Comment concilier ces effets paradoxaux? Le concept de « S-nitrosylation » [260] apparaît dans la littérature au début des années 90, mais aujourd'hui son action par l'hémoglobine semble mieux acceptée.

L'hémoglobine est une protéine contenue dans les érythrocytes dont le principal rôle est de transporter l'oxygène (O₂) des poumons aux tissus périphériques par le sang. L'hémoglobine est un tétramère composé de quatre globines, deux α et deux β , chacune

d'elles contenant un hème avec un ion ferreux auquel l'oxygène peut se lier. L'hémoglobine existe sous deux conformations structurales différentes. L'oxyhémoglobine, liée à 4 molécules d'O₂, forme l'état R pour relâché (↑ affinité pour O₂) et la désoxyhémoglobine, n'est pas liée à l'O₂, donne lieu à l'état T pour tendu (↓ affinité pour O₂). En résumé, lorsque la désoxyhémoglobine (état T) arrive dans la circulation pulmonaire son affinité pour l'O₂ est relativement faible. Étant donné la forte concentration d'oxygène dans les alvéoles pulmonaires, une molécule d'O₂ va tout de même réussir à se fixer à l'atome de fer d'un hème. Cette liaison amène un changement de conformation de la protéine qui affecte aussi la conformation des autres hèmes. C'est donc dire que la liaison de l'O₂ au fer de l'hème de l'hémoglobine va favoriser la transition de l'état T→R et promouvoir la liaison subséquente de l'oxygène sur les trois autres hèmes. Dans la situation inverse, c'est-à-dire lorsqu'il y a peu d'oxygène, un environnement avec un pH plus acide et une plus grande concentration de dioxyde de carbone (CO₂), comme c'est le cas dans les capillaires des tissus actifs, le CO₂ et des protons vont se lier à l'hémoglobine. Ils vont changer un peu la conformation de l'hémoglobine qui va perdre un peu son affinité pour l'O₂. L'hémoglobine va effectuer un changement de conformation de l'état R→T ce qui lui permet de libérer l'oxygène aux tissus. Il existe d'autres facteurs qui jouent un rôle dans la libération de l'O₂ (le 2,3-disphosphoglycérate, la pression d'O₂, la myoglobine, les ions Cl⁻ etc.) mais ils ne sont pas essentiels pour la compréhension la formation et distribution des S-nitrosothiols [289].

Lorsque le sang désoxygéné retourne dans la circulation pulmonaire (↑ [O₂]), la transition de T→R est privilégiée et la conformation R facilite la liaison du NO sur la cystéine 93 qui se retrouve sur l'hélice β (Cysβ93) de l'hémoglobine. Cette combinaison va permettre la formation de S-nitrosohémoglobine (SNO-Hb). Quand l'érythrocyte se retrouve dans un environnement hypoxique (ex. : muscles squelettiques durant un effort

physique), il va se départir de ses molécules d'O₂ pour oxygéner le tissu et son Hb va reprendre l'état T. À ce moment, le changement de conformation allostérique va aussi influencer les thiols sur les Cysβ93. En conformation T la probabilité d'obtenir des thiols sur les Cysβ93 est beaucoup plus faible [124]. En d'autres termes, les groupements S-nitrosothiols sont plus susceptibles de libérer le groupe NO lorsqu'il y a une faible pression d'oxygène dans le milieu [124]. Donc, la désoxygénation des SNO-Hb véhiculés par les érythrocytes permettrait une libération locale de NO pour augmenter le flot sanguin et l'oxygénation du tissu [259]. Un tel système attribuerait aux érythrocytes un rôle de transporteur d'oxygène, mais aussi de senseur du niveau d'oxygène et de coordonnateur du tonus vasculaire local [28].

Un des arguments en faveur d'un tel système est qu'il permet à l'organisme de répondre au besoin local des différents tissus dans un laps de temps relativement court. En fait, on a estimé que le transit sanguin au niveau des capillaires dans un tissu au repos est d'une seconde ou moins [299]. Mais lors d'activité accrue du tissu, par exemple les muscles squelettiques durant l'exercice physique, ce temps de transit serait encore plus court. Ce qui veut dire que le système en place doit être en mesure de détecter un signal métabolique, traduire une réponse par un signal chimique et livrer celui-ci aux cellules effectrices pour lesquelles puissent répondre et, tout cela, dans une fenêtre de temps d'environ une centaine de millisecondes [9]. Cette rapidité d'exécution, un système de SNO-Hb pourrait l'atteindre. D'autre part, on a rapporté qu'un défaut de transport ou de relâche de NO provenant des érythrocytes à cause d'une mauvaise S-nitrosylation pourrait être impliqué dans différentes maladies où il y a un dysfonctionnement vasculaire. Par exemple le diabète [122], l'anémie falciforme [21], l'insuffisance cardiaque congestive [54], les chocs septiques [48, 62] et l'hypertension pulmonaire [184].

Toutefois, comme mentionné précédemment, il existe beaucoup de controverse à savoir si ce système est important ou simplement complémentaire à d'autres mécanismes induits par l'hypoxie. La figure 29 représente une schématisation de trois hypothèses principales qui pourrait expliquer comment les érythrocytes peuvent induire une vasodilatation hypoxique. En plus des SNO-hémoglobines dont nous avons discuté, d'autres groupes de recherche suggèrent qu'il s'agirait de métabolites provenant du tissu environnant et générés par l'état hypoxique, par exemple l'adénosine, qui serait responsable de relaxer les vaisseaux (relâche d'ATP). Il a été démontré, chez le hamster et le lapin, que des érythrocytes libéraient de l'ATP en condition hypoxique, mais pas en normoxie [71, 255]. Cette relâche extracellulaire d'ATP se lierait aux récepteurs purinergique (P_{2Y}) à la surface des cellules endothéliales [70]. Les cellules endothéliales ainsi activées produisent du NO par les synthases de monoxyde d'azote endothélial, induisant une vasodilatation [230]. En parallèle, on a rapporté, chez des sujets humains, qu'une augmentation du flot sanguin aux muscles durant l'exercice physique corrèle avec une augmentation d'ATP dans le plasma [93].

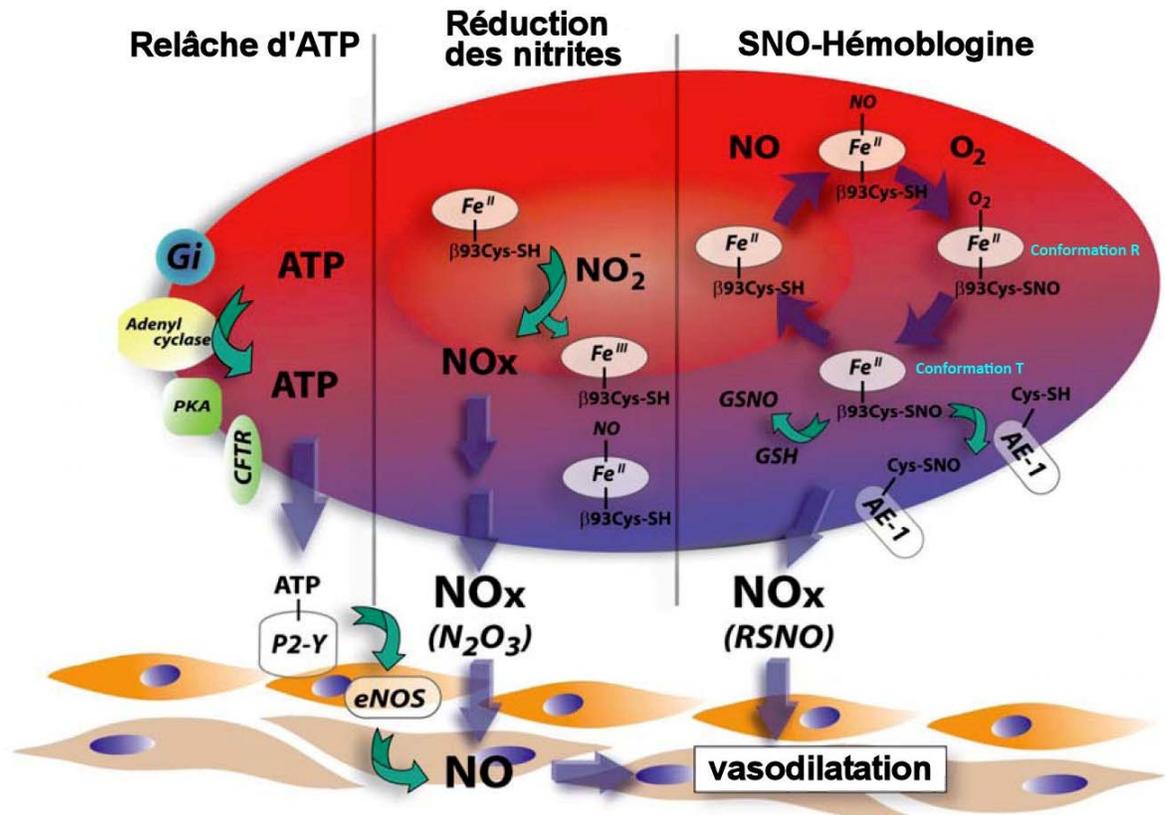


Figure 29 : Mécanismes proposés pour expliquer la vasodilatation hypoxique induite par les érythrocytes. La relâche d'ATP, la réduction des nitrites, la formation de SNO-hémoglobuline sur la cystéine 93 et la libération de NO en condition hypoxique (conformation T). Glutathion (GSH); échangeur anionique-1 « anion exchanger-1 » (AE-1) (Traduit de Isbell et al.)

La troisième hypothèse concernant le rôle possible des érythrocytes dans le contrôle du flot sanguin impliquerait la réduction des nitrites en molécule de NO (Figure 29). Une équipe, de l'Université d'Alabama à Birmingham, a démontré que la réaction des nitrites avec l'hémoglobine est maximale lorsque 50 % de celle-ci est oxygénée (P_{50}). De plus, ils ont observé, en utilisant des préparations d'aorte de rat, que la vasodilatation en présence d'érythrocytes débute elle aussi à P_{50} , suggérant que le rôle de senseur d'oxygène par l'hémoglobine est lié à la réduction de nitrite et la stimulation de la vasodilatation [49]. Outre ces trois hypothèses principales, d'autres suggèrent plutôt que plusieurs composés circulant dans le plasma peuvent servir de produit de réaction afin de produire du NO, sans l'aide d'érythrocytes, pour générer une relaxation des vaisseaux sanguins [295].

À la lumière de ces recherches et du débat qui a encore lieu dans ce domaine, nous pouvons entrevoir la possibilité que les érythrocytes ont sûrement un rôle à jouer dans le contrôle local du flot sanguin. Le paradigme des SNO-Hb est élégant en soi et supporté par plusieurs données scientifiques, mais des travaux récents remettent en question ce modèle. Des souris transgéniques possédant une hémoglobine humanisée (les chaînes α et β de la protéine murine ont été remplacées par la séquence humaine) avec une Cys β 93 mutée pour une alanine ont montré des changements de phénotypes mineurs [119]. Est-ce que ce modèle humanisé camoufle l'effet qu'aurait une vraie délétion? Est-il possible qu'une hémoglobine fœtale puisse compenser la mutation? Est-ce que l'apport des SNO-Hb est pertinent? Est-ce qu'une combinaison de l'implication des SNO-Hb, de la réduction des nitrites et de la relâche d'ATP par les érythrocytes serait plus probable? Le débat est bien entamé et nous espérons qu'il pourra nous éclairer.

Quoi qu'il en soit, je serais particulièrement intéressé à savoir si les SNO-Hb sont impliqués dans la relaxation et le remodelage des vaisseaux utérins durant la grossesse. Je

crois justement que la demande métabolique croissante du fœtus durant la grossesse crée une certaine « pression » sur la vasculature utérine qui se retrouve constamment dans un état « hypoxique », et ce, sur une longue période. Je crois alors qu'un système comme le SNO-Hb devient important pour permettre une « vasorelaxation hypoxique » avec un apport continu de NO dans la circulation utérine. Cette augmentation importante de NO localisée et sur une longue période pourrait avoir un effet important sur le remodelage vasculaire des vaisseaux utérins. Après parturition, le fœtus n'engendre plus cette demande métabolique et il y aurait disparition du « microenvironnement hypoxique » dans la circulation utérine. Il s'ensuivrait alors une diminution de l'apport local de NO et un rétablissement progressif de la circulation en post-partum pour revenir à son état initial. On sait que la production de NO est augmentée par les cellules endothéliales vasculaires utérines durant la gestation en réponse à l'augmentation d'œstrogènes [176, 203, 204]. On sait aussi que l'inhibition par le L-NAME de la production de NO produit par les synthases de NO diminue le remodelage circonférentiel des vaisseaux utérins [211]. Aurions-nous un effet similaire si nous bloquons l'apport de NO via les SNO-Hb? Il serait intéressant d'évaluer si un modèle transgénique similaire à celui d'Isbell et coll. [119] (hémoglobine avec Cys β 93 mutée pour une alanine) pour bloquer l'apport de NO par les SNO-Hb aurait un effet sur le remodelage vasculaire utérin durant la gestation. Aurions-nous un effet additif avec l'administration de L-NAME ce qui réduirait considérablement le remodelage? Peut-être que cette réduction de remodelage diminuerait l'apport sanguin au fœtus ce qui occasionnerait la naissance de bébés avec un petit poids de naissance. Ceci serait semblable à ce qui est observé dans le modèle RUPP (Reduced uterine perfusion pressure) où l'aorte abdominale est ligaturée juste au-dessus de la bifurcation iliaque ainsi que les deux artères ovariennes créant une réduction importante de la perfusion sanguine utéro-placentaire [2, 3, 8, 40, 44]. Je crois que les processus impliqués

dans le remodelage vasculaire utérin représentent une combinaison complexe de tensions qui affectent la paroi vasculaire, les hormones circulantes, les facteurs de croissances et d'autres facteurs générés localement en plus des phénomènes dépendant du NO. Mais, il serait intéressant de vérifier si une hypothèse aussi élégante que le système d'apport de NO via les SNO-Hb pourrait être un facteur important durant la grossesse. [285]

BIBLIOGRAPHIE

1. **Aaronson PI, Ward JPT, Wiener CM** 2004 The cardiovascular system at a glance: Wiley-Blackwell
2. **Abitbol MM, Gallo GR, Pirani CL, Ober WB** 1976 Production of experimental toxemia in the pregnant rabbit. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 124:460-470
3. **Abitbol MM, Ober MB, Gallo GR, Driscoll SG, Pirani CL** 1977 Experimental toxemia of pregnancy in the monkey, with a preliminary report on renin and aldosterone. *American Journal of Pathology* 86:573-590
4. **Abou-Mohamed G, Elmarakby A, Carrier GO, Catravas JD, Caldwell RW, White RE** 2003 Estradiol relaxes rat aorta via endothelium-dependent and -independent mechanisms. *Pharmacology* 69:20-26
5. **Abraham GE, Odell WD, Swerdloff RS, Hopper K** 1972 Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, and estradiol-17 beta during the menstrual cycle. *JClinEndocrinolMetab* 34:312-318
6. **Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y** 1987 Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* 262:5592-5595
7. **Albanito L, Madeo A, Lappano R, Vivacqua A, Rago V, Carpino A, Oprea TI, Prossnitz ER, Musti AM, Ando S, Maggiolini M** 2007 G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 67:1859-1866
8. **Alexander BT, Kassab SE, Miller MT, Abram SR, Reckelhoff JF, Bennett WA, Granger JP** 2001 Reduced uterine perfusion pressure during pregnancy in the rat is associated with increases in arterial pressure and changes in renal nitric oxide. *Hypertension* 37:1191-1195
9. **Allen BW, Piantadosi CA** 2006 How do red blood cells cause hypoxic vasodilation? The SNO-hemoglobin paradigm. *AmJPhysiol Heart CircPhysiol* 291:H1507-H1512
10. **Andersen HL, Weis JU, Fjalland B, Korsgaard N** 1999 Effect of acute and long-term treatment with 17-beta-estradiol on the vasomotor responses in the rat aorta. *British Journal of Pharmacology* 126:159-168

11. **Antonopoulou E, Swanson P, Borg B** 2009 Effects of aromatase inhibitors and different doses of testosterone on gonadotropins in one year old male Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp BiochemPhysiol A MollIntegrPhysiol* 153:408-416
12. **Aoi W, Gable D, Cleary RE, Young PCM, Weinberger MH** 1976 The antihypertensive effect of pregnancy in spontaneously hypertensive rats. *ProcSocExpBiolMed* 153:13-15
13. **Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME** 1989 Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 298:564-567
14. **Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J, Nilsson S** 1998 Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *MolPharmacol* 54:105-112
15. **Barron WM** 1987 Volume homeostasis during pregnancy in the rat. *AmJKidney Dis* 9:296-302
16. **Beausejour A, Auger K, St Louis J, Brochu M** 2003 High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat. *AmJPhysiol Heart CircPhysiol* 285:H375-H383
17. **Bedford CA, Challis JRG, Harrison FA, Heap RB** 1972 The role of oestrogens and progesterone in the onset of parturition in various species. *JReprodFert* 16:1-23
18. **Beyer C, Karolczak M** 2000 Estrogenic stimulation of neurite growth in midbrain dopaminergic neurons depends on cAMP/protein kinase A signalling. *JNeurosciRes* 59:107-116
19. **Bhalla RC, Toth KF, Bhatti RA, Thompson LP, Sharma RV** 1997 Estrogen reduces proliferation and agonist-induced calcium increase in coronary artery smooth muscle cells. *AmJPhysiol* 272:H1996-H2003
20. **Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, Parker MA, Tkachenko SE, Savchuck NP, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER** 2006 Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *NatChemBiol* 2:207-212
21. **Bonaventura C, Taboy CH, Low PS, Stevens RD, Lafon C, Crumbliss AL** 2002 Heme redox properties of S-nitrosated hemoglobin A0 and hemoglobin S: implications for interactions of nitric oxide with normal and sickle red blood cells. *Journal of Biological Chemistry* 277:14557-14563

22. **Bonnevier J, Arner A** 2004 Actions downstream of cyclic GMP/protein kinase G can reverse protein kinase C-mediated phosphorylation of CPI-17 and Ca(2+) sensitization in smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry* 279:28998-29003
23. **Boron WF, Boulpaep EL** 2003 *Medical physiology a cellular and molecular approach*. Philadelphia, Pa: W.B. Saunders
24. **Bourdeau V, Deschenes J, Metivier R, Nagai Y, Nguyen D, Bretschneider N, Gannon F, White JH, Mader S** 2004 Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *MolEndocrinol* 18:1411-1427
25. **Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA** 2002 The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 187:1416-1423
26. **Broughton BR, Miller AA, Sobey CG** 2010 Endothelium-dependent relaxation by G protein coupled receptor 30 agonists in rat carotid arteries. *AmJPhysiol Heart CircPhysiol*
27. **Bucci M, Roviezzo F, Cicala C, Pinto A, Cirino G** 2002 17- α -oestradiol-induced vasorelaxation in vitro is mediated by eNOS through hsp90 and akt/pkb dependent mechanism. *British Journal of Pharmacology* 135 1695-1700
28. **Buehler PW, Alayash AI** 2004 Oxygen sensing in the circulation: "cross talk" between red blood cells and the vasculature. *AntioxidRedoxSignal* 6:1000-1010
29. **Burger LL, Sherwood OD** 1995 Evidence that cellular proliferation contributes to relaxin-induced growth of both the vagina and the cervix in the pregnant rat. *Endocrinology* 136:4820-4826
30. **Burstein HJ** 2007 Aromatase inhibitor-associated arthralgia syndrome. *Breast* 16:223-234
31. **Buteau-Lozano H, Ancelin M, Lardeux B, Milanini J, Perrot-Appianat M** 2002 Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: a complex interplay between estrogen receptors alpha and beta. *Cancer Res* 62:4977-4984
32. **Cambonie G, Comte B, Zydorczyk C, Ntimbane T, Germain N, Le NL, Pladys P, Gauthier C, Lahaie I, Abran D, Lavoie JC, Nuyt AM** 2007 Antenatal antioxidant prevents adult hypertension, vascular dysfunction, and microvascular rarefaction associated with in utero exposure to a low-protein diet. *AmJPhysiol RegulIntegrComp Physiol* 292:R1236-R1245

33. **Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ** 1997 Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* 45:607-617
34. **Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR** 1997 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. *Circulation Research* 81:885-892
35. **Challis JR** 1998 Molecular aspects of preterm labor. *BullMemAcadRMedBelg* 153:263-270
36. **Chen DB, Bird IM, Zheng J, Magness RR** 2004 Membrane estrogen receptor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway mediates acute activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen in uterine artery endothelial cells. *Endocrinology* 145:113-125
37. **Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW** 1999 Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *JClinInvest* 103:401-406
38. **Chesley LC** 1978 Hypertensive disorders in pregnancy: Appleton Century crofts
39. **Cipolla M, Osol G** 1994 Hypertrophic and hyperplastic effects of pregnancy on the rat uterine arterial wall. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 171:805-811
40. **Clark KE, Durnwald M, Austin JE** 1982 A model for studying chronic reduction in uterine blood flow in pregnant sheep. *AmJPhysiol* 242:H297-H301
41. **Clark SL, Cotton DB, Lee W, Bishop C, Hill T, Southwick J, Pivarnik J, Spillman T, DeVore GR, Phelan J** 1989 Central hemodynamic assessment of normal term pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 161:1439-1442
42. **Coleman RE, Bolten WW, Lansdown M, Dale S, Jackisch C, Merkel D, Maass N, Hadji P** 2008 Aromatase inhibitor-induced arthralgia: clinical experience and treatment recommendations. *Cancer TreatRev* 34:275-282
43. **Colyer J** 1998 Phosphorylation states of phospholamban. *AnnNYAcadSci* 853:79-91
44. **Combs CA, Katz MA, Kitzmiller JL, Brescia RJ** 1993 Experimental preeclampsia produced by chronic constriction of the lower aorta: validation with longitudinal blood pressure measurements in conscious rhesus monkeys. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 169:215-223

45. **Conti MA, Adelstein RS** 1980 Phosphorylation by cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase regulates myosin light chain kinase. *FedProc* 39:1569-1573
46. **Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM** 1994 Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *AmJPhysiol* 267:C1405-C1413
47. **Couse JF, Curtis SW, Washburn TF, Lindzey J, Golding TS, Lubahn DB, Smithies O, Korach KS** 1995 Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female mouse after targeted disruption of the estrogen receptor gene. *MolEndocrinol* 9:1441-1454
48. **Crawford JH, Chacko BK, Pruitt HM, Pikhova B, Hogg N, Patel RP** 2004 Transduction of NO-bioactivity by the red blood cell in sepsis: novel mechanisms of vasodilation during acute inflammatory disease. *Blood* 104:1375-1382
49. **Crawford JH, Isbell TS, Huang Z, Shiva S, Chacko BK, Schechter AN, Darley-Usmar VM, Kerby JD, Lang JD, Jr., Kraus D, Ho C, Gladwin MT, Patel RP** 2006 Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation. *Blood* 107:566-574
50. **Crews JK, Khalil RA** 1999 Antagonistic effects of 17 beta-estradiol, progesterone, and testosterone on Ca²⁺ entry mechanisms of coronary vasoconstriction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19:1034-1040
51. **D'Angelo G, Osol G** 1993 Regional variation in resistance artery diameter responses to α -adrenergic stimulation during pregnancy. *AmJPhysiol* 264:H78-H85
52. **Darkow DJ, Lu L, White RE** 1997 Estrogen relaxation of coronary artery smooth muscle is mediated by nitric oxide and cGMP. *AmJPhysiol* 272:H2765-H2773
53. **Dash P, Keogh R** 2009 *Reproductive Biology*. In:
54. **Datta B, Tufnell-Barrett T, Bleasdale RA, Jones CJ, Beeton I, Paul V, Frenneaux M, James P** 2004 Red blood cell nitric oxide as an endocrine vasoregulator: a potential role in congestive heart failure. *Circulation* 109:1339-1342
55. **Daut J, Maier-Rudolph W, von BN, Mehrke G, Gunther K, Goedel-Meinen L** 1990 Hypoxic dilation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Science* 247:1341-1344
56. **de Rijk EPCT, van Esch E, Flik G** 2002 Pregnancy dating in the rat: placental morphology and maternal blood parameters. *ToxicolPathol* 30:271-282

57. **Deatherage JF, Moffat K** 1979 Structure of nitric oxide hemoglobin. *JMolBiol* 134:401-417
58. **DeCherney AH, Nathan L, ebrary I** 2003 Current obstetric & gynecologic diagnosis & treatment. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill
59. **Dennis MK, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Alcon SN, Nayak TK, Bologna CG, Leitao A, Brailoiu E, Deliu E, Dun NJ, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Oprea TI, Prossnitz ER** 2009 In vivo effects of a GPR30 antagonist. *NatChemBiol* 5:421-427
60. **Dieckman WJ, Michel HL** 1937 Vascular renal effects of posterior pituitary extracts in pregnant women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 33:131-137
61. **Doan VD, Gagnon S, Joseph V** 2004 Prenatal blockade of estradiol synthesis impairs respiratory and metabolic responses to hypoxia in newborn and adult rats. *AmJPhysiol RegulIntegrComp Physiol* 287:R612-R618
62. **Doctor A, Platt R, Sheram ML, Eischeid A, McMahon T, Maxey T, Doherty J, Axelrod M, Kline J, Gurka M, Gow A, Gaston B** 2005 Hemoglobin conformation couples erythrocyte S-nitrosothiol content to O₂ gradients. *ProcNatlAcadSciUSA* 102:5709-5714
63. **Doench JG, Petersen CP, Sharp PA** 2003 siRNAs can function as miRNAs. *Genes and Development* 17:438-442
64. **Dominguez-Salazar E, Portillo W, Baum MJ, Bakker J, Paredes RG** 2002 Effect of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual behavior, partner preference and neuronal Fos responses to estrous female odors in the rat accessory olfactory system. *Physiol Behav* 75:337-346
65. **Donaldson MD, Forest MG** 1980 Immunological interference of the synthetic aromatase inhibitor 1,4,6-androstatriene-3,17-dione (ATD) and its metabolite(s) in the radioimmunoassay for testosterone. *Steroids* 36:717-721
66. **Dowell RT, Kauer CD** 1997 Maternal hemodynamics and uteroplacental blood flow throughout gestation in conscious rats. *Methods FindExpClinPharmacol* 19:613-625
67. **Ducsay CA, Seron-Perre M, Germain AM** 1993 Endocrine and uterine activity rhythms in the perinatal period. *Semin Reprod Enocrinol* 11:285
68. **Duvekot JJ, Peeters LL** 1994 Maternal cardiovascular hemodynamic adaptation to pregnancy. *ObstetGynecolSurv* 49:S1-14
69. **Duvekot JJ, Peeters LL** 1994 Renal hemodynamics and volume homeostasis in pregnancy. *ObstetGynecolSurv* 49:830-839

70. **Ellsworth ML** 2004 Red blood cell-derived ATP as a regulator of skeletal muscle perfusion. *MedSciSports Exerc* 36:35-41
71. **Ellsworth ML, Forrester T, Ellis CG, Dietrich HH** 1995 The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *AmJPhysiol* 269:H2155-H2161
72. **Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M** 2000 Multiple actions of steroid hormones: a focus on rapid, nongenomic effects. *PharmacolRev* 52:513-555
73. **Favit A, Fiore L, Nicoletti F, Canonico PL** 1991 Estrogen modulates stimulation of inositol phospholipid hydrolysis by norepinephrine in rat brain slices. *Brain Research* 555:65-69
74. **Fehrenbacher JC, Loverme J, Clarke W, Hargreaves KM, Piomelli D, Taylor BK** 2009 Rapid pain modulation with nuclear receptor ligands. *Brain ResRev* 60:114-124
75. **Feil R, Gappa N, Rutz M, Schlossmann J, Rose CR, Konnerth A, Brummer S, Kuhbandner S, Hofmann F** 2002 Functional reconstitution of vascular smooth muscle cells with cGMP-dependent protein kinase I isoforms. *Circulation Research* 90:1080-1086
76. **Feng Y, Gregor P** 1997 Cloning of a novel member of the G protein-coupled receptor family related to peptide receptors. *BiochemBiophysResCommun* 231:651-654
77. **Filardo EJ, Quinn J, Pang Y, Graeber C, Shaw S, Dong J, Thomas P** 2007 Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology* 148:3236-3245
78. **Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR, Jr.** 2000 Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *MolEndocrinol* 14:1649-1660
79. **Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR, Jr., Bland KI** 2002 Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *MolEndocrinol* 16:70-84
80. **Fileiko AM, Danilova VM, Sobieszek A** 1997 Smooth muscle myosin light chain kinase, supramolecular organization, modulation of activity, and related conformational changes. *BiophysJ* 73:1593-1606

81. **Fitzpatrick SL, Richards JS** 1994 Identification of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-response element in the rat aromatase promoter that is required for transcriptional activation in rat granulosa cells and R2C leydig cells. *MolEndocrinol* 8:1309-1319
82. **Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ** 2006 Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology(Bethesda)* 21:29-37
83. **Freay AD, Curtis SW, Korach KS, Rubanyi GM** 1997 Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by estrogen in depolarized rat and mouse aorta. Role of nuclear estrogen receptor and Ca²⁺ uptake. *Circulation Research* 81:242-248
84. **Friedman F, Jr., Copperman AB, Brodman ML, Shah D, Sandler B, Grunfeld L** 1996 Perinatal outcome after embryo transfer in ovum recipients. A comparison with standard in vitro fertilization. *JReprodMed* 41:640-644
85. **Fuller R, Barron C, Mandala M, Gokina N, Osol G** 2009 Predominance of local over systemic factors in uterine arterial remodeling during pregnancy. *ReprodSci* 16:489-500
86. **Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y** 2006 G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *BiochemBiophysResCommun* 346:904-910
87. **Gabbe SG, Neibyl JR, Simpson JL** 2001 *Obstetrics: Normal and problem pregnancies* Philadelphia: Churchill Livingston
88. **Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML** 1990 Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *Journal of Biological Chemistry* 265:11083-11090
89. **Garland HO, Atherton JC, Baylis C, Morgan MRA, Milne CM** 1987 Hormone profiles for progesterone, oestradiol, prolactin, plasma renin activity, aldosterone and corticosterone during pregnancy and pseudopregnancy in two strains of rat: correlation with renal studies. *JEndocrinol* 113:435-444
90. **Gibori G** 1994 The corpus luteum of pregnancy. In: *The Ovary*. New York: Raven press; 261-317
91. **Gibori G, Sridaran R** 1981 Sites of androgen and estradiol production in the second half of pregnancy in the rat. *Biology of Reproduction* 24:249-256

92. **Glass CK, Rosenfeld MG** 2000 The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes and Development* 14:121-141
93. **Gonzalez-Alonso J, Olsen DB, Saltin B** 2002 Erythrocyte and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery: role of circulating ATP. *Circulation Research* 91:1046-1055
94. **Goodman LS, Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG** 2001 Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York: Mc Graw-Hill
95. **Goss PE, Qi S, Cheung AM, Hu H, Mendes M, Pritzker KP** 2004 Effects of the steroidal aromatase inhibitor exemestane and the nonsteroidal aromatase inhibitor letrozole on bone and lipid metabolism in ovariectomized rats. *ClinCancer Res* 10:5717-5723
96. **Grandas OH, Mountain DH, Kirkpatrick SS, Cassada DC, Stevens SL, Freeman MB, Goldman MH** 2009 Regulation of vascular smooth muscle cell expression and function of matrix metalloproteinases is mediated by estrogen and progesterone exposure. *JVascSurg* 49:185-191
97. **Gu Q, Moss RL** 1996 17 beta-Estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of the cAMP cascade. *JNeurosci* 16:3620-3629
98. **Gui Y, Zheng XL, Zheng J, Walsh MP** 2008 Inhibition of rat aortic smooth muscle contraction by 2-methoxyestradiol. *AmJPhysiol Heart CircPhysiol* 295:H1935-H1942
99. **Haas E, Bhattacharya I, Brailoiu E, Damjanovic M, Brailoiu GC, Gao X, Mueller-Guerre L, Marjon NA, Gut A, Minotti R, Meyer MR, Amann K, Ammann E, Perez-Dominguez A, Genoni M, Clegg DJ, Dun NJ, Resta TC, Prossnitz ER, Barton M** 2009 Regulatory role of G protein-coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. *Circulation Research* 104:288-291
100. **Haas E, Meyer MR, Schurr U, Bhattacharya I, Minotti R, Nguyen HH, Heigl A, Lachat M, Genoni M, Barton M** 2007 Differential effects of 17beta-estradiol on function and expression of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta, and GPR30 in arteries and veins of patients with atherosclerosis. *Hypertension* 49:1358-1363
101. **Halachmi S, Marden E, Martin G, MacKay H, Abbondanza C, Brown M** 1994 Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science* 264:1455-1458

102. **Hall JM, McDonnell DP** 1999 The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140:5566-5578
103. **Han G, Ma H, Chintala R, Miyake K, Fulton DJ, Barman SA, White RE** 2007 Nongenomic, endothelium-independent effects of estrogen on human coronary smooth muscle are mediated by type I (neuronal) NOS and PI3-kinase-Akt signaling. *AmJPhysiol Heart CircPhysiol* 293:H314-H321
104. **Han SZ, Karaki H, Ouchi Y, Akishita M, Orimo H** 1995 17 beta-Estradiol inhibits Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release induced by thromboxane A₂ in porcine coronary artery. *Circulation* 91:2619-2626
105. **Hannon GJ** 2002 RNA interference. *Nature* 418:244-251
106. **Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Bender JR** 2000 Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circulation Research* 87:677-682
107. **Henson MC, Pepe GJ, Albrecht ED** 1991 Regulation of placental low-density lipoprotein uptake in baboons by estrogen: dose-dependent effects of the anti-estrogen ethamoxytriphethylol (MER-25). *Biology of Reproduction* 45:43-48
108. **Herve MA, Meduri G, Petit FG, Domet TS, Lazennec G, Mourah S, Perrot-Appinat M** 2006 Regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR by estradiol through VEGF in uterus. *JEndocrinol* 188:91-99
109. **Hisaw FL** 1926 Experimental relaxation of the pubic ligament of the guinea pig. *ProcSocExpBiolMed* 23:661-663
110. **Honda H, Kaneko H, Kondo M, Kogo H** 1996 Comparison of endothelium-derived relaxing factor activity between nonpregnant and pregnant rats. *Comp BiochemPhysiol CPharmacolToxicolEndocrinol* 114:193-196
111. **Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS, Tung L** 1996 Nuclear receptor coactivators and corepressors. *MolEndocrinol* 10:1167-1177
112. **Howell A, Osborne CK, Morris C, Wakeling AE** 2000 ICI 182,780 (Faslodex): development of a novel, "pure" antiestrogen. *Cancer* 89:817-825
113. **Hsu HK, Yang RC, Shih HC, Hsieh YL, Chen UY, Hsu C** 2001 Prenatal exposure of testosterone prevents SDN-POA neurons of postnatal male rats from apoptosis through NMDA receptor. *JNeurophysiol* 86:2374-2380

114. **Hsueh AJ, Peck EJ, Jr., Clark JH** 1975 Progesterone antagonism of the oestrogen receptor and oestrogen-induced uterine growth. *Nature* 254:337-339
115. **Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E** 1998 Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* 280:605-613
116. **Hwang JJ, Lee AB, Fields PA, Haab LM, Mojonier LE, Sherwood OD** 1991 Monoclonal antibodies specific for rat relaxin. V. Passive immunization with monoclonal antibodies throughout the second half of pregnancy disrupts development of the mammary apparatus and, hence, lactational performance in rats. *Endocrinology* 129:3034-3042
117. **Ikebe M, Brozovich FV** 1996 Protein kinase C increases force and slows relaxation in smooth muscle: evidence for regulation of the myosin light chain phosphatase. *BiochemBiophysResCommun* 225:370-376
118. **Irvine JC, Favalaro JL, Widdop RE, Kemp-Harper BK** 2007 Nitroxyl anion donor, Angeli's salt, does not develop tolerance in rat isolated aortae. *Hypertension* 49:885-892
119. **Isbell TS, Sun CW, Wu LC, Teng X, Vitturi DA, Branch BG, Kevil CG, Peng N, Wyss JM, Ambalavanan N, Schwiebert L, Ren J, Pawlik KM, Renfrow MB, Patel RP, Townes TM** 2008 SNO-hemoglobin is not essential for red blood cell-dependent hypoxic vasodilation. *NatMed* 14:773-777
120. **Isensee J, Meoli L, Zazzu V, Nabzdyk C, Witt H, Soewarto D, Effertz K, Fuchs H, Gailus-Durner V, Busch D, Adler T, de Angelis MH, Irgang M, Otto C, Noppinger PR** 2009 Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in LacZ reporter mice. *Endocrinology* 150:1722-1730
121. **Jahagirdar V, Quadros PS, Wagner CK** 2008 Endogenous oestradiol regulates progesterone receptor expression in the brain of female rat fetuses: what is the source of oestradiol? *JNeuroendocrinol* 20:359-365
122. **James PE, Lang D, Tufnell-Barret T, Milsom AB, Frenneaux MP** 2004 Vasorelaxation by red blood cells and impairment in diabetes: reduced nitric oxide and oxygen delivery by glycated hemoglobin. *Circulation Research* 94:976-983
123. **James PH, Pruschy M, Vorherr TE, Penniston JT, Carafoli E** 1989 Primary structure of the cAMP-dependent phosphorylation site of the plasma membrane calcium pump. *Biochemistry* 28:4253-4258

124. **Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS** 1996 S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 380:221-226
125. **Jiang C, Sarrel PM, Lindsay DC, Poole-Wilson PA, Collins P** 1991 Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 α -oestradiol invitro. *British Journal of Pharmacology* 104:1033-1037
126. **Jin H, Koyama T, Hatanaka Y, Akiyama S, Takayama F, Kawasaki H** 2006 Histamine-induced vasodilation and vasoconstriction in the mesenteric resistance artery of the rat. *European Journal of Pharmacology* 529:136-144
127. **Jin N, Siddiqui RA, English D, Rhoades RA** 1996 Communication between tyrosine kinase pathway and myosin light chain kinase pathway in smooth muscle. *AmJPhysiol* 271:H1348-H1355
128. **Johnson MR, Abdalla H, Allman AC, Wren ME, Kirkland A, Lightman SL** 1991 Relaxin levels in ovum donation pregnancies. *FertilSteril* 56:59-61
129. **Jones ME, Boon WC, McInnes K, Maffei L, Carani C, Simpson ER** 2007 Recognizing rare disorders: aromatase deficiency. *NatClinPractEndocrinolMetab* 3:414-421
130. **Joshi MS, Ferguson TB, Jr., Han TH, Hyduke DR, Liao JC, Rassaf T, Bryan N, Feelisch M, Lancaster JR, Jr.** 2002 Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions. *ProcNatlAcadSciUSA* 99:10341-10346
131. **Kanasaki K, Palmsten K, Sugimoto H, Ahmad S, Hamano Y, Xie L, Parry S, Augustin HG, Gattone VH, Folkman J, Strauss JF, Kalluri R** 2008 Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyoestradiol is associated with pre-eclampsia. *Nature* 453:1117-1121
132. **Kanda N, Watanabe S** 2003 17Beta-estradiol enhances the production of nerve growth factor in THP-1-derived macrophages or peripheral blood monocyte-derived macrophages. *JInvest Dermatol* 121:771-780
133. **Kanda N, Watanabe S** 2003 17beta-estradiol inhibits oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression. *JInvest Dermatol* 121:1500-1509
134. **Kanda N, Watanabe S** 2004 17beta-estradiol enhances the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human keratinocytes. *JInvest Dermatol* 123:329-337
135. **Kanda N, Watanabe S** 2004 17beta-estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin D2 expression. *JInvest Dermatol* 123:319-328

136. **Kang K, Lee SB, Jung SH, Cha KH, Park WD, Sohn YC, Nho CW** 2009 Tectoridin, a poor ligand of estrogen receptor alpha, exerts its estrogenic effects via an ERK-dependent pathway. *MolCells* 27:351-357
137. **Karaer O, Oruc S, Koyuncu FM** 2004 Aromatase inhibitors: possible future applications. *Acta ObstetGynecolScand* 83:699-706
138. **Karas RH, Schulten H, Pare G, Aronovitz MJ, Ohlsson C, Gustafsson JA, Mendelsohn ME** 2001 Effects of estrogen on the vascular injury response in estrogen receptor alpha, beta (double) knockout mice. *Circulation Research* 89:534-539
139. **Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P** 1990 Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 9:1603-1614
140. **Kaufmann P, Huppertz B, Frank HG** 1996 The fibrinoids of the human placenta: origin, composition and functional relevance. *AnnAnat* 178:485-501
141. **Kelly B, Stone S, Poston L** 2000 Cardiovascular adaptation to pregnancy: the role of altered vascular structure. *Fetal and Maternal Medicine Review* 11:105-116
142. **Keung W, Vanhoutte PM, Man RY** 2005 Acute impairment of contractile responses by 17beta-estradiol is cAMP and protein kinase G dependent in vascular smooth muscle cells of the porcine coronary arteries. *British Journal of Pharmacology* 144:71-79
143. **Kim C, Cheng CY, Saldanha SA, Taylor SS** 2007 PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. *Cell* 130:1032-1043
144. **Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K** 1996 Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273:245-248
145. **Kitazawa T, Hamada E, Kitazawa K, Gaznabi AK** 1997 Non-genomic mechanism of 17 beta-oestradiol-induced inhibition of contraction in mammalian vascular smooth muscle. *JPhysiol* 499 (Pt 2):497-511
146. **Kitazawa T, Takizawa N, Ikebe M, Eto M** 1999 Reconstitution of protein kinase C-induced contractile Ca²⁺ sensitization in triton X-100-demembrated rabbit arterial smooth muscle. *JPhysiol* 520 Pt 1:139-152
147. **Klopper A, Masson G, Campbell D, Wilson G** 1973 Estriol in plasma. A compartmental study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 117:21-26

148. **Knaus HG, McManus OB, Lee SH, Schmalhofer WA, Garcia-Calvo M, Helms LM, Sanchez M, Giangiacomo K, Reuben JP, Smith AB, III** 1994 Tremorgenic indole alkaloids potentially inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels. *Biochemistry* 33:5819-5828
149. **Knobil E, Neill J, Sherwood OD** 1994 *The physiology of Reproduction*. New York: Raven Press
150. **Kolodgie FD, Jacob A, Wilson PS, Carlson GC, Farb A, Verma A, Virmani R** 1996 Estradiol attenuates directed migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *American Journal of Pathology* 148:969-976
151. **Krasinski K, Spyridopoulos I, Asahara T, van der Zee R, Isner JM, Losordo DW** 1997 Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation* 95:1768-1772
152. **Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O** 1998 Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *ProcNatlAcadSciUSA* 95:15677-15682
153. **Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA** 1997 Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-870
154. **Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA** 1996 Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *ProcNatlAcadSciUSA* 93:5925-5930
155. **Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA** 1998 Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139:4252-4263
156. **Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P** 1987 Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51:941-951
157. **Kvingedal AM, Smeland EB** 1997 A novel putative G-protein-coupled receptor expressed in lung, heart and lymphoid tissue. *FEBS Lett* 407:59-62
158. **Labrie F** 1991 *Intracrinology*. *MolCell Endocrinol* 78:C113-C118
159. **Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J** 2001 DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front Neuroendocrinol* 22:185-212

160. **Lantin-Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, German Z, Chen Z, Shaul PW** 1997 Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *AmJPhysiol* 273:L119-L126
161. **Lee JS, Obach RS, Fisher MB** 2003 Drug metabolizing enzymes cytochrome P450 and other enzymes in drug discovery and development. Lausanne, Switzerland: FontisMedia SA
162. **Leiberman E, Zachmann M** 1992 Familial adrenal feminization probably due to increased steroid aromatization. *HormRes* 37:96-102
163. **Leiberman JR, Wiznitzer A, Glezerman M, Feldman B, Levy J, Sharoni Y** 1993 Estrogen and progesterone receptors in the uterine artery of rats during and after pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 51:35-40
164. **Leranth C, Hajszan T, MacLusky NJ** 2004 Androgens increase spine synapse density in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. *JNeurosci* 24:495-499
165. **Leung HS, Seto SW, Kwan YW, Leung FP, Au AL, Yung LM, Yao X, Huang Y** 2007 Endothelium-independent relaxation to raloxifene in porcine coronary artery. *European Journal of Pharmacology* 555:178-184
166. **Leung HS, Yung LM, Leung FP, Yao X, Chen ZY, Ko WH, Laher I, Huang Y** 2006 Tamoxifen dilates porcine coronary arteries: roles for nitric oxide and ouabain-sensitive mechanisms. *British Journal of Pharmacology* 149:703-711
167. **Levick JR** 2003 *An introduction to Cardiovascular Physiology*: Arnold
168. **Lindberg BS, Johansson ED, Nilsson BA** 1974 Plasma levels of nonconjugated oestrone, oestradiol-17beta and oestriol during uncomplicated pregnancy. *Acta ObstetGynecolScandSuppl* 32:21-36
169. **Lindsey SH, Cohen JA, Brosnihan KB, Gallagher PE, Chappell MC** 2009 CHRONIC TREATMENT WITH THE GPR30 AGONIST G-1 DECREASES BLOOD PRESSURE IN OVARECTOMIZED MREN2.LEWIS RATS. *Endocrinology*
170. **Liu CY, Sturek M** 1996 Attenuation of endothelin-1-induced calcium response by tyrosine kinase inhibitors in vascular smooth muscle cells. *AmJPhysiol* 270:C1825-C1833
171. **Loeb AL, Godeny I, Longnecker DE** 2000 Functional evidence for inward-rectifier potassium channels in rat cremaster muscle arterioles. *MicrovascRes* 59:1-6
172. **MacGillivray I, Rose GA, Rowe B** 1969 Blood pressure survey in pregnancy. *ClinSci* 37:395-407

173. **Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, Montanaro D, Musti AM, Picard D, Ando S** 2004 The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 279:27008-27016
174. **Magness RR, Phernetton TM, Gibson TC, Chen DB** 2005 Uterine blood flow responses to ICI 182 780 in ovariectomized oestradiol-17beta-treated, intact follicular and pregnant sheep. *JPhysiol* 565:71-83
175. **Magness RR, Rosenfeld CR** 1989 Local and systemic estradiol-17 beta: effects on uterine and systemic vasodilation. *AmJPhysiol* 256:E536-E542
176. **Magness RR, Shaw CE, Phernetton TM, Zheng J, Bird IM** 1997 Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. II. Pregnancy effects on NO synthase expression. *AmJPhysiol* 272:H1730-H1740
177. **Marston SB, Redwood CS** 1992 Inhibition of actin-tropomyosin activation of myosin MgATPase activity by the smooth muscle regulatory protein caldesmon. *Journal of Biological Chemistry* 267:16796-16800
178. **Martensson UE, Salehi SA, Windahl S, Gomez MF, Sward K, Daszkiewicz-Nilsson J, Wendt A, Andersson N, Hellstrand P, Grande PO, Owman C, Rosen CJ, Adamo ML, Lundquist I, Rorsman P, Nilsson BO, Ohlsson C, Olde B, Leeb-Lundberg LM** 2009 Deletion of the G protein-coupled receptor 30 impairs glucose tolerance, reduces bone growth, increases blood pressure, and eliminates estradiol-stimulated insulin release in female mice. *Endocrinology* 150:687-698
179. **Massicotte G, St Louis J, Parent A, Schiffrin EL** 1987 Decreased in vitro responses to vasoconstrictors during gestation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *CanJPhysiol Pharmacol* 65:2466-2471
180. **Matagne V, Rasier G, Lebrethon MC, Gerard A, Bourguignon JP** 2004 Estradiol stimulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in vitro: correlation with perinatal exposure to sex steroids and induction of sexual precocity in vivo. *Endocrinology* 145:2775-2783
181. **Matsuda K, Sakamoto H, Mori H, Hosokawa K, Kawamura A, Itose M, Nishi M, Prossnitz ER, Kawata M** 2008 Expression and intracellular distribution of the G protein-coupled receptor 30 in rat hippocampal formation. *NeurosciLett* 441:94-99
182. **Mauras N, Gonzalez de PL, Hsiang HY, Desrosiers P, Rapaport R, Schwartz ID, Klein KO, Singh RJ, Miyamoto A, Bishop K** 2008 Anastrozole increases predicted adult height of short adolescent males treated with growth hormone: a

- randomized, placebo-controlled, multicenter trial for one to three years. *JClinEndocrinolMetab* 93:823-831
183. **McKenna NJ, O'Malley BW** 2002 Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108:465-474
184. **McMahon TJ, Ahearn GS, Moya MP, Gow AJ, Huang YC, Luchsinger BP, Nudelman R, Yan Y, Krichman AD, Bashore TM, Califf RM, Singel DJ, Piantadosi CA, Tapson VF, Stamler JS** 2005 A nitric oxide processing defect of red blood cells created by hypoxia: deficiency of S-nitrosohemoglobin in pulmonary hypertension. *ProcNatlAcadSciUSA* 102:14801-14806
185. **McNeill AM, Duckles SP, Krause DN** 1996 Relaxant effects of 17 beta-estradiol in the rat tail artery are greater in females than males. *European Journal of Pharmacology* 308:305-309
186. **Mendelsohn ME, Karas RH** 1999 The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *NEnglJMed* 340:1801-1811
187. **Merger R, Lvy J, Melchior J** 2001 *Pr,cis d'obst,rique*: Masson
188. **Merry DE, Korsmeyer SJ** 1997 Bcl-2 gene family in the nervous system. *AnnuRevNeurosci* 20:245-267
189. **Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, Marriner GA, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA** 2001 Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: structure-activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *JMedChem* 44:4230-4251
190. **Milde-Langosch K** 2005 The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *EurJCancer* 41:2449-2461
191. **Mokbel K** 2002 The evolving role of aromatase inhibitors in breast cancer. *IntJClinOncol* 7:279-283
192. **Moll W, Nienartowicz A, Hees H, Wrobel KH, Lenz A** 1988 Blood flow regulation in the uteroplacental arteries. *Trophoblast Research* 3:83-96
193. **Morales DE, McGowan KA, Grant DS, Maheshwari S, Bhartiya D, Cid MC, Kleinman HK, Schnaper HW** 1995 Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation* 91:755-763
194. **Moritz A, Gust R, Pertz HH** 2007 Characterization of the relaxant response to N,N'-dipropyl-1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamine in porcine

- coronary arteries. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 321:699-706
195. **Moriyama I, Sugawa T** 1972 Progesterone facilitates implantation of xenogenic cultured cells in hamster uterus. *NatNew Biol* 236:150-152
 196. **Moutquin JM, Bilodeau R, Raynaud P, Amyot G, Blair JF, Labelle L, Rainville C, Gagnon L** 1982 Etude prospective de la tension art,rielle au cours de la grossesse: Pr,diction des complications hypertensives. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 11:833-837
 197. **Mugge A, Riedel M, Barton M, Kuhn M, Lichtlen PR** 1993 Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 beta-oestradiol in vitro. *CardiovascRes* 27:1939-1942
 198. **Nabekura J, Oomura Y, Minami T, Mizuno Y, Fukuda A** 1986 Mechanism of the rapid effect of 17 beta-estradiol on medial amygdala neurons. *Science* 233:226-228
 199. **Naden RP, Rosenfeld CR** 1981 Effect of angiotensin II on uterine and systemic vasculature in pregnant sheep. *Journal of Clinical Investigation* 68:468-474
 200. **Naden RP, Rosenfeld CR** 1985 Systemic and uterine responsiveness to angiotensin II and norepinephrine in estrogen-treated non-pregnant sheep. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 153:417-425
 201. **Nakajima T, Kitazawa T, Hamada E, Hazama H, Omata M, Kurachi Y** 1995 17beta-Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca²⁺ currents in aortic smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology* 294:625-635
 202. **Nelson MT, Quayle JM** 1995 Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *AmJPhysiol* 268:C799-C822
 203. **Nelson SH, Steinsland OS, Wang Y, Yallampalli C, Dong YL, Sanchez JM** 2000 Increased nitric oxide synthase activity and expression in human uterine artery during pregnancy. *Circulation Research* 87 406-411
 204. **Ni Y, Meyer M, Osol G** 1997 Gestation increases nitric oxide-mediated vasodilation in rat uterine arteries. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 176:856-864
 205. **Noel SD, Keen KL, Baumann DI, Filardo EJ, Terasawa E** 2009 Involvement of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) in rapid action of estrogen in primate LHRH neurons. *MolEndocrinol* 23:349-359
 206. **Ntimbane T, Krishnamoorthy P, Huot C, Legault L, Jacob SV, Brunet S, Levy E, Gueraud F, Lands LC, Comte B** 2008 Oxidative stress and cystic fibrosis-related diabetes: a pilot study in children. *JCystFibros* 7:373-384

207. **O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch KR, Heng HH, Kolakowski LF, Jr., George SR** 1998 Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics* 47:310-313
208. **O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U** 2004 Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *MolEndocrinol* 18:1859-1875
209. **Oosterhof H, Wichers G, Fidler V, Aarnoudse JG** 1993 Blood viscosity and uterine artery flow velocity waveforms in pregnancy: a longitudinal study. *Placenta* 14:555-561
210. **Orshal JM, Khalil RA** 2004 Interleukin-6 impairs endothelium-dependent NO-cGMP-mediated relaxation and enhances contraction in systemic vessels of pregnant rats. *AmJPhysiol RegulIntegrComp Physiol* 286:R1013-R1023
211. **Osol G, Barron C, Gokina N, Mandala M** 2009 Inhibition of Nitric Oxide Synthases Abrogates Pregnancy-Induced Uterine Vascular Expansive Remodeling. *JVascRes* 46:478-486
212. **Osol G, Cipolla M** 1993 Pregnancy-induced changes in the three-dimensional mechanical properties of pressurized rat uteroplacental (radial) arteries. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 168:268-274
213. **Osol G, Mandala M** 2009 Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. *Physiology(Bethesda)* 24:58-71
214. **Otto C, Fuchs I, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Andreasen P, Schwarz G, Altmann H, Klewer M, Schoor M, Vonk R, Fritzeimer KH** 2009 GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice. *Biology of Reproduction* 80:34-41
215. **Otto C, Rohde-Schulz B, Schwarz G, Fuchs I, Klewer M, Brittain D, Langer G, Bader B, Prella K, Nubbemeyer R, Fritzeimer KH** 2008 G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology* 149:4846-4856
216. **Owman C, Blay P, Nilsson C, Lolait SJ** 1996 Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. *BiochemBiophysResCommun* 228:285-292
217. **Page KL, Celia G, Leddy G, Taatjes DJ, Osol G** 2002 Structural remodeling of rat uterine veins in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 187:1647-1652

218. **Pandey DP, Lappano R, Albanito L, Madeo A, Maggiolini M, Picard D** 2009 Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *EMBO J* 28:523-532
219. **Pang Y, Thomas P** 2009 Involvement of estradiol-17beta and its membrane receptor, G protein coupled receptor 30 (GPR30) in regulation of oocyte maturation in zebrafish, *Danio rario*. *GenComp Endocrinol* 161:58-61
220. **Park WS, Son YK, Kim N, Ko JH, Kang SH, Warda M, Earm YE, Jung ID, Park YM, Han J** 2007 Acute hypoxia induces vasodilation and increases coronary blood flow by activating inward rectifier K(+) channels. *Pflugers Arch*
221. **Parr MK, Fusholler G, Schlorer N, Opfermann G, Piper T, Rodchenkov G, Schanzer W** 2009 Metabolism of androsta-1,4,6-triene-3,17-dione and detection by gas chromatography/mass spectrometry in doping control. *Rapid CommunMass Spectrom* 23:207-218
222. **Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB, Brosens I** 1980 Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta* 1:3-19
223. **Prakash YS, Togaibayeva AA, Kannan MS, Miller VM, Fitzpatrick LA, Sieck GC** 1999 Estrogen increases Ca²⁺ efflux from female porcine coronary arterial smooth muscle. *AmJPhysiol* 276:H926-H934
224. **Pratt WB, Toft DO** 1997 Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *EndocrRev* 18:306-360
225. **Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A** 1999 EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402:884-888
226. **Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ** 2008 Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *AnnuRevPhysiol* 70:165-190
227. **Prossnitz ER, Maggiolini M** 2009 Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *MolCell Endocrinol* 308:32-38
228. **Punnonen R, Lukola A** 1981 Binding of estrogen and progestin in the human fallopian tube. *FertilSteril* 36:610-614
229. **Purba HS, Bhatnagar AS** 1990 A comparison of methods measuring aromatase activity in human placenta and rat ovary. *JEnzyme Inhib* 4:169-178
230. **Ralevic V, Burnstock G** 1998 Receptors for purines and pyrimidines. *PharmacolRev* 50:413-492

231. **Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER** 2003 Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *Journal of Biological Chemistry* 278:2701-2712
232. **Reis SE, Gloth ST, Blumenthal RS, Resar JR, Zacur HA, Gerstenblith G, Brinker JA** 1994 Ethinyl estradiol acutely attenuates abnormal coronary vasomotor responses to acetylcholine in postmenopausal women. *Circulation* 89:52-60
233. **Resnik R** 2002 Intrauterine growth restriction. *ObstetGynecol* 99:490-496
234. **Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER** 2005 A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307:1625-1630
235. **Revankar CM, Mitchell HD, Field AS, Burai R, Corona C, Ramesh C, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER** 2007 Synthetic estrogen derivatives demonstrate the functionality of intracellular GPR30. *ACS ChemBiol* 2:536-544
236. **Rosenfeld CR** 2001 Mechanisms regulating angiotensin II responsiveness by the uteroplacental circulation. *AmJPhysiol RegulIntegrComp Physiol* 281:R1025-R1040
237. **Rosenfeld CR, Chen C, Roy T, Liu X** 2003 Estrogen selectively up-regulates eNOS and nNOS in reproductive arteries by transcriptional mechanisms. *JSocGynecollInvest* 10:205-215
238. **Rosenfeld CR, Cornfield DN, Roy T** 2001 Ca(2+)-activated K(+) channels modulate basal and E(2)beta-induced rises in uterine blood flow in ovine pregnancy. *AmJPhysiol Heart CircPhysiol* 281:H422-H431
239. **Rosenfeld CR, Gresores A, Roy TA, Magness RR** 1995 Comparison of ANG II in fetal and pregnant sheep: Metabolic clearance and vascular sensitivity. *AmJPhysiol* 268:E237-E247
240. **Rosenfeld CR, Killam AP, Battaglia FC, Makowski EL, Meschia G** 1973 Effect of estradiol-17, on the magnitude and distribution of uterine blood flow in nonpregnant, oophorectomized ewes. *PediatrRes* 7:139-148
241. **Rosenfeld CR, Roy T, Cox BE** 2002 Mechanisms modulating estrogen-induced uterine vasodilation. *VasculPharmacol* 38:115-125
242. **Rosenfeld CR, White RE, Roy T, Cox BE** 2000 Calcium-activated potassium channels and nitric oxide coregulate estrogen-induced vasodilation. *AmJPhysiol Heart CircPhysiol* 279:H319-H328

243. **Roy-Clavel E, Picard S, St Louis J, Brochu M** 1999 Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 180:608-613
244. **Roy B, Sicotte B, Brochu M, St-Louis J** 1999 Modulation of calcium mobilization in aortic rings of pregnant rats: Contribution of extracellular calcium and of voltage-operated calcium channels. *Biology of Reproduction* 60:979-988
245. **Rupnow HL, Phernetton TM, Shaw CE, Modrick ML, Bird IM, Magness RR** 2001 Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VII. Estrogen and progesterone effects on eNOS. *AmJPhysiol Heart CircPhysiol* 280:H1699-H1705
246. **Sakamoto H, Matsuda K, Hosokawa K, Nishi M, Morris JF, Prossnitz ER, Kawata M** 2007 Expression of G protein-coupled receptor-30, a G protein-coupled membrane estrogen receptor, in oxytocin neurons of the rat paraventricular and supraoptic nuclei. *Endocrinology* 148:5842-5850
247. **Salas E, Lopez MG, Villarroya M, Sanchez-Garcia P, De PR, Dixon WR, Garcia AG** 1994 Endothelium-independent relaxation by 17-alpha-estradiol of pig coronary arteries. *European Journal of Pharmacology* 258:47-55
248. **Scott PA, Provencher M, Guerin P, St-Louis J** 2009 Gestation-induced uterine vascular remodeling. *Methods MolBiol* 550:103-123
249. **Scott PA, Tremblay A, Brochu M, St-Louis J** 2007 Vasorelaxant action of 17 - estradiol in rat uterine arteries: role of nitric oxide synthases and estrogen receptors. *AmJPhysiol Heart CircPhysiol* 293:H3713-H3719
250. **Shaw L, Taggart MJ, Austin C** 2000 Mechanisms of 17 beta-oestradiol induced vasodilatation in isolated pressurized rat small arteries. *British Journal of Pharmacology* 129:555-565
251. **Shozu M, Sebastian S, Takayama K, Hsu WT, Schultz RA, Neely K, Bryant M, Bulun SE** 2003 Estrogen excess associated with novel gain-of-function mutations affecting the aromatase gene. *NEnglJMed* 348:1855-1865
252. **Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Davis S, Jones M** 1999 Local estrogen biosynthesis in males and females. *EndocrRelat Cancer* 6:131-137
253. **Singleton DW, Khan SA** 2003 Xenoestrogen exposure and mechanisms of endocrine disruption. *Front Biosci* 8:s110-s118
254. **Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS** 1994 Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *NEnglJMed* 331:1056-1061

255. **Sprague RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, Lonigro AJ** 1996 ATP: the red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation. *AmJPhysiol* 271:H2717-H2722
256. **St-Louis J, Massicotte G** 1985 Chronic decrease of blood pressure by rat relaxin in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 37:1351-1357
257. **St-Louis J, Massicotte G, Parent A** 1988 Effet anti-hypertenseur de la grossesse: Influence de la r,activit, vasculaire. *M,decine/Science* 6:358-365
258. **St-Louis J, Par, H, Sicotte B, Brochu M** 1997 Increased reactivity of uterine arcuate artery throughout pregnancy and postpartum. *AmJPhysiol* 273:H1148-H1153
259. **Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA** 1997 Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 276:2034-2037
260. **Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J** 1992 S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *ProcNatlAcadSciUSA* 89:444-448
261. **Standen NB, Quayle JM** 1998 K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 164:549-557
262. **Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT** 1989 Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science* 245:177-180
263. **Stauffer SR, Coletta CJ, Tedesco R, Nishiguchi G, Carlson K, Sun J, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA** 2000 Pyrazole ligands: structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor-alpha-selective agonists. *JMedChem* 43:4934-4947
264. **Stice SL, Ford SP, Rosazza JP, Van Orden DE** 1987 Role of 4-hydroxylated estradiol on reducing Ca²⁺ uptake of uterine arterial smooth muscle cells through potential-sensitive channels. *Biology of Reproduction* 36:361-368
265. **Streng T, Lehtoranta M, Poutanen M, Talo A, Lammintausta R, Santti R** 2002 Developmental, estrogen induced infravesical obstruction is reversible in adult male rodents. *JUrol* 168:2263-2268
266. **Surks HK** 2007 cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: a tale of two isoforms. *Circulation Research* 101:1078-1080

267. **Takada Y, Kato C, Kondo S, Korenaga R, Ando J** 1997 Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. *BiochemBiophysResCommun* 240:737-741
268. **Taniguchi J, Furukawa KI, Shigekawa M** 1993 Maxi K+ channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 423:167-172
269. **Taziaux M, Keller M, Bakker J, Balthazart J** 2007 Sexual behavior activity tracks rapid changes in brain estrogen concentrations. *JNeurosci* 27:6563-6572
270. **Thaler I, Manor D, Itskovitz J, Rottem S, Levit N, Timor-Tritsch I, Brandes JM** 1990 Changes in uterine blood flow during human pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 162:121-125
271. **Thomas P, Dong J** 2006 Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *JSteroid BiochemMolBiol* 102:175-179
272. **Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J** 2005 Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146:624-632
273. **Thoresen M, Wesche J** 1988 Doppler measurements of changes in human mammary and uterine blood flow during pregnancy and lactation. *Acta ObstetGynecolScand* 67:741-745
274. **Tiulpakov A, Kalintchenko N, Semitcheva T, Polyakov A, Dedov I, Sverdlova P, Kolesnikova G, Peterkova V, Rubtsov P** 2005 A potential rearrangement between CYP19 and TRPM7 genes on chromosome 15q21.2 as a cause of aromatase excess syndrome. *JClinEndocrinolMetab* 90:4184-4190
275. **Toran-Allerand CD** 2004 Minireview: A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end? *Endocrinology* 145:1069-1074
276. **Tortora GJ, Grabowski SR** 2001 *Principes d'anatomie et de physiologie: ditions du nouveau p,dagogique inc.*
277. **Towle AC, Sze PY** 1983 Steroid binding to synaptic plasma membrane: differential binding of glucocorticoids and gonadal steroids. *JSteroid Biochem* 18:135-143
278. **Tremblay A, Tremblay GB, Labrie C, Labrie F, Giguere V** 1998 EM-800, a novel antiestrogen, acts as a pure antagonist of the transcriptional functions of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 139:111-118

279. **Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguere V** 1997 Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *MolEndocrinol* 11:353-365
280. **Trundley A, Moffett A** 2004 Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 63:1-12
281. **Tsai CC, Lai TY, Huang WC, Liu IM, Liou SS** 2005 Role of cGMP signals in tetramethylpyrazine induced relaxation of the isolated rat aortic strip. *Life Sci* 77:1416-1424
282. **Tsang SY, Yao X, Chan HY, Wong CM, Chen ZY, Au CL, Huang Y** 2003 Contribution of K⁺ channels to relaxation induced by 17beta-estradiol but not by progesterone in isolated rat mesenteric artery rings. *JCardiovascPharmacol* 41:4-13
283. **Tulchinsky D, Hobel CJ** 1973 Plasma human chorionic gonadotropin, estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17 alpha-hydroxyprogesterone in human pregnancy. 3. Early normal pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 117:884-893
284. **Tulchinsky D, Hobel CJ, Yeager E, Marshall JR** 1972 Plasma estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17-hydroxyprogesterone in human pregnancy. I. Normal pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 112:1095-1100
285. **Tulchinsky D, Simmer HH** 1972 Sources of plasma 17alpha-hydroxyprogesterone in human pregnancy. *JClinEndocrinolMetab* 35:799-808
286. **Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Bahamonde MI, Mann GE, Vergara C, Latorre R** 1999 Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the α subunit. *Science* 285:1929-1931
287. **van der Heijden OW, Essers YP, Fazzi G, Peeters LL, De Mey JG, van Eys GJ** 2005 Uterine artery remodeling and reproductive performance are impaired in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Biology of Reproduction* 72:1161-1168
288. **van der Heijden OW, Essers YP, Spaanderman ME, De Mey JG, van Eys GJ, Peeters LL** 2005 Uterine artery remodeling in pseudopregnancy is comparable to that in early pregnancy. *Biology of Reproduction* 73:1289-1293
289. **Voet D, Voet JG** 1998 L'hémoglobine: la fonction d'une protéine dans un microcosme. In: *Biochimie*. Paris, Bruxelles: De Boeck Services; 215-250
290. **Voutilainen R, Tapanainen J, Chung BC, Matteson KJ, Miller WL** 1986 Hormonal regulation of P450_{scc} (20,22-desmolase) and P450_{c17} (17 alpha-

- hydroxylase/17,20-lyase) in cultured human granulosa cells. *JClinEndocrinolMetab* 63:202-207
291. **Wakeling AE, Dukes M, Bowler J** 1991 A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res* 51:3867-3873
 292. **Walsh SW, Kittinger GW, Novy MJ** 1979 Maternal peripheral concentrations of estradiol, estrone, cortisol, and progesterone during late pregnancy in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) and after experimental fetal anencephaly and fetal death. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 135:37-42
 293. **Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M** 1985 Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *ProcNatlAcadSciUSA* 82:7889-7893
 294. **Wang C, Dehghani B, Magrisso IJ, Rick EA, Bonhomme E, Cody DB, Elenich LA, Subramanian S, Murphy SJ, Kelly MJ, Rosenbaum JS, Vandenberg AA, Offner H** 2008 GPR30 contributes to estrogen-induced thymic atrophy. *MolEndocrinol* 22:636-648
 295. **Wang X, Tanus-Santos JE, Reiter CD, Dejam A, Shiva S, Smith RD, Hogg N, Gladwin MT** 2004 Biological activity of nitric oxide in the plasmatic compartment. *ProcNatlAcadSciUSA* 101:11477-11482
 296. **Warnmark A, Almlöf T, Leers J, Gustafsson JA, Treuter E** 2001 Differential recruitment of the mammalian mediator subunit TRAP220 by estrogen receptors ERalpha and ERbeta. *Journal of Biological Chemistry* 276:23397-23404
 297. **Watters JJ, Campbell JS, Cunningham MJ, Krebs EG, Dorsa DM** 1997 Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* 138:4030-4033
 298. **Watts SW, Yeum CH, Campbell G, Webb RC** 1996 Serotonin stimulates protein tyrosyl phosphorylation and vascular contraction via tyrosine kinase. *JVascRes* 33:288-298
 299. **Weibel ER** 1984 Delivering oxygen to the cells. In: *The Pathway for Oxygen, Structure and Function in the Mammalian Respiratory System*: Harvard University Press; 175-209
 300. **Weihua Z, Saji S, Makinen S, Cheng G, Jensen EV, Warner M, Gustafsson JA** 2000 Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. *ProcNatlAcadSciUSA* 97:5936-5941

301. **Wellman GC, Bonev AD, Nelson MT, Brayden JE** 1996 Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca(2+)-dependent K⁺ channels. *Circulation Research* 79:1024-1030
302. **White RE, Darkow DJ, Lang JL** 1995 Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circulation Research* 77:936-942
303. **White RE, Han G, Maunz M, Dimitropoulou C, El-Mowafy AM, Barlow RS, Catravas JD, Snead C, Carrier GO, Zhu S, Yu X** 2002 Endothelium-independent effect of estrogen on Ca(2+)-activated K(+) channels in human coronary artery smooth muscle cells. *CardiovascRes* 53:650-661
304. **Wilson M, Morganti AA, Zervoudakis I, Letcher RL, Romney BM, Von Oeyon P, Papera S, Sealey JE, Laragh JH** 1980 Blood pressure, the renin-aldosterone system and sex steroids throughout normal pregnancy. *AmJMed* 68:97-104
305. **Wu X, Somlyo AV, Somlyo AP** 1996 Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphate. *BiochemBiophysResCommun* 220:658-663
306. **Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson PA, Collins P** 1995 Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation* 91:1154-1160
307. **Zacharia LC, Dubey RK, Mi Z, Jackson EK** 2003 Methylation of 2-hydroxyestradiol in isolated organs. *Hypertension* 42:82-87
308. **Zhou Y, Watters JJ, Dorsa DM** 1996 Estrogen rapidly induces the phosphorylation of the cAMP response element binding protein in rat brain. *Endocrinology* 137:2163-2166

